



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

Suplementación con vitamina D en epilepsia: estudio en
pacientes con antiepilépticos clásicos y de nueva
generación

Irene Villegas Martínez

2016

*A mis padres y mi hermano,
A mi niño, el amor de mi vida
Y a mi abuelo, por tener fe en que su nieta sería doctora algún día*

AGRADECIMIENTOS

Cada vez que he leído una tesis durante la preparación de la mía, me he ido directa a los agradecimientos, porque me parece que ahí es donde cada uno pone realmente un poquito de su alma, dejando a un lado datos, análisis y artículos publicados. Ahí es dónde realmente se intuye, aunque sea superficialmente, el esfuerzo que supone para el tesinando dejar en suspenso su vida, su familia, sus amigos, sus actividades habituales y sus hobbies para dedicarse en cuerpo y alma al “parto prolongado” de lo que luego será la tesis doctoral. Y aunque pueda parecer un hábito ya instaurado y algo sin importancia, el apartado de agradecimientos adquiere una dimensión enorme, ya que en él intentamos devolver, sin conseguirlo por supuesto, un poquito de la inversión que el resto de nuestro mundo ha hecho sobre nosotros, ya sea en tiempo o en conocimientos o en los dos.

Una vez dicho esto, quiero agradecer en primer lugar a mis dos super directores de tesis, el Dr. Javier Martín y el Dr. Francisco Martínez, que han sabido aguantar (o, utilizando un anglicismo, “endurar”) mi espíritu independiente y perfeccionista, al igual que las prisas del último momento. Por supuesto también a mi profesor y guía en el complejo mundo de la estadística, el Prof. Manuel Canteras, que ha sabido darle coherencia a mis “peticiones”, y encima un toque de humor, de forma que incluso ¡voy a echar de menos los martes en el departamento de Bioestadística riéndome con él!

Otro gran agradecimiento va a mi compañera de sufrimientos, la próximamente doctora Irene de Miguel, por empujarme cada vez que me podía la pereza para reclutar a los pacientes y por el trabajazo que realizó en un tiempo record con las muestras del estudio. ¡Sé que tú también puedes terminar Irene!

Mi eterno agradecimiento a Rubén Carrasco, porque, a pesar de ser su “no-tutora”, estuvo conmigo (y a veces sin mí, con su altruismo innato) llamando a pacientes para citarlos en esas largas tardes de miércoles, con complejo de operadores de Orange vendiendo ofertas. ¡Gracias siempre!

Y gracias a Maria José, nuestra incansable enfermera de la Unidad de Epilepsia, por contribuir haciendo todas y cada una de las analíticas de este estudio sin un “pero”, pesar y tallar a los pacientes y todo con una sonrisa. Gracias a Diego Tortosa, mi compañero de fatigas y proyectos, ahora y siempre, por soportar la intrusión de los pacientes del estudio en nuestro despacho, sin rechistar (demasiado...). Gracias al resto del servicio de Neurología de la Arrixaca, por

supuesto, por el apoyo constante y los buenos momentos, y en especial a María Cerdán, que también se pasó alguna tarde con nosotros; a Encarnación Andreu, que me ha aguantado estoicamente este verano de desquicie; a Rocío Hernández, porque a pesar de nuestras diferencias, llegaremos a la meta juntas; y, por supuesto, a Ossama Morsi, por devolverme a la vida en su momento y defenderme en estos últimos tiempos como mi “grand frère” que es. También quiero agradecer su aportación a la tesis a Lorena, nuestra nutricionista de cabecera, que analizó todas las dietas, a Claudio Piqueras y Matías Felipe, que vieron cómo a sus pacientes se les hacía una cosa extraña llamada densitometría, y a Carlos Marras, que sin comérselo ni bebérselo, se ha leído mi tesis, y encima sin que lo invite a comer...

Y pasando a la parte personal, hay mucha gente a la que desgraciadamente me voy a dejar en el tintero. Todos los días que he estado encerrada, mis amigos se han encargado de darme ánimos (Juan, Pili, Sandri, Rosar, Isa y Juanlux ¡va por vosotros!). Parece mentira pero algunos de nosotros ya vamos a ser doctores y todo.

Gracias a mi tía Maite, por el apoyo incondicional y los consejos zen (los mejores sin duda), a mi tío Manolo y mi tío Pablo porque sé que estáis ahí aunque no hablemos, a mi abuela Rosario, que no se lo va a creer cuando me vea defendiendo la tesis, y a mi abuelo Pepe, que está aguantando hasta que la lea, lo sé.

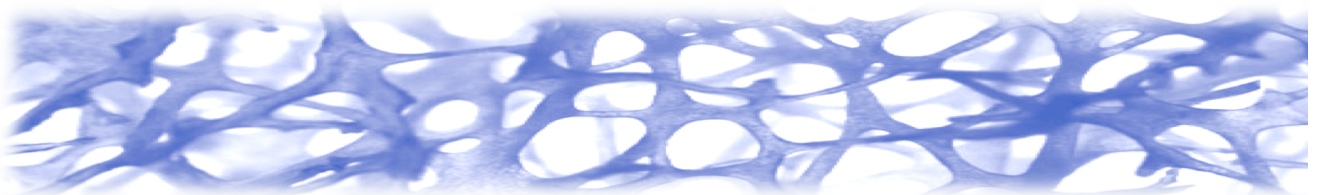
Y para terminar de ponerme emotiva, mis pilares absolutos: mi padre, artífice de esta tesis y de toda mi trayectoria vital, ¡gracias por empujarme a terminarla y por todo el refuerzo positivo durante el proceso!; mi madre, modelo de fuerza y amor, ¡gracias por tus mimos constantes y tus mensajes de ánimo que me llegan directamente al sistema límbico!; mi hermano Héctor, ejemplo de fortaleza y energía no matter what ¡gracias por demostrarme cada día que merece la pena seguir y alcanzar tus sueños!; y mi compañero de vida, Jose, con sus abrazos por la mañana y sus “you can do it”, ha conseguido sacar mi mejor versión ¡agradezco todos los días el haberte encontrado, por fin! Y finalmente, a ese ser que estamos gestando juntos, le agradezco el haber tenido la sabiduría y la paciencia para esperar a que su madre terminara con esta tesis.

¡Gracias a todos!

*“Hay que tener la mente abierta,
pero no tanto como para que se te caiga el cerebro”*
Richard Feynman

“Somos polvo de estrellas que piensa acerca de las estrellas”
Carl Sagan

INDICE Y ABREVIATURAS.



INDICE

ABREVIATURAS.....	17
INTRODUCCIÓN	19
1. METABOLISMO ÓSEO Y VITAMINA D: CONCEPTOS Y GENERALIDADES	21
1.1 LA REMODELACIÓN ÓSEA: PARTICIPANTES Y MECANISMOS	21
1.2 LA PÉRDIDA FISIOLÓGICA DE MASA ÓSEA.....	24
1.3 LA VITAMINA D: UNA HORMONA CON MÚLTIPLES FUNCIONES ..	25
1.3.1 VITAMINA D: DEFINICIÓN Y METABOLISMO	26
1.3.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SÍNTESIS DE VITAMINA D	28
1.3.3 ¿CUÁL ES EL PAPEL DE LA VITAMINA D EN EL METABOLISMO ÓSEO?	30
1.3.4 OTRAS FUNCIONES.....	30
1.3.5 NIVELES SÉRICOS DE VITAMINA D	31
1.3.6 CAUSAS DE DÉFICIT DE VITAMINA D.....	32
1.3.7 SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA D	33
1.4 OPCIONES TERAPÉUTICAS EN LA OSTEOPOROSIS	35
2. FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS Y METABOLISMO ÓSEO: ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA.....	36
2.1 ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE POBLACIÓN EXPUESTA A TRATAMIENTO ANTIEPILÉPTICO	37
2.1.1 EFECTO DE LA POLITERAPIA.....	38
2.1.2 FAES INDUCTORES VS NO INDUCTORES ENZIMÁTICOS ..	38
2.1.3 RELACIÓN CON LA DOSIS DE FAE Y EL TIEMPO DE TRATAMIENTO	40
2.1.4 PACIENTES MAYORES DE 50 AÑOS VS JÓVENES	40
SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA D EN EPILEPSIA: ESTUDIO EN PACIENTES CON ANTIEPILÉPTICOS CLÁSICOS Y DE NUEVA GENERACIÓN	9

2.1.4 PACIENTES CON BAJA MOVILIDAD O INSTITUCIONALIZADOS	40
2.1.6 ANTIEPILÉPTICOS UTILIZADOS EN PATOLOGÍAS NO EPILÉPTICAS	40
2.1.7 GÉNERO, OSTEOPENIA Y ANTIEPILÉPTICOS	41
2.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIEPILÉPTICO EN NIÑOS Y ADOLESCENTES	41
2.3 EFECTO DE LOS FAES INDUCTORES ENZIMÁTICOS SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO	42
2.4 EFECTO DEL ÁCIDO VALPROICO SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO	43
2.5 EFECTO DE LOS FAES DE SEGUNDA GENERACIÓN SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO: LAMOTRIGINA, OXCARBACEPINA, TOPIRAMATO Y ZONISAMIDA	44
2.6 POSIBLES EFECTOS DE LOS FAES DE TERCERA GENERACIÓN SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO: LEVETIRACETAM, LACOSAMIDA Y ESLICARBACEPINA	45
3. ESTRATEGIAS PARA ABORDAR LAS ALTERACIONES DEL METABOLISMO ÓSEO EN PERSONAS CON EPILEPSIA.....	46
3.1 SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA D	47
3.2 TRATAMIENTOS ANTIRRESORTIVOS.....	48
4. ¿CÓMO MEDIR EL METABOLISMO EN LAS PERSONAS CON EPILEPSIA? DEFINICIONES Y RECOMENDACIONES.....	49
4.1 DEFINICIÓN OPERATIVA DE OSTEOPOROSIS.....	49
4.2 DENSITOMETRÍA Y SU PAPEL EN EL DIAGNÓSTICO Y MANEJO DE LA OSTEOPOROSIS.....	51
4.3 PAPEL DE LOS BIOMARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO Y MANEJO DE LA OSTEOPOROSIS.....	52
4.3.1 MARCADORES DE FORMACIÓN ÓSEA	54
4.3.2 MARCADORES DE RESORCIÓN ÓSEA.....	54
4.4 PAPEL DEL FRAX EN EL MANEJO DE LA OSTEOPOROSIS	55
SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA D EN EPILEPSIA: ESTUDIO EN PACIENTES CON ANTIEPILÉPTICOS CLÁSICOS Y DE NUEVA GENERACIÓN	10

5. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL METABOLISMO ÓSEO APLICADO A PERSONAS CON EPILEPSIA.....	57
5.1 DEFINICIÓN DE POLIMORFISMO GENÉTICO	57
5.2 POLIMORFISMOS ASOCIADOS AL METABOLISMO ÓSEO	57
5.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL METABOLISMO ÓSEO EN PERSONAS CON EPILEPSIA.....	58
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	59
1. JUSTIFICACIÓN.....	61
2. HIPÓTESIS	61
OBJETIVOS.....	63
1. OBJETIVOS PRINCIPALES	65
2. OBJETIVOS SECUNDARIOS	65
MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
1. TIPO DE ESTUDIO	69
2. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	69
2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	69
2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	70
3. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL.....	70
4. LUGAR DE REALIZACIÓN.....	70
5. ESQUEMA DEL ESTUDIO	71
6. RECOGIDA DE DATOS Y TOMA DE MUESTRAS	71
SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA D EN EPILEPSIA: ESTUDIO EN PACIENTES CON ANTIEPILÉPTICOS CLÁSICOS Y DE NUEVA GENERACIÓN	11

6.1 RECOGIDA DE DATOS	72
6.2 TOMA DE MUESTRAS	76
6.3 VARIABLES ANALÍTICAS ESPECÍFICAS	77
6.4 POLIMORFISMOS GENÉTICOS	80
6.5 DENSITOMETRÍA	81
7. ASPECTOS ÉTICOS	84
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85
RESULTADOS	87
1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MUESTRA	89
1.1 DATOS DE SEGUIMIENTO	89
1.2 COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS DE ESTUDIO: VARIABLES CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS BASALES Y A LOS SEIS MESES	89
1.3 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS GENERALES EN GRUPO VITD Y GRUPO CONTROL	92
2. ANÁLISIS FACTORIAL	94
3. ESTUDIO DE POSIBLES FACTORES DE CONFUSIÓN	95
3.1 GÉNERO	96
3.2 MESES DE TRATAMIENTO	97
3.3 NIVELES DE HOMOCISTEÍNA	98
3.4 TABAQUISMO	98
3.5 OTROS FACTORES DE CONFUSIÓN: VARIABLES CUALITATIVAS	98
3.6 OTROS FACTORES DE CONFUSIÓN: VARIABLES CUANTITATIVAS	99
4. POLIMORFISMOS GENÉTICOS	99
4.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MUESTRA	99
4.2 POLIMORFISMOS EN EL GRUPO VITAMINA D/CONTROL	101
4.2.1 POLIMORFISMO DEL GEN COL1A1	101
4.2.2 POLIMORFISMO DEL GEN CTR-ALUI	102
4.2.3 POLIMORFISMO DEL GEN ESR1P-PVU	102
4.2.4 POLIMORFISMO DEL GEN ESR1X-XBA	103
SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA D EN EPILEPSIA: ESTUDIO EN PACIENTES CON ANTIEPILÉPTICOS CLÁSICOS Y DE NUEVA GENERACIÓN	12

4.2.5 POLIMORFISMO DEL GEN VDR-BSM.....	103
4.2.6 POLIMORFISMO DEL GEN VDR-FOK.....	104
5. ESTUDIO SEGÚN FÁRMACOS CLÁSICOS/NUEVA	
GENERACIÓN.....	104
5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA	104
5.2 VARIABLES ANALÍTICAS GENERALES.....	106
5.3 BIOMARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA	107
5.4 PARÁMETROS DENSITOMÉTRICOS	107
6. BIOMARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA.....	109
6.1 BIOMARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA: COMPARACIÓN	
GRUPO VITD Y GRUPO CONTROL	109
6.2 NIVELES DE VITAMINA D: COMPARACIÓN ENTRE GRUPO VITD Y	
GRUPO CONTROL.....	111
6.3 CORRELACIÓN ENTRE NIVELES DE VITAMINA D Y	
BIOMARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA	112
6.4 COMPARACIÓN EN PACIENTES CON DEFICIENCIA E	
INSUFICIENCIA DE VITAMINA D BASAL.....	113
6.5 RELACIÓN ENTRE IMC Y NIVELES SÉRICOS DE VITAMINA D	115
7. RESULTADOS DENSITOMÉTRICOS	115
7.1 COMPARACIÓN ENTRE EL GRUPO VITD Y EL GRUPO CONTROL	
.....	115
7.2 CORRELACIÓN CON LOS NIVELES DE VITAMINA D	119
7.2.1 GRUPO VITD.....	119
7.2.2 GRUPO CONTROL	120
7.3 COMPARACIÓN EN PACIENTES CON DEFICIENCIA E	
INSUFICIENCIA DE VITAMINA D BASAL.....	120
7.3.1 GRUPO VITD.....	120
7.3.2 GRUPO CONTROL	122
7.3.3 GRUPO VITD Y CONTROL EN FUNCIÓN DEL GÉNERO....	123
7.3.4 COMPARACIÓN GRUPO VITD Y GRUPO CONTROL	124
8. RELACIÓN ENTRE FAES Y PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y	
DENSITOMÉTRICOS	124
SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA D EN EPILEPSIA: ESTUDIO EN PACIENTES	13
CON ANTIEPILÉPTICOS CLÁSICOS Y DE NUEVA GENERACIÓN	

8.1 CAMBIOS EN BIOMARCADORES Y VARIABLES DENSITOMÉTRICAS EN FUNCIÓN DEL TIPO DE FAE CON/SIN SUPLEMENTACIÓN	124
8.2 CAMBIOS EN BIOMARCADORES Y VARIABLES DENSITOMÉTRICAS EN FUNCIÓN DE LA CLASIFICACIÓN CLÁSICO/NUEVA GENERACIÓN.....	125
DISCUSIÓN	127
1. ALTERACIONES DEL METABOLISMO ÓSEO EN FAES DE NUEVA GENERACIÓN	129
1.1 PARÁMETROS DENSITOMÉTRICOS EN PACIENTES CON LEVETIRACETAM	130
1.2 BIOMARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA EN PACIENTES CON LEVETIRACETAM	131
2. NIVELES DE VITAMINA D Y RELACIÓN CON LOS PARÁMETROS MEDIDOS.....	132
2.1 NIVELES DE VITAMINA D, IMC Y GLUCEMIA	132
2.2 NIVELES DE VITAMINA D Y DMO.....	133
3. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA D EN LA MUESTRA ESTUDIADA	133
3.1 AUMENTO DE NIVELES DE VITAMINA D EN EL GRUPO VITD Y EL GRUPO CONTROL.....	134
3.2 CAMBIOS EN LOS PACIENTES CON SUPLEMENTACIÓN DE VITAMINA D Y CALCIO.....	135
3.2 CAMBIOS EN LOS PACIENTES CON DEFICIENCIA E INSUFICIENCIA DE VITAMINA D.....	136
4. PAPEL DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS	137
5. CONSIDERACIONES FINALES Y FUTURAS VÍAS DE INVESTIGACIÓN.....	137
SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA D EN EPILEPSIA: ESTUDIO EN PACIENTES CON ANTIEPILÉPTICOS CLÁSICOS Y DE NUEVA GENERACIÓN	14

CONCLUSIONES 139

BIBLIOGRAFÍA 143

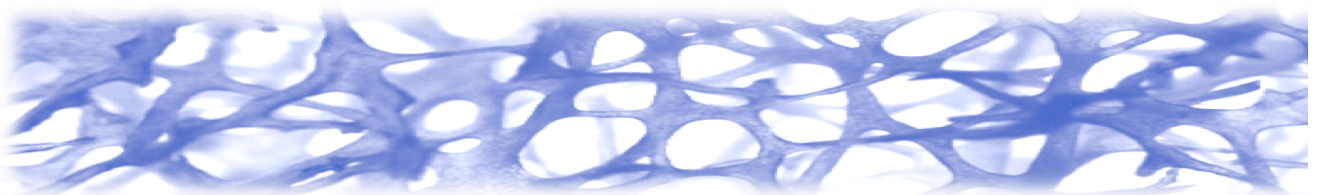
ANEXOS..... 157

ABREVIATURAS

- AEMPS: Agencia Española del Medicamento
- CBZ: Carbamacepina
- CMO: Contenido mineral óseo
- β -CTX: Telopéptido C-terminal del colágeno tipo 1
- DE: Desviación estándar
- DEXA: Absorciometría radiográfica de doble energía
- DLP: Dislipemia
- DM: Diabetes
- DMO: Densidad mineral ósea
- sDMO: Densidad mineral ósea estandarizada
- EDTA: Acido etilendiaminotetraacético
- ESL: Acetato de eslicarbacepina
- FA: Fosfatasa alcalina total
- FAES: Fármacos antiepilépticos
- FAos: Fosfatasa alcalina ósea
- GOT: Transaminasa Glutámico-oxalacética
- GPT: Transaminasa Glutamicopirúvica
- GGT: Gamma glutamil transpeptidasa
- HCUVA: Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca
- HTA: Hipertensión arterial
- IMC: Índice de masa corporal
- ILAE: International League Against Epilepsy
- LCM: Lacosamida
- LEV: Levetiracetam
- LTG: Lamotrigina
- NTX: Telopéptido N-terminal del colágeno tipo 1
- OC: Osteocalcina
- OPG: Osteoprotegerina
- OXC: Oxcarbacepina
- P1NP: Propéptido N-terminal del protocólágeno tipo 1
- PB: Fenobarbital
- PHT: Fenitoína
- PRM: Primidona
- PTH: Parathormona
- PXR: Receptor X de pregnano

- RANK: Receptor activador para el factor nuclear- κ -B
- RANKL: Ligando del receptor activador para el factor nuclear- κ -B
- SPN: Polimorfismo de nucleótido simple
- T4: Hormona tiroxina
- TPM: Topiramato
- TSH: Hormona tirotropina
- UVB: Radiación ultravioleta B
- VDR: Receptor de vitamina D
- VPA: Ácido valproico
- ZNS: Zonisamida

INTRODUCCIÓN.



La relación entre los fármacos antiepilépticos y el metabolismo óseo en las personas con epilepsia es muy compleja, y su comprensión requiere un conocimiento al menos básico de la fisiopatología ósea. Antes de analizar el estado actual del tema y las posibles estrategias a seguir, como la suplementación con vitamina D, conviene repasar los elementos fundamentales del metabolismo óseo, así como las funciones de la vitamina D, protagonista principal de este estudio.

1. METABOLISMO ÓSEO Y VITAMINA D: CONCEPTOS Y GENERALIDADES

El sistema óseo es un sistema dinámico, que se encuentra en continuo cambio durante la vida del individuo. Durante la infancia y la adolescencia se produce un crecimiento longitudinal y radial, mientras que durante la etapa adulta predomina un proceso llamado remodelación ósea (del inglés “bone remodeling”), gracias al cual el hueso se renueva constantemente, preservando así la fuerza y manteniendo la homeostasis mineral (Clarke, 2008). Esto es especialmente útil cuando se generan microrroturas, que se reparan antes de que se manifiesten clínicamente. También es un método de ahorro en caso de periodos prolongados de inmovilidad, en los que se pierde masa ósea que no se precisa (Armas and Recker, 2012).

La remodelación ósea implica la participación de diversos tipos celulares y un sistema de modulación complejo en el que se ven involucrados señalizadores y hormonas, que analizaremos someramente a continuación.

1.1 LA REMODELACIÓN ÓSEA: PARTICIPANTES Y MECANISMO

Durante el recambio óseo asistimos a una actividad perfectamente coordinada entre tres tipos de células: osteoclastos, osteoblastos y osteocitos (Figura 1.1). El proceso consta de cuatro fases primordiales: una primera fase de activación, seguida de la etapa de resorción, que dura de 2 a 4 semanas, posteriormente una fase de inversión en la que finaliza la resorción mientras comienza la formación ósea y una última fase de formación, tras la que el hueso queda en reposo en espera de reiniciar el ciclo. Todo el proceso dura, aproximadamente, de 4 a 6 meses (Iñiguez-Ariza and Clarke, 2015).

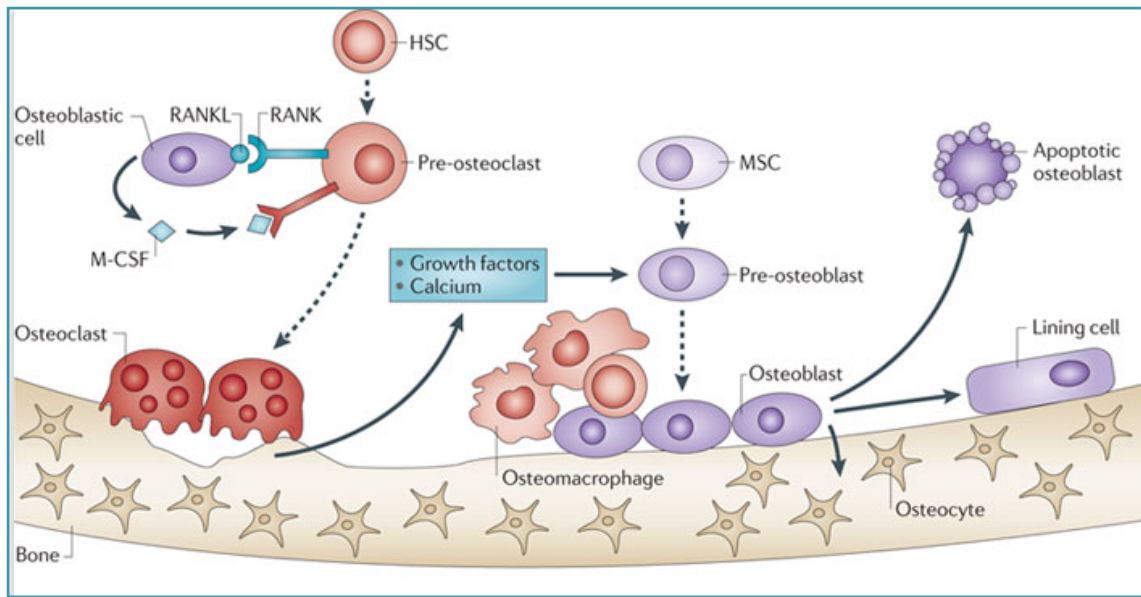


Figura 1.1. Participantes en la remodelación ósea. HSC: célula madre hematopoyética. M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos. MSC: célula madre mesenquimal. RANK: receptor activador para el factor nuclear- κ -B. RANKL: ligando del receptor RANK. Reproducido con la autorización de Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Cancer] (Weilbaecher et al, 2011), Copyright © 2011

En la primera fase de resorción, los osteoclastos son los protagonistas. Estos provienen de células hematopoyéticas y se encargan de destruir el tejido óseo, en forma de pequeñas unidades en la superficie, en el caso del hueso trabecular, o como sistemas Haversianos tunelizando el hueso cortical. Los osteoblastos, por su parte, derivan de células mesenquimales, y son los responsables de rellenar, en la etapa de formación, los espacios generados por los osteoclastos, con colágeno tipo I y otras proteínas como osteocalcina (OC), osteonectina y osteopontina, que se mineralizarán posteriormente para formar la matriz ósea. El destino de los osteoblastos tras esta fase será entrar en apoptosis o quedar enterrados en la matriz ósea en forma de osteoblastos diferenciados llamados osteocitos (Lewiecki, 2011).

La diferenciación, formación y supervivencia de los osteoclastos depende tanto de factores locales como sistémicos. Entre los factores locales encontramos interleukinas, factores estimulantes de colonias y un sistema que merece una mención especial por su relevancia clínica: el sistema RANKL/OPG (Figura 1.2). El ligando del receptor activador para el factor nuclear- κ -B (RANKL) es una citoquina expresada por los osteoblastos, que también puede encontrarse en forma soluble. Cuando RANKL activa su receptor (RANK) situado en la superficie celular de los pre-osteoclastos y los osteoclastos maduros, se produce un aumento tanto de la formación de osteoclastos como de su actividad y supervivencia. La osteoprotegerina (OPG), por el contrario, es una proteína soluble también producida por los osteoblastos que contrarresta los efectos del RANKL, ya que

actúa como receptor señuelo de este último. Es la relación entre RANKL y OPG, en definitiva, la que gobierna en qué fase de la remodelación ósea nos encontramos (Iñiguez-Ariza et al, 2015).

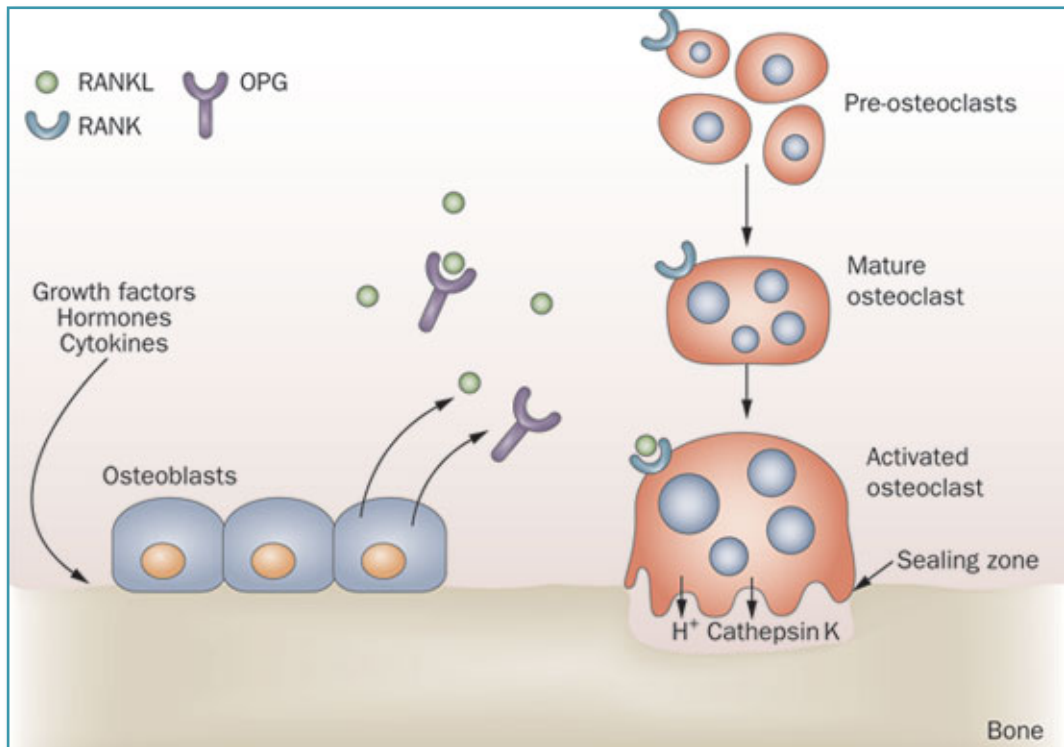


Figura 1.2. Sistema RANKL/OPG. RANK: receptor activador para el factor nuclear- κ -B. RANKL: ligando del receptor RANK. OPG: osteoprotegerina. Reproducido con la autorización de Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Rheumatology] (Lewiecki, 2011), Copyright © 2011.

En cuanto a los factores sistémicos que influyen en la actividad osteoclástica, destacan los estrógenos, la vitamina D, la parathormona (PTH) y la calcitonina. Sobre el papel de los estrógenos y la vitamina D hablaremos en profundidad en los epígrafes siguientes. La PTH, por su parte, favorece la reabsorción de calcio a nivel renal e interacciona con los osteoblastos aumentando la expresión de RANKL, que a su vez aumenta la actividad de los osteoclastos, teniendo como resultado final el incremento de los niveles de calcio en sangre. Así mismo, la PTH estimula la producción renal de $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D, que se encarga de regular la absorción de calcio en el intestino y en el hueso (González Macías and Olmos, 2010).

1.2 LA PÉRDIDA FISIOLÓGICA DE MASA ÓSEA

La pérdida de masa ósea tiene lugar tanto en hombres como en mujeres como parte del proceso de envejecimiento natural. Durante la infancia y la pubertad se alcanza el pico de masa ósea, que se mantiene hasta la tercera década de la vida, en la que se empieza a producir una pérdida de hueso trabecular en los dos sexos (45% en hombres y 55% en mujeres). En las mujeres, la pérdida de masa ósea se acelera durante la transición a la menopausia, llegando a perder hasta un 20-30% de hueso trabecular en esta etapa, así como un 5-10% de hueso cortical. Tras la menopausia, la tasa de pérdida de masa de ambos tipos de hueso se equipara (*Drake et al, 2015*).

La patofisiología de este fenómeno depende fundamentalmente de la disminución de los niveles de estrógeno, que genera un aumento tanto de la resorción ósea como de la formación, aunque en el balance la destrucción de hueso envejecido supera a la formación de hueso nuevo (*Figura 1.3*). En un estado eugonadal, los estrógenos inhiben el RANKL, por lo que durante la menopausia la presencia osteoclástica se multiplica. Además, los estrógenos también se encargan de facilitar la expresión de OPG y, consecuentemente, la ratio RANKL/OPG se incrementa de forma considerable con la disminución de las concentraciones de estrógenos, generando así un aumento tanto en la osteoclastogénesis y como en la actividad osteoclástica, y por lo tanto, un incremento de la resorción ósea (*González Macías and Olmos, 2010*).

En los hombres, la pérdida de masa ósea también se ha relacionado con los niveles de estradiol, más que con los niveles de testosterona, aunque estos también juegan un papel importante en el equilibrio entre resorción y formación ósea. Sin embargo, los hombres por encima de 50 años pierden la mitad de masa ósea y presentan únicamente un tercio de fracturas, comparados con mujeres postmenopáusicas (*Lewiecki, 2011*).



Figura 1.3. Visión esquematizada de la remodelación ósea en la superficie del hueso trabecular en A: una mujer sana premenopáusica; B: una mujer con osteoporosis no tratada; C: durante el tratamiento con una terapia antirresortiva; D: durante el tratamiento con una terapia osteoanabólica. Reproducido con la autorización de Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Rheumatology] (Lewiecki, 2011), Copyright © 2011.

1.3 LA VITAMINA D: UNA HORMONA CON MÚLTIPLES FUNCIONES

La vitamina D comenzó a producirse hace más de 500 millones de años por el fitoplancton, y, según las hipótesis actuales, tenía como función principal proteger de la luz solar las macromoléculas sensibles a la luz ultravioleta como son el ADN, el ARN o ciertas proteínas, cuando estas formas primitivas de vida se exponían a la luz para realizar la fotosíntesis. En etapas posteriores de la evolución de la vida en la Tierra, cuando los vertebrados abandonaron el océano -rico en calcio-, la vitamina D aseguró un mecanismo eficiente de absorción intestinal de calcio que permitía mantener el esqueleto calcificado de los mamíferos, pero también continuó ejerciendo otras funciones imprescindibles para la supervivencia, como veremos posteriormente (Wacker and Holick, 2013).

1.3.1. VITAMINA D: DEFINICIÓN Y METABOLISMO

Con el término “vitamina D” nos referimos a la familia de pro-hormonas liposolubles de las cuales destacamos el ergocalciferol (vitamina D₂, de origen vegetal) y el colecalciferol (vitamina D₃, de origen animal). El metabolito funcional de la vitamina D, el 1,25-dihidroxicolecalciferol (también llamado calcitriol ó 1,25(OH)₂D), es una hormona secoesterólica que regula la transcripción de genes dependientes de vitamina D, incluidos los necesarios para la absorción de calcio a nivel intestinal (Geller and Adams, 2008).

Los humanos obtenemos la vitamina D principalmente de la exposición a la luz solar, aunque también existe una vía de adquisición mediante la dieta, ingiriendo alimentos ricos en vitamina D₂ o D₃ o en forma de suplementos dietéticos (Tabla 1.1). La radiación ultravioleta B penetra en la piel y convierte el 7-dehidrocolesterol en pre-vitamina D₃, que es rápidamente convertida en vitamina D₃ (Figura 1.4). El excedente que se produce de pro-vitamina D₃ o vitamina D₃ es destruido por la luz solar por lo que una exposición “excesiva” al sol no podría causar intoxicación por vitamina D (Holick, 2007).

FUENTE	CONTENIDO EN VITAMINA D
FUENTES NATURALES	
Salmón fresco salvaje (100 g)	600-1000 UI (vitamina D ₃)
Salmón fresco de piscifactoría (100 g)	100-250 UI (vitamina D ₃ o D ₂)
Sardinias en lata (100 g)	300 UI (vitamina D ₃)
Atún en lata (100 g)	250 UI (vitamina D ₃)
Aceite de bacalao (1 cucharadita)	400-1000 UI (vitamina D ₃)
Shiitake fresco (100 g)	100 UI (vitamina D ₂)
Shiitake desecado (100 g)	1600 UI (vitamina D ₂)
Exposición al sol UVB(1/2 dosis eritemática mínima*)	3000 UI (vitamina D ₃)
ALIMENTOS ENRIQUECIDOS	
Leche enriquecida (250 mL)**	100 UI (habitualmente vitamina D ₃)
Zumo de naranja enriquecido (250 mL)	100 UI (vitamina D ₃)
Yogur enriquecido (220 g)	100 UI (habitualmente vitamina D ₃)
Mantequilla enriquecida (100 g)	50 UI (habitualmente vitamina D ₃)
Queso enriquecido (85 g)	100 UI (habitualmente vitamina D ₃)
Cereales desayuno enriquecidos (bol)	100 UI (habitualmente vitamina D ₃)
SUPLEMENTOS	
Vitamina D con o sin calcio	Múltiples dosificaciones

Tabla 1.1. Contenido en vitamina D de las distintas fuentes alimentarias y tras exposición solar.

* definición de dosis eritemática mínima: dosis de radiación UV que produce una reacción eritematosa en la zona expuesta (Heckman et al, 2013)

** en estudios sobre el contenido de vitamina D en leches enriquecidas se evidenció que el 62% de las muestras analizadas contenían menos del 80% de la cantidad de vitamina D anunciada en el etiquetado y hasta un 14% no contenían vitamina D detectable (Holick et al, 1992).

Tanto la vitamina D que proviene de la síntesis cutánea como la adquirida por la dieta son metabolizadas en el hígado, convirtiéndose en 25-OH vitamina D o calcidiol, que posteriormente sufre la siguiente metabolización a la forma activa en el riñón mediante la acción de la 25-OH-D-1 α hidroxilasa. A diferencia de la 25-hidroxilación en el hígado, la 1 α -hidroxilación en el riñón se regula según los requerimientos de 1,25(OH) $_2$ D. La 1 α -OHasa se estimula por varios factores iónicos (calcio, fósforo, magnesio y potasio) y hormonales (calcitonina, hormonas sexuales, hormona del crecimiento, prolactina, insulina, etc.), particularmente por la PTH (Rodríguez Sangrador, 2006).

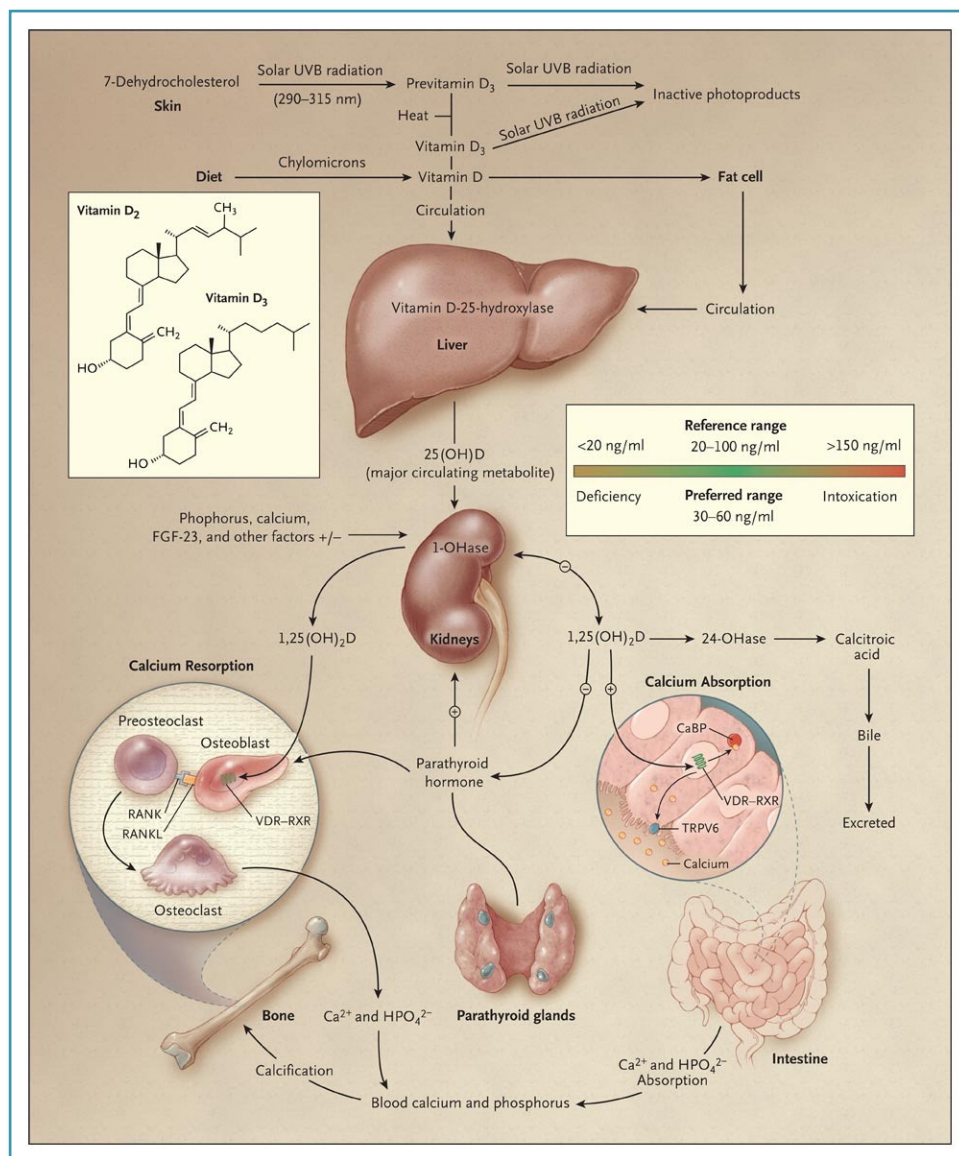


Figura 1.4. Metabolismo de la vitamina D. Reproducido con autorización de (Holick, M. F. (2007) 'Vitamin D deficiency', N Engl J Med, 357(3), pp. 266-81), Copyright Massachusetts Medical Society.

1.3.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SÍNTESIS DE VITAMINA D

La síntesis cutánea de vitamina D depende de factores como la pigmentación cutánea y el tipo de piel, el contenido cutáneo de 7-dehidrocolesterol, la edad, la latitud geográfica, la cantidad de piel expuesta (determinada por las costumbres para vestirse) o la utilización de protectores solares. Se ha comprobado que los sujetos de piel más oscura presentan insuficiencia de vitamina D con mayor frecuencia, y la aplicación de protector solar, incluso de un factor de protección tan bajo como 8, impide por completo la síntesis de vitamina D (*Geller and Adams, 2008*).

En contra de lo que se podría pensar, en los países más soleados también se ha detectado una prevalencia inusualmente elevada de déficit de vitamina D. Binkley et al recogieron los niveles de vitamina D séricos en una muestra de voluntarios sanos en Hawai (21°N), que declaraban haberse expuesto al sol durante más de tres horas al día, más de cinco días a la semana, durante los tres meses previos (*Binkley et al, 2007*). Encontraron que el 51% de los sujetos presentaban unos niveles de vitamina D inferiores a 30 ng/ml (umbral que define la insuficiencia de vitamina D, como veremos posteriormente), a pesar de la elevada exposición solar. Los autores argumentaron una probable variabilidad genética interindividual o, incluso, sugirieron la posibilidad de que poblaciones habitualmente más expuestas al sol hubieran adaptado sus mecanismos de síntesis de vitamina D cutánea, aumentando la tasa de destrucción de pre-vitamina D.

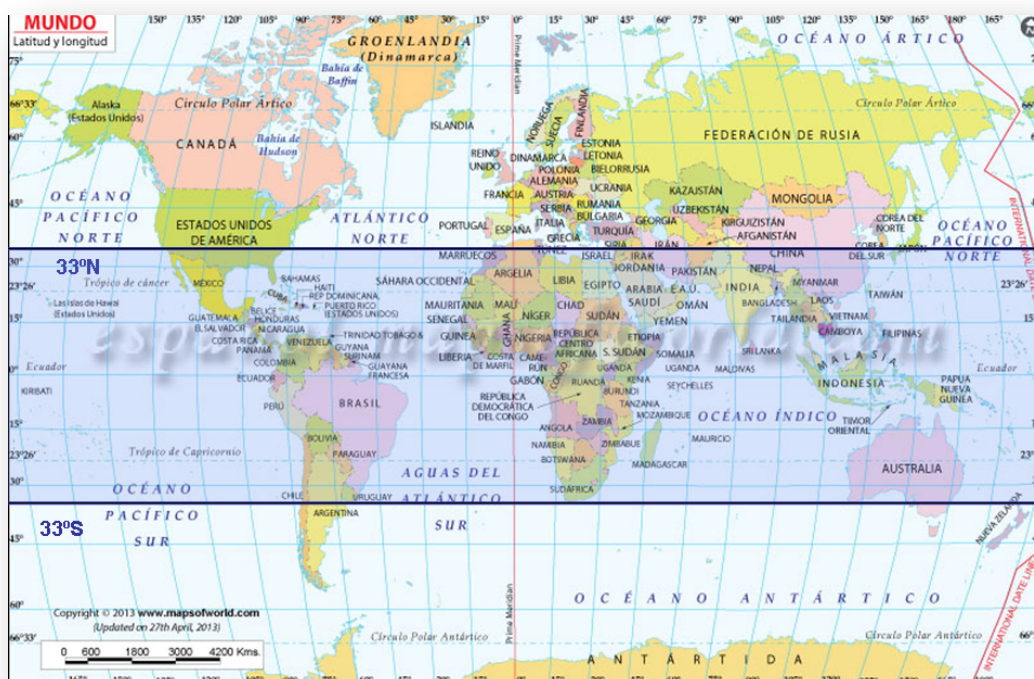


Figura 1.5. Mapa mundial con latitudes. Encontramos sombreada la franja entre los dos paralelos 33°, donde se puede sintetizar vitamina D cutánea durante todo el año. Modificado de <http://espanol.mapsofworld.com/mapa-del-mundo/mapa-del-mundo-con-latitud-y-longitud.html>

Intuitivamente, sería lógico asumir que los países con latitudes más bajas tuviesen una menor prevalencia de déficit de vitamina D, ya que el ángulo de incidencia del sol en estas regiones es más adecuado para su síntesis en la piel, sobre todo en verano/otoño y en las horas centrales del día. En latitudes por encima de los 33° (Figura 1.5), es prácticamente imposible sintetizar vitamina D desde el mes de noviembre hasta marzo (Holick, 2011). Sin embargo, los datos recogidos en estudios observacionales indican lo contrario: los niveles más bajos de vitamina D se encontraron en el Sur de Europa y América Latina, mientras que en el Norte de Europa y el Sudeste Asiático eran más altos, en una muestra de 7.564 mujeres postmenopáusicas (Hagenau et al, 2009).

España se encuentra entre los 43° y los 36°N (Figura 1.6), por lo que es previsible una variación estacional de los niveles de vitamina D y una disminución de la síntesis durante el invierno y el inicio de la primavera. Olmos et al lo comprobaron en una muestra de 1811 individuos (la cohorte del estudio Camargo) compuesta por mujeres postmenopáusicas y hombres mayores de 50 años, en Cantabria (43°N). Efectivamente, los niveles de vitamina D fueron de 26.2 ng/ml de media durante el periodo verano/otoño mientras que cayeron a 20.4 ng/ml en invierno y primavera (Olmos et al, 2015). Lo más interesante de este estudio fue comprobar que ni siquiera durante los periodos de mayor insolación se alcanzaban niveles medios superiores a los 30 ng/ml y hasta un 40% de los participantes presentaban niveles de vitamina D inferiores a 20 ng/ml (criterios de deficiencia).



Figura 1.6. Mapa de España mostrando su situación entre los paralelos 36 y 43°N. Modificado de http://educativa.catedu.es/44700165/aula/archivos/repositorio/3500/3661/html/1_la_posicin_de_espaa.html

En la Región de Murcia, en concreto, se han observado ciertas paradojas sobre la variabilidad estacional de los niveles de vitamina D. Pérez-Llamas et al estudiaron una muestra de sujetos de 65 a 94 años sin limitación de movilidad, en los que, curiosamente, los niveles más bajos de vitamina D se alcanzaban en verano (15 ± 8.9 ng/ml). Los autores explicaban esta paradoja por las altas temperaturas que se alcanzan en la Región de Murcia durante estos meses, propiciando que los individuos -sobre todo ancianos- permanezcan en lugares sombríos o en interiores para protegerse del calor (Pérez-Llamas et al, 2008).

1.3.3. ¿CUAL ES EL PAPEL DE LA VITAMINA D EN EL METABOLISMO ÓSEO?

Sin vitamina D, únicamente se absorbe el 10-15% del calcio y el 60% del fósforo consumido en la dieta. La interacción del calcitriol con el receptor de vitamina D (VDR) intestinal aumenta la eficiencia de la absorción de calcio a ese nivel hasta un 40% y la de fósforo a un 80% (Holick, 2007). La vitamina D también influye en los niveles de calcio y fósforo de forma indirecta mediante la regulación de los niveles de PTH. La activación del VDR por la vitamina D en las glándulas paratiroides suprime la producción de PTH y, por el contrario, el déficit de vitamina D genera un hiperparatiroidismo secundario, con el consiguiente aumento de resorción ósea (Wacker and Holick, 2013).

Por otro lado, la presencia de vitamina D es esencial para la correcta mineralización de la matriz ósea, y su déficit se ha asociado a osteomalacia, una condición en la que predomina el osteoide no mineralizado en el hueso, y se caracteriza clínicamente, en adultos, por algias óseas y musculares y una mayor tendencia a presentar fracturas, principalmente de estrés (Maricic, 2008).

Recientemente, se han cuestionado los mecanismos por los que la vitamina D podría, además, tener un efecto anabólico directo sobre el hueso (Souberbielle, 2014). Las hipótesis más aceptadas son las siguientes: la vitamina D, a través de la activación de su receptor VDR, podría disminuir la expresión de RANKL en los osteoblastos y, en caso de haber una concentración de calcio adecuada a nivel sérico, inhibir directamente la diferenciación osteoclástica, generando así un predominio de la formación sobre la resorción ósea –al contrario de lo que sucedería en caso de hipocalcemia, en que se favorece la osteoclastogénesis- (Anderson et al, 2013). Esta situación se ha demostrado en casos de **suplementación farmacológica con vitamina D diaria** (Takahashi et al, 2014).

1.3.4. OTRAS FUNCIONES

Como ya avanzábamos previamente, la vitamina D ejerce un papel fundamental en la homeostasis del calcio, pero no es su única función. En efecto, esta vitamina se ha relacionado con la proliferación y diferenciación celular, así como los

mecanismos de apoptosis o angiogénesis, por lo que su implicación en las enfermedades oncológicas ha sido objeto de estudio (revisado extensamente en *Weilbaecher, 2011; Binkley et al, 2012; Wacker and Holick 2013*). El receptor de la vitamina D (VDR) está presente en prácticamente la mayor parte de los tejidos del organismo y la vitamina D regula directa o indirectamente la expresión de hasta 2000 genes (*Wacker and Holick 2013*).

El análisis de las patologías extraóseas relacionadas con el déficit de vitamina D sobrepasa los objetivos de esta tesis, por lo que únicamente enumeraremos las más relevantes (*Wacker and Holick, 2013; Grant et al, 2015*):

- debilidad muscular, sarcopenia
- cáncer de vejiga, mama, cuello de útero, colon, endometrio, esófago, estómago, pulmón, ovario, páncreas, recto, riñón, vulva y linfoma de Hodgkin y no Hodgkin
- obesidad, síndrome metabólico
- diabetes tipo 2
- riesgo cardiovascular (síndrome coronario, enfermedad vascular periférica, insuficiencia cardiaca)
- riesgo cerebrovascular (ictus isquémico)
- enfermedades autoinmunes: diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide
- peor respuesta ante enfermedades infecciosas
- asma
- demencia tipo Alzheimer, espectro autista, depresión y esquizofrenia.

1.3.5. NIVELES SÉRICOS DE VITAMINA D

Aunque la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ es la forma biológicamente activa y sería por tanto la medida ideal del estado de suficiencia/insuficiencia de vitamina D, realmente no es así. La vida media del calcitriol circulante es de tan sólo 4-6 horas. Además, debido a la acción de la PTH, cuando un paciente comienza a presentar una deficiencia de vitamina D, los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se mantienen o incluso aumentan, por aumento de producción renal. De todo ello se deriva que la determinación del estado de suficiencia/insuficiencia de vitamina D se realice mediante el análisis del parámetro $25(\text{OH})\text{D}$ en suero, mucho más estable, según las recomendaciones de las Sociedad de Endocrinología (*Holick et al, 2011*). Tampoco se recomienda la determinación separada de $25(\text{OH})\text{D}_2$ y $25(\text{OH})\text{D}_3$ (*Holick, 2009*).

Tras un extenso debate (*Binkley et al, 2009; Holick, 2009; Sempos et al, 2015*), el consenso actual para definir los niveles de vitamina D podría ser el siguiente (*Holick et al, 2011*):

- ≥ 30 ng/ml: suficiencia
- 21-29 ng/ml: insuficiencia
- < 20 ng/ml: deficiencia
- > 100 ng/ml: intoxicación

1.3.6. CAUSAS DE DÉFICIT DE VITAMINA D

Las causas por las que se puede generar un déficit de vitamina D son múltiples. Aparte de la consabida baja exposición a la radiación UVB, existen diversas patologías o situaciones relacionadas con una alteración en la síntesis, absorción o metabolismo de esta vitamina, que se resumen en la [tabla 1.2](#).

CAUSA	EFEECTO
SÍNTESIS CUTÁNEA REDUCIDA	
Uso de protectores solares Pigmentación cutánea Envejecimiento Estación, latitud, hora del día	reduce síntesis vitamina D ₃ (92-99%) reduce síntesis vitamina D ₃ (hasta 99%) reduce síntesis vitamina D ₃ (en un 75% a los 70 años) por encima de 33-35º no hay producción de noviembre a febrero-marzo
BIODISPONIBILIDAD DISMINUIDA	
Malabsorción (celiaquía, Crohn, bypass gástrico, fibrosis quística...) Obesidad	Disminución de la absorción intestinal de vitamina D secuestro de vitamina D en tejido adiposo
CATABOLISMO AUMENTADO	
Antiepilépticos, corticoides, antiretrovirales	activan la destrucción de la 25(OH)D y 1,25(OH) ₂ D
SÍNTESIS 25(OH)D DISMINUIDA	
Fallo hepático	Malabsorción de vitamina D y disminución de producción de 25(OH)D en función de la gravedad
PÉRDIDA URINARIA DE 25(OH)D	
Síndrome nefrótico	Pérdida urinaria de 25(OH)D con su proteína transportadora
SÍNTESIS DE 1,25(OH)₂D DISMINUIDA	
Insuficiencia renal crónica	hipocalcemia, hiperparatiroidismo secundario
ENFERMEDADES CONGÉNITAS	
Raquitismo dependiente/resistente a vitamina D	varios efectos dependiendo de la mutación
ENFERMEDADES ADQUIRIDAS	
Osteomalacia inducida por tumor Hiperparatiroidismo primario Enfermedades granulomatosas (tuberculosis, sarcoidosis) Hipertiroidismo	fosfaturia, hipofosfatemia, niveles bajos de calcitriol 25(OH)D disminuido, calcitriol aumentado 25(OH)D disminuido, calcitriol aumentado reduce niveles de 25(OH)D

Tabla 1.2. Causas de déficit de vitamina D y sus efectos. Reproducido y modificado con autorización de (Holick, M. F. (2007) 'Vitamin D deficiency', N Engl J Med, 357(3), pp. 266-81), Copyright Massachusetts Medical Society. 25(OH)D: calcidiol, 1,25(OH)₂D: calcitriol.

1.3.7. SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA D

La pandemia actual de déficit de vitamina D ha generado la puesta en marcha de estrategias y planificación por parte de las autoridades sanitarias. La Sociedad de Endocrinología estableció en 2013 las recomendaciones de evaluación y prevención del déficit de vitamina D (*Holick et al, 2011*), y, posteriormente, la Fundación Internacional de Osteoporosis se pronunció en una guía sobre el tipo de suplementación más adecuada para la población con déficit de vitamina D (*Cianferotti et al, 2015*). Esto ha sido necesario ya que existen varias formulaciones para la suplementación con vitamina D, derivadas de sus distintos metabolitos, y no se disponía de un consenso establecido sobre qué tipo administrar en qué situación, y aún más a la población general.

1.3.7.1. Tipo de suplementación

La suplementación de vitamina D se puede administrar en forma de colecalciferol, ergocalciferol, calcidiol o calcitriol, con o sin calcio añadido.

Existe cierta evidencia sobre una mayor eficacia de la **vitamina D₃** sobre la D₂ (*Balvers et al, 2015*), sin embargo la Sociedad de Endocrinología recomienda los dos tipos por igual (en Estados Unidos únicamente se comercializa la vitamina D₂ como presentación farmacéutica (*Holick, 2007*), mientras que en Europa sí disponemos de ambas presentaciones) (*Holick et al, 2011*).

El **calcitriol** está recomendado en situaciones de patología renal, ya que no precisa de la metabolización en riñón para ejercer su acción. A pesar de ser eficaz en el tratamiento de la osteoporosis y prevención de fracturas (*Peppone et al, 2010*), la aparición frecuente de hipercalcemia, o, en casos más graves, nefrolitiasis, hace que este metabolito no sea la primera opción de suplementación en la población general (*Cianferotti et al, 2015*).

El **calcidiol**, por el contrario, parece ser un buen candidato, ya que no precisa de metabolización hepática, y su mayor hidrosolubilidad hace que sea más absorbible que el colecalciferol. Los niveles de vitamina D se alcanzarían más rápido con la administración de calcidiol que con calciferol, sin embargo no disponemos de evidencia suficiente para establecer una recomendación a este respecto (*Cianferotti et al, 2015*).

En cuanto a la suplementación con calcio, si el aporte en la dieta es adecuado, no se recomienda su uso, excepto en situaciones excepcionales (*Chel et al, 2008*).

1.3.7.2. Dosis recomendadas

Después de comprobar que las dosis de vitamina D que inicialmente se recomendaban (400-800 UI al día) eran menos eficaces que dosis más elevadas en el tratamiento de la deficiencia de vitamina D (*Leidig-Bruckner et al, 2011; Bischoff-Ferrari et al, 2012*), se intentaron establecer guías sobre las necesidades de vitamina D en los distintos grupos poblacionales (*Rosen et al, 2012*), sin que se haya alcanzado finalmente un consenso internacional (*El-Hajj Fuleihan et al, 2015*). Las recomendaciones de la Sociedad de Endocrinología son las más exhaustivas y toman en consideración el caso de las personas sometidas a tratamiento antiepiléptico (*Holick et al, 2011*). En ellas se establece lo siguiente:

- Todos los adultos de 19 a 50 años requieren, al menos, 600 UI de vitamina D al día (de cualquier fuente). Sin embargo, en caso de déficit objetivado, pueden requerir al menos 1500-2000 UI diarias para aumentar sus niveles a 30 ng/ml de forma constante.
- Todos los adultos de 50 a 70 años, y de 70 años en adelante, requieren al menos 600 UI y 800 UI diarias, respectivamente. Para elevar sus niveles por encima de 30 ng/ml pueden requerir al menos 1500-2000 UI diarias.
- En sujetos obesos o **en tratamiento con fármacos antiepilépticos**, corticoides, antifúngicos o antivirales, se requiere al menos de dos a tres veces la dosis recomendada para su grupo poblacional (3000-6000 UI/d).
- Las dosis máximas recomendadas son 4000 UI diarias.

Así mismo, se recomienda en situaciones de deficiencia establecida, una dosis de carga, para alcanzar niveles superiores a 30 ng/ml, y posteriormente continuar con un tratamiento de mantenimiento diario o semanal, preferiblemente no mensual (*Balvers et al, 2015*). Sin embargo, la controversia persiste, y se ha llegado a calificar estas recomendaciones de “excesivas” (*Rosen and Taylor, 2013*).

1.4 OPCIONES TERAPÉUTICAS EN LA OSTEOPOROSIS

Conforme más se conoce la fisiopatología de la osteoporosis, surgen nuevas líneas terapéuticas, que se añaden a los ya clásicos tratamientos antirresortivos. Excede los objetivos de esta tesis el realizar una revisión detallada de cada uno de los agentes terapéuticos, por lo que únicamente se citarán de forma resumida.

Como medidas no farmacológicas, se recomienda el ejercicio moderado-intenso, de fuerza, tanto en jóvenes como en adultos, ya que incrementa la masa ósea, así como una ingesta diaria de calcio de 1000 mg (*Pérez-Edo et al, 2011; Kanis et al, 2013*). Además de la suplementación con vitamina D, que ya se ha comentado ampliamente, existe una cierta evidencia sobre la suplementación con vitamina K2 en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis. Esta vitamina parece jugar un papel en la mineralización ósea a través de la carboxilación de la OC y mantiene el número de osteoblastos inhibiendo su apoptosis (*Huang et al, 2015*). Su uso en población general todavía no está consensuado.

Por otro lado, se ha relacionado la alteración de la microbiota intestinal y el estado de disbiosis con una alteración del equilibrio RANKL/OPG (*Sjögren et al, 2012*), por lo que una intervención sobre la microbiota como la suplementación con probióticos y la eliminación de factores que promueven la inflamación de bajo grado podría ser una nueva diana terapéutica también para la osteoporosis (*Ohlsson and Sjögren, 2015*).

Finalmente, disponemos de un gran arsenal farmacológico para combatir la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas (*Tabla 1.3*). Sin embargo, su uso en hombres y mujeres premenopáusicas plantea problemas de indicación. En pacientes con osteoporosis secundaria, las recomendaciones de la Sociedad Española de Osteoporosis son, inicialmente, medidas no farmacológicas, y en caso de la osteoporosis inducida por corticoides a largo plazo, combinar bifosfonatos (alendronato, risedronato o zoledronato) o teriparatida, con vitamina D y calcio (*Pérez-Edo et al, 2011*). Sin embargo, la mayoría de estos fármacos presentan una limitación temporal en su uso (en el caso de la teriparatida, no se recomienda más de dos años de tratamiento por el riesgo de efectos secundarios a largo plazo, (*Iñiguez-Ariza and Clarke, 2015*), y con los bifosfonatos se requiere un periodo “vacacional” tras 10 años de tratamiento, (*Adler et al, 2015*)) por lo que se plantean muchos interrogantes en el caso de tener que recurrir a ellos para poblaciones de pacientes jóvenes con osteoporosis secundaria, como podrían ser las personas con epilepsia en tratamiento con fármacos antiepilépticos (FAEs), como veremos posteriormente.

PRINCIPIO ACTIVO	INDICACIÓN
ANTIRRESORTIVOS	
Tratamiento hormonal sustitutivo Calcitonina Raloxifeno Bazedoxifeno Bifosfonatos: Etidronato Alendronato Risedronato Ibandronato Zoledronato Denosumab Inhibidores de la catepsina K	uso restringido por efectos secundarios segunda línea OP en mujeres postmenopáusicas OP en mujeres postmenopáusicas OP vertebral en mujeres postmenopáusicas OP en mujeres postmenopáusicas, hombres y secundaria a corticoides OP en mujeres postmenopáusicas, hombres y secundaria a corticoides OP en mujeres postmenopáusicas OP en mujeres postmenopáusicas, hombres y secundaria a corticoides OP en mujeres postmenopáusicas y hombres nueva terapia
ANABÓLICOS	
Análogos de la parathormona: Teriparatida Abaloparatida Romosozumab	OP en mujeres postmenopáusicas, hombres y secundaria a corticoides nueva terapia nueva terapia
ACCIÓN MIXTA	
Ranelato de estroncio	uso restringido por efectos secundarios

Tabla 1.3. Tratamiento farmacológico de la osteoporosis y su indicación. Adaptado de *Iñiguez-Ariza and Clarke, 2015*. OP: osteoporosis.

2. FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS Y METABOLISMO ÓSEO: ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

A finales de los años 60 se disponía fundamentalmente de tres fármacos para controlar las crisis epilépticas: el fenobarbital (PB), la primidona (PRM) y la fenitoína (PHT); poco después se incorporaría también al arsenal terapéutico la carbamazepina (CBZ). La utilización en tratamientos a largo plazo de los tres primeros, puso de manifiesto –entre los años 1967 y 1972- un efecto secundario desconocido hasta el momento, que afectaba, curiosamente, el metabolismo óseo (*Schmid, 1967*). En este sentido, primero Schmid y posteriormente Kruse fueron los primeros que describieron la aparición de osteomalacia en pacientes sometidos a tratamientos prolongados (más de un año) con PHT y PRM (*Kruse, 1968*). Posteriormente, Christiansen corroboró estos hallazgos, encontrando que en los pacientes en tratamiento con PHT, PB o su combinación, existía un menor contenido mineral óseo (CMO), medido mediante densitometría en los antebrazos, que en los controles sanos pareados por edad y sexo (*Christiansen et al, 1973b*).

La aparición de nuevos antiepilépticos como la ya citada CBZ o el ácido valproico (VPA) relegó a un segundo plano este efecto sobre el metabolismo óseo, hasta que volvió a investigarse a partir de los trabajos de A. Pack y R. Sheth al respecto (*Pack et al, 2003; Pack et al, 2005; Sheth et al 2006; Pack et al, 2008; Sheth et al, 2008a*). A partir de ese momento la PHT y el PB dejaron de ser los únicos posibles responsables de la disminución de la DMO y la aparición de fracturas patológicas en personas que eran demasiado jóvenes y sin factores de riesgo, a priori, para esta enfermedad, para dar paso a una lista de FAEs implicados en el desequilibrio del metabolismo óseo, que fue aumentando de forma alarmante con nuevas investigaciones (*Verrotti et al, 2010*).

En la actualidad, a pesar de que en las dos últimas décadas hemos asistido a una expansión del número de nuevos antiepilépticos que cuentan con mejores perfiles de efectos secundarios e interacciones, la preocupación por la prevalencia de osteoporosis en la población epiléptica sigue estando presente (*Miziak et al, 2014*). Incluso, se siguen describiendo situaciones tan espectaculares como la publicada recientemente por Cagirmaz, que relata el caso de un varón de 24 años diagnosticado de epilepsia estructural tras haber padecido una meningitis a los 6 meses de edad y en tratamiento con PHT durante 8 años. Este paciente presentó una **fractura femoral bilateral** tras sufrir una crisis generalizada tónico-clónica, algo muy poco frecuente en pacientes de esa edad y que se explica fundamentalmente por la osteopenia de la que fue diagnosticado tras la cirugía traumatológica, mediante una densitometría lumbar (*Cagirmaz et al, 2015*).

Pero, ¿por qué unos fármacos que están en principio diseñados para modular la actividad neuronal pueden dar lugar a alteraciones del sistema óseo? Veamos cual es la evidencia y las explicaciones propuestas a este respecto.

2.1 ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE POBLACIÓN EXPUESTA A TRATAMIENTO ANTIEPILÉPTICO

El impacto de los FAEs, como grupo farmacológico, sobre la densidad mineral ósea (DMO) y el riesgo de fractura se ha estudiado en profundidad. En su metanálisis Shen y su grupo recogieron datos de 22 estudios descriptivos (casos-controles, cohortes o transversales) desde 1995 a 2012 en los que el objetivo fue determinar la relación entre la exposición a FAEs y la aparición de fracturas (*Shen et al, 2014*). Encontraron que el uso de FAEs estaba asociado a un aumento del riesgo de fracturas del 86%, en cualquier localización, y de un 90% en el caso concreto de fracturas de cadera. Al restringir el análisis a las fracturas osteoporóticas, el aumento del riesgo persistía, por lo que confirmaban el efecto deletéreo que parecían tener los FAEs sobre la salud ósea de los pacientes. Establecieron

asimismo una serie de consideraciones añadidas, que detallamos a continuación (Figura 2.1).

2.1.1. EFECTO DE LA POLITERAPIA

Los pacientes en politerapia con FAEs presentan un aumento del riesgo de fractura de 1.61 con respecto a los que únicamente llevaban un FAE como tratamiento (*Shen et al, 2014*). Esto se podría relacionar con el hecho de que los pacientes en tratamiento con más de un FAE suelen tener una mayor probabilidad de presentar crisis, ya que la politerapia está asociada a epilepsias que pueden ser más refractarias y en las que los pacientes frecuentemente no están libres de crisis (*Schiller and Najjar, 2008*). Además, el efecto acumulativo de los FAEs sobre el sistema nervioso central puede acarrear inestabilidad y pérdida de equilibrio, principalmente en pacientes mayores, y aumentar por lo tanto el riesgo de caídas y de fracturas (*Petty et al, 2010*). Sin embargo, a pesar de estos factores de confusión reconocidos, sí que se ha asociado el propio tratamiento crónico con más de un FAE con una menor DMO (*Fahrat et al, 2002*). Además, se ha descrito en poblaciones jóvenes (menores de 50 años) expuestas a FAEs, principalmente en politerapia, que es más frecuente presentar fracturas por traumatismos de baja energía y caídas no relacionadas con crisis epilépticas que por traumatismos generados por crisis, y el riesgo de fractura sigue siendo más elevado si se les compara con sujetos no tratados (*Shiek Ahmad et al, 2012*)

No parece que haya ninguna combinación de fármacos que sea especialmente deletérea, pero, en todos los estudios en los que se analizó el efecto de la politerapia sobre el metabolismo óseo, se incluía un FAE inductor enzimático en el tratamiento (*Beerhorst et al, 2013a*).

2.1.2. FAES INDUCTORES VS. NO INDUCTORES ENZIMÁTICOS

Tanto los FAEs inductores enzimáticos -CBZ, PHT o PB- como los no inductores -VPA- se han relacionado con un mayor riesgo de fractura, en cualquier localización (*Shen et al, 2014*). Clásicamente, en los estudios sobre antiepilépticos y metabolismo óseo, se ha diferenciado entre los FAEs inductores y los inhibidores enzimáticos, ya que, en un principio, se describieron las alteraciones en los pacientes tratados con FAEs inductores del citocromo P450, tanto la disminución de la DMO como el hallazgo de unos niveles bajos de vitamina D en sangre, y se postuló que debía de existir una interacción entre los FAEs y la vitamina D a nivel hepático (*Pack and Morrell, 2004*). Sin embargo, algunos estudios empezaron a relacionar también el VPA, un inhibidor enzimático, con la aparición de osteoporosis en personas con epilepsia (*Boluk et al, 2004; Pack et al, 2005*), y en este caso no se podía explicar mediante la misma interacción en el hígado, por lo que hubo que replantearse los mecanismos fisiopatogénicos implicados en la disminución de la DMO en estos pacientes.

Posteriormente surgieron nuevos fármacos como la lamotrigina (LTG), la oxcarbacepina (OXC) o el topiramato (TPM), con cierta acción inductora del citocromo P450, en el caso de los dos últimos (*Khanna et al, 2009*), y finalmente las nuevas generaciones de FAEs de eliminación fundamentalmente renal como levetiracetam (LEV), lacosamida (LCM), o zonisamida (ZNS), de los que aún disponemos de pocos datos sobre su implicación en el metabolismo óseo o son contradictorios.

Detallaremos posteriormente cuáles son las hipótesis que se manejan en la actualidad con respecto a la acción de cada FAE sobre el metabolismo óseo.

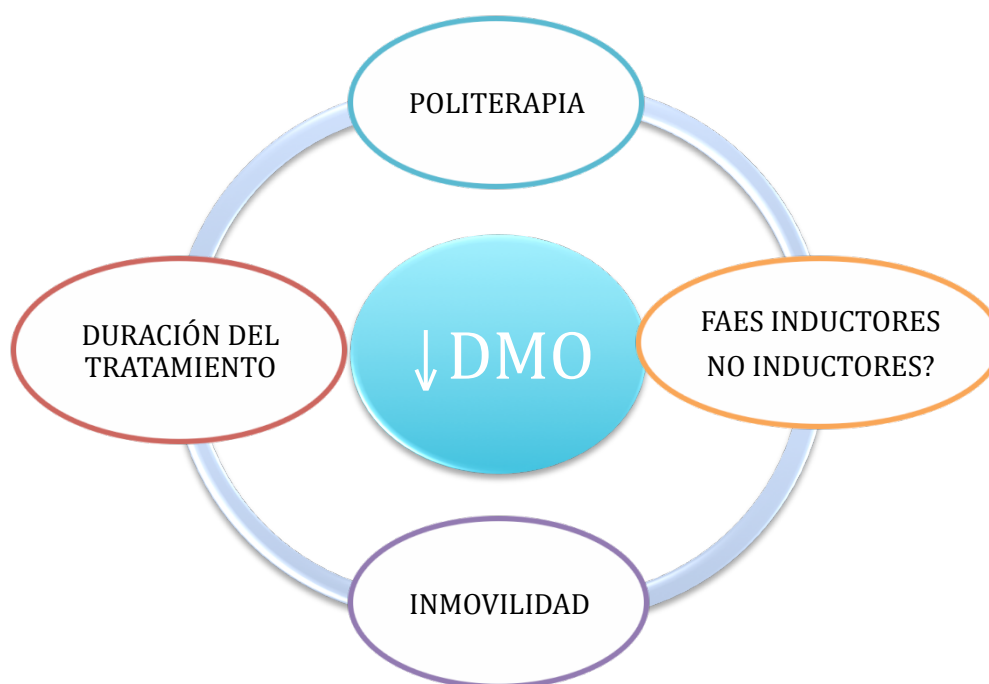


Figura 2.1. Factores relacionados con los FAEs que influyen en la disminución de la DMO.

2.1.3. RELACIÓN CON LA DOSIS DE FAE Y EL TIEMPO DE TRATAMIENTO

La mayor duración del tratamiento antiepiléptico ha sido asociada tanto a la disminución de la DMO (*Hamed et al, 2014*) como al aumento del riesgo de fracturas, de tal manera que cada año de exposición a FAEs aumenta un 9% el riesgo de fractura en los pacientes (*Souverein et al, 2005*). Se han detectado alteraciones significativas de los biomarcadores de remodelación ósea, sugestivas de una aceleración del recambio, en pacientes tratados con OXC, desde las primeras dos semanas, y con VPA a partir de los tres meses de tratamiento (*Bauer et al, 2013*). En cuanto a cambios detectables en la densitometría, se han observado disminuciones de DMO ya desde los seis meses después de iniciar el tratamiento con CBZ (*Kim et al, 2007*).

La dosis de FAEs y sus niveles sanguíneos, por el contrario, no se han relacionado con la aparición, o no, de alteraciones en el metabolismo óseo (*Koo et al, 2013*).

2.1.4. PACIENTES MAYORES DE 50 AÑOS VS JÓVENES

El aumento de riesgo de fractura está descrito tanto en pacientes mayores de 50 años como en jóvenes, por lo que ningún grupo poblacional parece estar exento de presentar esta patología asociada al tratamiento con FAEs (*Shen et al, 2014*).

2.1.5. PACIENTES CON BAJA MOVILIDAD O INSTITUCIONALIZADOS

Se ha asociado la aparición de fracturas en las personas tratadas con FAEs a la condición de institucionalización y baja movilidad, que se puede dar en pacientes con epilepsias refractarias o encefalopatías asociadas (*Beerhorst et al, 2013b*). En estos casos, se podría explicar por la baja actividad física y la muy baja exposición al sol. Sin embargo, también se han realizado estudios en personas con epilepsia sin limitación de la movilidad, seguidas de forma ambulatoria, con resultados similares en cuanto a la disminución de DMO y aparición de fracturas patológicas, sin encontrar otro factor de riesgo que no fueran los FAEs (*Andress et al, 2002; El-Hajj Fuleihan et al, 2008*).

2.1.6. ANTIEPILÉPTICOS UTILIZADOS EN PATOLOGÍAS NO EPILÉPTICAS

En la revisión sistemática de Shen et al se incluyeron estudios llevados a cabo tanto en personas con epilepsia como con otras patologías, minimizando así la posible repercusión que podría tener la propia epilepsia en la aparición de fracturas. Como ya se ha comentado, el papel de los FAEs sobre el aumento del riesgo de fractura es independiente de la patología padecida por el paciente, por lo que se considera estos fármacos de alto riesgo para osteoporosis junto a otras

patologías como el hiperparatiroidismo primario o el tratamiento con corticoides (*Espallargues et al, 2001*).

Efectivamente, éste es un aspecto a tener en cuenta, debido al uso extensivo que se está haciendo de los FAEs fuera de su indicación primaria como en el tratamiento del dolor neuropático o en patologías psiquiátricas. El impacto de los FAEs sobre la DMO se ha estudiado, por ejemplo, en una patología tan prevalente como las cefaleas, ya que el TPM se utiliza de forma habitual en la prevención de migraña, y la población diana suele ser joven. Ali et al determinaron en un grupo de 19 mujeres, cuya mediana de edad fue de 38.7 años, que el tratamiento con TPM durante más de 6 meses estaba asociado a una pérdida de masa ósea, y fuertemente relacionado con la duración del tratamiento (*Ali et al, 2011*).

2.1.7. GÉNERO, OSTEOPENIA Y ANTIEPILÉPTICOS

El tratamiento crónico con antiepilépticos se ha asociado a una disminución de DMO tanto en hombres como en mujeres, de cualquier edad, a pesar de que la osteoporosis se considera una enfermedad de predominio en mujeres postmenopáusicas (*Andress et al, 2002; Pack et al, 2005; Sheth et al, 2008a; Ensrud et al, 2008*). De hecho, se han descrito fracturas tras un traumatismo de bajo grado en un 20-40% de hombres y mujeres premenopáusicas con epilepsia (*Sheth et al, 2006*).

2.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIEPILÉPTICO EN NIÑOS Y ADOLESCENTES

La población pediátrica se encuentra también afectada por la repercusión de los FAEs sobre el metabolismo óseo. En efecto, se ha descrito tanto casos de raquitismo como de osteoporosis, en niños y adolescentes tratados con antiepilépticos, siendo más frecuentes en pacientes con epilepsias refractarias en politerapia y baja exposición a la luz solar (*Vestergaard, 2015*).

Los mecanismos por los que se produce la desmineralización ósea o la disminución de DMO son los mismos que en los adultos, y se recomienda la suplementación con vitamina D y calcio, aunque las dosis, una vez más, no están plenamente consensuadas (*Cebeci and Ekici, 2014*).

2.3 EFECTO DE LOS FAES INDUCTORES ENZIMÁTICOS SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO

Una vez revisada la evidencia científica sobre la repercusión de los FAEs, en general, sobre la DMO de las personas con epilepsia y los diversos factores de

riesgo relacionados con ello, pasemos a describir cuales son los posibles mecanismos propuestos por los que los FAEs producen una alteración del metabolismo óseo, empezando por los inductores enzimáticos.

El efecto más estudiado que comparten todos los fármacos inductores enzimáticos clásicos -PB, PHT y CBZ- es la disminución que se produce en los niveles de vitamina D circulante y sus metabolitos activos. La inducción del sistema citocromo p450 produce una inhibición de la hidroxilación de la vitamina D a nivel hepático, pero, además, también produce una inducción del CYP24, mediante la activación por parte de los FAEs del receptor X de pregnano (PXR), que acelera el catabolismo del calcitriol a ácido calcitroico, un metabolito inactivo de la vitamina D (*Khanna et al, 2009*).

La hipovitaminosis D induce a su vez una hipocalcemia que generaría un hiperparatiroidismo secundario, compensatorio. El aumento de la PTH produce, a nivel óseo, la activación de los osteoclastos –como ya se ha comentado previamente- y un aumento de la resorción ósea (*Verrotti et al, 2010b*).

Además, existen otros mecanismos propuestos para explicar la disminución de la DMO por los FAEs inductores, que se añaden al déficit de vitamina D (*Figura 2.2*). En efecto, estos fármacos también generan un déficit de vitamina K, por lo que se impide la carboxilación de la OC, empeorando así el proceso de mineralización (*Onodera et al, 2002*). Así mismo, existe cierta evidencia sobre la disminución de los estrógenos circulantes por parte de los FAEs inductores, lo que conlleva, como ya se ha explicado anteriormente, un desequilibrio en la ratio RANKL/OPG (*Khanna et al, 2009*). Por otro lado, se ha encontrado, en modelos animales, que la PHT podría disminuir directamente la proliferación y diferenciación osteoblástica (*Feldkamp et al, 2000*).

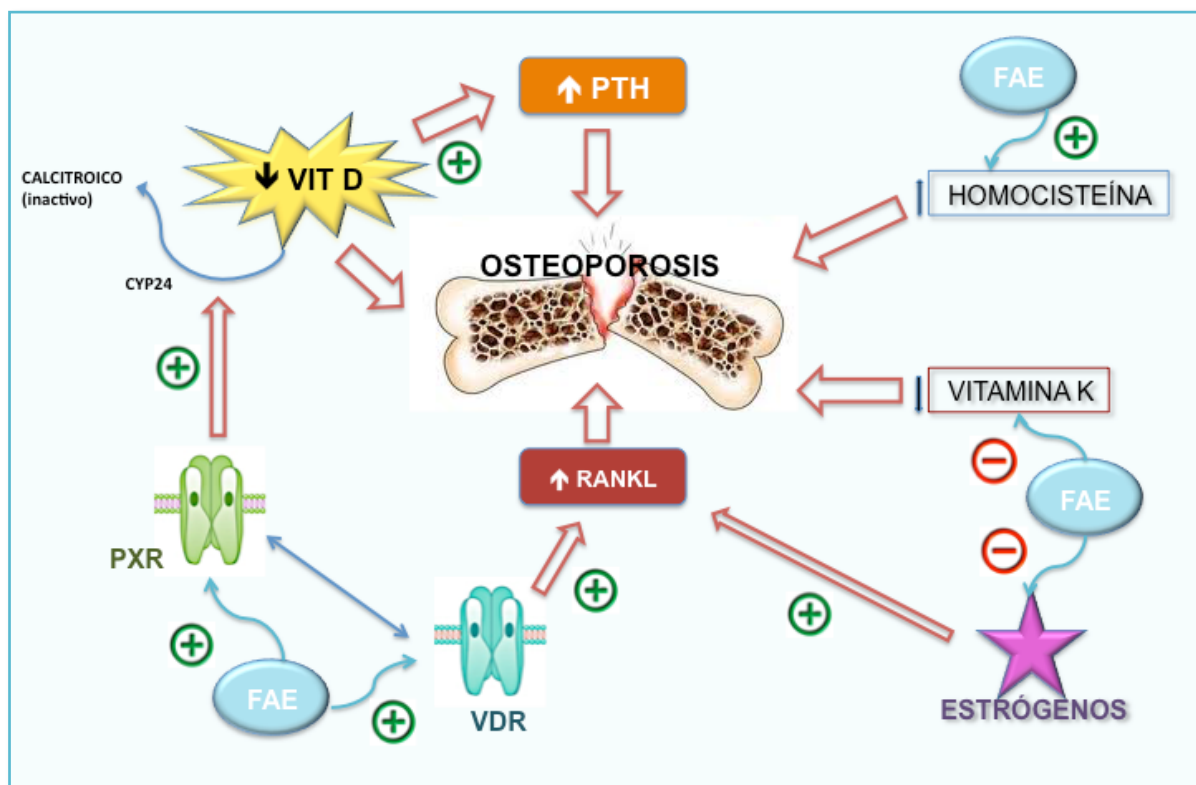


Figura 2.2. Mecanismos por los que los FAEs inductores podrían desencadenar una menor DMO y predisponer a la aparición de osteoporosis. FAE: fármaco antiépiléptico. PTH: parathormona. VIT D: vitamina D. PXR: receptor X de pregnano. VDR: receptor de la vitamina D. RANKL: ligando del receptor activador para el factor nuclear- κ -B.

2.4 EFECTO DEL ÁCIDO VALPROICO SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO

Existen diversas hipótesis para explicar el efecto deletéreo del VPA sobre la DMO. A pesar de no ser un FAE inductor, y por lo tanto, no poseer el efecto catabólico de la CBZ o la PHT sobre la vitamina D, el tratamiento crónico con VPA se ha relacionado de forma consistente con una disminución de DMO y un aumento del recambio óseo, tanto en niños como en adultos, así como un aumento del riesgo de fracturas (Sato *et al*, 2001; Boluk *et al*, 2004; Verrotti *et al*, 2010; Borusiak *et al*, 2013). Estos cambios se han detectado ya incluso desde los primeros 3 meses de tratamiento (Bauer *et al*, 2013).

Se postula que, en los pacientes en tratamiento con VPA, la actividad osteoclástica estaría aumentada a través de un mecanismo indirecto por *up-regulation* del sistema RANKL/OPG (Elwakkad *et al*, 2008), lo que conllevaría un aumento de la resorción ósea, especialmente en el hueso trabecular, generando una mayor separación entre trabéculas y, por lo tanto, mayor fragilidad (Senn *et al*, 2010). Los marcadores de formación ósea -como la OC- también parecen estar aumentados, lo que significa que existe un recambio óseo elevado pero con predominio global de resorción ósea (Nissen-Meyer *et al*, 2007). Otro hallazgo aún más interesante es la

probable acción directa del VPA sobre la producción osteoblástica de colágeno tipo I. Según estudios realizados en cultivos celulares, el VPA disminuiría la producción de colágeno tipo I. Se ha encontrado una menor cantidad de cadenas tanto $\alpha 1$ como $\alpha 2$, por lo que habría una regulación a la baja de la producción de colágeno más que un recambio de fibras ya unidas (*Fuller et al, 2010; Humphrey et al, 2013*).

2.5 EFECTO DE LOS FAES DE SEGUNDA GENERACIÓN SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO: LAMOTRIGINA, OXCARBACEPINA, TOPIRAMATO Y ZONISAMIDA

Sobre los FAEs que aparecieron posteriormente como LTG, OXC, TPM o ZNS, disponemos de una menor, pero existente, evidencia sobre su repercusión en el metabolismo óseo, gracias a estudios realizados en población epiléptica y en otras patologías. Sin embargo, las relaciones no están tan establecidas como en el caso de los FAEs clásicos que se acaban de describir.

No disponemos de datos sobre una asociación directa entre LTG y el riesgo de fracturas, pero los estudios de Kim et al y Pack et al parecen indicar que no hay una reducción de la DMO o cambios en el recambio óseo durante el tratamiento con este FAE (*Pack et al, 2005; Kim et al, 2007*).

Sobre la OXC, por el contrario, sí que se ha descrito una disminución de la DMO en los pacientes en tratamiento con este fármaco durante al menos 18 meses (*Cansu et al, 2008*). El mecanismo parece ser semejante al de la CBZ, ya que se ha relacionado la toma de OXC con unos menores niveles de vitamina D (*Mintzer et al, 2006*). Sin embargo, en otros estudios más recientes no se ha podido comprobar un empeoramiento de la masa ósea tras la exposición al fármaco (*Koo et al, 2014*), aunque sí un aumento del recambio óseo (*Bauer et al, 2013*), por lo que no se ha alcanzado un consenso al respecto.

En cuanto a ZNS y TPM, los mecanismos propuestos están relacionados con la inhibición de la anhidrasa carbónica, que generaría un estado de acidosis metabólica que puede predisponer tanto a la formación de cálculos renales como a la aparición de osteoporosis. En el caso del TPM, disponemos de varios estudios realizados en pacientes epilépticos (*Heo et al, 2011; Benizcky et al, 2012*) y en tratamiento de migraña (*Ali et al, 2011*). Sobre ZNS, los estudios hasta la fecha han sido llevados a cabo en animales (*Takahashi et al, 2003*), aunque la semejanza entre los mecanismos de acción de los dos FAEs hace sospechar que ZNS también podría provocar un aumento en la resorción ósea en humanos.

2.6 POSIBLES EFECTOS DE LOS FAES DE TERCERA GENERACIÓN SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO: LEVETIRACETAM, LACOSAMIDA Y ESLICARBACEPINA

Sobre los FAEs de nueva generación como LEV, LCM o Eslicarbacepina (ESL) disponemos de muy pocos datos aún.

En el estudio de Koo et al no se encontró que LEV tuviera un efecto deletéreo sobre la DMO durante el primer año de tratamiento en monoterapia (Koo et al, 2013). Sin embargo, estudios realizados en ratas apuntan a que LEV reduce la resistencia ósea y la formación de hueso (Nissen-Meyer et al, 2007) o incluso disminuye la DMO (Fekete et al, 2013), de modo que en estudios observacionales con mayor tiempo de exposición sí parece existir cierta tendencia a la osteopenia (Benizcky et al, 2012). En el estudio de Nissen-Meyer et al, los niveles de osteocalcina estaban disminuidos y parecía haber mayor afectación del hueso trabecular, mientras que Fekete et al detectaron un aumento de la resorción ósea, por lo que concluyen que son necesarios más estudios para poder conocer el alcance de la administración de LEV sobre el metabolismo óseo (Fekete et al, 2013).

En cuanto a los últimos FAEs comercializados como LCM y ESL, no existen estudios en humanos hasta la fecha. Un estudio en ratas sugiere una posible tendencia al aumento de resorción ósea en sujetos en tratamiento con LCM, pero este hallazgo no se ha comprobado posteriormente (Simko et al, 2014).

ANTIEPILÉPTICO	↑ RESORCIÓN	↑ RECAMBIO	↓ VITAMINA D	OTROS MECANISMOS
FENOBARBITAL	+	+	+	+
FENITOÍNA	+	+	+	+
PRIMIDONA	+	+	+	+
CARBAMACEPINA	+	+	+	¿?
VALPROICO	+	+	-/¿?	+
LAMOTRIGINA	-	-	-/¿?	-
OXCARBACEPINA	+/¿?	+	+	¿?
TOPIRAMATO	+	¿?	¿?	+
ZONISAMIDA	+	¿?	¿?	+
LEVETIRACETAM	+/¿?	-	¿?	+
ESLICARBACEPINA	¿?	¿?	¿?	¿?
LACOSAMIDA	+/¿?	¿?	¿?	¿?

Tabla 2.1. Resumen de las acciones conocidas de los distintos FAEs sobre el metabolismo óseo.

3. ESTRATEGIAS PARA ABORDAR LAS ALTERACIONES DEL METABOLISMO ÓSEO EN PERSONAS CON EPILEPSIA

Las fracturas osteoporóticas son una causa mayor de morbilidad en la población general. Se estimó que el coste directo de la osteoporosis en España durante 2010 fue de 6.110 millones de euros, teniendo en cuenta fracturas patológicas, tratamiento y calidad de vida, y se espera un incremento para el 2025 del 30% en nuestro país (*Svedbom et al, 2013*).

Las personas con epilepsia en tratamiento crónico con FAEs presentan un riesgo de fractura de 2 a 6 veces superior al de la población general (*Mattson and Gidal, 2004*), por lo que resulta fácil comprender el alcance económico y sanitario del problema que nos ocupa. Sin embargo, las guías de epilepsia tanto nacionales como internacionales son poco claras sobre las estrategias preventivas a seguir y el manejo de pacientes expuestos a FAEs de forma prolongada en cuanto al metabolismo óseo, y tampoco hacen referencia al tratamiento recomendado para los pacientes que ya presentan una osteoporosis establecida, secundaria a FAEs (qué tipo de terapia, dosis...).

El grupo de epilepsia de la Sociedad Española de Neurología, en su guía de práctica clínica en epilepsia, únicamente recomienda “En pacientes con osteopenia e hipotiroidismo, deben evitarse los FAE inductores enzimáticos” (*Sancho Rieger et al, 2012*). La Academia Americana de Epilepsia, por su parte, estableció en 2006 una serie de consideraciones (recogidas en la publicación de *Sheth and Harden, 2007*), proponiendo la suplementación indiscriminada de vitamina D y calcio en los pacientes en tratamiento antiepiléptico (**Figura 3.1**). Las dosis de vitamina D sugeridas eran 400 UI, acompañadas de al menos 1200 mg de calcio, diarias. Sin embargo, estas recomendaciones no fueron consensuadas posteriormente ni se recogieron en las guías internacionales. La disminución de DMO y el mayor riesgo de fractura en personas con epilepsia en tratamiento con FAEs, a pesar de ser conocida desde hace décadas, como ya hemos visto, sigue siendo un problema sin resolver y su manejo depende mucho del criterio del neurólogo/epileptólogo (*Beerhorst et al, 2012; Miziak et al, 2014*).

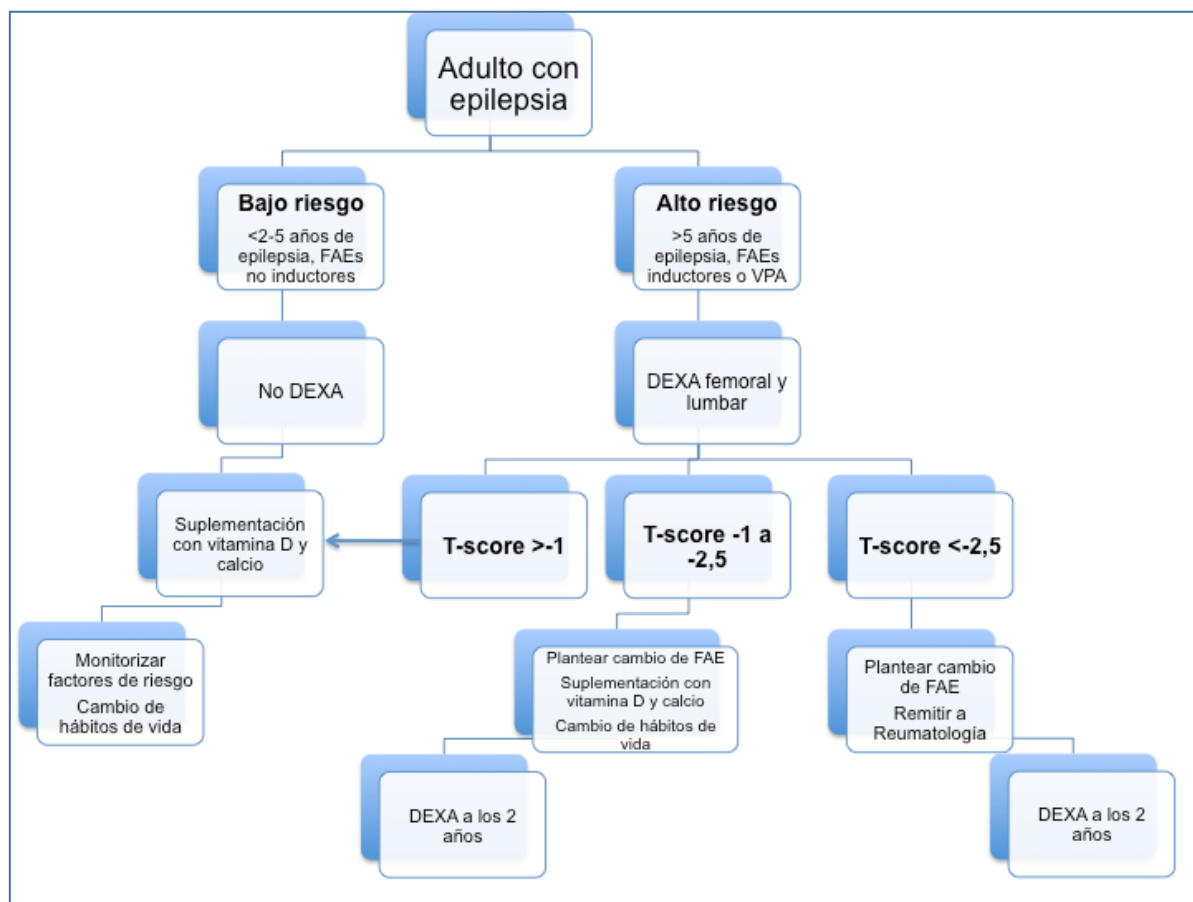


Figura 3.1. Propuesta de algoritmo de manejo de situación ósea en adultos con epilepsia. Adaptado de *Sheth and Harden, 2007*. FAE: fármaco antiepiléptico. DEXA: densitometría ósea. VPA: ácido valproico.

3.1 SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA D

Aunque las recomendaciones de la Sociedad de Endocrinología (*Holick et al, 2011*) abogan por una suplementación con vitamina D -sin calcio- a altas dosis en los pacientes tratados con FAEs, y la propuesta de *Sheth and Harden*, que acabamos de comentar, también apuesta por la suplementación con vitamina D -con calcio-, los datos sobre el efecto real de la suplementación con vitamina D en pacientes en tratamiento con FAEs son escasos, y se refieren a un único ensayo clínico aleatorizado realizado en 2006 por *Mikati et al*.

Previamente, en los años 70, ya se había publicado un estudio no aleatorizado controlado con sujetos sanos, en el que se administró 2000 UI de vitamina D₂ y 390 mg de lactato de calcio al día durante 3 meses a pacientes en tratamiento con PHT, PB o PRM. Los resultados fueron un aumento del contenido mineral óseo en un 4% en los pacientes suplementados, por lo que los autores recomendaban la administración de vitamina D pero consideraban que eran precisos más estudios para establecer qué dosis de vitamina D era la indicada (*Christiansen et al, 1973a*).

Diez años después se publicó un estudio con un tamaño muestral reducido -30 pacientes en tratamiento con CBZ en monoterapia durante más de un año- que se dividieron en dos grupos de forma aleatorizada para tomar 4000 UI diarias de vitamina D₂ o D₃, con 500 mg de calcio, durante 24 semanas (*Tjellesen et al, 1983*). Los resultados de este estudio fueron no concluyentes.

Sin embargo, no fue hasta 2005 cuando se emprendió el desarrollo del primer gran -y único hasta el momento- ensayo clínico aleatorizado con vitamina D en adultos y niños en tratamiento crónico con FAEs (*Mikati et al, 2006*). Centrándonos en el estudio realizado en adultos, se aleatorizaron pacientes tanto en politerapia como en monoterapia con cualquier FAE, obteniendo 37 pacientes que fueron suplementados con 4000 UI de ergocalciferol frente a 35 pacientes con 400 UI de la misma vitamina D₂. Se les realizó una densitometría basal y otra a los 12 meses desde el inicio de la suplementación, y encontraron que ninguno de los grupos de pacientes consiguió normalizar los valores de DMO pero sí que hubo un incremento de la densidad, tanto en los pacientes que habían tomado una dosis baja de vitamina D como en los que fueron suplementados con 4000 UI, siendo más significativo el cambio evolutivo con la dosis más alta. Sus conclusiones, que son las que prevalecen hasta la actualidad, fueron que la vitamina D puede ser útil a altas dosis pero siguen siendo necesarios más estudios con distintas dosis para poder establecer una recomendación.

3.2 TRATAMIENTOS ANTIRRESORTIVOS

Recientemente se han realizado estudios con otro tipo de terapias anti-osteoporóticas en modelos animales expuestos a FAEs (*Khanna et al, 2011; Anwar et al, 2014*). El uso de bifosfonatos como el alendronato o el risendronato demostró ser eficaz para revertir el efecto osteoporótico de la PHT en ratones (*Khanna et al 2011*) y el raloxifeno, por su parte, podría contrarrestar el efecto de VPA o PHT sobre el estradiol circulante en ratones hembra y mejorar el estado óseo (*Anwar et al, 2014*).

El único estudio publicado realizado en humanos es el ensayo clínico aleatorizado ADOPT, en el que se administró risendronato durante dos años a 40 veteranos de guerra en tratamiento con FAEs (todos hombres). Se controló con placebo, aunque se administró a todos los sujetos vitamina D (ergocalciferol) en dosis de 500 a 750 UI diarias, con 1000-1500 mg de calcio. Se suplementó con una megadosis antes de iniciar el estudio a aquellos que presentaban niveles de deficiencia de vitamina D basalmente. Aunque la DMO de los pacientes suplementados únicamente con vitamina D y calcio también aumentó ligeramente, la mejoría con risendronato fue significativa, por lo que los autores alentaban el uso de bifosfonatos en personas con epilepsia, con las precauciones en cuanto a la duración del tratamiento que ya hemos comentado con anterioridad (*Lazzari et al , 2013*).

4. ¿CÓMO MEDIR EL METABOLISMO ÓSEO EN PERSONAS CON EPILEPSIA? DEFINICIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 DEFINICIÓN OPERATIVA DE OSTEOPOROSIS

La osteoporosis fue definida en la última conferencia de consenso del National Institute of Health y la International Osteoporosis Foundation como una enfermedad esquelética caracterizada por una masa ósea disminuida y un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, que conlleva una mayor fragilidad ósea y aumento de riesgo de fractura (*Kanis et al, 2013; Pérez Edo et al, 2011*).

El objetivo fundamental que persigue la medida de la densidad ósea es proporcionar un criterio diagnóstico y una información pronóstica sobre la probabilidad de presentar fracturas en el futuro. También se utiliza para establecer una medida basal sobre la cual monitorizar la respuesta al tratamiento establecido. La DMO es la cantidad de masa ósea por unidad volumétrica o por unidad de área, y ambas pueden ser determinadas in vivo mediante técnicas densitométricas (*Kanis et al, 2013*).

La técnica más ampliamente utilizada para medir la DMO es la basada en la absorciometría ósea por rayos X, en concreto la que utiliza energía dual o DEXA, ya que la absorción de radiación X es muy sensible a la cantidad de calcio presente en un tejido, y el hueso es la fuente fundamental de calcio en el organismo.

La DMO se describe habitualmente como t-score o z-score, que son unidades de desviación estandar (DE):

- La t-score describe el número de DE de las que difiere el individuo estudiado con respecto al valor medio esperado en un individuo joven sano.
- La z-score describe la diferencia entre la DMO del individuo estudiado y la DMO media de un sujeto de su mismo sexo, edad y etnia, en DE. Se suele utilizar para pacientes jóvenes (niños y adolescentes).

La definición operativa de osteoporosis en uso actualmente está basada en la t-score de la DMO a nivel de cuello femoral y se define como una diferencia de 2.5 DE o mayor en la DMO con respecto a la media de la DMO de una mujer adulta. Los valores seleccionados como referencia según la OMS para calcular la t-score provienen de la base de datos de la NHANES III (National Health and Nutrition

Examination Survey) realizada en mujeres caucásicas de 20 a 29 años, en las que se midió la DMO en cuello femoral (Kanis et al, 2013).

Los niveles o puntos de corte de la DMO medida por DEXA en columna lumbar y cadera corresponden a:

- normal: valores de DMO > -1 DE en relación con la media de adultos jóvenes (T-score > -1);
- osteopenia o masa ósea baja, valores de DMO entre -1 y $-2,5$ DE (T-score entre -1 y $-2,5$);
- osteoporosis: valores de DMO $< -2,5$ DE (T-score $< -2,5$), como definíamos previamente y
- osteoporosis establecida, cuando a las condiciones previas se asocia más de una fractura osteoporótica.

Para los varones adultos se ha propuesto estos mismos puntos de corte (Pérez-Edo et al, 2011).

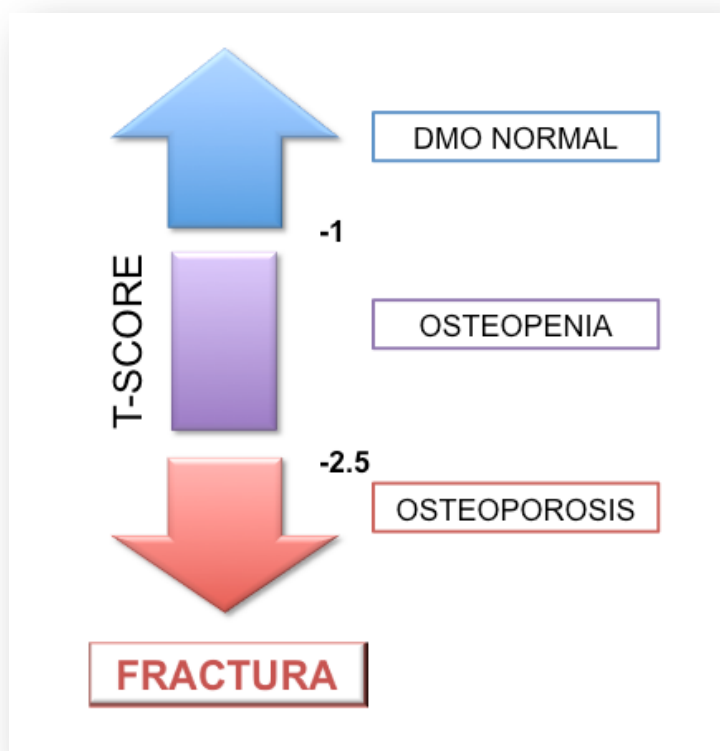


Figura 4.1. Representación del continuum entre la DMO normal y la osteoporosis, según los valores de la T-score

Sin embargo, la aparición creciente de pacientes con fracturas en traumatismos de baja energía y parámetros densitométricos compatibles con osteopenia pero no con osteoporosis, ya que no alcanzan valores de t-score $< -2,5$ DE, ha generado la necesidad de complementar la definición y el diagnóstico de osteoporosis con variables más clínicas y algoritmos como el FRAX®, del que hablaremos posteriormente (Siris et al, 2014).

4.2 DENSITOMETRÍA Y SU PAPEL EN EL DIAGNÓSTICO Y MANEJO DE LA OSTEOPOROSIS

Como hemos indicado previamente, la densitometría mediante DEXA es la técnica de elección para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con osteoporosis.

La DEXA se puede realizar en los siguientes puntos:

- cuello femoral o cadera
- columna lumbar
- tercio distal del radio, en determinadas situaciones como hiperparatiroidismo, pacientes muy obesos por encima de los límites de valores estándar para DEXA o pacientes en los que la determinación de cadera o columna lumbar no sea medible o no se pueda interpretar.

Según la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica en su documento de posicionamiento de 2013 (*Schousboe et al, 2013*), las recomendaciones para la indicación de la determinación de DMO mediante DEXA son las siguientes:

- mujeres de más de 65 años
- mujeres postmenopáusicas pero con menos de 65 años, sólo si presentan un factor de riesgo para tener menor masa ósea como son:
 - o bajo peso
 - o fracturas previas
 - o uso de fármacos que aumenten el riesgo de osteoporosis (no se especifican cuáles)
 - o enfermedad asociada a pérdida de masa ósea
- mujeres en transición a menopausia con alguno de los factores de riesgo mencionados en el punto anterior
- hombres mayores de 70 años
- hombres menores de 70 años si presentan uno de los factores de riesgo mencionados en el punto anterior
- adultos con fractura por fragilidad
- adultos que presenten una patología asociada a baja masa ósea o a pérdida de masa ósea
- adultos que estén recibiendo un tratamiento asociado con baja masa ósea o pérdida de masa ósea
- cualquiera en el que se plantee terapia farmacológica por osteoporosis
- cualquiera que ya esté tratado, para monitorizar el efecto del tratamiento

- cualquiera que no esté recibiendo tratamiento pero haya evidencia de pérdida de masa ósea que vaya a conllevar la necesidad de tratamiento.

Los pacientes epilépticos en tratamiento con FAEs entrarían en la categoría de **“adultos que estén recibiendo un tratamiento asociado con baja masa ósea o pérdida de masa ósea”**, por lo que no se tendría en cuenta ni la edad ni el género a la hora de prescribir la realización de una primera densitometría.

No disponemos de una indicación específica recogida en las guías de manejo de Epilepsia (española o internacional) para la indicación de densitometría en pacientes en tratamiento con FAEs, a pesar de que, como ya hemos referido anteriormente, la repercusión de los FAEs sobre la masa ósea se conoce desde hace más de 40 años. Encontramos en la literatura propuestas como la de Seth durante el curso de la Academia Americana de Epilepsia en 2006 (*Sheth and Harden, 2007*), ya comentada anteriormente, en la que se promueve la realización de DEXA en pacientes en tratamiento con FAEs en los siguientes casos: pacientes en tratamiento durante más de 5 años con fármacos inductores enzimáticos o VPA.

En el documento de posicionamiento de la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica también se hacen las siguientes recomendaciones (*Schousboe et al, 2013*):

- en mujeres postmenopáusicas y hombres por encima de los 50 años, la medición preferida es la t-score
- en mujeres antes de la menopausia y hombres menores de 50 años, se prefiere la z-score.
- En hombres menores de 50 años y mujeres antes de la transición a la menopausia no se puede establecer el diagnóstico de osteoporosis basándose únicamente en la DMO.
- Los intervalos entre densitometrías estarán determinados por la clínica del paciente de forma individual: típicamente se repetirá la densitometría un año después de haber iniciado una terapia anti-osteoporótica, pero **en patologías o situaciones relacionadas con una pérdida de masa ósea rápida, como el tratamiento con corticoides, sería apropiado realizarla con más frecuencia.**
- La densitometría para un mismo paciente se realizará siempre en la misma máquina, a no ser que se pueda realizar una calibración cruzada.

4.3 PAPEL DE LOS BIOMARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO Y MANEJO DE LA OSTEOPOROSIS

Si bien la densitometría por DEXA es la técnica de elección para la determinación de DMO y el diagnóstico de un paciente con osteoporosis, tanto primaria como secundaria, disponemos de otros parámetros analíticos como los biomarcadores de remodelación ósea que han demostrado utilidad principalmente en el seguimiento

de estos pacientes (*Civitelli et al, 2009*). Estos marcadores bioquímicos nos ofrecen un análisis dinámico y global del esqueleto, que complementa la medición de la DMO al ofrecernos una aproximación al ritmo de recambio óseo.

Además, los cambios debidos a la terapia antirresortiva en los biomarcadores óseos son detectables en las primeras semanas de tratamiento, mientras que los cambios en la DMO medida por DEXA no empiezan a observarse antes de los 6 meses/1 año, por lo que se propone la determinación de biomarcadores para la monitorización del tratamiento antiosteoporótico (*Civitelli et al, 2009*).

La matriz orgánica del hueso está constituida por colágeno tipo I en un 90%, como ya hemos visto. Durante el proceso de degradación extracelular se liberan péptidos de los extremos carboxi y aminoterminal de las moléculas de protocógeno, que son los que pasan al torrente sanguíneo. Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo miden estos productos generados durante el proceso de formación o degradación de la matriz ósea y pueden determinarse en sangre y orina (*Romero Barco et al, 2012*).

Los biomarcadores de los que disponemos actualmente son los desglosados en la Tabla 4.1.

FORMACIÓN	RESORCIÓN
Fosfatasa alcalina total (FA)	Telopéptido C-terminal del colágeno tipo 1 (1CTP)
Fosfatasa alcalina ósea (FAos)	Telopéptido C-terminal del colágeno tipo 1 (CTX)
Osteocalcina (OC)	Telopéptido N-terminal del colágeno tipo 1 (NTX)
Propéptido C-terminal del protocógeno tipo 1 (P1CP)	Hidroxiprolina urinaria (HP)
Propéptido N-terminal del protocógeno tipo 1 (P1NP)	Piridinolina urinaria (PYD)
	Deoxipiridolina urinaria (DPD)
	Fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRACP 5b)

Tabla 4.1. Biomarcadores de remodelación ósea

Los kits de detección de marcadores como CTX y NTX mediante ELISA han reducido notablemente la variabilidad que existía con los métodos no automatizados, y ha mejorado la reproducibilidad de las mediciones (*Vasikaran et al, 2011*).

4.3.1. MARCADORES DE FORMACIÓN ÓSEA

- FA y FAos: la FA es una ectoenzima anclada a la membrana de las células osteoblásticas y su presencia es necesaria para la mineralización ósea. La isoforma ósea es específica de la función osteoblástica.
- Osteocalcina: es una proteína de la matriz ósea sintetizada por osteoblastos maduros. Constituye el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz ósea. Presenta mucha variabilidad horaria (dependiente del ritmo circadiano).
- P1NP: es un péptido derivado de la división postranslacional de las moléculas de colágeno tipo 1 antes de agruparse en fibrillas. Uno de los marcadores de formación ósea más fiables.

4.3.2. MARCADORES DE RESORCIÓN ÓSEA

- NTX: es un producto de degradación del colágeno tipo 1 que resulta de la acción de los osteoclastos.
- CTX: es también un producto de degradación del colágeno tipo 1. En el adulto, aproximadamente un 70 % de las moléculas de colágeno tipo I del tejido óseo están isomerizadas, y lo que se detecta mediante ELISA es la forma isomerizada β (beta-crosslaps), que está relacionada con colágeno envejecido. Se asume que la mayor parte del CTX detectable proviene de la acción osteoclástica, aunque ningún marcador derivado del colágeno tipo 1 es exclusivamente específico del hueso.
- DPD y PYD: son marcadores de resorción ósea urinarios, también productos de degradación del colágeno tipo 1, con gran variabilidad inducida por horario y ritmo circadiano.
- TRACP 5b: es una enzima lisosómica del osteoclasto involucrada en la degradación del hueso, aunque también está presente en otros tejidos. Su escasa especificidad, unida a la dificultad metodológica de determinación, cuestiona su uso en la actualidad.

Según el artículo de posicionamiento de Fundación Internacional de Osteoporosis los biomarcadores más fiables y adecuados para la valoración del metabolismo óseo son:

- **sCTX** (telopéptido C-terminal del colágeno tipo I sérico) como marcador de resorción ósea
- **sP1NP** (propéptido N-terminal del protocolágeno tipo I sérico) como marcador de formación ósea.

Ambos se determinan en sangre, ya que en orina existe más variabilidad intrasujeto y horaria (*Vasikaran et al, 2011*).

4.4 PAPEL DEL FRAX® EN EL MANEJO DE LA OSTEOPOROSIS

FRAX® es un algoritmo informático patrocinado por la OMS, que calcula la probabilidad de presentar una fractura mayor en los 10 años siguientes (cadera, columna, húmero o muñeca), así como la probabilidad de presentar una fractura de cadera de forma específica en los 10 años siguientes a la valoración. Es una herramienta de asesoramiento sobre el riesgo de fractura, específica para cada país, que combina los datos de DMO de cuello femoral (o cadera total) con un grupo de factores de riesgo clínicos para fractura, que han sido validados y ponderados, y por lo tanto independientes de la DMO (*Kanis et al, 2013*).

Está basado en datos epidemiológicos obtenidos de 60.000 sujetos, estudiados de forma prospectiva para correlacionar factores de riesgo de fractura con la aparición de estas mismas. Posteriormente se validó en cohortes independientes de más de 230.000 pacientes. Es muy útil en pacientes sin tratamiento previo, tanto hombres como mujeres, entre los 40 y 90 años (*Jeremiah et al, 2015*).

El riesgo de fractura se calcula utilizando los siguientes parámetros:

- Edad
- Sexo
- IMC
- Fractura previa por fragilidad
- Antecedentes familiares de fractura de cadera
- Hábito tabáquico en el momento actual
- Tratamiento con corticoides (>5 mg prednisolona diarios o equivalente durante 3 meses o más)
- Artritis reumatoide
- Otras causas de osteoporosis secundaria: se especifican:
 - o Hipogonadismo no tratado en hombres y mujeres
 - o Enfermedad intestinal inflamatoria crónica
 - o Inmovilidad prolongada
 - o Trasplante
 - o Diabetes tipo 1 y 2
 - o Hipertiroidismo o tratamiento hormonal tiroideo de supresión
 - o Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- Consumo de alcohol superior a 3 unidades diarias.
- De forma opcional se puede añadir la DMO de cuello femoral para mejorar la capacidad predictiva

El algoritmo se ofrece de forma gratuita en la página <http://www.shef.ac.uk/FRAX/tool.aspx?country=4> calibrado para población española.

Figura 4.2. Cuestionario autorrellenable para calcular el FRAX® en versión española. Tomado de <http://www.shef.ac.uk/FRAX/tool.aspx?lang=sp>

No existe consenso actualmente sobre el umbral por encima del cual un riesgo de fractura se consideraría alto en la población española, según las guías de la Sociedad Española de Reumatología (*Pérez Edo et al, 2011*). Una aproximación sería:

- riesgo absoluto de fractura a 10 años <10%: bajo
- riesgo absoluto de fractura a 10 años entre 10 y 20%: moderado
- riesgo absoluto de fractura a 10 años >20%: alto.

Sin embargo, para los pacientes en tratamiento con fármacos antiepilépticos, tanto hombres como mujeres, esta herramienta presenta limitaciones, ya que no se considera como factor de riesgo la toma de éstos, y únicamente se podría ponderar mediante la inclusión de la DMO femoral en el cálculo (*Compston, 2015*).

5. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL METABOLISMO ÓSEO APLICADO A PERSONAS CON EPILEPSIA

5.1 DEFINICIÓN DE POLIMORFISMO GENÉTICO

Las mutaciones que se producen habitualmente en el genoma pueden dar lugar a mutaciones puntuales en un sujeto o prevalecer en la población general, dando lugar a los llamados polimorfismos genéticos de nucleótido único (SPN), que generan variación alélica entre individuos y diversidad en la especie. Pueden estar, o no, asociados a enfermedades, y para que sean considerados como polimorfismos propiamente dichos, la frecuencia de uno de sus alelos en la población debe superar el 1% (*Furey et al, 2004*).

5.2 POLIMORFISMOS ASOCIADOS AL METABOLISMO ÓSEO

El interés por identificar posibles genes asociados con la osteoporosis es enorme, y se han realizado multitud de estudios intentando relacionar ciertos polimorfismos con la aparición de fracturas osteoporóticas o una menor DMO. Estos estudios están ampliamente desarrollados en una revisión reciente (*Liu et al, 2014*), por lo que expondremos brevemente el estado actual del tema.

Uno de los primeros polimorfismos estudiados fue el del receptor de la vitamina D (VDR). Como ya hemos comentado, el VDR juega un papel fundamental en la acción del calcitriol sobre los osteoblastos, pero también es muy ubicuo y puede tener otras funciones interesantes, tanto a nivel óseo como sistémico. Se han descrito al menos cuatro polimorfismos del VDR relacionados con la tendencia a una menor DMO: BsmI, ApaI, TaqI y FokI. Los estudios poblacionales relacionando estos polimorfismos con la aparición de osteoporosis y aumento del riesgo de fracturas son aún confusos y contradictorios (*Thakkestian et al, 2004; Uitterlinden et al, 2006; Pedrera-Canal et al, 2015*).

Otro polimorfismo ampliamente estudiado en población general es el del gen COL1A1, ya que juega un papel importante en la determinación genética de la masa ósea. El colágeno tipo I está codificado por dos genes: COL1A1 y COL1A2. El gen COL1A1 está localizado en el cromosoma 17, región 17q21-22 y presenta 51 exones. Uno de los polimorfismos más extensamente estudiados es el denominado Sp1, que consiste en la sustitución de una guanina (G) por una timina (T) en la primera base del primer intrón del gen, que afecta al sitio de unión del factor de transcripción Sp1, y por tanto, a la regulación de la transcripción del gen (*Stewart and Ralston, 2000*).

Se ha relacionado la presencia del alelo “s” del polimorfismo COL1A1 Sp1 con una menor DMO así como peor calidad ósea y por lo tanto una mayor tendencia a la aparición de fracturas (*Mann et al, 2001*). Sin embargo, estas conclusiones no se mantuvieron en el estudio GENOMOS, uno de los estudios más ambiciosos realizados para comprobar la relación entre el polimorfismo COL1A1 Sp1 y la presencia de osteoporosis. En él se reclutó a 26.242 participantes y se recogió datos de DMO lumbar, femoral e historia de fracturas traumáticas y atraumáticas. Los resultados confirmaron que, efectivamente, la condición de homocigosis “ss” estaba asociada a una menor DMO tanto lumbar como femoral, pero la heterocigosis perdía relevancia, y no se encontró un aumento del riesgo de fracturas en los sujetos con alelo “s” (*Ralston et al, 2006*). Estudios posteriores sí que han vuelto a poner sobre el tablero la influencia de la presencia del alelo “s” en la aparición de fracturas patológicas, por lo que la controversia persiste (*Marini et al, 2013*).

Finalmente, otros posibles polimorfismos genéticos implicados podrían ser los que se han relacionado con receptores estrogénicos – como el ESR o el PXR, comentado anteriormente – o con las nuevas moléculas asociadas a la fisiopatología del metabolismo óseo, como son el sistema OPG/RANKL o las catepsinas (*Liu et al, 2014*).

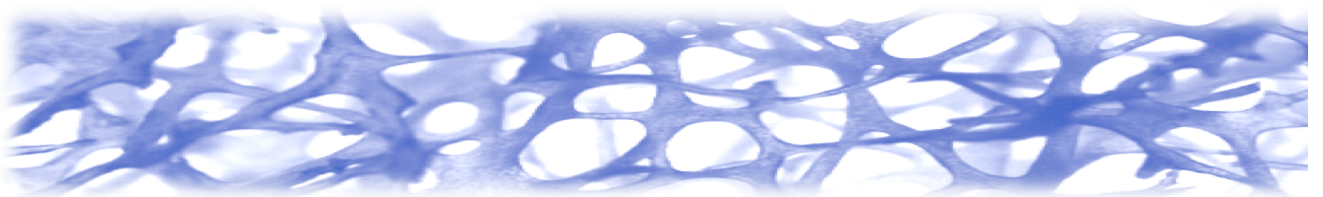
5.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL METABOLISMO ÓSEO EN PERSONAS CON EPILEPSIA

La osteoporosis inducida por FAEs también se ha intentado relacionar en los últimos años con algunos de los polimorfismos genéticos que hemos mencionado previamente. Se ha descrito en estudios publicados recientemente una relación entre la presencia del alelo B en el polimorfismo del gen del VDR y la disminución de DMO en pacientes en tratamiento con FAEs en monoterapia (*Lambrinouadaki et al, 2011*). En su estudio, Lambrinouadaki et al analizaron el polimorfismo del VDR en 73 pacientes en monoterapia con VPA, LEV y OXC, excluyendo a mujeres menopáusicas o postmenopáusicas. Encontraron que la presencia del alelo B, y en especial la condición de homocigosis BB, estaba relacionada con una menor DMO lumbar medida mediante DEXA, así como niveles más bajos de vitamina D sérica.

En el estudio posterior de Phabphal et al se analizó en una muestra más amplia y homogénea de pacientes la presencia del polimorfismo Bsml del VDR, y también encontraron que se relacionaba con unos valores disminuidos de t-score y z-score tanto a nivel lumbar como femoral (*Phabphal et al, 2013a*).

Sobre el polimorfismo del gen COL1A1 o los receptores estrogénicos no se han realizado estudios en población epiléptica hasta la fecha.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.



1. JUSTIFICACIÓN

La osteoporosis y el riesgo aumentado de fracturas en la población epiléptica es un problema que genera tanto incógnitas como dificultades a la hora del manejo de los pacientes por los profesionales que nos dedicamos a la Epilepsia. Conocemos la repercusión de los antiepilépticos llamados clásicos como CBZ o PHT en la salud ósea de nuestros pacientes cuando se consumen de forma crónica, e incluso de algunos de los FAEs de generaciones posteriores como OXC o TPM, pero no tenemos datos suficientes sobre la acción de los FAEs más recientes, aunque su uso sea extendido e indiscriminado.

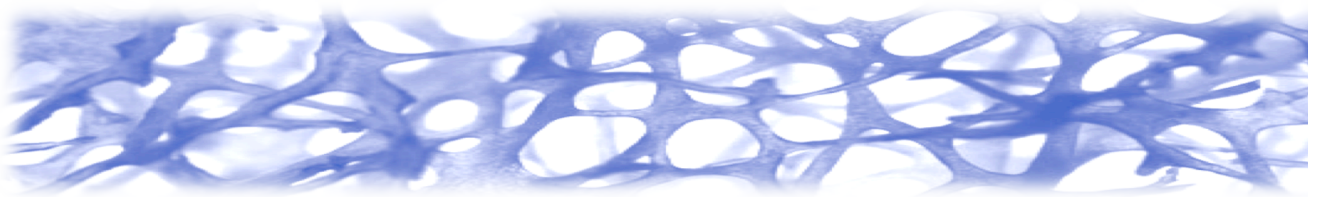
De igual manera, tampoco disponemos de guías de manejo y tratamiento de esta patología asociada a FAEs, y la salud ósea de las personas con epilepsia radica, en parte, en el seguimiento por parte del Neurólogo de recomendaciones que, como se ha comentado, son mayoritariamente externas a las Sociedades de Epilepsia, y en las que tampoco encontramos ningún consenso final.

2. HIPÓTESIS

Por todo ello, se planteó este estudio, con dos hipótesis principales:

- Los FAEs de nueva generación pueden asociarse a alteraciones del metabolismo óseo, al igual que los FAEs clásicos.
- La suplementación con vitamina D, a las dosis prescritas según práctica clínica habitual, pueden disminuir las alteraciones del metabolismo óseo inducidas por FAEs clásicos o de nueva generación.

OBJETIVOS.



Los objetivos de esta tesis fueron los siguientes:

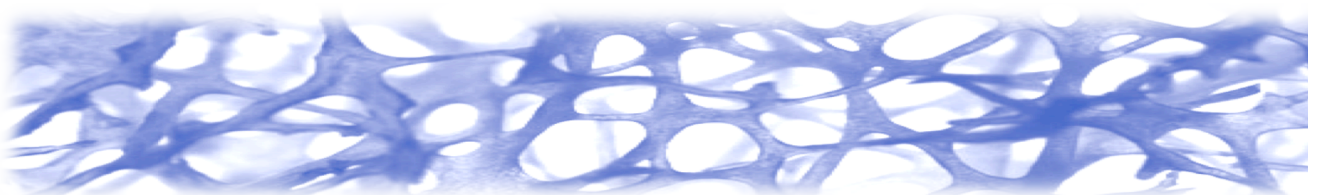
1. OBJETIVOS PRINCIPALES

- estudiar la posible afectación del metabolismo óseo en pacientes epilépticos tratados con FAEs de nueva generación, mediante parámetros densitométricos, comparados con pacientes tratados con FAEs clásicos
- determinar el efecto de la suplementación con vitamina D en los parámetros densitométricos de los pacientes epilépticos tratados tanto con FAEs clásicos como FAEs de nueva generación

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- estudiar la posible afectación del metabolismo óseo en pacientes epilépticos tratados con FAEs de nueva generación, mediante biomarcadores de remodelación ósea, comparados con pacientes tratados con FAEs clásicos
- determinar el efecto de la suplementación con vitamina D en los biomarcadores de remodelación ósea de los pacientes epilépticos tratados tanto con FAEs clásicos como FAEs de nueva generación
- determinar la influencia de los polimorfismos genéticos relacionados con el metabolismo óseo en la respuesta a la suplementación con vitamina D en estos pacientes
- estudiar la utilidad de la herramienta FRAX® en una población epiléptica con suplementación o no de vitamina D

MATERIAL Y MÉTODOS.



1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio observacional prospectivo, clasificado por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios como Estudio Postautorización de Seguimiento Prospectivo (EPA-SP) con el código IRE-CBZ-2014-01.

2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron personas con epilepsia en tratamiento en monoterapia con FAEs clásicos (PHT, VPA y CBZ) y de nueva generación (LEV, ESL, LCM) de forma crónica (más de 12 meses), a los que se les iba a realizar un estudio de metabolismo óseo según práctica clínica habitual y pautar o no una suplementación con vitamina D y calcio siguiendo las recomendaciones de la Academia Americana de Epilepsia (*Sheth y Harden, 2007*).

Para ello, se reclutaron pacientes que se encontraban en seguimiento en las consultas de la Unidad de Epilepsia del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA), en el periodo comprendido entre enero 2013 y abril 2014, a los que se les iba a realizar un estudio de metabolismo óseo y que cumplían los criterios de inclusión que se citan a continuación. Todos los pacientes reclutados habían sido diagnosticados de epilepsia mediante criterios clínicos, apoyados mediante criterios electroencefalográficos (EEG) y radiológicos. La clasificación etiológica se realizó en base a los hallazgos de las pruebas electroencefalográficas (EEG basal de rutina) y de neuroimagen (resonancia magnética cerebral de 1.5T con protocolo de epilepsia) que se habían realizado previamente y constaban en la historia clínica de los pacientes. Se utilizó la clasificación vigente de la ILAE 2010 (*Berg et al, 2010*).

2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Pacientes mayores de 18 años diagnosticados de epilepsia genética, estructural o desconocida según la clasificación de la ILAE 2010.
- Pacientes en tratamiento con un fármaco antiepiléptico en monoterapia (PHT, CBZ, VPA, LEV, LCM, o ESL), durante más de 12 meses, y sin cambios de dosificación en el último mes.
- Pacientes sin crisis durante el año previo a su inclusión.

- Pacientes que den su consentimiento mediante la firma del consentimiento informado.

2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Pacientes en tratamiento con suplementos de calcio o vitamina D antes de iniciar el estudio
- Pacientes en tratamiento con fármacos con capacidad documentada para alterar el metabolismo óseo como son benzodiazepinas, corticoides, tiazidas, anticoagulantes orales, calcitonina o bifosfonatos.
- Pacientes con osteoporosis primaria ya diagnosticada antes de comenzar el tratamiento con antiepilépticos.
- Pacientes con enfermedades crónicas que provoquen osteoporosis secundaria como enfermedades hepáticas o renales crónicas, hipertiroidismo, malabsorción intestinal, diabetes tipo 1, hipogonadismo, osteogénesis imperfecta...
- Pacientes con movilidad limitada.
- Mujeres embarazadas o que hayan estado dando lactancia en los últimos 6 meses.

3. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

El cálculo del tamaño muestral se realizó tomando como variable principal la DMO femoral ya que los cambios en ésta son el criterio diagnóstico reconocido por la Guía Europea de diagnóstico y manejo de Osteoporosis (*Kanis et al, 2013*). Para una desviación típica del 11%, y esperando detectar una diferencia del 7% en la variable principal, necesitaríamos 31 pacientes por grupo. Si ajustamos un 10% de pérdidas necesitaríamos 34 pacientes por grupo, con un total de **68 pacientes**. Todo ello para un nivel de confianza ($1-\alpha$) del 95% y una potencia β del 80%.

4. LUGAR DE REALIZACIÓN

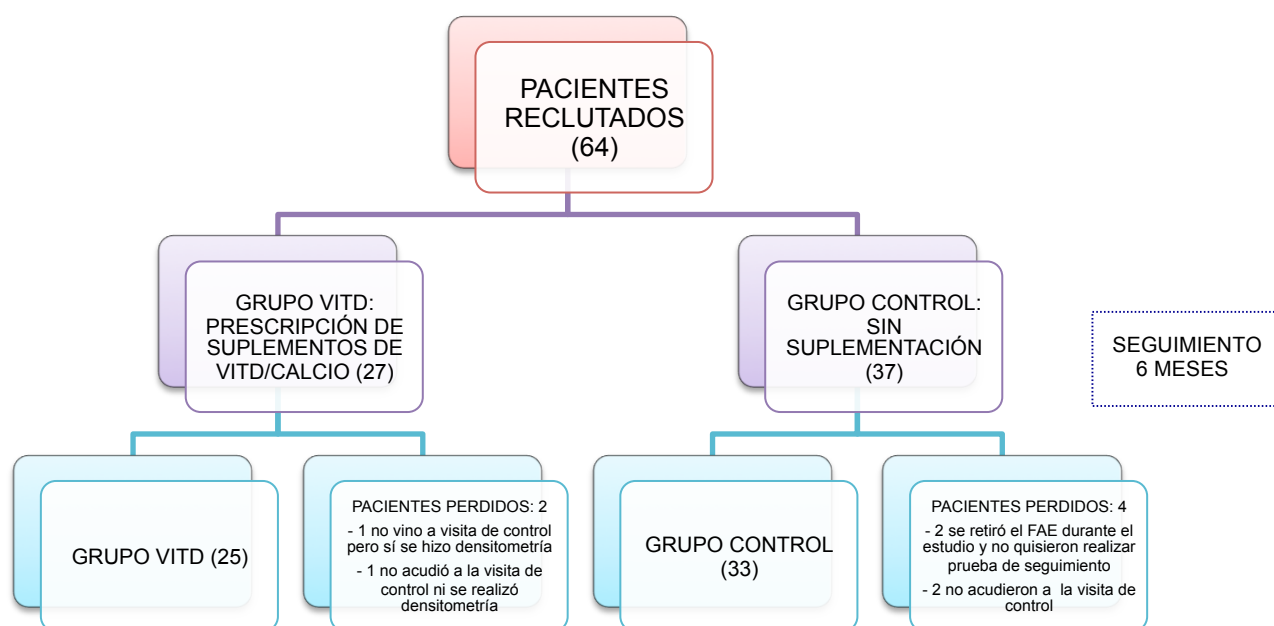
Los pacientes fueron seleccionados en las consultas externas de la Unidad de Epilepsia del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA), localizadas en el edificio Policlínico del citado Hospital.

La extracción sanguínea, tallado y pesado, así como recogida de variables clínicas y demográficas se realizó en el Laboratorio de Epilepsia, situado en la 4ª planta izquierda del edificio general del HCUVA.

El procesamiento de las muestras sanguíneas se realizó en el Laboratorio de Análisis Clínicos del HCUVA, situado en la planta baja del edificio general del HCUVA.

Las densitometrías se realizaron todas en el centro concertado Scanner Murcia, localizado en la calle Abenarabi, nº 3, Murcia.

5. ESQUEMA DEL ESTUDIO



6. RECOGIDA DE DATOS Y TOMA DE MUESTRAS

Los pacientes fueron reclutados durante los meses de noviembre de 2012 a marzo de 2013 y posteriormente de noviembre de 2013 a marzo de 2014 para asegurar unas condiciones basales de exposición solar homogéneas en su visita basal, teniendo en cuenta la latitud de la Región de Murcia (37°N).

Una vez seleccionados los pacientes y firmado el consentimiento informado por cada uno de ellos, realizamos una primera visita basal en la que se recogieron variables demográficas y clínicas, detalladas a continuación, mediante una entrevista personal. Con ello rellenamos el cuaderno de recogida de datos (CRD, ver anexo) y se le asignó a cada paciente un código numerado.

Se procedió a la medición de talla y peso en ayunas, sin zapatos ni complementos, dejando únicamente las piezas de ropa ligera. La medición se realizó en el peso del Laboratorio de Epilepsia, calibrado según los estándares proporcionados por el fabricante, con un error de precisión de 100 g para el peso y de 1 cm para la talla. Las medidas se tomaron siempre entre las 9.00 h y las 10:00 h am, por la misma persona (enfermera de la Unidad de Epilepsia). Se calculó el índice de masa corporal (IMC) con la siguiente fórmula: $IMC = \text{peso (kg)} / \text{talla}^2 (\text{m}^2)$.

Tras la visita basal y en función del criterio de su neurólogo, se prescribió o no a los pacientes del estudio una suplementación con vitamina D y calcio. Las dosis y preparados quedaron a criterio del neurólogo según práctica clínica habitual.

6.1 . RECOGIDA DE DATOS

6.1.1. DATOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS Y ANTROPOMÉTRICOS (VISITA BASAL)

- Edad, en años
- Género (hombre/mujer)
- Altura, en metros
- Peso, en kg
- IMC, en kg/m^2
- Tipo de piel clasificándola según la escala de fototipos de Fitzpatrick (Roberts, 2009).

FOTOTIPO	
I	Piel blanca que SIEMPRE se quema y NO se broncea
II	Piel blanca que SIEMPRE se quema y se broncea mínimamente
III	Piel blanca que se quema mínimamente y se broncea gradualmente de forma moderada
IV	Piel ligeramente morena que se quema mínimamente y se broncea bien
V	Piel morena que difícilmente se quema y se broncea intensamente
VI	Piel muy morena o negra que NUNCA se quema y se broncea intensamente

Tabla 1. Clasificación de los fototipos cutáneos de Fitzpatrick. Adaptado de *Roberts, 2009*.

- Antecedentes familiares de osteoporosis: sí/no/desconocido.
- Antecedentes personales:
 - Hipertensión: sí/no
 - Diabetes: sí/no
 - Dislipemia: sí/no
 - Tabaquismo activo: sí/no. En caso afirmativo, se recogió el número de cigarrillos/día
 - Hábito enólico activo: sí/no. En caso afirmativo, se recogieron las unidades de alcohol consumidas diarias
 - Enfermedades endocrinas: sí/no. En caso afirmativo, se recogió el tipo (siempre y cuando no constituyera un criterio de exclusión).
- Historia de epilepsia:
 - Años de epilepsia (años)
 - Etiología: genética, estructural, desconocida. Siguiendo las directrices de la clasificación vigente de los síndromes epilépticos de la ILAE 2010.
 - Tipo de crisis: generalizadas, focales, convulsiones bilaterales. Igualmente siguiendo las directrices de la clasificación de crisis de la ILAE 2010.

- Fármaco antiepiléptico actual: PHT, CBZ, VPA, LEV, LCM, ESL.
 - Dosis del FAE actual en mg.
 - Duración del tratamiento actual en meses.
 - Medicación antiepiléptica anterior: sí/no. En caso afirmativo, se recogió de qué FAE se trataba.
- Medicación concomitante, siempre y cuando no cumpliera los criterios de exclusión.
 - En mujeres, situación hormonal actual: menarquia activa, perimenopausia, postmenopausia.

Se procedió a la realización de una extracción sanguínea para la determinación de parámetros bioquímicos generales y específicos, que se describen en el apartado 6.2.

6.1.2. DATOS CLÍNICOS Y ANTROPOMÉTRICOS EN VISITA DE CONTROL (SEIS MESES)

Transcurridos seis meses desde la visita basal, se realizó una nueva visita de control en la que se recogieron los datos que se especifican a continuación. Se procedió a la medición de talla y peso de los pacientes en las mismas condiciones que durante la visita basal y se realizó una nueva extracción sanguínea periférica. En esta ocasión únicamente se precisó la extracción de dos tubos secos sin anticoagulante, ya que la determinación de polimorfismos genéticos es única y no requería un control evolutivo.

- Altura, en metros
- Peso, en kg
- IMC, en kg/m²
- Toma de suplemento de vitamina D y calcio: sí/no
- Dosis del suplemento en mg
- Número de crisis presentadas en los seis meses
- Cambios en la medicación crónica o introducción de nueva medicación: sí/no (en caso afirmativo, especificado)
- Tabaquismo activo: sí/no
- Hábito enólico activo: sí/no

6.1.3. ACTIVIDAD FÍSICA

Se recogió la actividad física realizada por los pacientes, tanto en la visita basal como en la visita de control a los seis meses. Se adaptó para ello la clasificación descrita en trabajos anteriores para pacientes epilépticos por *Verrotti et al, 2010a* en:

- 1 = >1 hora diaria, ó >3h/d durante 3 días/semana
- 2 = >2 horas durante 3 días/semana
- 3 = 1-6 horas semanales
- 4 = esporádico (no más de 1 hora semanal)
- 5 = no realiza

6.1.4. ENCUESTA NUTRICIONAL

Se recogió una encuesta nutricional, tanto en la visita basal como en la visita de control a los seis meses. Ésta fue realizada de forma libre por el paciente (sin formulario suministrado, pero con indicaciones orales por parte del personal investigador sobre cómo recogerla), describiendo los alimentos ingeridos durante los tres días previos a la visita. Los datos fueron analizados por una nutricionista experta mediante el programa online gratuito <http://www.invesalia.es/evaluacion/evalnutri.php>. Este programa permite realizar una determinación de la cantidad de calcio y vitamina D ingeridas en la dieta, entre otras determinaciones, mediante una estimación según la ingesta de los tres últimos días. Los alimentos incluidos llevan la composición de nutrientes de la Base de Datos Española de Composición de Alimentos publicada por la Red BEDCA del Ministerio de Ciencia e Innovación y bajo la coordinación y financiación de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Los valores de composición de alimentos recogidos en esta base de datos han sido obtenidos de distintas fuentes que incluyen laboratorios, industria alimentaria y publicaciones científicas o calculados. El acceso y uso de esta base de datos están sujetos a unas condiciones que puede conocer en el siguiente enlace: <https://www.bedca.net/bdpub/UsoBD.pdf>

LISTA DE ELEMENTOS SELECCIONADOS					
Alimento		Periodo	Eliminar	Gráfico	Kcal.
Leche con fibra 0% MG "CLAS"	250g.	Desayuno	✗		97,50
Café solo	5g.	Desayuno	✗		0,10
Pan integral de molde	30g.	Desayuno	✗		74,10
Jamón cocido	30g.	Desayuno	✗		29,70
Naranja	268g.	Desayuno	✗		86,91
PECHUGAS DE POLLO CON CIRUELAS		Comida	✗		555,24
Pan integral	30g.	Comida	✗		68,40
Kiwis	81g.	Comida	✗		41,50
CUSCÚS SALTEADO CON VERDURAS		Cena	✗		294,66
Pavo, pechuga asada	100g.	Cena	✗		135,00
Pan integral	20g.	Cena	✗		45,60
Naranja	268g.	Cena	✗		86,91

Figura 1. Ejemplo de dieta introducida en el programa de nutrición.

De la composición por nutrientes, se recogieron las siguientes variables:

- Cantidad diaria ingerida de vitamina D en μg
- Cantidad diaria ingerida de calcio en mg

6.2 TOMA DE MUESTRAS

Se realizó una extracción sanguínea periférica mediante punción antecubital en ayunas de 12 horas, siempre por la misma persona (enfermera de la Unidad de Epilepsia). Se extrajeron 3 tubos en la primera determinación: 10 ml de sangre en cada uno de los dos tubos secos sin anticoagulante que se centrifugaron y se analizó el suero para los parámetros analíticos desglosados a continuación y los biomarcadores de remodelamiento óseo, y un tubo con 5 ml de sangre total con EDTA, para la determinación de polimorfismos genéticos relacionados con el metabolismo óseo. A los seis meses, se realizó una nueva extracción sanguínea, en la que se recolectaron dos tubos secos sin anticoagulante.

El primer tubo seco, tanto en la visita basal como a los seis meses, fue centrifugado y procesado en la máquina de HITACHI habitual del laboratorio de Análisis Clínicos del HCUVA, obteniendo los siguientes parámetros:

- Glucemia en mg/dl (valores normales: 74-106)
- Urea mg/dl (valores normales: 10-50)

- Creatinina en mg/dl (valores normales: 0.7-1.2)
- Proteínas totales en g/dl (valores normales: 6.4-8.3)
- Calcio en mg/dl (valores normales: 8.6-10)
- Fósforo en mg/dl (valores normales: 2.7-4.5)
- Colesterol total en mg/dl (valores normales: <200)
- HDL-colesterol en mg/dl (valores normales: >40)
- LDL-colesterol en mg/dl (valores normales: <160)
- Triglicéridos en mg/dl (valores normales: <200)
- GOT en U/L (valores normales: 5-40)
- GPT en U/L (valores normales: 5-41)
- GGT en U/L (valores normales: 10-71)
- Fosfatasa alcalina en U/L (valores normales: 40-130)
- Folato en ng/ml (valores normales: 3.8-16)
- Vitamina B12 en pg/ml (valores normales: 191-663)
- Homocisteína en $\mu\text{mol/L}$ (valores normales: 5-15)
- TSH en mUI/L (valores normales: 0.27-4.2)
- T4 en ng/dl (valores normales: 0.93-1.7)

Cada uno de estos parámetros fue repetido en la visita a los seis meses.

6.3 VARIABLES ANALÍTICAS ESPECÍFICAS

El segundo tubo seco fue centrifugado para la obtención de suero a 3500 revoluciones por minuto durante 10 minutos. Las muestras fueron alicuotadas y conservadas a -80°C en los congeladores específicos del Laboratorio de Bioquímica hasta su procesamiento. De ellas se obtuvieron los siguientes parámetros en la visita basal y se repitieron a los seis meses:

6.3.1. VITAMINA D

Se determinó la Vitamina D total en suero mediante el kit Liaison® 25-OH vitamin D total de Diasorin, que emplea la tecnología de inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA: chemiluminescent immunoassay) para la determinación cuantitativa de la 25-hidroxivitamina D (25-OH-D) y otros metabolitos de la vitamina D hidroxilados en

suero o plasma con EDTA. Este test presenta una sensibilidad funcional < 4 ng/ml y un coeficiente de variación (CV) de 1,9-5,5%.

Se establecieron los siguientes intervalos de suficiencia/insuficiencia (*Holick et al, 2011*):

- ≥ 30 ng/ml: suficiencia
- 20-29 ng/ml: insuficiencia
- <20 ng/ml: deficiencia

6.3.2. HORMONA PARATIROIDEA (PTH)

Determinación cuantitativa por radioinmunoensayo (RIA) de la hormona paratiroidea humana C-terminal en suero con el C-terminal PTH RIA Kit de Diasorin®. Los valores normales suministrados por el fabricante fueron: 9-65 pg/ml. CV < 5,7%.

6.3.3. ISOENZIMA ÓSEA DE LA FOSFATASA ALCALINA (FAOS)

Para la determinación de la FAos empleamos el kit Metra™ BAP EIA, que es un enzimoimmunoensayo que proporciona una medida cuantitativa de la actividad de la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina en suero, como indicador de actividad osteoblástica. CV 0,9-2,4%.

6.3.4. OSTEOCALCINA (OC)

Para la determinación de OC se utilizó el N-MID Osteocalcin, un test inmunológico *in vitro* para la determinación cuantitativa de OC en suero y plasma humanos. Es un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia "ECLIA" tipo sándwich, para su uso en los analizadores automáticos Elecsys de Roche Diagnostics®. CV 1,1-1,6%.

6.3.5. PROPÉPTIDO AMINOTERMINAL DEL PROCOLÁGENO TIPO 1 (P1NP)

La determinación del P1NP en suero se realizó mediante el test total P1NP, un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) concebido para ser utilizado en los inmunoanalizadores Elecsys y Cobas e de Roche Diagnostics®. CV 1,7-4,1%.

6.3.6. BETA-CROSSLAPS (B-CTX)

Para la determinación del Beta-CrossLaps se empleó el test inmunológico Beta – CrossLaps en suero, que es un test inmunológico *in vitro* para la determinación cuantitativa de los productos de degradación del colágeno tipo 1 en suero. Es un ensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) concebido para su uso en los analizadores automáticos Elecsys y Cobas e de Roche Diagnostics®. CV 2,7-7,6%.

El CTX es el Telopéptido Carboxi terminal del colágeno tipo I. El inmunoensayo con el que se determinó reconoce un octapeptido de la cadena α -1 del colágeno tipo I, que contiene un aminoácido que forma parte de un enlace piridinolínico y otro aminoácido, un aspartico, que puede encontrarse en su forma natural alfa no isomerizada (α -CTX) o en su forma isomerizada beta (β -CTX o Beta-CrossLaps). En el adulto, aproximadamente un 70 % de las moléculas de colágeno tipo I del tejido óseo están isomerizadas, por lo que su presencia se asocia al envejecimiento de la molécula de colágeno.

6.3.7. TELOPÉPTIDO N-TERMINAL DEL COLÁGENO TIPO 1 (NTX)

La determinación del NTX en suero se realizó mediante la prueba en suero NTX de Osteomark®, que consiste en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas inhibitoras competitivas (ELISA/EIA) que permite una determinación cuantitativa de NTX en suero humano. La variabilidad intra-ensayo fue 4.6%. La variabilidad entre ensayos fue 6.9%. La precisión del ensayo se determinó analizando los dos niveles de control: para el nivel 1 el CV fue del 13.99% y para el nivel 2 fue 11.92%

	VALORES NORMALES MUJERES	VALORES NORMALES HOMBRES
FAos	18-25 años: 6-34 U/L Premenopausia: 11.6-29.6 U/L Postmenopausia: 14.2-42.7 U/L	18-25 años: 0-45 U/L >25 años: 15-41.3 U/L
OC	Premenopausia: 11-43 ng/ml Postmenopausia: 15-46 ng/ml	18-29 años: 24-70 ng/ml 30-50 años: 14-42 ng/ml >50 años: 14-46 ng/ml
P1NP	Premenopausia: 4.5-55.7 ng/ml Postmenopausia: 19.6-61.2 ng/ml	Todos: 11.4-80.6 ng/ml
B-CTX	Premenopausia: 0-0.3 ng/ml Postmenopausia: 0-0.56 ng/ml	Todos: 0-0.30 ng/ml
NTX	6.2-19 nmol/L	5.4-24.2 nmol/L

Tabla 2. Valores normales tomados como referencia para los distintos biomarcadores de remodelamiento óseo (suministrados por los fabricantes). FAos: fosfatasa alcalina ósea. OC: osteocalcina. P1NP: propéptido aminoterminal del protocógeno tipo 1. B-CTX: β -crossLaps. NTX: telopéptido N-terminal del colágeno tipo 1.

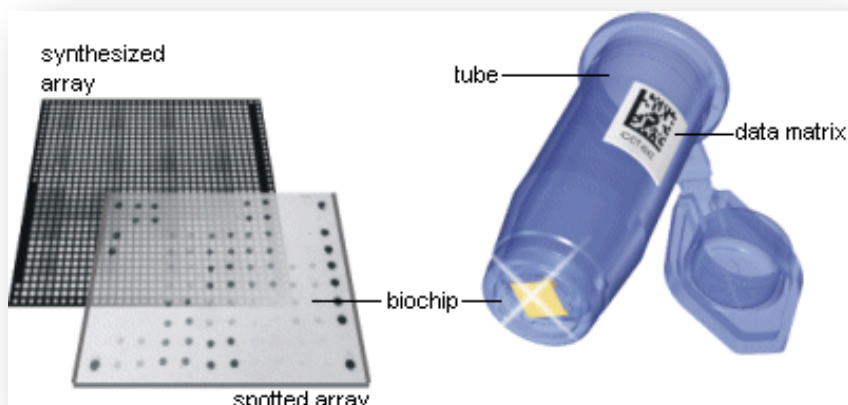
6.4 POLIMORFISMOS GENÉTICOS

El protocolo de trabajo constó de cinco procesos principales: extracción y purificación de ADN genómico, amplificación mediante PCR del ADN purificado, hibridación de los productos amplificados, lectura del array en el lector de tubos AT y determinación de los siguientes polimorfismos mediante un software específico.

- Gen del Colágeno tipo 1 (Col1A1): SNP Col1A1-SP1: Genotipos SS, Ss, ss.
- Gen del receptor de la vitamina D (VDR): SNP VDRB-Bsm I: Genotipos BB, Bb, bb.
- Gen del receptor de la vitamina D (VDR): SNP VDR-Fok I: Genotipos FF, Ff, ff.
- Gen del receptor de calcitonina (CTR): SNP CTR-Alu I: Genotipos AA, Aa, aa
- Gen del receptor de estrógenos (ER): SNP ESR1P-Pvu II: Genotipos PP, Pp, pp
- Gen del receptor de estrógenos (ER): SNP ESR1X-Xba I: Genotipos XX, Xx, xx.

Para el estudio de los polimorfismos se utilizó la muestra de sangre total con EDTA a partir de la cual se llevó a cabo la extracción del ADN. Para el diagnóstico *in vitro* del polimorfismo Col1A1 se empleó un kit comercial (CLART® Metabone, Genomica) que se basa en la amplificación de fragmentos específicos del genoma humano y la posterior detección mediante hibridación con sondas de captura específicas del gen. La detección del producto amplificado por PCR se llevó a cabo mediante una plataforma tecnológica llamada array en tubo (AT), que se basa en la adaptación de un microarray de baja densidad en la parte inferior de un tubo de ensayo tipo Eppendorf. La detección del SNP conlleva un mínimo de tres sondas que detectan la presencia de dos variantes posibles, y una zona común del gen.

El procesamiento de los resultados obtenidos a partir de cada uno de los arrays se realizó de forma automática en un lector de tubos AT (Clondiag Chip Technologies GmbH), y la interpretación de los mismos se llevó a cabo a través de un Software específico para CLART® MetaBone. Para resto de especificaciones, ver Anexo.



Para cada paciente obtuvimos su caracterización genotípica de cada uno de los polimorfismos estudiados, únicamente tras la visita basal:

- Col1A1 Sp1
- VDRB-BsmI
- VDR-FokI
- CTR-AluI
- ESR1P-PvuII
- ESR1X-XbaI

6.5 DENSITOMETRÍA

6.5.1. DENSITOMETRÍA BASAL

En los días posteriores a la visita basal (7-10 días), se realizó una densitometría femoral y lumbar mediante DEXA, con el densitómetro Norland®, modelo Excell Plus. Siempre se utilizó la misma máquina para cada paciente, y las densitometrías fueron realizadas por el mismo técnico. Se realizaron calibraciones diarias de la máquina siguiendo las indicaciones determinadas por el fabricante (ver anexo), mediante la realización de un fantoma previo a la exploración del paciente.

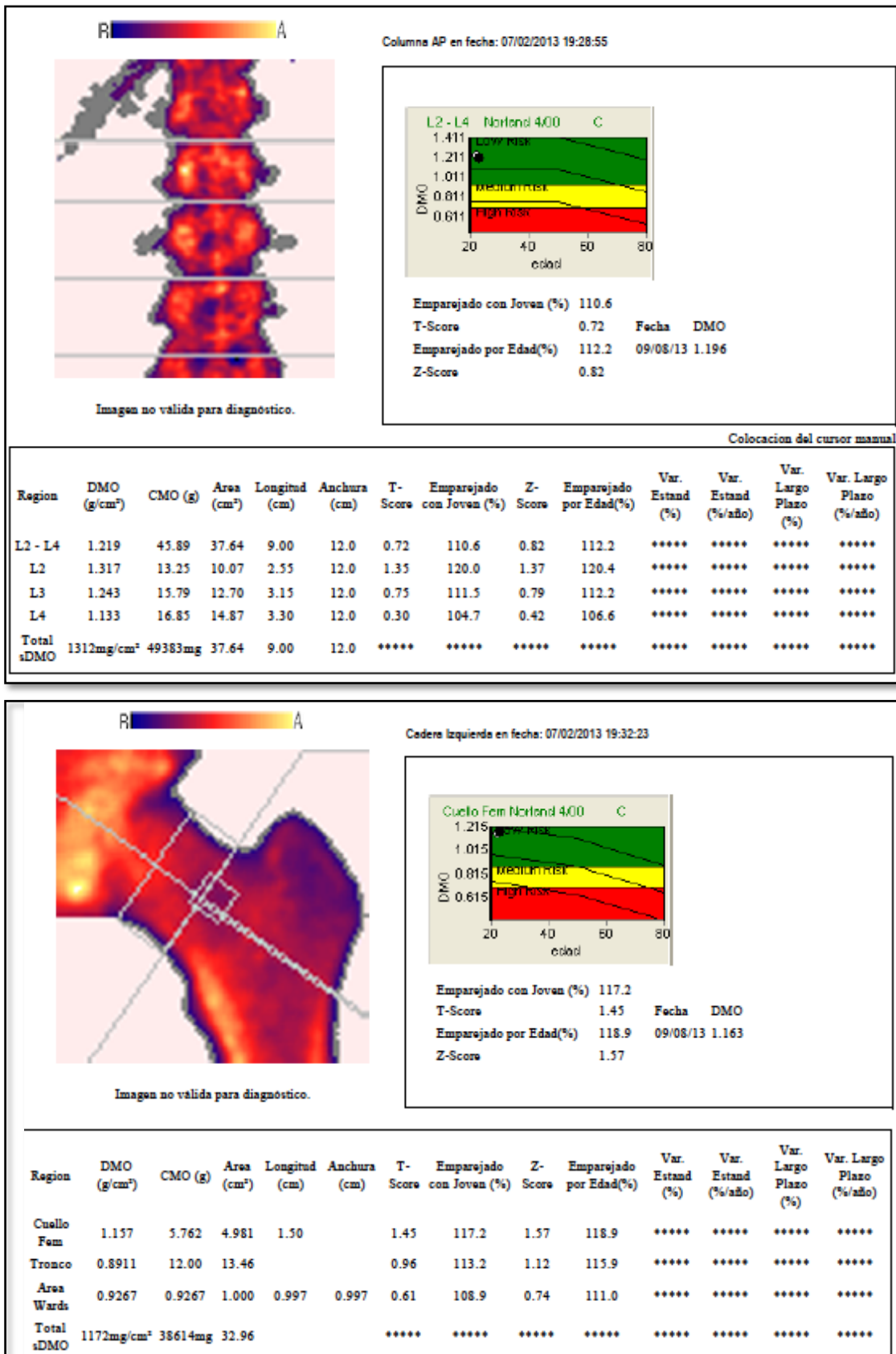


Figura 3. Ejemplo de informe de densitometría lumbar y femoral.

La densitometría se realizó a nivel lumbar con proyección anteroposterior y femoral izquierda, determinando los siguientes parámetros:

- DMO lumbar L2-L4 en g/cm^2
- sDMO lumbar total (L2-L4) en mg/cm^2
- T-score lumbar en desviaciones estándar
- Z-score lumbar en desviaciones estándar
- DMO cuello femoral izquierdo en g/cm^2
- T-score femoral en desviaciones estándar
- Z-score femoral en desviaciones estándar

Se calculó el cambio mínimo significativo (error debido a la precisión de la máquina, LSC) para cada uno de los pacientes, mediante la siguiente fórmula:

$$2 \times \sqrt{2} \times \text{CV}/100 \times \text{DMO}$$

Los Coeficientes de Variación (CV) medidos fueron los siguientes:

- CV femoral DMO: 1.2%
- CV lumbar DMO: 1.0%

El t-score y z-score se determinaron comparando los datos obtenidos de los pacientes con las bases de datos proporcionadas por el fabricante:

- Para el t-score femoral, se utilizó la base de datos extraída del NHANES III, correspondiente a mujeres caucásicas de 20 a 29 años.
- Para el t-score lumbar, se compararon los datos de DMO con los proporcionados por la base de datos propia del fabricante, según recomendaciones de la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (*Schousboe et al, 2013*).
- Para los z-score tanto femoral como lumbar, se compararon los datos de DMO con los proporcionados por la base de datos propia del fabricante, en función de rango de edad, raza y género.

Se seleccionó el t-score o el z-score como parámetro a analizar en función de las características del paciente: en mujeres antes de la menopausia y hombres menores de 50 años, se escogió el z-score mientras que en mujeres postmenopáusicas y hombres por encima de los 50 años se determinó el t-score, siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (*Schousboe et al, 2013*). Se generó así la variable z/t score, que fue seleccionada para los análisis posteriores.

Una vez obtenida la DMO femoral, se procedió al cálculo del FRAX® mediante la herramienta proporcionada por la OMS de forma gratuita en la dirección <http://www.shef.ac.uk/FRAX/tool.aspx?lang=sp>. Se calcularon las siguientes variables:

- Riesgo de fractura mayor a 10 años en %
- Riesgo de fractura de cadera a 10 años en %

Se calculó el riesgo de fractura osteoporótica mayor y fractura de cadera a 10 años introduciendo tanto los datos demográficos y factores de riesgo requeridos, como la DMO femoral determinada por la densitometría. En los pacientes menores de 40 años, asumimos la estimación generada por el programa, que asimila la edad del paciente a 40 años, como se ha hecho previamente en otros estudios con población epiléptica (*Beerhorst et al, 2013a*).

6.5.2. DENSITOMETRÍA DE CONTROL

Se repitió la densitometría durante los 7-10 días posteriores a la visita de control a los seis meses, en la misma máquina en la que se realizó la densitometría basal, y por el mismo técnico.

Consideramos la exposición a FAEs como un factor de alto recambio óseo, como se sugiere en los estudios de *Kim et al, 2007*; y *Bauer et al, 2013*, por lo que un espacio de seis meses entre densitometrías sería suficiente para detectar cambios relevantes en la DMO inducidos por la terapia iniciada (*Schousboe et al, 2013*).

Se volvió a calcular el riesgo de fractura mediante la herramienta FRAX® con el resultado de la segunda densitometría.

7. ASPECTOS ÉTICOS

Se realizó el estudio de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. El estudio se desarrolló de acuerdo con el protocolo y con los procedimientos normalizados de trabajo que aseguraron el cumplimiento de las normas de Buena Práctica Clínica, de acuerdo con las pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos (Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas CIOMS, Ginebra, 2002).

El investigador se comprometió a asegurar la intimidad y confidencialidad de los datos de carácter personal de los sujetos incluidos en el estudio, de conformidad a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la misma, así como la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica y documentos contenidos en el archivo.

El presente estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó para el análisis estadístico el paquete informático SPSS versión 21.0. Se realizó inicialmente un análisis factorial para detectar correlaciones entre las distintas variables y destacar componentes principales y posibles factores de confusión. Estos últimos fueron controlados mediante análisis múltiples de covarianza para cada uno de ellos.

Se realizó una estadística descriptiva de cada variable obteniéndose la distribución de frecuencias. En el caso de variables cuantitativas, se calcularán los parámetros característicos: media, mediana, cuarteles, desviación típica, máximo y mínimo.

La comparación de grupos se realizó mediante un análisis de varianza de una vía para datos independientes y transversales. El análisis de varianza fue de dos vías cuando se quiso neutralizar la influencia de una variable cualitativa como la suplementación con vitamina D o el tipo de FAE. El análisis fue de covarianza cuando se quiso neutralizar una variable cuantitativa, como la glucemia. Estos análisis de varianza se complementaron con contrastes de igualdad de pares de medias con el método DMS (mínima diferencia significativa) con la corrección de Bonferroni.

Para comparar medias de datos apareados se usó el test de la t-Student para datos apareados. La comparación de proporciones para datos apareados se realizó mediante el test de Mc Nemar.

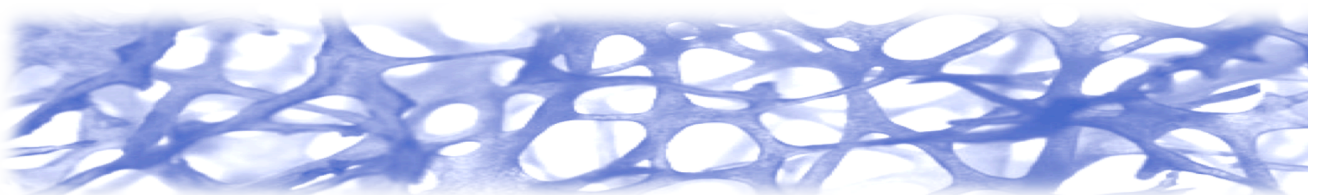
La relación entre variables cualitativas se realizó mediante análisis de tablas de contingencia con el test de la χ^2 de Pearson. Se complementó con un análisis de residuos para determinar las tendencias asociativas.

Se utilizó modelos de regresión y correlación lineal obteniendo el coeficiente de correlación de Pearson.

Se realizaron análisis multivariantes para el estudio de los factores de confusión. La comparación de grupos en función de varias variables (cualitativas y cuantitativas) se analizaron mediante un análisis de covarianza.

Los valores se redondearon con dos decimales. Se utilizó un nivel de significación estadística de 0,05 para todas las pruebas realizadas.

RESULTADOS.



1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MUESTRA

1.1. DATOS DE SEGUIMIENTO

En todos los pacientes estudiados, la dosis de vitamina D/calcio fue de **400 UI de colecalciferol y 1500 mg de carbonato cálcico**. Se asumió un mismo tratamiento para todos los pacientes del grupo suplementado (grupo VitD) en los análisis siguientes.

A tres pacientes se les realizó un cambio de tratamiento durante el estudio (5%): en dos casos se redujo la dosis de LEV hasta suspenderlo (por lo que no quisieron realizar la analítica y densitometría de control) y en uno se cambió LEV por LCM al quinto mes de estudio. Ningún paciente presentó crisis epilépticas durante el periodo de seguimiento, ni fracturas.

Cinco pacientes refirieron presentar enfermedades endocrinas, que en los 5 casos fue hipotiroidismo. Los parámetros de TSH y T4 libre estaban dentro de límites normales, por lo que no cumplían criterios de exclusión.

Las dosis medias por FAEs fueron las siguientes: CBZ: 629 mg/d (rango 400-800 mg/d); PHT: 300 mg/d; VPA: 1169 mg/d (rango 500-1600 mg/d); LEV: 1325 mg/d (rango 500-3000 mg/d); ESL: 1000 mg/d (rango 800-1200 mg/d) y LCM 200 mg/d.

1.2. COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS DE ESTUDIO: VARIABLES CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS BASALES Y A LOS SEIS MESES

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos a nivel basal en cuanto a variables demográficas, antropométricas, antecedentes personales o historia de epilepsia, salvo en el caso de la proporción de fumadores, que fue mayor en el grupo no tratado (61% vs 17% en grupo tratado, $p = 0,043$). Tampoco se encontraron diferencias en los meses de tratamiento, años de epilepsia, ni en la actividad física o el tipo de piel (Tabla 1.1).

En cuanto al IMC, no se detectaron diferencias entre el grupo tratado y el grupo control, ni a nivel basal ni tras los seis meses de estudio.

		FRECUENCIA (N)		CHI-CUADRADO	SIGNIFICACIÓN
		VITD	CONTROL		
SEXO	hombre	17	25	0,147	0,702
	mujer	10	12		
ESTADO HORMONAL	hombre	17	25	1,737	0,420
	menstruación activa	4	8		
	postmenopausia	6	4		
ANTECEDENTES OSTEOPOROSIS	no	22	30	0,002	0,968
	sí	5	7		
HTA	no	23	35	1,627	0,202
	sí	4	2		
DM	no	25	35	0,107	0,744
	sí	2	2		
DLP	no	20	32	1,579	0,209
	sí	7	5		
FUMADOR ACTIVO	no	23	23	4,093	0,043*
	sí	4	14		
HÁBITO ENÓLICO	no	27	35	1,507	0,220
	sí	0	2		
ENFERMEDADES ENDOCRINAS	no	26	33	1,095	0,295
	sí	1	4		
TIPO DE CRISIS	generalizadas	11	15	0	0,987
	focales	13	14	0,68	0,409
	convulsiones bilat	5	12	1,549	0,213
ETIOLOGÍA	genética	5	9	0,37	0,831
	estructural	15	20		
	desconocida	7	8		
TIPO FAE	clásico	13	16	0,142	0,697
	nuevo	14	21		
FAE	CBZ	5	2	9,648	0,086
	PHT	3	1		
	VPA	5	13		
	LEV	14	16		
	ESL	0	4		
	LCM	0	1		

Tabla 1.1. Comparación de variables cualitativas entre el grupo tratado y el grupo control, mediante el test de Chi-cuadrado. * p > 0.05. HTA: Hipertensión. DM: diabetes. DLP: dislipemia. FAE: fármaco antiepiléptico. VITD: grupo tratado con vitamina D y calcio.

En el grupo tratado se halló una mayor proporción de pacientes en tratamiento con CBZ con respecto al otro grupo (19% vs 5%), mientras que en el no tratado predominaban los pacientes con VPA (35% vs 19%), y cuatro pacientes con ESL (ausentes en el grupo tratado), pero estas diferencias no alcanzaron significación estadística. La proporción de pacientes en tratamiento con LEV en el grupo tratado y control fue similar (52% vs 43%).

No se produjeron cambios significativos entre la actividad física basal y a los seis meses en ninguno de los dos grupos. Tampoco se detectaron diferencias significativas en cuanto a la toma de FAEs previos distintos al actual –tomados hasta, al menos, un año antes de la inclusión en el estudio- entre los dos grupos. Los FAEs referidos fueron: PHT (3 pacientes en el grupo tratado y 2 pacientes en el grupo control; CBZ: 1:3, respectivamente; VPA: 0:1; LTG 0:1; Etosuximida 1:0).

		FRECUENCIA (N)		CHI-CUADRADO	SIGNIFICACIÓN
		VITD	CONTROL		
ACTIVIDAD FÍSICA**	1	8	7	2,407	0,661
	2	4	6		
	3	5	4		
	4	5	10		
	5	5	10		
TIPO DE PIEL***	I	0	0	3,524	0,318
	II	10	8		
	III	15	21		
	IV	2	7		
	V	0	1		
	VI	0	0		
MEDICACIÓN CONCOMITANTE	ninguna	17	26	9,018	0,173
	horm tiroideas	0	4		
	estatinas	4	3		
	anti-HTA	3	1		
	otros	3	3		
FAES PREVIOS	no	22	30	0,002	0,968
	sí	5	7		

Tabla 1.1 (continuación). Comparación de variables cualitativas entre el grupo tratado y el grupo control, mediante el test de Chi-cuadrado. * $p > 0.05$. *** según la clasificación de actividad definida en Material y Métodos sección 6.1.3. ***según la escala de fototipos de Fitzpatrick.

La cantidad cuantificada de ingesta de vitamina D en la dieta según la encuesta nutricional realizada durante los tres días previos (Tabla 1.2), reveló una diferencia estadísticamente significativa, siendo mayor en el grupo tratado que en el grupo no tratado, a nivel basal ($6,14 \pm 2,64$ vs $4,43 \pm 3,42$ μg , $p = 0.038$). Si aplicamos la fórmula de conversión a UI (Holick, 2011), por la que 1 μg equivale a 40 UI, obtenemos una media de ingesta en los pacientes del grupo tratado de 245,6 UI a nivel basal, frente a 177,2 UI para el grupo control. Es decir, los pacientes que posteriormente tomaron suplementos de vitamina D y calcio ya tomaban una mayor cantidad de vitamina D en la dieta. Sin embargo, esta diferencia no se mantuvo a los seis meses.

	GRUPO VITD (27)	GRUPO CONTROL (37)	Significación
EDAD	44,48 ± 17,66	39,43 ± 14,14	0,209
PESO BASAL (kg)	76,54 ± 13,37	80,07 ± 20,52	0,438
PESO 6M (kg)	76,21 ± 13,89	79,57 ± 19,31	0,458
TALLA (m)	1,69 ± 0,09	1,71 ± 0,10	0,276
IMC BASAL (kg/m ²)	27 ± 4,62	27,10 ± 5,70	0,937
IMC 6M (kg/m ²)	26,95 ± 4,83	27,18 ± 5,70	0,866
AÑOS DE EPILEPSIA	10,02 ± 10,79	10,32 ± 7,65	0,895
MESES DE TRATAMIENTO	62,30 ± 63,98	73,65 ± 66,96	0,498
DIETA VITAMINA D BASAL (µg)	6,14 ± 2,64	4,43 ± 3,42	0,038*
DIETA VITAMINA D 6M (µg)	7,04 ± 6,17	5,18 ± 4,62	0,208
DIETA CALCIO BASAL (mg)	859,41 ± 281,31	810,87 ± 308,53	0,525
DIETA CALCIO 6M (mg)	875,20 ± 331,66	916,96 ± 540,45	0,725

Tabla 1.2. Comparación de variables cuantitativas entre el grupo tratado y el grupo control mediante el test de la t-student para variables independientes. IMC: índice de masa corporal. 6M: 6 meses. *p<0,05

1.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS GENERALES EN GRUPO TRATADO Y GRUPO CONTROL

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros bioquímicos generales estudiados entre el grupo tratado y el grupo control. Los valores se detallan en la tabla a continuación (Tabla 1.3).

	GRUPO VITD	GRUPO CONTROL	Significación
Glucosa basal	96,22 ± 17,62	93,51 ± 18,74	0,560
Glucosa 6m	95,08 ± 20,36	92,42 ± 19,04	0,612
Urea basal	33,3 ± 9,43	33,32 ± 9,23	0,997
Urea 6m	32,68 ± 8,54	34,58 ± 12,14	0,508
Creatinina basal	0,79 ± 0,20	0,84 ± 0,14	0,337
Creatinina 6m	0,82 ± 0,22	0,84 ± 0,15	0,373
Proteínas totales basales	7,33 ± 0,43	7,35 ± 0,42	0,814
Proteínas totales 6m	7,12 ± 0,45	6,96 ± 0,62	0,565
Calcio basal	9,67 ± 0,36	9,74 ± 0,32	0,428
Calcio 6m	9,66 ± 0,36	9,61 ± 0,42	0,680
Fósforo basal	3,52 ± 0,49	3,48 ± 0,54	0,775
Fósforo 6m	3,46 ± 0,77	3,64 ± 0,83	0,413
Colesterol basal	192,67 ± 37,004	188,84 ± 31,79	0,659
Colesterol 6m	184,32 ± 42,07	187,97 ± 36,8	0,726
HDL basal	65,33 ± 24,77	56,95 ± 15,70	0,130
HDL 6m	61,20 ± 22,03	57,52 ± 17,88	0,485
LDL basal	108,44 ± 33,39	111,70 ± 27,05	0,668
LDL 6m	104,44 ± 37,85	108,30 ± 32,58	0,678
Triglicéridos basal	94,48 ± 47,27	100,49 ± 58,92	0,664
Triglicéridos 6m	92,64 ± 54,07	110,58 ± 60,54	0,247
GOT basal	20,26 ± 5,06	21,65 ± 8,76	0,463
GOT 6m	19,05 ± 3,95	21,82 ± 12,03	0,230
GPT basal	21,07 ± 7,82	24,43 ± 14,72	0,243
GPT 6m	19,44 ± 6,74	25,73 ± 22,84	0,142
Fosfatasa alcalina basal	76,41 ± 24,22	69,46 ± 17,67	0,189
Fosfatasa alcalina 6m	69,44 ± 23,06	66,12 ± 17,45	0,535
GGT basal	25 ± 14,16	28 ± 20,02	0,508
GGT 6m	25,72 ± 20,92	35,27 ± 37,84	0,226
Folato basal	8,52 ± 3,64	9,90 ± 4,46	0,192
Folato 6m	8,56 ± 3,88	8,54 ± 3,43	0,984
Vitamina B12 basal	552,81 ± 232,02	549,49 ± 199,10	0,951
Vitamina B12 6m	568,25 ± 216,08	520,73 ± 183,83	0,375
Homocisteína basal	11,24 ± 2,25	10,61 ± 3,25	0,390
Homocisteína 6m	10,63 ± 2,53	11,16 ± 3,56	0,533
T4 basal	1,18 ± 0,17	1,20 ± 0,21	0,657
T4 6m	1,18 ± 0,14	1,23 ± 0,16	0,245
TSH basal	2,17 ± 0,79	2,32 ± 1,69	0,636
TSH 6m	2,21 ± 0,83	2,43 ± 1,13	0,409

Tabla 1.3. Comparación de parámetros bioquímicos generales entre el grupo tratado y el grupo control mediante t-student para variables independientes. 6m: 6 meses.

2. ANÁLISIS FACTORIAL

Realizamos un análisis factorial en el que se destacó una distribución de las variables en siete componentes, que detallamos a continuación. Este análisis orientó el esquema de relaciones entre los posibles factores relevantes y otros factores de confusión con las variables principales del estudio, tanto densitométricas como bioquímicas (biomarcadores de remodelación óseo y niveles de vitamina D).

- **Primer componente:**
 - sDMO lumbar basal
 - DMO lumbar basal
 - sDMO lumbar 6m
 - DMO lumbar 6m
 - T-score lumbar basal
 - T-score lumbar 6m
 - Z-score lumbar basal
 - Z-score lumbar 6m
 - Z/T score lumbar basal
 - Z/T score lumbar 6m
 - sDMO femoral basal
 - sDMO femoral 6m
 - FAE clásico/nuevo
- **Segundo componente:**
 - FRAX HF basal
 - FRAX HF 6m
 - DMO femoral 6m
 - DMO femoral basal
 - T-score femoral basal
 - T-score femoral 6m
 - Z-score femoral basal
 - Z-score femoral 6m
 - Z/T score femoral basal
 - Z/T score femoral 6m
 - Edad
 - Fósforo 6m
 - HTA
 - FRAX MO basal
 - Urea 6m
 - Homocisteína basal
 - Tabaquismo
 - Hábito enólico
 - Folato basal
 - Proteínas totales
- Enfermedades endocrinas
- **Tercer componente:**
 - LDL basal
 - Colesterol basal
 - Colesterol 6m
 - LDL 6m
 - IMC basal
 - IMC 6m
 - Peso basal
 - Peso 6m
 - TG 6m
 - Folato 6m
 - FAos diferencia basal-6m
 - TSH 6m
 - GPT 6m
 - Vitamina D diferencia basal-6m
 - IMC diferencia basal-6m
 - GOT 6m
- **Cuarto componente:**
 - glucosa basal
 - glucosa 6m
 - sDMO femoral diferencia basal-6m
 - DMO femoral diferencia basal-6m
 - Z/T score diferencia basal-6m
 - DLP
 - TG basal
 - OC 6m
 - GGT basal
 - GGT 6m
 - CTX basal

- Calcio basal
- NTX basal
- GOT basal
- **Quinto componente:**
 - vitamina D 6m
 - FAos basal
 - FAos 6m
 - Vitamina D basal
 - FA 6m
 - NTX 6m
 - CTX diferencia basal-6m
 - NTX diferencia basal-6m
 - Crisis generalizadas
 - PTH basal
 - Creatinina 6m
 - Proteínas totales 6m
 - Crisis focales
 - CTX 6m
 - PTH 6m
 - T4 basal
 - GPT basal
 - Urea basal
- **Sexto componente:**
 - sexo
 - talla
 - T4 6m
 - HDL basal
 - Creatinina basal
- P1NP 6m
- HDL 6m
- FRAX MO 6m
- Homocisteína 6m
- Dieta calcio basal
- Dieta vitamina D basal
- Antecedentes osteoporosis
- Calcio 6m
- FAEs previos
- Dieta vitamina D 6m
- Diabetes
- **Séptimo componente:**
 - P1NP diferencia basal-6m
 - OC diferencia basal-6m
 - Z/T lumbar diferencia basal-6m
 - sDMO lumbar diferencia basal-6m
 - DMO lumbar diferencia basal-6m
 - OC basal
 - P1NP basal
 - Vitamina B12 basal
 - Años de epilepsia
 - TSH basal
 - Vitamina B12 6m
 - Fósforo basal
 - Meses de tratamiento

Se desecharon las últimas variables de los componentes (o colas) para los análisis siguientes, ya que la correlación era muy pequeña.

3. ESTUDIO DE POSIBLES FACTORES DE CONFUSIÓN

En base a los hallazgos del análisis factorial, se estudiaron los posibles factores de confusión como el género, los meses de tratamiento, los niveles de homocisteína,

vitamina B12, ácido fólico, glucemia y otros antecedentes personales como edad, tabaquismo, alcoholismo, hipertensión arterial y dislipemia.

3.1. GÉNERO

En la población estudiada, las mujeres presentaron menores DMO tanto a nivel femoral como a nivel lumbar, basales y a los seis meses (femoral basal: 0.82 ± 0.14 vs 0.98 ± 0.18 g/m², $p = 0.001$; femoral 6 meses: 0.84 ± 0.14 vs 0.96 ± 0.18 g/m², $p = 0.006$; lumbar basal: 0.98 ± 0.13 vs 1.13 ± 0.21 g/m², $p < 0.001$; lumbar 6 meses: 0.97 ± 0.3 vs 1.12 ± 0.19 g/m², $p = 0.002$). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres en la evolución sufrida por la DMO a los seis meses (aumento o disminución), tanto a nivel femoral como a nivel lumbar (Figura 3.1). La z/t femoral y lumbar también fue menor en mujeres (femoral basal: -0.23 ± 1.14 vs 0.61 ± 1.69 , $p = 0.022$; femoral 6 meses: -0.07 ± 1.05 vs 0.40 ± 1.47 , *ns*; lumbar basal: -0.68 ± 1.09 vs 0.69 ± 1.68 , $p = 0.001$; lumbar 6 meses: -0.70 ± 1.14 vs 0.57 ± 1.52 , $p = 0.001$), pero tampoco se encontró diferencias estadísticamente significativas ente géneros en la evolución de este parámetro a los 6 meses (Figura 3.2).

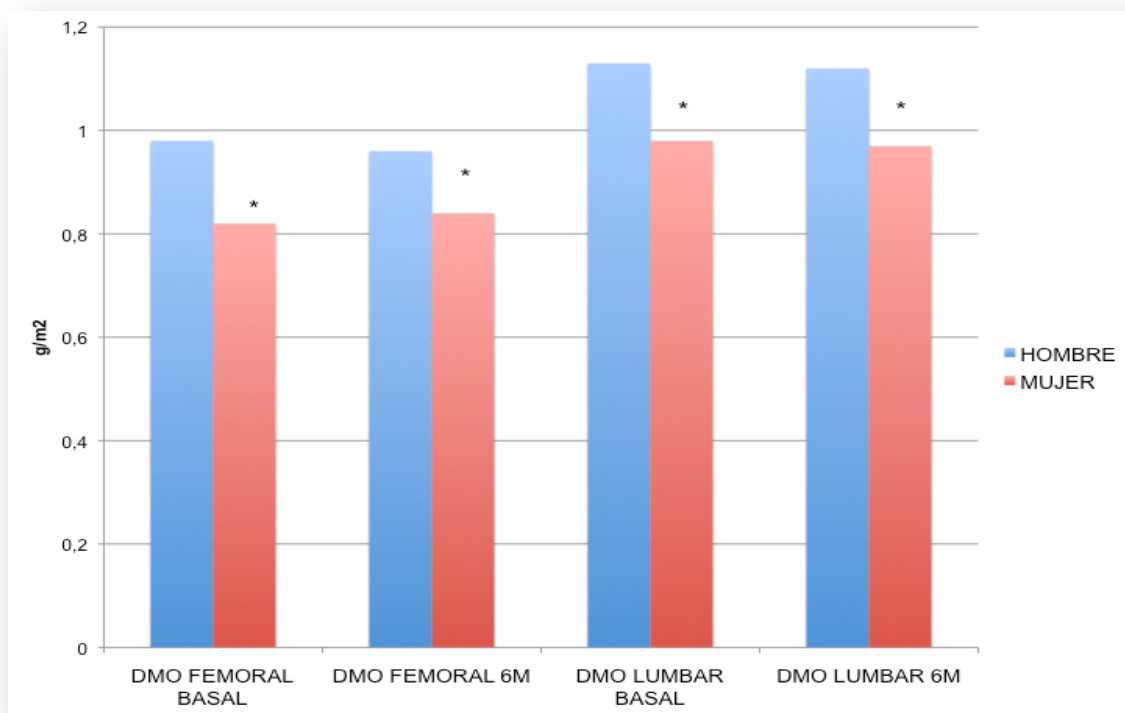


Figura 3.1. Densidad mineral ósea (DMO) en hombres y mujeres a nivel basal y a los 6 meses (femoral y lumbar) * $p < 0.05$

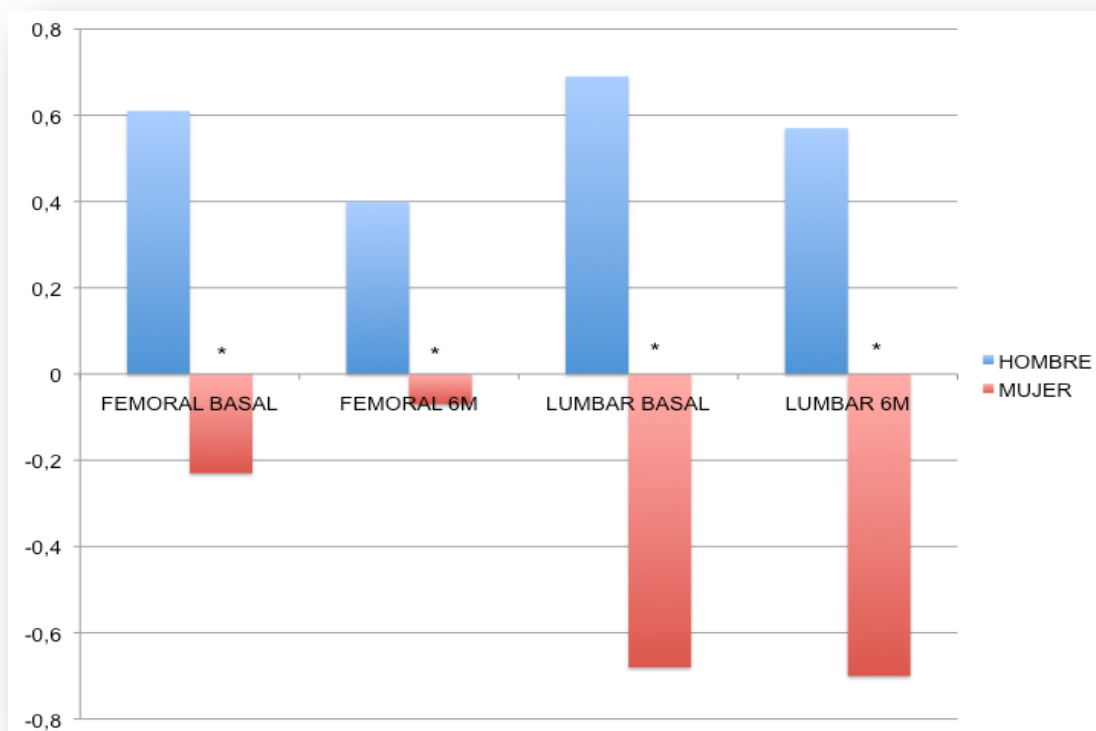


Figura 3.2. Valor del z/t score en hombres y en mujeres, a nivel basal y a los 6 meses (femoral y lumbar) * $p < 0.05$

3.2. MESES DE TRATAMIENTO

Se realizó un análisis de correlación entre los meses de tratamiento y las diferentes variables densitométricas y biomarcadores de remodelación ósea, en toda la muestra, no encontrando ninguna correlación significativa excepto, de forma aislada, para la diferencia de osteocalcina entre la determinación basal y a los seis meses, con un coeficiente de correlación de Pearson $R = 0,31$ ($p = 0,018$).

En el grupo tratado, se encontró una correlación positiva entre los meses de tratamiento y el aumento de DMO lumbar tras los 6 meses ($R = 0,392$, $p = 0,047$) pero no se correlacionó de forma significativa con los valores basales de DMO lumbar ni femoral. Tampoco se detectó ninguna correlación significativa entre los meses de tratamiento y el resto de parámetros en este grupo.

En el grupo control, no se encontraron correlaciones significativas con los meses de tratamiento salvo con los valores de osteocalcina basales, que presentaron una correlación negativa ($R = -0,343$, $p = 0,037$)

3.3. NIVELES DE HOMOCISTEÍNA

Se compararon las medias de homocisteína entre los dos grupos estudiados, tanto a nivel basal como a los seis meses y las diferencias entre ellas, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

	GRUPO VITD	GRUPO CONTROL	Significación bilateral
HOMOCISTEÍNA BASAL	11,24 ± 2,25	10,61 ± 3,25	0,191
HOMOCISTEINA 6M	10,63 ± 2,53	11,16 ± 3,56	0,275
HOMOCISTEÍNA DIFERENCIA	-0,64 ± 2,10	0,33 ± 3,62	0,273

Tabla 3.4. Comparación de niveles de homocisteína séricos entre el grupo tratado y el grupo control, mediante la prueba t-student para variables independientes.

3.4. TABAQUISMO

Se analizó la influencia del hábito tabáquico en los pacientes incluidos en el estudio sobre los parámetros bioquímicos y densitométricos. 18 pacientes presentaban hábito tabáquico activo en el momento del estudio, cuatro de ellos fueron suplementados con vitamina D y calcio y 14 fueron seguidos como controles. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los fumadores y los no fumadores en cuanto a medias de DMO lumbar o femoral, tanto basal como a los 6 meses, t-score o z-score lumbar y femoral (basal y 6 meses), ni en cuanto a los marcadores de remodelación óseo basales o a los 6 meses. Tampoco se observaron cambios significativos en los niveles de vitamina D basales o a 6 meses.

3.5. OTROS FACTORES DE CONFUSIÓN: VARIABLES CUALITATIVAS

Se realizó un ANOVA de dos vías para analizar la posible influencia de las siguientes variables sobre la evolución de los biomarcadores de remodelación ósea y los parámetros densitométricos tras los 6 meses, en función de pertenecer al grupo tratado o el grupo control:

- Hipertensión arterial
- Dislipemia
- Hábito enólico
- Antiepiléptico clásico o de nueva generación

Únicamente se consiguieron destacar relaciones significativas en los parámetros que se detallan a continuación:

- el único factor que se relacionó de forma independiente con el cambio en los niveles de osteocalcina fue el tratamiento con un antiepiléptico clásico o de nueva generación ($p = 0,025$)
- la evolución de la DMO femoral se relacionó de forma independiente con la suplementación con vitamina D ($p = 0,003$), el tratamiento con un FAE clásico o de nueva generación ($p = 0,039$) y con la DLP ($p = 0,009$). En el caso de la z/t-score femoral, se mantuvieron los mismos factores: suplementación con vitamina D ($p = 0,006$) y DLP ($p = 0,033$), aunque el tratamiento con FAE clásico o de nueva generación no alcanzó la significación estadística ($p = 0,066$)
- el cambio en los niveles de vitamina D, en el resto de biomarcadores de remodelación ósea y de los parámetros densitométricos lumbares no se relacionaron con ningún factor de forma independiente.

3.6. OTROS FACTORES DE CONFUSIÓN: VARIABLES CUANTITATIVAS

Se procedió a realizar un análisis de covarianza para variables cuantitativas para determinar las posibles influencias de los niveles de vitamina B12, folato, TSH, glucemia, edad, IMC y años de epilepsia. Al ajustar por estos factores de confusión, la suplementación con vitamina D se destacó como un variable relacionada de forma independiente con los cambios en los niveles de CTX ($p = 0,009$) y de OC ($p = 0,019$), mientras que la edad fue la única que se relacionó con la FAos ($p = 0,020$). Los parámetros densitométricos no mostraron estar influenciados por ninguno de los factores analizados.

Cabe destacar que la variación de los niveles de vitamina D séricos se vieron influidos por la glucemia, tanto basal ($p = 0,013$) como a los 6 meses ($p = 0,018$), por lo que incluimos las dos variables de glucemia como factores de confusión a tener en cuenta en los análisis siguientes. La suplementación con vitamina D no alcanzó la significación estadística, aunque sí mostró una tendencia a la significación ($p = 0,067$).

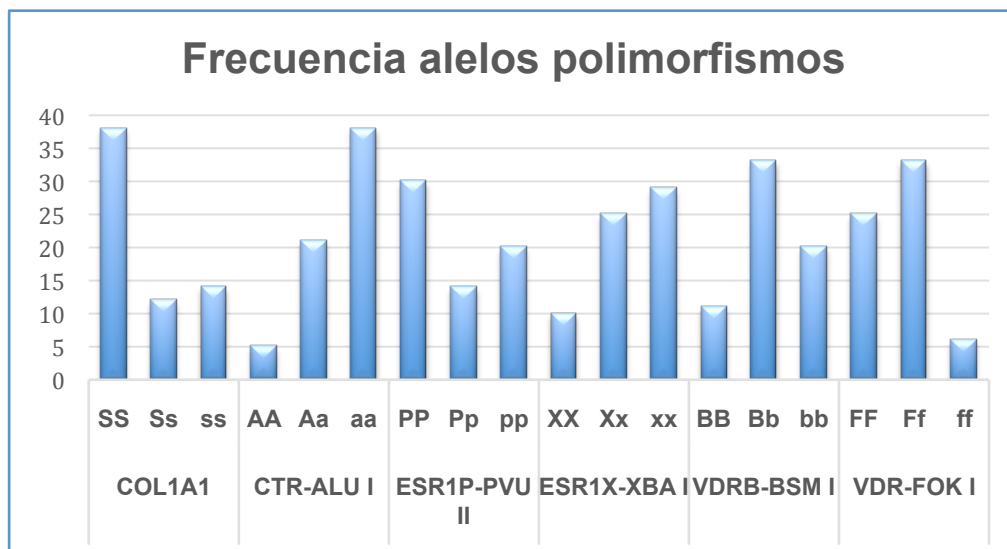
4. POLIMORFISMOS GENÉTICOS

4.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MUESTRA

La distribución de los polimorfismos genéticos asociados al metabolismo óseo en la población de estudio se describe en la tabla a continuación (Tabla 4.1 y Gráfica 4.1).

POLIMORFISMO	Alelos	Frecuencia	Porcentaje	Total
COL1A1	SS	38	59,4	64
	Ss	12	18,7	
	ss	14	21,9	
CTR-ALU I	AA	5	7,8	64
	Aa	21	32,8	
	aa	38	59,4	
ESR1P-PVU II	PP	30	46,9	64
	Pp	14	21,9	
	pp	20	31,3	
ESR1X-XBA I	XX	10	15,6	64
	Xx	25	39,1	
	xx	29	45,3	
VDRB-BSM I	BB	11	17,2	64
	Bb	33	51,6	
	bb	20	31,3	
VDR-FOK I	FF	25	39,1	64
	Ff	33	51,6	
	ff	6	9,4	

Tabla 4.1 Distribución por alelos para cada polimorfismo del metabolismo óseo estudiado, de toda la muestra.



Gráfica 4.1. Distribución de frecuencias de cada polimorfismo del metabolismo óseo estudiado, en toda la muestra

4.2. POLIMORFISMOS EN EL GRUPO VITAMINA D/CONTROL

Se compararon las frecuencias de los distintos polimorfismos genéticos entre los pacientes del grupo tratado y los del grupo control, y no encontrando ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Tabla 4.2).

		Vit D		Total	Chi-cuadrado	Significación
		Sí	No			
COL1A1	SS	14	24	38	1.096	0,295
	Ss/ss	13	13	26		
CTR-ALU I	AA	3	2	5	0.795	0,672
	Aa	8	13	21		
	aa	16	22	38		
ESR1P-PVU II	PP	12	18	30	0.8	0,670
	Pp	5	9	14		
	pp	10	10	20		
ESR1X-XBA I	XX	4	6	10	0.853	0,653
	Xx	9	16	25		
	xx	14	15	29		
VDRB-BSM I	BB	4	7	11	0.219	0,896
	Bb	14	19	33		
	bb	9	11	20		
VDR-FOK I	FF	10	15	25	0.2	0,905
	Ff	14	19	33		
	ff	3	3	6		

Tabla 4.2. Comparación de frecuencias de cada uno de los alelos para los polimorfismos del metabolismo óseo entre el grupo tratado y control, mediante la prueba Chi-cuadrado.

Se realizó un ANOVA de dos vías para cada uno de los polimorfismos y de los parámetros densitométricos, teniendo en cuenta la suplementación con vitamina D y ajustando siempre con la glucemia basal y a los 6 meses como factor de confusión. Los resultados obtenidos se desglosan a continuación por polimorfismos.

4.2.1. POLIMORFISMO DEL GEN COL1A1

No se encontró una relación entre los distintos polimorfismos del gen COL1A1 y la DMO femoral o lumbar, z/t femoral o lumbar, ni con la evolución de los niveles de vitamina D.

4.2.2. POLIMORFISMO DEL GEN CTR-ALUI

Tampoco se encontró ninguna relación entre los polimorfismos del gen CTR ALUI y la DMO femoral o lumbar ni con la z/t femoral o lumbar. Por el contrario, sí que se detectó una distinta evolución en los niveles de vitamina D séricos entre los grupos AA, Aa y aa, en función de si habían tomado suplementación con vitamina D o no ($p = 0,017$), pero los resultados del ANOVA indicaron que esta diferencia no era debida al propio polimorfismo (Tabla 4.3).

CTR ALUI	GRUPO VITD	GRUPO CONTROL
AA	6,90 ± 10,32	-0,80 ± 1,14
Aa	5,37 ± 4,14	3,01 ± 4,55
aa	6,20 ± 4,44	5,12 ± 7,56

Tabla 4.3. Diferencias entre los niveles basales de vitamina D y a los 6 meses, expresadas en medias (ng/ml) ± desviación estandar, en función del tipo de polimorfismo del gen CTR ALUI y la suplementación de vitamina D.

4.2.3. POLIMORFISMO DEL GEN ESR1P-PVU

El polimorfismo del gen ESR1P-PVU sí que se relacionó con los cambios en la z/t femoral de forma independiente ($p = 0,046$), así como la toma de suplementación con vitamina D ($p = 0,031$). La DMO femoral también mostró una tendencia a la significación ($p = 0,068$), pero no así los parámetros lumbares o los niveles de vitamina D (Tabla 4.4).

		PP	Pp	pp
DMO FEMORAL (g/m ²)	VITD	-0,02 ± 0,12	0,12 ± 0,16	0,01 ± 0,05
	CONTROL	0,001 ± 0,05	-0,03 ± 0,05	-0,02 ± 0,05
Z/T FEMORAL	VITD	-0,09 ± 1,01	0,97 ± 1,33	0,06 ± 0,65
	CONTROL	-0,20 ± 0,59	-0,19 ± 0,40	-0,21 ± 0,40
DMO LUMBAR (g/m ²)	VITD	0,02 ± 0,05	0,01 ± 0,07	0,02 ± 0,05
	CONTROL	-0,02 ± 0,06	0,002 ± 0,06	0,02 ± 0,05
Z/T LUMBAR	VITD	0,2 ± 0,4	0,13 ± 0,57	0,15 ± 0,53
	CONTROL	-0,23 ± 0,54	-0,005 ± 0,57	0,12 ± 0,56

Tabla 4.4. Diferencias entre los valores de DMO y z/t femoral y lumbar basales y a los 6 meses, expresadas en medias (g/m²) ± desviación estandar, en función del tipo de polimorfismo del gen ESR1P PVU y la suplementación de vitamina D.

4.2.4. POLIMORFISMO DEL GEN ESR1X-XBA

En el caso del polimorfismo del receptor para estrógenos ESR1X, el ANOVA reveló que, ajustando según este polimorfismo, se destacaba la suplementación con vitamina D como factor independiente relacionado con el cambio de las z/t femorales y lumbares ($p = 0,017$ y $0,031$ respectivamente) y el cambio de la DMO lumbar ($p = 0,044$).

		XX	Xx	xx
DMO FEMORAL (g/m ²)	VITD	0,09 ± 0,16	0,02 ± 0,18	0,01 ± 0,04
	CONTROL	-0,04 ± 0,04	0,002 ± 0,06	-0,02 ± 0,02
Z/T FEMORAL	VITD	0,93 ± 1,44	0,19 ± 1,43	0,06 ± 0,58
	CONTROL	-0,62 ± 0,45	-0,09 ± 0,55	-0,20 ± 0,35
DMO LUMBAR (g/m ²)	VITD	-0,0009 ± 0,09	0,03 ± 0,06	0,01 ± 0,05
	CONTROL	-0,05 ± 0,03	-0,008 ± 0,07	0,01 ± 0,05
Z/T LUMBAR	VITD	0,05 ± 0,81	0,23 ± 0,48	0,16 ± 0,47
	CONTROL	-0,57 ± 0,19	-0,09 ± 0,58	0,09 ± 0,52

Tabla 4.5. Diferencias entre los valores de DMO y z/t femoral y lumbar basales y a los 6 meses, expresadas en medias (g/m²) ± desviación estandar, en función del tipo de polimorfismo del gen ESR1X XBA y la suplementación de vitamina D.

4.2.5. POLIMORFISMO DEL GEN VDR-BSM

Ajustando según el polimorfismo del receptor de vitamina D, se encontró de nuevo que la suplementación con vitamina D fue un factor relacionado de forma independiente con el cambio de los parámetros lumbares (DMO lumbar: $p = 0,028$; z/t lumbar: $p = 0,040$).

		BB	Bb	bb
DMO FEMORAL (g/m ²)	VITD	0,004 ± 0,10	0,05 ± 0,13	-0,03 ± 0,09
	CONTROL	0,01 ± 0,03	-0,02 ± 0,04	-0,003 ± 0,05
Z/T FEMORAL	VITD	0,05 ± 0,83	0,47 ± 1,06	-0,22 ± 0,93
	CONTROL	0,03 ± 0,47	-0,27 ± 0,42	-0,22 ± 0,60
DMO LUMBAR (g/m ²)	VITD	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,06	0,01 ± 0,04
	CONTROL	-0,04 ± 0,05	0,01 ± 0,07	-0,006 ± 0,06
Z/T LUMBAR	VITD	0,42 ± 0,21	0,12 ± 0,57	0,10 ± 0,38
	CONTROL	-0,35 ± 0,43	0,02 ± 0,64	0,01 ± 0,42

Tabla 4.6. Diferencias entre los valores de DMO y z/t femoral y lumbar basales y a los 6 meses, expresadas en medias (g/m²) ± desviación estandar, en función del tipo de polimorfismo del gen VDR BSM y la suplementación de vitamina D.

4.2.6. POLIMORFISMO DEL GEN VDR-FOK

El polimorfismo del gen VDR-FOK sin embargo no se relacionó con ningún cambio en los parámetros densitométricos.

5. ESTUDIO SEGÚN FÁRMACOS CLÁSICOS/NUEVA GENERACIÓN

Se analizó, a nivel basal, los parámetros de metabolismo óseo determinados para los pacientes en función del FAE que estuvieran tomando, y posteriormente se comparó la evolución de estos parámetros tras la toma o no de suplemento de vitamina D dividiendo los FAEs en clásicos (PHT, VPA y CBZ) o de nueva generación (LEV, LCM y ESL).

Para el primer análisis, debido al bajo número de pacientes con algunos fármacos, se procedió a agrupar los FAEs por mecanismo de acción en inductores enzimáticos (PHT, CBZ y ESL), inhibidores enzimáticos (VPA) y neutros (LEV y LCM).

5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA

Se encontró una diferencia significativa entre FAEs en cuanto al tiempo de tratamiento, que fue menor en los pacientes tratados con LEV o LCM, y en los años de epilepsia, que también fue significativamente menor en los pacientes tratados con estos últimos (Tabla 5.1). Tras la corrección de Bonferroni, los meses de tratamiento seguían manteniendo una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0,001$ entre el grupo con inhibidores y con FAEs neutros.

	INDUCTORES (15)	INHIBIDORES (18)	NEUTROS (31)	Significación bilateral
EDAD (años)	45,27 ± 15,43	37,61 ± 10,74	42,56 ± 15,79	0,377
PESO BASAL (kg)	72,89 ± 16,96	83,08 ± 20,70	78,74 ± 16,16	0,266
TALLA (m)	1,65 ± 0,09	1,72 ± 0,11	1,71 ± 0,09	0,122
IMC BASAL (kg/m ²)	26,49 ± 5,54	27,68 ± 4,55	26,97 ± 5,57	0,807
AÑOS DE EPILEPSIA	12,4 ± 8,53	13,39 ± 8,21	7,27 ± 9,03	0,038*
MESES DE TRATAMIENTO	64,27 ± 62,57	119,56 ± 83,97	41,65 ± 29,25	0,001*
DIETA VITAMINA D BASAL (µg)	4,99 ± 2,64	4,83 ± 3,60	5,44 ± 3,27	0,801
DIETA CALCIO BASAL (mg)	767,10 ± 192,36	776,25 ± 288,98	897,01 ± 333,37	0,261

Tabla 5.1. Comparación entre variables basales demográficas, antropométricas, dietéticas y duración del tratamiento y la enfermedad, en función del tipo de FAE, mediante un ANOVA de una vía. * $p < 0,05$.

En cuanto a las variables cualitativas, en el análisis mediante tablas de contingencia se observó una diferencia significativa en la distribución por género de los pacientes entre los distintos FAEs, con una mayor frecuencia de hombres tratados con inhibidores y neutros, mientras que los FAEs inductores se encontraban más en mujeres (inductores: 60% mujeres; inhibidores: 83,3% hombres; neutros: 67,7% hombres; $p = 0,031$).

También se observó una diferencia en la distribución de etiologías de la epilepsia, por FAEs: los fármacos inductores estaban presentes en mayor frecuencia en pacientes con epilepsias estructurales o de origen desconocido (53,3% y 40%, respectivamente), mientras que los fármacos inhibidores se repartían entre epilepsias genéticas y estructurales (44,4% para las dos); los FAEs neutros estaban presentes tanto en epilepsias estructurales (61,3%) como genéticas o desconocidas (16,1% y 22,6% respectivamente); todo ello con una $p = 0,044$.

Para el resto de variables no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

5.2. VARIABLES ANALÍTICAS GENERALES

	INDUCTORES (15)	INHIBIDORES (18)	NEUTROS (31)	Significación bilateral
GLUCOSA	93,67 ± 12,99	98,89 ± 26,49	93,84 ± 14,61	0,832
UREA	30,27 ± 6,84	35,44 ± 9,98	33,58 ± 9,66	0,274
CREATININA	0,73 ± 0,20	0,82 ± 0,11	0,86 ± 0,16	0,093
PROTEÍNAS	7,12 ± 0,45	7,32 ± 0,32	7,46 ± 0,42	0,031*
CALCIO	9,46 ± 0,34	9,82 ± 0,35	9,76 ± 0,27	0,003**
FÓSFORO	3,68 ± 0,46	3,48 ± 0,59	3,42 ± 0,49	0,292
COLESTEROL	196,87 ± 32,13	195,28 ± 30,57	184,55 ± 36,41	0,404
HDL	77,93 ± 26,42	48,44 ± 13,37	59,03 ± 13,99	0,001**
LDL	102,40 ± 30,53	121,44 ± 27,16	107,71 ± 29,74	0,147
TRIGLICÉRIDOS	82,47 ± 42,49	126,83 ± 73,79	88,68 ± 38,52	0,041*
GOT	19,60 ± 4,47	21,94 ± 8,95	21,26 ± 7,67	0,657
GPT	21,73 ± 6,58	24,28 ± 14,59	22,90 ± 13,27	0,842
FA	82,73 ± 17,76	60,67 ± 16,80	74,19 ± 21,49	0,006*
GGT	40,33 ± 19,12	27,72 ± 20,38	19,58 ± 10,37	0,002**
VITAMINA B12	559,73 ± 258,64	658,67 ± 240,61	484,03 ± 136,31	0,028*
HOMOCISTEÍNA	9,21 ± 2,96	10,66 ± 1,13	11,81 ± 3,18	0,008*
T4	1,06 ± 0,17	1,26 ± 0,23	1,22 ± 0,16	0,005*
TSH	2,23 ± 1,60	2,26 ± 1,63	2,26 ± 1,12	0,997

Tabla 5.2. Comparación entre variables analíticas generales en función del tipo de FAE, mediante un ANOVA de una vía. * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de FAEs en las siguientes variables analíticas generales a nivel basal: proteínas totales, calcio, HDL, triglicéridos, fosfatasa alcalina, GGT, vitamina B12, homocisteína y hormona tiroidea T4 (Tabla 5.2). Aplicando la corrección de Bonferroni, se mantenían las siguientes diferencias de forma estadísticamente significativa:

- **Proteínas totales:** inferiores en pacientes con FAEs inductores que con neutros ($p = 0,027$)
- **Calcio:** niveles inferiores en pacientes con FAEs inductores que con inhibidores ($p = 0,002$) o neutros ($p = 0,003$)
- **HDL:** niveles más elevados en pacientes con FAEs inductores que con inhibidores ($p < 0,001$) o neutros ($p = 0,003$)
- **Triglicéridos:** niveles más elevados en pacientes con FAEs inhibidores que en pacientes con FAEs neutros ($p = 0,046$)
- **Fosfatasa alcalina:** niveles más elevados en pacientes con FAEs inductores que con inhibidores ($p = 0,006$)

- **GGT:** niveles más elevados en pacientes con FAEs inductores que con FAEs neutros ($p < 0,001$)
- **Vitamina B12:** niveles inferiores en pacientes con FAEs neutros que con VPA ($p = 0,015$)
- **Homocisteína:** niveles más elevados de homocisteína en pacientes en tratamiento con FAEs neutros que con FAEs inductores ($p = 0,010$)
- **Hormona tiroidea T4:** niveles más bajos en pacientes con FAEs inductores que en pacientes con FAEs inhibidores ($p = 0,006$) o neutros ($p = 0,019$).

5.3. BIOMARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA

En cuanto a los marcadores de remodelación ósea en función del tipo de FAE, únicamente se destacó una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de P1NP basales, que fueron más bajos en los pacientes tratados con inhibidores ($p = 0,040$) y tras la corrección de Bonferroni se mantuvieron significativamente más bajos que los niveles de P1NP de los pacientes en tratamiento con FAEs neutros ($p = 0,046$); y en cuanto a los niveles de osteocalcina basal, fueron más elevados en el grupo de pacientes tratados con LEV que en los tratados con VPA, con la corrección de Bonferroni ($p = 0,044$). Comparando los niveles de OC basal mediante una variable cualitativa dicotómica (alterado/no alterado) teniendo en cuenta género y rango de edad, se siguió detectando una diferencia significativa en la prueba de Chi-cuadrado, ya que el porcentaje de OC alterada era mayor en el caso del VPA que para LEV (39% vs 6,5%, $p = 0,013$) El resto de parámetros no mostró diferencias significativas (Tabla 5.3).

	INDUCTORES (15)	INHIBIDORES (18)	NEUTROS (31)	Significación bilateral
PTH (pg/ml)	32,20 ± 9,24	28,28 ± 8,48	28,55 ± 12,79	0,512
β-CTX (ng/ml)	0,39 ± 0,14	0,34 ± 0,14	0,45 ± 0,25	0,078
NTX (nmol/L)	15,89 ± 7,71	17,37 ± 7,43	15,98 ± 7,61	0,798
OC (ng/ml)	20,54 ± 6,44	18,69 ± 7,31	23,60 ± 9,07	0,114
P1NP (ng/ml)	56,04 ± 22,52	42,82 ± 14,55	56,06 ± 24,89	0,040*
FAos (U/L)	12,59 ± 4,36	9,63 ± 3,02	12,07 ± 5,82	0,154
Vitamina D (ng/ml)	15,65 ± 6,56	21,30 ± 8,12	20,10 ± 9,92	0,159

Tabla 5.3. Comparación entre biomarcadores de remodelación ósea en función del tipo de FAE, mediante un ANOVA de una vía. * $p < 0,05$.

5.4. PARÁMETROS DENSITOMÉTRICOS

A nivel femoral no se encontraron diferencias significativas entre los distintos FAEs, pero a nivel lumbar sí que se detectó una menor DMO en los pacientes en tratamiento con FAEs inductores comparados con los FAEs inhibidores (0,970 ±

0,14 vs $1,127 \pm 0,27 \text{ g/m}^2$, $p = 0,022$) y con los FAEs neutros ($0,970 \pm 0,14$ vs $1,106 \pm 0,15 \text{ g/m}^2$, $p = 0,025$). Sucedió de igual manera para los valores de sDMO, t-score y z/t-score lumbares (Tabla 5.4).

	INDUCTORES (15)	INHIBIDORES (17)	NEUTROS (31)	Significación bilateral
DMO femoral	$0,862 \pm 0,19$	$0,946 \pm 0,20$	$0,937 \pm 0,18$	0,361
sDMO femoral	$919,9 \pm 152,8$	$1018,4 \pm 990,7$	$980,6 \pm 189,2$	0,327
t-score femoral	$-0,10 \pm 1,75$	$0,43 \pm 1,50$	$0,10 \pm 1,42$	0,613
z-score femoral	$0,45 \pm 1,35$	$0,65 \pm 1,57$	$0,69 \pm 1,46$	0,865
z/t-score femoral	$0,07 \pm 1,78$	$0,63 \pm 1,55$	$0,26 \pm 1,49$	0,595
DMO lumbar	$0,970 \pm 0,14$	$1,127 \pm 0,27$	$1,106 \pm 0,15$	0,013*
sDMO lumbar	$1043,5 \pm 147,5$	$1230,2 \pm 292,2$	$1195,5 \pm 163,2$	0,009*
t-score lumbar	$-0,76 \pm 1,19$	$0,59 \pm 2,29$	$0,36 \pm 1,36$	0,018*
z-score lumbar	$-0,17 \pm 1,34$	$0,71 \pm 2,07$	$0,63 \pm 1,23$	0,153
z/t-score lumbar	$-0,69 \pm 1,16$	$0,60 \pm 2,17$	$0,43 \pm 1,32$	0,016*
FRAX® MO	$3,12 \pm 1,63$	$2,39 \pm 1,41$	$2,44 \pm 1,22$	0,240
FRAX® HF	$0,44 \pm 0,64$	$0,21 \pm 0,29$	$0,41 \pm 0,82$	0,540

Tabla 5.4. Comparación entre parámetros densitométricos y riesgo de fractura (FRAX®) en función del tipo de FAE, mediante un ANOVA de una vía. * $p < 0,05$.

Se procedió a clasificar a los pacientes en función de su z/t-score lumbar para valorar el grado de osteopenia, obteniendo los resultados que se describen en el gráfico 5.5. Se encontró una mayor frecuencia de osteopenia en pacientes en tratamiento con FAEs inductores que con el resto de FAEs ($p = 0,039$).

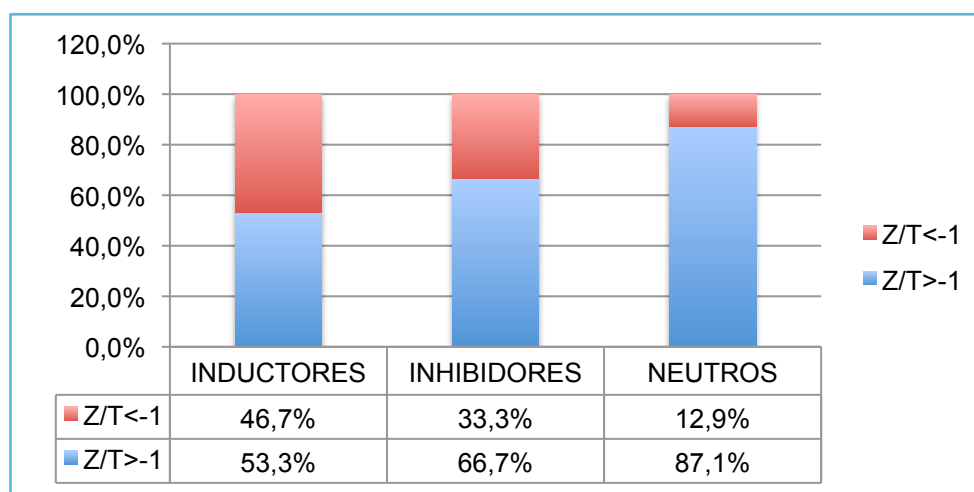


Gráfico 5.5. Distribución de pacientes con z/t-score lumbar inferior a -1 en función del tipo de FAE.

6. BIOMARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA

6.1. BIOMARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA: COMPARACIÓN GRUPO TRATADO Y GRUPO CONTROL

	GRUPO VITD	GRUPO CONTROL	Significación
PTH basal (pg/ml)	28,37 ± 9,23	30,03 ± 12,05	0,553
PTH 6m (pg/ml)	31,28 ± 16,54	26,21 ± 12,22	0,204
PTH diferencia basal-6m (pg/ml)	2,08 ± 12,33	-3,82 ± 7,78	0,046
β-CTX basal (ng/ml)	0,40 ± 0,24	0,41 ± 0,17	0,909
β-CTX 6m (ng/ml)	0,36 ± 0,18	0,44 ± 0,22	0,261
β-CTX diferencia basal-6m (ng/ml)	-0,05 ± 0,16	0,04 ± 0,11	0,015
NTX basal (nmol/L)	14,90 ± 7,67	17,41 ± 7,28	0,186
NTX 6m (nmol/L)	10,04 ± 7,57	13,25 ± 8,51	0,147
NTX diferencia basal-6m (nmol/L)	-5,23 ± 7,38	-4,22 ± 6,78	0,596
OC basal (ng/ml)	21,29 ± 9,42	21,65 ± 7,34	0,865
OC 6m (ng/ml)	19,62 ± 7,54	21,69 ± 7,60	0,307
OC diferencia basal-6m (ng/ml)	-1,78 ± 4,62	0,20 ± 4,33	0,099
P1NP basal (ng/ml)	51,77 ± 20,52	52,75 ± 23,91	0,865
P1NP 6m (ng/ml)	45,41 ± 18,50	49,82 ± 21,32	0,412
P1NP diferencia basal-6m (ng/ml)	-6,28 ± 10,63	-2,80 ± 20,77	0,447
FAos basal (U/L)	11,76 ± 5,19	11,32 ± 4,77	0,730
FAos 6m (U/L)	9,75 ± 4,48	10,24 ± 4,35	0,676
FAos diferencia basal-6m (U/L)	-1,94 ± 2,04	-1,29 ± 2,05	0,234

Tabla 6.1. Comparación de biomarcadores de remodelación ósea entre el grupo tratado y el grupo control, t-student para variables independientes. *p<0,05

Se realizó una comparación de medias entre el grupo tratado y el grupo control, mediante la realización de una prueba de t-student para variables independientes (Tabla 6.1).

En este análisis no se encontraron diferencias significativas entre los valores de los distintos marcadores de remodelación ósea en función de haber tomado tratamiento con suplementos de vitamina D y calcio o no, salvo en el caso de la hormona paratiroidea y los β -crosslaps. Los niveles de PTH aumentaron en los pacientes suplementados mientras que disminuyeron en los del grupo control ($2,1 \pm 12,3$ vs $-3,8 \pm 7,8$ pg/ml, $p = 0,046$). En cuanto a los niveles de β -CTX, se observó una disminución a los 6 meses en el grupo suplementado mientras que en el grupo control, por el contrario, se apreció un aumento, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($-0,05 \pm 0,16$ vs $0,04 \pm 0,22$ ng/ml, $p = 0,015$).

Se procedió a clasificar los niveles de los biomarcadores teniendo en cuenta los rangos de normalidad en función del grupo poblacional (género y edad), dividiéndolos en “alterado”/“no alterado”. Se realizó una comparación entre los datos basales y a los seis meses, tanto en el grupo vitD como en el grupo control, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en la prueba de McNemmar para los valores de OC, P1NP, FAos, β -CTX, y NTX.

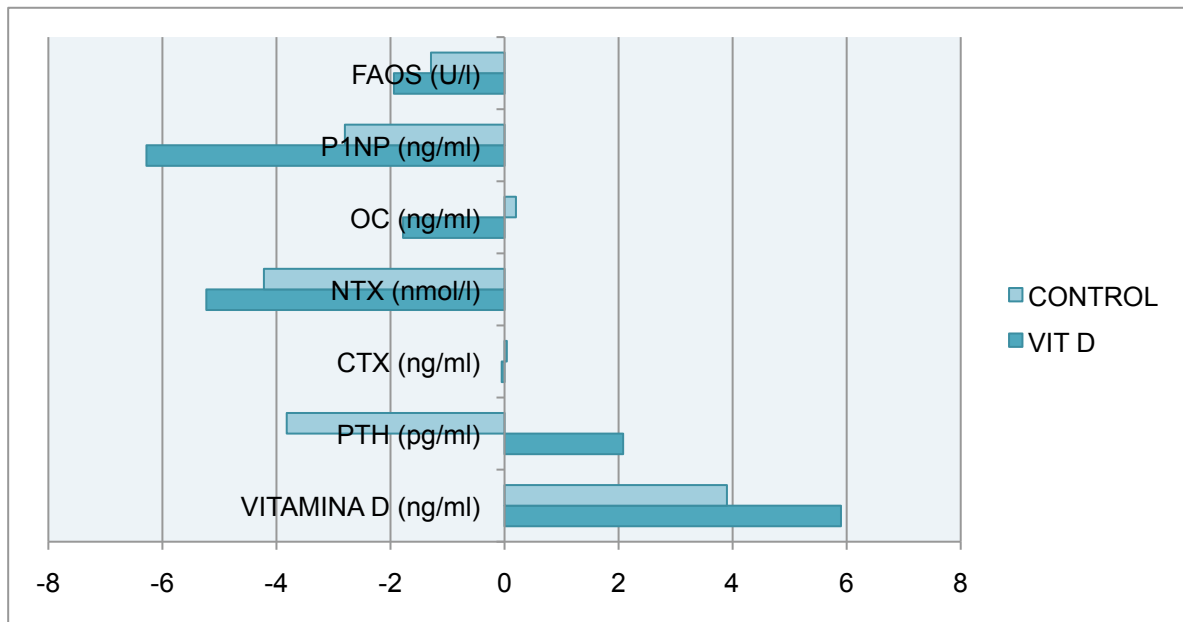
Sin embargo, realizando un contraste de medias apareadas en el grupo vitD, sí se apreciaba una diferencia estadísticamente significativa entre las determinaciones basales y tras el tratamiento en el caso de los siguientes biomarcadores:

- NTX: se observó una disminución de este marcador de resorción ósea tras los seis meses de estudio, con una diferencia de $5,23 \pm 7,38$ nmol/L ($p = 0,002$).
- Los marcadores de formación ósea disminuyeron de forma estadísticamente significativa tras el tratamiento: OC ($1,78 \pm 4,62$ ng/ml, $p = 0,066$), P1NP ($6,28 \pm 10,63$ ng/ml, $p = 0,007$), FAos ($1,94 \pm 2,04$ U/L, $p < 0,001$).
- Los niveles de vitamina D aumentaron, como era esperable: $5,9 \pm 4,77$ ng/ml, $p < 0,001$. Curiosamente, los niveles de PTH aumentaron también, pero no alcanzaron la significación estadística ($2,08 \pm 12,32$ pg/ml, *ns*).

Se realizó el mismo análisis en el grupo control, encontrando lo siguiente:

- una disminución de los niveles de PTH ($3,82 \pm 7,78$ pg/ml, $p = 0,008$) y un aumento de los niveles de vitamina D ($3,99 \pm 6,47$ ng/ml, $p = 0,001$)
- una disminución de uno de los marcadores de formación ósea (FAos: $1,29 \pm 2,05$ U/L, $p = 0,001$). El resto de marcadores de formación no mostraron diferencias significativas.

- De los marcadores de resorción ósea, el NTX mostró una disminución estadísticamente significativa ($4,22 \pm 6,78$ nmol/L, $p = 0,001$) pero no así los niveles de β -CTX, que aumentaron sin alcanzar la significación estadística ($0,04 \pm 0,11$ ng/ml, $p = 0,077$).



Gráfica 6.1. Diferencias evolutivas a los 6 meses de cada uno de los biomarcadores de remodelación ósea, en el grupo tratado y el grupo control.

6.2. NIVELES DE VITAMINA D: COMPARACIÓN ENTRE GRUPO TRATADO Y GRUPO CONTROL

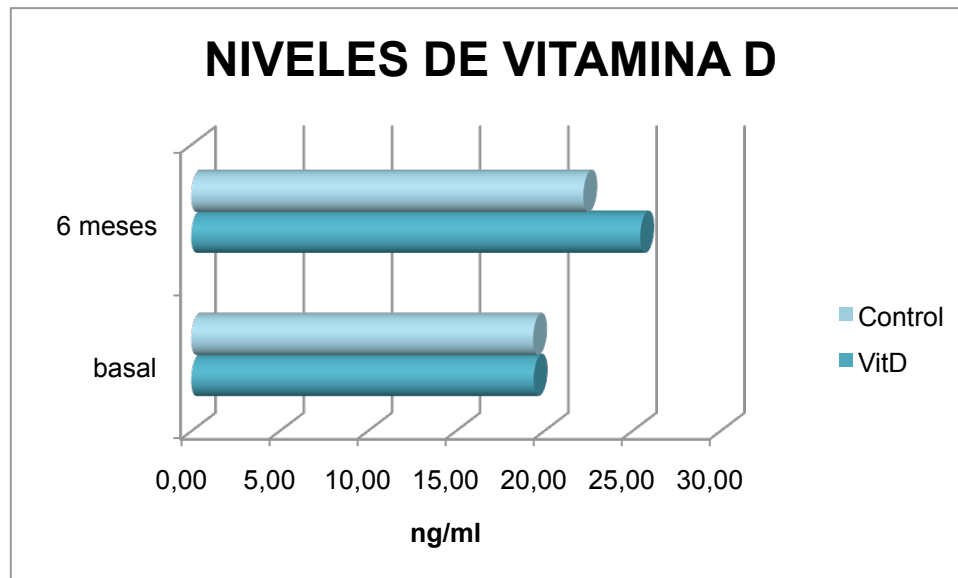
Para los niveles de vitamina D en sangre (25-OH-vitamina D):

	GRUPO VITD	GRUPO CONTROL	Significación
Vit D basal (ng/ml)	$19,42 \pm 7,71$	$19,38 \pm 9,75$	$0,495$
Vit D 6m (ng/ml)	$25,46 \pm 6,34$	$22,23 \pm 7,56$	$0,045^*$
Diferencia Vit D basal-6m (ng/ml)	$6,20 \pm 4,61$	$3,99 \pm 6,47$	$0,111$

Tabla 6.2. Comparación de niveles de vitamina D séricos entre el grupo tratado y el grupo control mediante la prueba t-student para variables independientes

Comparando los niveles de vitamina D basal, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo que tomó suplementación y el control ($19,4 \pm 7,7$ vs $19,4 \pm 9,7$ ng/ml, *ns*). A los 6 meses, tras el tratamiento, el grupo vitD presentaba

unos niveles de vitamina D medios superiores a los determinados en el grupo control, alcanzando la significación estadística en el análisis univariante ($25,5 \pm 6,3$ vs $22,2 \pm 7,6$ ng/ml, $p=0,045$). La diferencia entre los valores de vitamina D al inicio y tras los seis meses de estudio no fue distinta de forma significativa entre los pacientes tratados y los que no ($6,2 \pm 4,6$ vs $4 \pm 6,5$ ng/ml, *ns*).



Gráfica 6.2. Niveles séricos de vitamina D en los grupos tratado y control, en basal y a los 6 meses.

Sin embargo, comparando los valores a los 6 meses con los basales en cada grupo, sí que existía una diferencia estadísticamente significativa, tanto en el grupo tratado como en el control. En los dos casos, los niveles de vitamina D en sangre aumentaron a los seis meses (de 19,42 a 25,46 ng/ml, $p < 0,001$ para el grupo vitD; y de 19,38 a 22,23 ng/ml, $p = 0,001$ para el grupo control).

6.3. CORRELACIÓN ENTRE NIVELES DE VITAMINA D Y BIOMARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA

Se analizó la posible correlación entre los niveles de vitamina D y los distintos biomarcadores de remodelación ósea, encontrando únicamente una correlación negativa entre los niveles de vitamina D y de PTH a los 6 meses ($R = -0,448$, $p = 0,025$) en el grupo vitD, mientras que en grupo control no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas.

6.4. COMPARACIÓN EN PACIENTES CON DEFICIENCIA E INSUFICIENCIA DE VITAMINA D BASAL

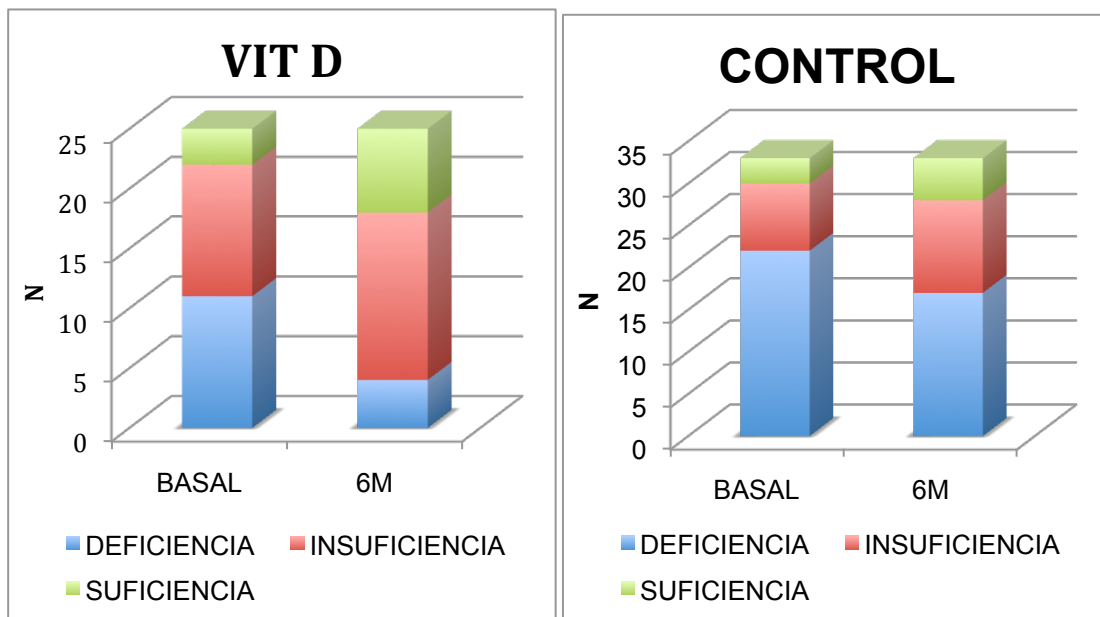
Si se agrupan los pacientes en función de la clasificación aceptada de deficiencia, insuficiencia y nivel adecuado de vitamina D, se obtiene la siguiente distribución:

	Vit D 6m			Total
	> 30 ng/ml	20-29,9 ng/ml	< 20 ng/ml	
Vit D basal > 30 ng/ml	4	2	0	6
20-29,9 ng/ml	6	11	2	19
< 20 ng/ml	2	12	19	33
Total	12	25	21	58

Tabla 6.3. Distribución de frecuencias en función de la clasificación de deficiencia/insuficiencia/suficiencia, en toda la muestra.

El número de pacientes con valores normales de vitamina D aumentó tras los seis meses de estudio, pasando de 6 a 12 (del 10 al 20%); los pacientes en rango de insuficiencia de vitamina D también aumentaron (19 a 25) mientras que los pacientes que presentaban unos niveles definidos como deficiencia de vitamina D disminuyeron (33 a 21; del 57 al 36%). Todo ello alcanzó una significación estadística en la prueba de McNemar-Bowker con una $p = 0,011$.

Analizando cada grupo por separado, se observó que, en el grupo vitD, esta evolución fue aun más llamativa, aumentando el número de pacientes con niveles de vitamina D por encima de 30 ng/ml de 3 a 7 (del 12 al 28%), los pacientes en rango de insuficiencia del 44 al 56% y mientras los que se encontraban en rango de deficiencia (por debajo de 20 ng/ml) disminuyeron de 11 a 4 (del 44 al 16%), todo ello de forma estadísticamente significativa ($p = 0,019$). Sin embargo, en el grupo control no se observaron cambios significativos con respecto al número de pacientes en cada rango de niveles.



Gráfica 6.3. Distribución de pacientes en cada grupo en función de la clasificación por niveles de vitamina D séricos.

Se utilizó esta división por grupos para analizar la posible repercusión de la suplementación con vitamina D sobre los biomarcadores de remodelación óseo en los pacientes con unos niveles de vitamina D basales inferiores a los niveles recomendados (< 30 ng/ml).

En el grupo tratado, la PTH aumentó ligeramente, sin alcanzar significación estadística, y el resto de parámetros de remodelación, tanto de formación como de resorción ósea, disminuyeron; en el caso del NTX, OC, P1NP y FAos de forma estadísticamente significativa (Tabla 6.4).

	Media ± desviación típica	Sig. (bilateral)
PTH basal – PTH 6m	-4,18 ± 14,24	0,183
β-CTX basal – β-CTX 6m	0,05 ± 0,16	0,158
NTX basal – NTX 6m	4,96 ± 7,51	0,007*
OC basal – OC 6m	1,78 ± 4,71	0,090
P1NP basal - P1NP 6m	6,83 ± 10,72	0,007*
FAos basal – FAos 6m	2,13 ± 2,07	<0,001*

Tabla 6.4. Comparación de medias apareadas (t-student) de biomarcadores de remodelación ósea en pacientes con niveles basales de vitamina D inferiores a 30 ng/ml, grupo tratado. * p<0,05

En el grupo control, por el contrario, en los pacientes con niveles basales de vitamina D inferiores a 30 ng/ml, se observó una disminución de PTH de forma significativa ($3,97 \pm 6,55$ pg/ml, $p = 0,002$), así como de NTX ($3,78 \pm 6,55$ nmol/L, $p = 0,002$) y de FAos ($1,25 \pm 2,12$ U/L, $p = 0,003$). Sin embargo, se produjo un aumento significativo de CTX a los seis meses ($-0,04 \pm 0,11$ ng/ml, $p = 0,035$) (Tabla 6.5).

	Media \pm desviación típica	Sig. (bilateral)
PTH basal – PTH 6m	$3,97 \pm 6,55$	0,002*
β -CTX basal – β -CTX 6m	$-0,04 \pm 0,11$	0,035*
NTX basal – NTX 6m	$3,78 \pm 6,55$	0,004*
OC basal – OC 6m	$-0,28 \pm 4,42$	0,733
P1NP basal - P1NP 6m	$2,54 \pm 21,77$	0,527
FAos basal – FAos 6m	$1,25 \pm 2,12$	0,003*

Tabla 6.5. Comparación de medias apareadas (t-student) de biomarcadores de remodelación ósea en pacientes con niveles basales de vitamina D inferiores a 30 ng/ml, grupo control. * $p < 0,05$

6.5. RELACIÓN ENTRE IMC Y NIVELES SÉRICOS DE VITAMINA D

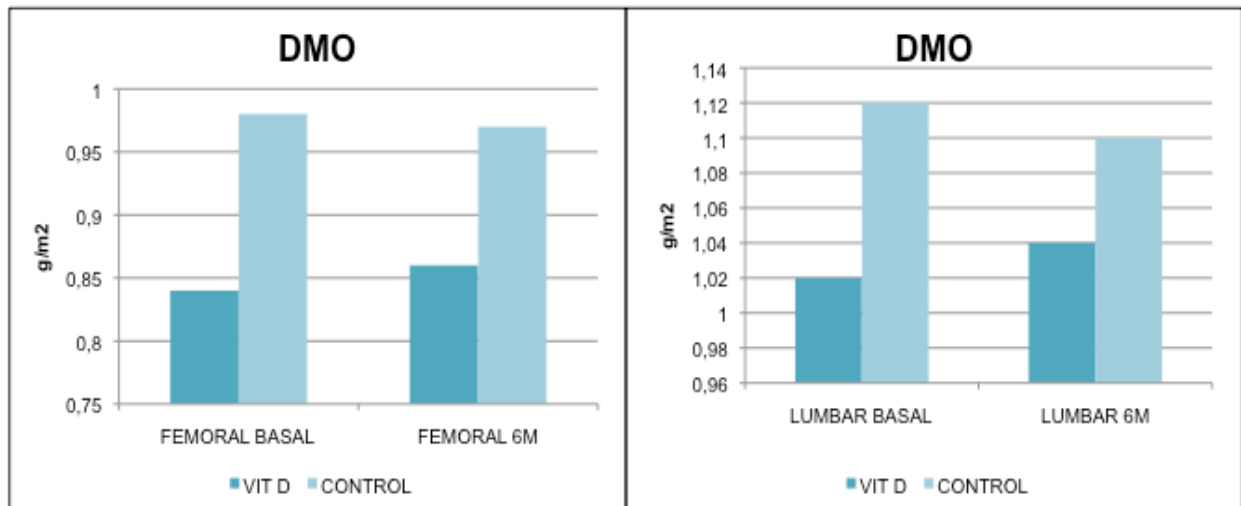
Se encontró una correlación negativa estadísticamente significativa entre el IMC basal y los niveles de vitamina D basales ($R = -0,422$, $p = 0,028$), así como entre el IMC a los 6 meses y los niveles de vitamina D a los 6 meses ($R = -0,546$, $p = 0,005$), únicamente en el grupo vitD.

7. RESULTADOS DENSITOMÉTRICOS

7.1. COMPARACIÓN ENTRE EL GRUPO VITD Y EL GRUPO CONTROL

La DMO femoral y lumbar basales fueron menores en el grupo vitD que en el grupo control ($0,84 \pm 0,16$ vs $0,98 \pm 0,18$ g/m², $p = 0,02$; $1,02 \pm 0,15$ vs $1,12 \pm 0,22$ g/m², $p = 0,027$, respectivamente). A los seis meses se mantenía la diferencia de la DMO femoral entre los dos grupos pero ya no resultaba estadísticamente significativa para la DMO lumbar. Tampoco se apreciaron diferencias estadísticamente

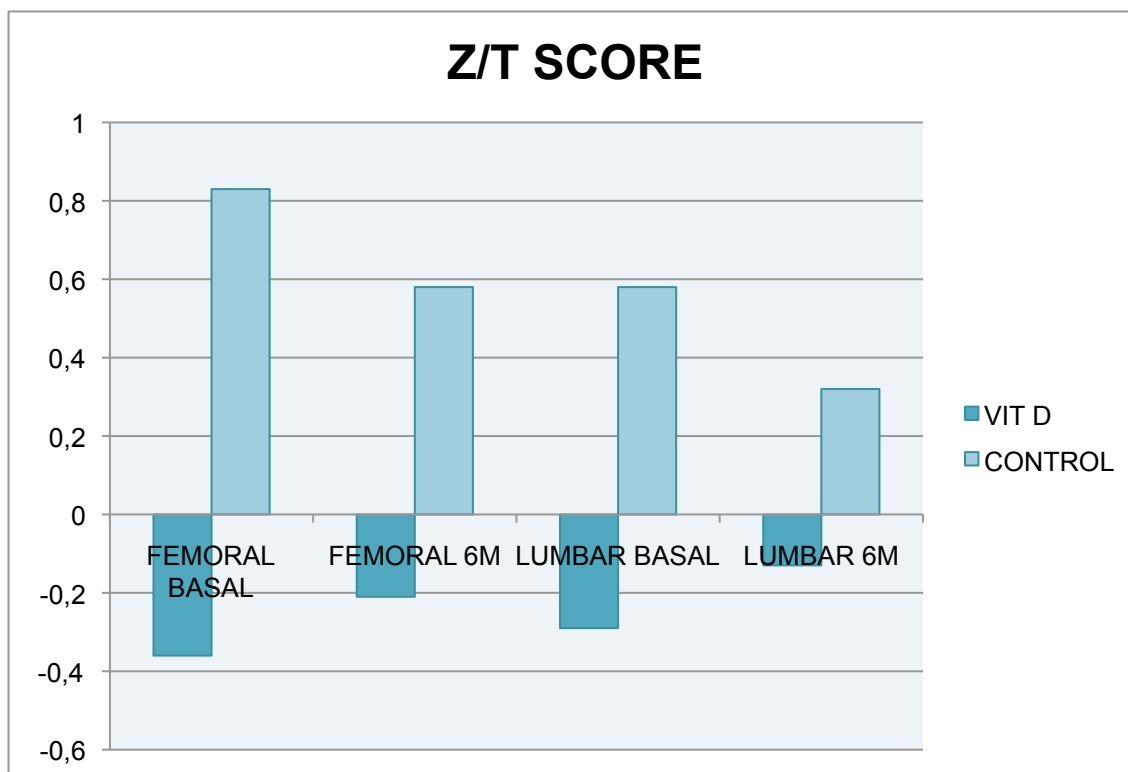
significativas entre los dos grupos en los cambios entre la DMO femoral y lumbar a los seis meses con respecto a las basales, aunque existía una tendencia a aumentar en el caso del grupo tratado y a disminuir en el no tratado.



Gráfica 7.1. Comparación de DMO femoral y lumbar, basal y a los 6 meses, entre el grupo tratado y el grupo control, mediante la prueba t-student para variables independientes.

El z/t score femoral basal fue menor en los pacientes del grupo vitD ($-0,36 \pm 1,37$ vs $0,82 \pm 1,53$, $p = 0,002$). Esta diferencia se mantenía a los seis meses, siendo la z/t score femoral más baja en el grupo tratado que en el grupo control ($-0,21 \pm 1,21$ vs $0,58 \pm 1,37$, $p = 0,024$). Sin embargo, la diferencia entre la z/t score femoral basal y la determinada a los seis meses fue positiva en el caso del grupo tratado (la z/t score mejoró), mientras que fue negativa en el grupo control, con una diferencia estadísticamente significativa en el análisis univariante ($0,17 \pm 0,98$ vs $-0,19 \pm 0,49$, $p = 0,038$).

En cuanto a la z/t score lumbar, también fue significativamente más baja en los pacientes del grupo tratado al inicio del estudio ($-0,29 \pm 1,29$ vs $0,58 \pm 0,3$, $p = 0,035$) y tras el tratamiento la diferencia se había reducido y ya no alcanzaba significación estadística ($-0,13 \pm 1,36$ vs $0,32 \pm 1,63$, *ns*). El cambio en este parámetro tras los seis meses de estudio fue positivo en el caso de los pacientes tratados (aumento de la z/t score lumbar) mientras que en los pacientes no tratados siguió una evolución negativa (disminución de la z/t score lumbar), y la comparación de medias no alcanzó una significación estadística en el análisis bivariante pero sí en el univariante ($0,18 \pm 0,47$ vs $-0,06 \pm 0,54$, $p = 0,035$).



Gráfica 7.2. Comparación del valor z/t-score femoral y lumbar, basal y a los 6 meses, entre el grupo tratado y el grupo control, mediante la prueba t-student para variables independientes. * p<0.05

	GRUPO VITD	GRUPO CONTROL	Significación
DMO femoral basal	0,84 ± 0,16	0,98 ± 0,18	0,020*
DMO femoral 6m	0,86 ± 0,14	0,97 ± 0,18	0,015*
DMO femoral diferencia	0,02 ± 0,11	-0,01 ± 0,05	0,191
sDMO femoral basal	911,39 ± 161,41	1035,48 ± 193,66	0,010*
sDMO femoral 6m	929,40 ± 147,37	1016,70 ± 186,42	0,057
sDMO femoral diferencia	22,12 ± 78,15	-15,13 ± 69,29	0,062
t-score femoral basal	-0,51 ± 1,31	0,63 ± 1,48	0,002**
t-score femoral 6m	-0,37 ± 1,15	0,35 ± 1,32	0,031*
t-score femoral diferencia	0,15 ± 0,99	-0,21 ± 0,5	0,075
z-score femoral basal	0,005 ± 1,28	1,09 ± 1,4	0,003**
z-score femoral 6m	0,26 ± 1,14	0,84 ± 1,27	0,084
z-score femoral diferencia	0,19 ± 1,08	-0,15 ± 0,49	0,134
z/t score femoral basal	-0,36 ± 1,37	0,83 ± 1,53	0,002**
z/t score femoral 6m	-0,21 ± 1,21	0,58 ± 1,37	0,024*
z/t score femoral diferencia	0,17 ± 0,98	-0,19 ± 0,49	0,076

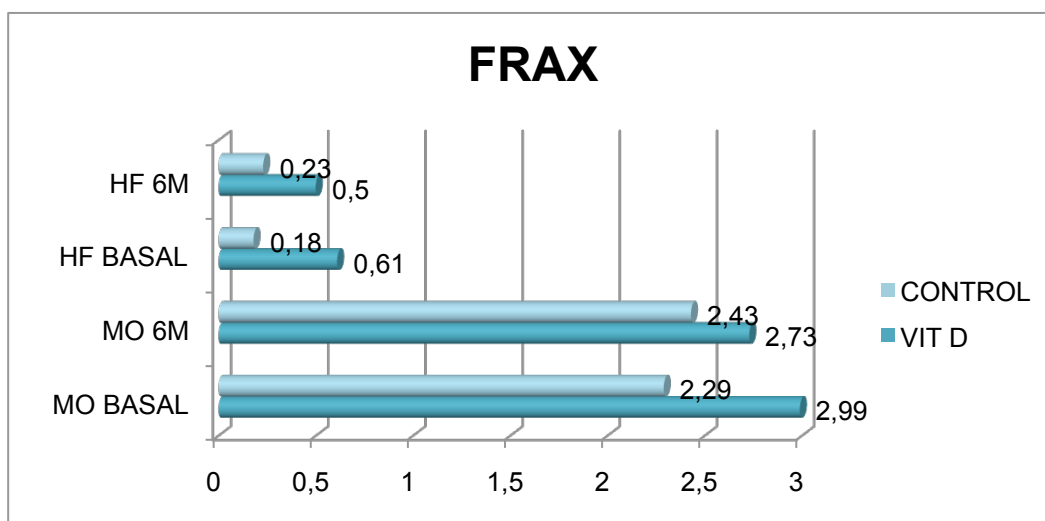
Tabla 7.1. Comparación de parámetros densitométricos femorales entre el grupo tratado y el grupo control, t-student para variables independientes. DMO expresada en g/m²; sDMO en mg/cm²; t y z-score en desviaciones estandar *p<0,05; **p<0,005

En las Tablas 7.1 y 7.2 se desglosan los valores de las distintas variables densitométricas y la comparación entre grupo vitD y grupo control.

	GRUPO VITD	GRUPO CONTROL	Significación
DMO lumbar basal	1,02 ± 0,15	1,12 ± 00,22	0,027*
DMO lumbar 6m	1,04 ± 0,16	1,10 ± 0,21	0,232
DMO lumbar diferencia	0,02 ± 0,05	-0,01 ± 0,06	0,101
sDMO lumbar basal	1097,11 ± 159,85	1222,92 ± 231,73	0,019*
sDMO lumbar 6m	1116,4 ± 168,07	1191,05 ± 222,93	0,164
sDMO lumbar diferencia	21,51 ± 56,13	-7,32 ± 68,83	0,093
t-score lumbar basal	-0,33 ± 1,31	0,51 ± 1,85	0,049*
t-score lumbar 6m	-0,16 ± 1,37	0,23 ± 1,70	0,332
t-score lumbar diferencia	0,19 ± 0,47	-0,06 ± 0,54	0,064
z-score lumbar basal	0,04 ± 1,19	0,76 ± 1,72	0,057
z-score lumbar 6m	0,21 ± 1,17	0,48 ± 1,58	0,481
z-score lumbar diferencia	0,07 ± 0,47	-0,12 ± 0,54	0,173
z/t score lumbar basal	-0,29 ± 1,29	0,58 ± 1,77	0,035*
z/t score lumbar 6m	-0,13 ± 1,36	0,32 ± 1,63	0,262
z/t score lumbar diferencia	0,18 ± 0,47	-0,06 ± 0,55	0,077

Tabla 7.1. Comparación de parámetros densitométricos lumbares entre el grupo tratado y el grupo control, t-student para variables independientes. DMO expresada en g/m²; sDMO en mg/cm²; t y z-score en desviaciones estandar *p<0,05

En el análisis se aprecia que el porcentaje de riesgo de fractura determinado por el FRAX era mayor en los pacientes del grupo vitD al inicio del estudio, pero posteriormente se equipara al del grupo control, tras los seis meses de tratamiento (Gráfica 7.3).



Gráfica 7.3. Comparación entre los dos grupos del riesgo FRAX, tanto de fractura en cadera (HF) como en cualquier localización, tanto a nivel basal como a los 6 meses.

7.2. CORRELACIÓN CON LOS NIVELES DE VITAMINA D

Determinamos el coeficiente de correlación de Pearson para detectar el porcentaje de dependencia entre los niveles de vitamina D y la DMO femoral y lumbar tanto basal como a los 6 meses, en el grupo suplementado y en el grupo control.

7.2.1. GRUPO VITD

Los niveles de vitamina D basales (25-OH-vitamina D) se correlacionaron de forma significativa con los niveles de vitamina D a los seis meses, con una dependencia de 63% ($p < 0.001$) y de forma inversa con el incremento de vitamina D tras el tratamiento ($R = -0.543$, $p = 0.005$). También se correlacionaron positivamente con la DMO femoral tanto basal como a los seis meses (23%, $p = 0,01$; y 32%, $p = 0.003$, respectivamente), pero no con la DMO lumbar.

Sin embargo, los niveles de vitamina D a los 6 meses no se correlacionaron de forma estadísticamente significativa con ninguno de los parámetros analizados.

El incremento de vitamina D en el grupo tratado mostraba una dependencia inversa con la DMO femoral a los 6 meses ($R = -0.478$, $p = 0.016$), es decir, a mayor incremento de vitamina D, menor DMO femoral tras el tratamiento.

Por otro lado, la DMO femoral y lumbar mostraron una correlación positiva entre las basales y las determinadas a los seis meses.

7.2.2. GRUPO CONTROL

En el grupo no tratado, por el contrario, no encontramos correlación significativa entre los niveles de vitamina D y ninguno de los parámetros densitométricos analizados. Los niveles de vitamina D basales se correlacionaron con los niveles determinados a los seis meses, y la DMO femoral y lumbar únicamente mostraron correlación positiva entre sus valores basales y los controles a los seis meses.

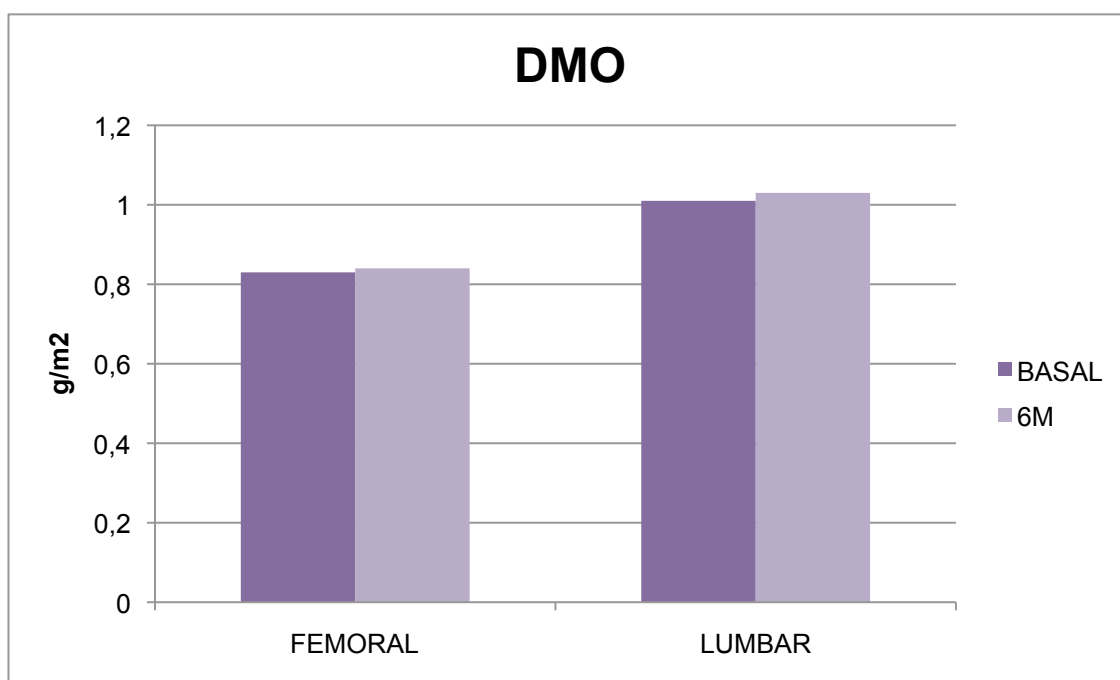
7.3. COMPARACIÓN EN PACIENTES CON DEFICIENCIA E INSUFICIENCIA DE VITAMINA D BASAL

Al dividir los pacientes de cada grupo según los niveles de vitamina D basales, se excluyeron los que presentaban niveles adecuados de vitamina D y se analizaron los parámetros densitométricos en los pacientes que presentaban deficiencia o insuficiencia de vitamina D basal. En ellos se observaron los siguientes resultados :

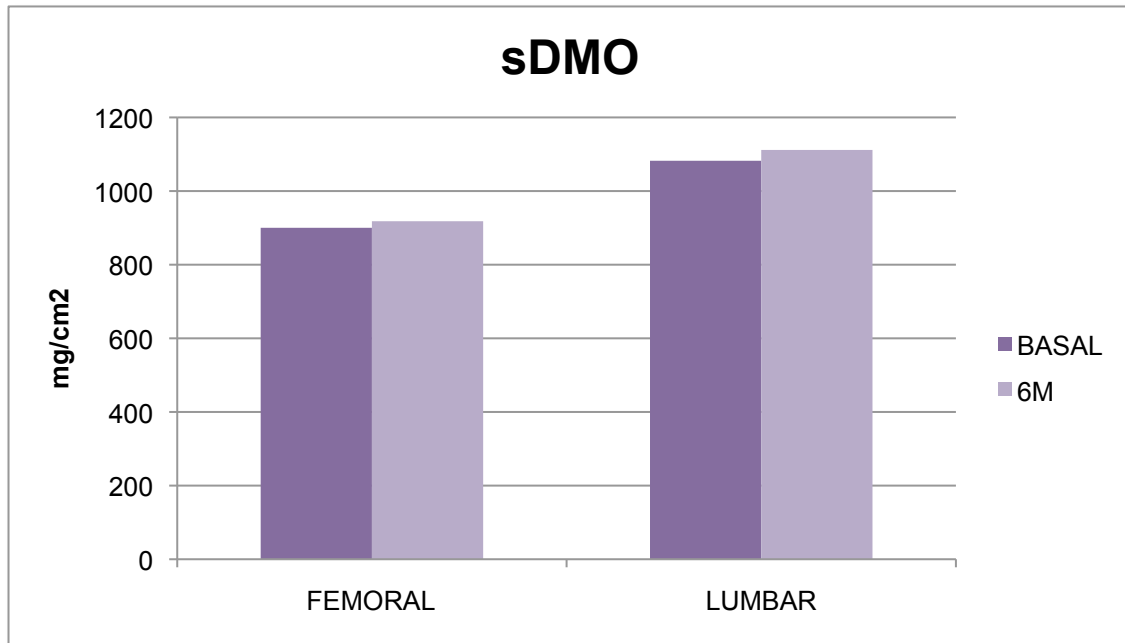
7.3.1. GRUPO VITD

Todos los parámetros densitométricos estudiados (femorales, lumbares y FRAX) mostraron una mejoría a los seis meses, con una diferencia estadísticamente significativa en la DMO, sDMO y z/t score a nivel lumbar:

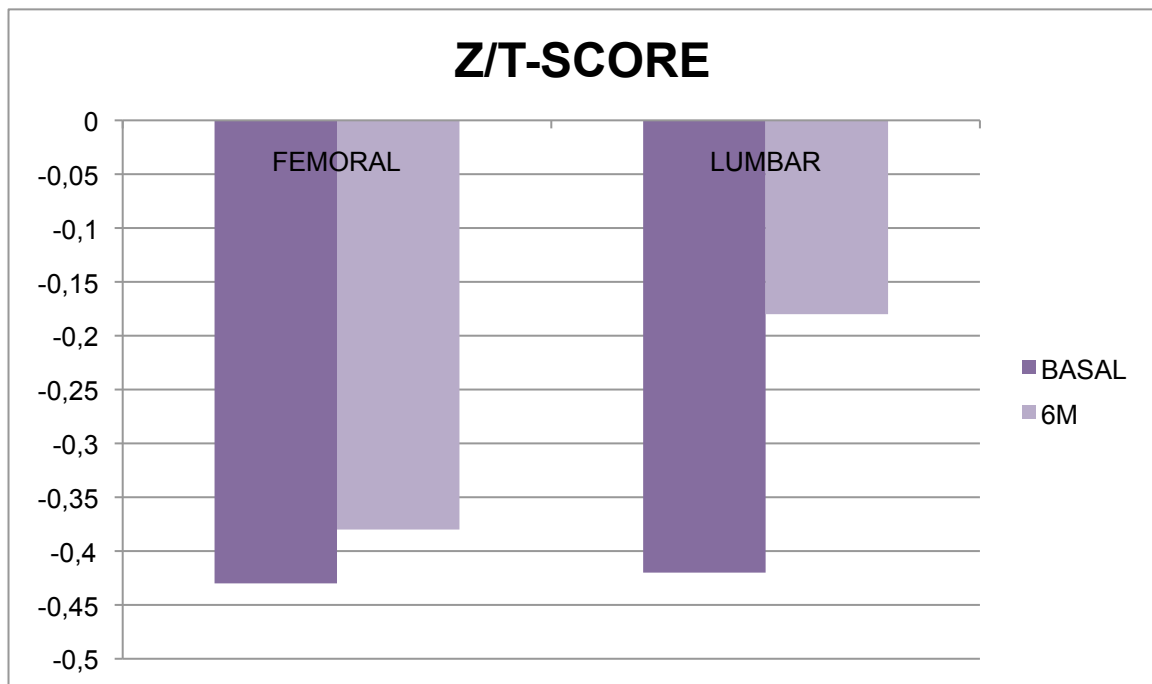
- la DMO, sDMO y z/t score femorales aumentaron, aunque no alcanzaron significación estadística
- la DMO lumbar pasó de 1,01 g/m² a 1,03 g/m² tras los seis meses de tratamiento (**p = 0,012**). La sDMO sufrió una evolución similar (Gráfica 6.5).
- la z/t score lumbar aumentó de -0,42 a -0,18 (**p = 0.015**).
- el porcentaje de riesgo de fractura medido por el FRAX disminuyó en sus dos determinaciones, sin alcanzar la significación estadística.



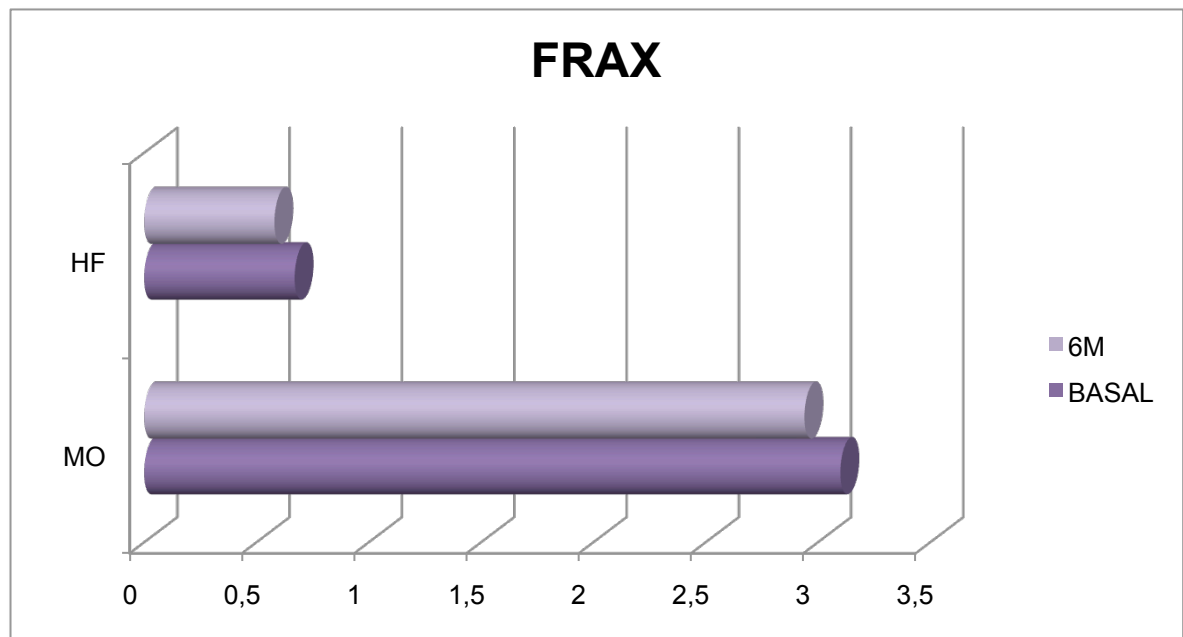
Gráfica 7.4. DMO en los pacientes del grupo tratado que presentaban unos niveles de vitamina D basales <30 ng/ml.



Gráfica 7.5. sDMO en los pacientes del grupo tratado que presentaban unos niveles de vitamina D basales <30 ng/ml.



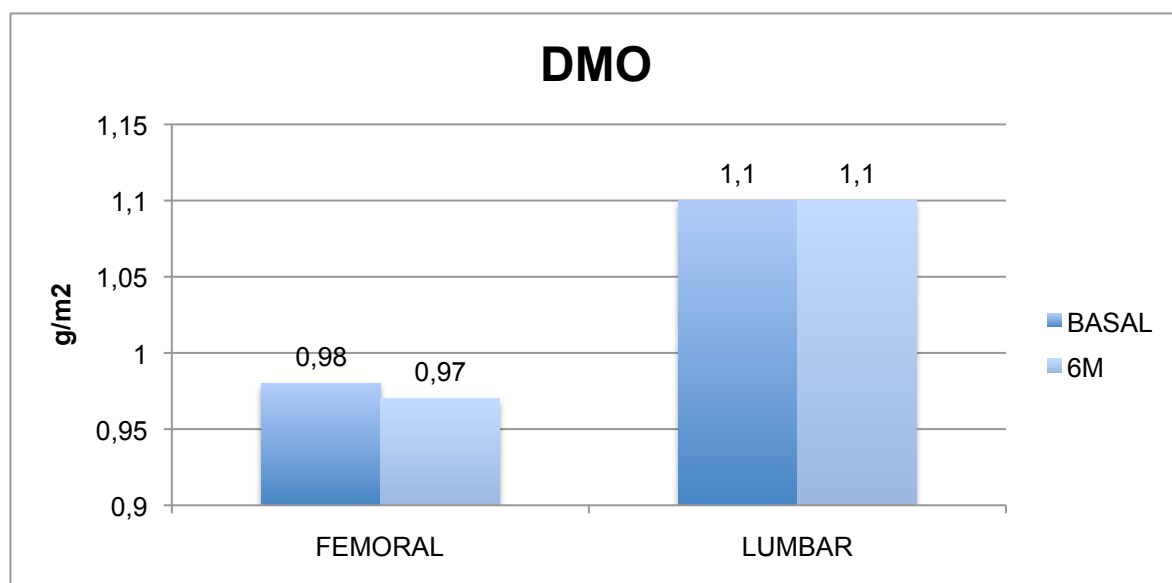
Gráfica 7.6. z/t-score femoral y lumbar en los pacientes del grupo tratado que presentaban unos niveles de vitamina D basales <30 ng/ml.



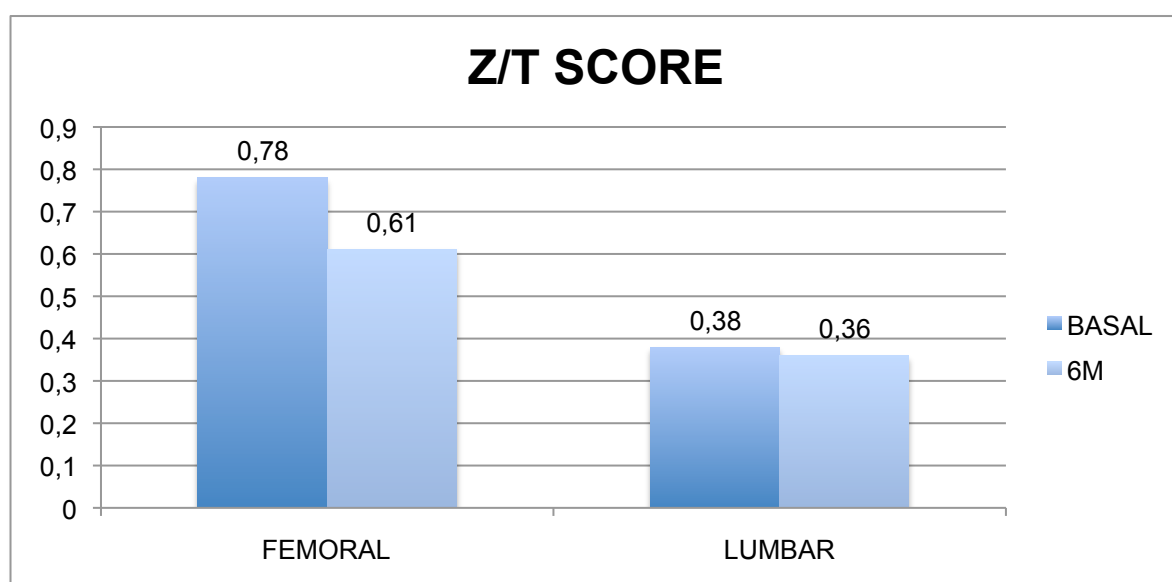
Gráfica 7.7. Riesgo FRAX en los pacientes del grupo tratado que presentaban unos niveles de vitamina D basales <30 ng/ml.

7.3.2. GRUPO CONTROL

En el grupo control, por el contrario, no sólo no se observó una mejoría, sino un empeoramiento de los parámetros densitométricos, en este grupo concreto con niveles basales de vitamina D por debajo de 30 ng/ml. Curiosamente, la única diferencia estadísticamente significativa encontrada en este grupo de pacientes fue el z/t score femoral, que disminuyó de 0,78 a 0,61 ($p = 0,05$). Las diferencias en el resto de parámetros no alcanzaron significación estadística.



Gráfica 7.8. DMO femoral y lumbar en los pacientes del grupo control que presentaban unos niveles de vitamina D basales <30 ng/ml.



Gráfica 7.9. DMO femoral y lumbar en los pacientes del grupo control que presentaban unos niveles de vitamina D basales <30 ng/ml.

7.3.3. GRUPO VITD Y CONTROL EN FUNCIÓN DEL GÉNERO

Se realizó este mismo análisis en función del género para determinar la influencia del mismo en los parámetros densitométricos, no encontrando diferencias estadísticamente significativas salvo los parámetros de DMO lumbar en los hombres del grupo vitD, que mejoraron tras el tratamiento: la DMO lumbar aumentó en $0,03 \pm 0,06 \text{ g/m}^2$ ($p = 0,011$) y la z/t score aumentó en $0,27 \pm 0,55$ ($p = 0,012$). En las mujeres, tanto en el grupo tratado como en el no tratado, ninguna diferencia alcanzó la significación estadística.

7.3.4. COMPARACIÓN GRUPO VITD Y GRUPO CONTROL

En los pacientes con los niveles de vitamina D basales inferiores a 30 ng/ml, se realizó un análisis comparando las evoluciones de los parámetros densitométricos entre el grupo vitD y el grupo control, mediante un ANOVA. La DMO femoral no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, pero la DMO lumbar, al ajustar con la glucemia, sí que reveló una diferencia significativa entre el grupo vitD y el control, con un aumento de la DMO de $0,027 \pm 0,047 \text{ g/m}^2$ en el grupo vitD vs una disminución de $0,003 \pm 0,064 \text{ g/m}^2$ en el grupo control ($p = 0,025$).

8. RELACIÓN ENTRE FAES Y PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y DENSITOMÉTRICOS

8.1. CAMBIOS EN BIOMARCADORES Y VARIABLES DENSITOMÉTRICAS EN FUNCIÓN DEL TIPO DE FAE CON/SIN SUPLEMENTACIÓN

Se realizó un ANOVA de dos vías para detectar la posible influencia del tipo de FAE (clasificado como se definió anteriormente en inductores, inhibidores y neutros) en la evolución de los biomarcadores de remodelación ósea, niveles de vitamina D y parámetros densitométricos en los pacientes, tras haber llevado suplementación con vitamina D o no.

El tipo de FAE no demostró ninguna influencia sobre el cambio en los niveles de vitamina D o los parámetros densitométricos (DMO y z/t femoral y lumbar). Por el contrario, sí que se detectaron cambios relacionados con el tipo de FAE pero no con la suplementación de vitamina D en cuanto a los niveles de NTX ($p = 0,042$) y de OC ($p = 0,008$), (Tabla 8.1).

También se destacó la suplementación con vitamina D como único factor relacionado con la diferencia detectada en la z/t femoral a los seis meses, al ajustar por FAEs y glucemia (aumento de $0,18 \pm 1$ en el grupo vitD vs disminución de $0,2 \pm 0,48$, $p = 0,045$), así como con el cambio en los niveles de β -CTX (disminución de $0,05 \pm 0,16 \text{ ng/ml}$ en el grupo vitD vs aumento de $0,04 \pm 0,11 \text{ ng/ml}$ en el grupo control, $p = 0,022$).

	INDUCTORES (14)		INHIBIDORES (15)		NEUTROS (29)		Significación
	VITD (7)	CONTROL (7)	VITD (4)	CONTROL (11)	VITD (14)	CONTROL (15)	
Vitamina D 6m – vitamina D basal	6,73 ± 4,61	4,10 ± 3,92	4,52 ± 6,41	5,08 ± 6,2	6,41 ± 4,48	3,15 ± 4,61	0,737
PTH 6m – PTH basal	7,43 ± 12,57	-2,86 ± 4,78	1,5 ± 5,26	-2,27 ± 9,84	-0,62 ± 13,4	-5,4 ± 7,38	0,672
β-CTX 6m – β-CTX basal	-0,04 ± 0,15	0,12 ± 0,13	-0,04 ± 0,1	0,03 ± 0,1	-0,06 ± 0,18	0,004 ± 0,1	0,568
NTX 6m – NTX basal	0,004 ± 4,6	-3,12 ± 4,59	-12,28 ± 6	-4,39 ± 8,49	-5,46 ± 7,38	-4,61 ± 6,62	0,171 ⁺
P1NP 6m – P1NP basal	-10,26 ± 9,9	-14,67 ± 22	-3,87 ± 8,3	1,44 ± 11,9	-4,97 ± 11,6	-0,36 ± 24,2	0,707
FAos 6m – FAos basal	-2,45 ± 1,5	-2,42 ± 3,1	-2,24 ± 2,1	-0,54 ± 1,4	-1,6 ± 2,3	-1,3 ± 1,7	0,777
OC 6m – OC basal	0,51 ± 3,2	1,45 ± 4,98	0,91 ± 5,24	1,78 ± 3,82	-3,69 ± 4,4	-1,54 ± 3,97	0,885 ⁺⁺

Tabla 8.1. Comparación entre las diferencias entre niveles basales y a los 6 meses (6m) de biomarcadores de remodelación ósea y niveles de vitamina D en función del tipo de FAE, y la suplementación con vitamina D, mediante un ANOVA de dos vías. Se expresa la significación cruzada entre grupo vitD/control y tipo de FAE. ⁺significación sólo con FAE p=0,042. ⁺⁺significación sólo con FAE p=0,008

8.2. CAMBIOS EN BIOMARCADORES Y VARIABLES DENSITOMÉTRICAS EN FUNCIÓN DE LA CLASIFICACIÓN CLÁSICO/NUEVA GENERACIÓN

Se realizó otro análisis, esta vez dividiendo los FAEs en clásicos (PHT, CBZ y VPA) y nueva generación (LEV, LCM y ESL), para determinar su influencia en los cambios de los biomarcadores de remodelación ósea y los parámetros densitométricos, mediante un ANOVA de dos vías, incluyendo como factor de confusión las glucemias basales y a los 6 meses.

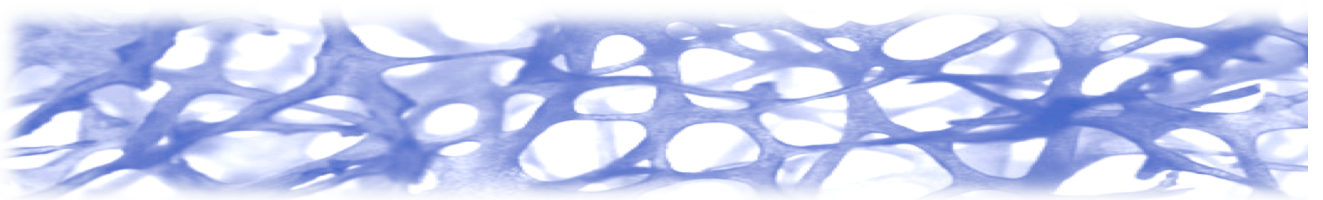
Los resultados en este caso fueron los siguientes:

- Los niveles de vitamina D no mostraron estar influenciados por el tipo de FAE.
- Los niveles de NTX, P1NP o FAos tampoco se vieron influidos por el tipo de FAE.
- Los niveles de PTH y CTX no se vieron influidos por el tipo de FAE pero al ajustar por estas variables, destacó la suplementación con vitamina D como factor relacionado de forma significativa con ellos ($p = 0,036$ y $p = 0,017$ respectivamente).
- Los niveles de OC sí mostraron una relación estadísticamente significativa con el tipo de FAE ($p = 0,002$) pero no con la suplementación con vitamina D.
- La z/t-score femoral no se vió influida por el tipo de FAE pero al ajustar por esta variable, la suplementación con vitamina D sí mostró

tener una relación estadísticamente significativa con este parámetro ($p = 0,049$).

- La DMO lumbar y z/t-score lumbar presentaron el mismo comportamiento, y aunque no alcanzaron la significación estadística, sí mostraron una tendencia a estar relacionadas con la suplementación con vitamina D al ajustar por FAEs ($p = 0,079$ y $p = 0,065$ respectivamente).

DISCUSIÓN.



En nuestro estudio, los FAEs de nueva generación no mostraron diferencias significativas con los FAEs inductores enzimáticos en cuanto a la aparición de alteraciones del metabolismo óseo. Los FAEs de nueva generación se relacionaron con unos menores niveles de vitamina D pero no con una menor DMO. Por otro lado, la suplementación con 400 UI de colecalciferol y 1500 mg de carbonato cálcico tuvo un efecto beneficioso, aunque inferior al deseado, sobre los parámetros densitométricos de los pacientes.

Discutiremos a continuación los resultados, desglosados por objetivos.

1. ALTERACIONES DEL METABOLISMO ÓSEO EN FAES DE NUEVA GENERACIÓN

En nuestra muestra, el FAE de nueva generación predominante fue LEV, con 30 pacientes. La presencia de LCM fue anecdótica –sólo un paciente–, y ESL fue el fármaco utilizado en monoterapia sólo por cuatro pacientes de nuestra muestra, ya que los criterios de inclusión especificaban que los pacientes debían encontrarse en monoterapia estable durante más de un año con ese fármaco, y la ESL apareció en el mercado muy recientemente (en España se comercializó en 2011).

Debido al bajo tamaño muestral con los fármacos LCM y ESL, y también en el caso de PHT o CBZ (4 y 7 pacientes, respectivamente), no se pudo hacer un análisis para cada FAE de forma independiente, por lo que decidimos agruparlos en función de su patrón de interacciones como inductores enzimáticos, inhibidores y neutros, como ya se venía haciendo en estudios anteriores (*Farhat et al, 2002; Ensrud et al, 2008*), añadiendo como novedad la clasificación de “neutro” debido a la necesidad de diferenciación de los nuevos FAEs libres de interacciones. Como inductores enzimáticos consideramos los clásicos PHT y CBZ, pero también la ESL, ya que, a pesar de ser un FAE de nueva generación, se ha visto que presenta interacciones significativas con estatinas o anticonceptivos hormonales debido a su posible inducción del CYP3A4 (*Bialer and Soares-da-Silva, 2012*). De igual manera, LCM es un fármaco sin interacciones relevantes (*Markoula et al, 2014*) al igual que LEV (*Stepanova and Beran, 2014*), por lo que se agruparon bajo el epígrafe de FAEs neutros.

El elevado número de pacientes en tratamiento con LEV en monoterapia sí permitió extraer conclusiones consistentes sobre la acción de este FAE sobre el metabolismo óseo. Los estudios realizados, hasta la fecha, en pacientes epilépticos con LEV son escasos. En el estudio publicado por Koo et al, los pacientes estuvieron expuestos a LEV durante un año, ya que se trataba de un estudio

longitudinal prospectivo en el que se iniciaba tratamiento con LEV como primer antiepiléptico (Koo et al, 2102). Aunque la muestra era amplia – 61 pacientes en monoterapia- el tiempo de exposición al FAE fue inferior al de este estudio – más de tres años de media -, por lo que los resultados probablemente no sean comparables. En el estudio de Beniczky et al se incluyeron 17 pacientes en monoterapia con LEV, entre otros FAEs (Beniczky et al, 2012) y en otro estudio más reciente, en población pediátrica, se analizó la salud ósea de 20 niños con LEV en monoterapia (Serin et al, 2015). Nuestro estudio es el primero en analizar los parámetros del metabolismo óseo en una muestra amplia de pacientes en tratamiento crónico estable con LEV.

1.1. PARÁMETROS DENSITOMÉTRICOS EN PACIENTES CON LEVETIRACETAM

Los pacientes en tratamiento con LEV, en este estudio, presentaron unos valores de DMO lumbar y femoral semejantes a los presentados por los pacientes en tratamiento con VPA. Sí que encontramos diferencias significativas al comparar los valores de DMO y z/t lumbar de los pacientes con LEV con los pacientes en tratamiento con inductores enzimáticos, siendo inferiores en estos últimos. El porcentaje de pacientes con una z/t score lumbar inferior a -1 –rango de osteopenia y osteoporosis- fue de 12,9%, inferior al encontrado en pacientes en tratamiento con inductores enzimáticos o VPA.

La población de este estudio era joven -41 años de media, con un rango 19-82 años- y predominantemente masculina -42 hombres y 22 mujeres-. En el caso de los pacientes con LEV, la edad media fue de 42 años y un 68% de pacientes eran hombres. La osteoporosis es una enfermedad más prevalente en mujeres, como ya hemos mencionado anteriormente (Kanis et al, 2013), y en personas mayores, por lo que el estudio de las alteraciones del metabolismo óseo en una población como la presente mitiga la posible influencia de los factores relacionados habitualmente con la aparición de osteoporosis, y refuerza la consistencia de nuestros resultados en cuanto a la influencia directa de los FAEs como factor de riesgo para presentar una DMO disminuida. Además, tuvimos en cuenta posibles factores de confusión relacionados con una menor DMO en la población epiléptica, bien como criterios de exclusión –politerapia, movilidad reducida, enfermedades endocrinas o medicación con efecto osteoporótico ya probado como los corticoides-, bien como factores controlados en los análisis – tabaquismo, hábito enólico, edad, género, dislipemia, alteraciones de metabolismo hidrocarbonado o IMC- (Shen et al, 2104). Los años de epilepsia no se correlacionaron en nuestra muestra con los parámetros densitométricos ni con los biomarcadores de remodelación ósea.

Las diferencias de DMO en función del género se han estudiado en personas con epilepsia, pero en un rango de edad que difiere al de nuestra muestra. Sheth et al

analizaron los valores de DMO en adolescentes en tratamiento con FAEs de forma crónica, encontrando que tanto hombres como mujeres tenían densidades inferiores a las de los controles, pero los hombres parecían estar más afectados que las mujeres a esa edad (*Sheth et al, 2008*). En nuestra muestra, las mujeres presentaron valores de DMO inferiores a los de los hombres, tanto a nivel femoral como a nivel lumbar, de forma estadísticamente significativa. El análisis por género en el subgrupo de LEV no se realizó.

Los estudios realizados en ratones sobre el impacto teórico de LEV sobre el hueso apuntan a una probable disminución de la DMO tras una exposición prolongada (*Fekete et al, 2013*), pero principalmente argumentan la existencia de una menor resistencia en la estructura ósea, explicada por la afectación predominante del hueso trabecular (*Nissen-Meyer et al, 2007*). Es posible que la determinación de la DMO mediante DEXA no sea la herramienta más indicada para determinar el riesgo de fractura en estos pacientes, y actualmente se aboga por la utilización de otras técnicas como la Trabecular Bone Score (TBS), una aproximación más fiable a la microarquitectura trabecular ósea (*Harvey et al, 2105*).

1.2. BIOMARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA EN PACIENTES CON LEVETIRACETAM

En cuanto a los marcadores de remodelación ósea, encontramos resultados interesantes en el grupo de pacientes tratados con LEV.

En efecto, los niveles de vitamina D séricos no mostraron diferencias significativas entre los distintos FAEs, y la media en el grupo de LEV fue de $20,10 \pm 9,92$ ng/ml, es decir, en el límite de la deficiencia de vitamina D. Algunos estudios han relacionado el tratamiento con LEV con unos niveles de vitamina D similares a los encontrados en pacientes con otros FAEs (*Serin et al, 2015*), aunque el perfil de interacciones de este fármaco induciría a pensar que no tendría por qué alterar el metabolismo de esta hormona. De hecho, se ha comunicado un aumento de los niveles de vitamina D, así como una mejora de la DMO en los pacientes en tratamiento crónico con PHT que posteriormente cambiaron a LEV (*Phabphal et al, 2013b*).

Se podría argumentar que los hallazgos de deficiencia o insuficiencia de vitamina D son el reflejo de la pandemia de hipovitaminosis D que sufrimos actualmente, aún más en los países del Sur de Europa y en concreto en España (*Hagenau et al, 2009; Holick, 2011; Olmos et al, 2015*). Sin embargo, resulta desconcertante que los niveles detectados basalmente en la muestra de este estudio, en los pacientes en tratamiento con LEV, no difiera significativamente de la de pacientes en tratamiento con fármacos de reconocida acción catabólica sobre la vitamina D como son los inductores enzimáticos (*Menon and Harinayaran, 2010*).

Los niveles de osteocalcina y de P1NP, por otro lado, fueron significativamente mayores que los detectados en los pacientes con VPA, y sin diferencias significativas con el grupo de inductores enzimáticos. Nuestros resultados apuntan a una menor formación ósea en el caso de VPA, más que un aumento de los marcadores de formación en los pacientes con LEV. La reducción de los niveles de OC está descrita en pacientes pediátricos en tratamiento prolongado con VPA (*Song et al, 2005*), aunque también se ha descrito un aumento de OC al iniciar un tratamiento con VPA de novo (*Verrotti et al, 2010a*).

En nuestro estudio, los niveles de osteocalcina se correlacionaron negativamente con los meses de tratamiento y mostraron estar relacionados de forma consistente con el tipo de FAE, al controlar otros factores de confusión. Los niveles de este biomarcador disminuyeron en los pacientes en tratamiento con LEV a los seis meses, tanto si recibieron suplementación con vitamina D como si no. Teniendo en cuenta que, en los pacientes en tratamiento con LEV, los meses de tratamiento eran menores que para el resto de FAEs, podríamos inferir que la tendencia evolutiva de la OC en presencia de LEV, en esta muestra, es a disminuir, corroborando los resultados encontrados en estudios animales (*Nissen-Meyer et al, 2007*). No obstante, teniendo en cuenta la variabilidad de este biomarcador inter e intra-sujeto (*Vasikaran et al, 2011*), debemos tomar estas conclusiones con precaución.

2. NIVELES DE VITAMINA D Y RELACIÓN CON LOS PARÁMETROS MEDIDOS

2.1. NIVELES DE VITAMINA D, IMC Y GLUCEMIA

Los niveles de vitamina D eran bajos a nivel basal, tanto en el grupo que recibió suplementación como en el que no ($19,42 \pm 7,71$ vs $19,38 \pm 9,75$ ng/ml), y se situaban en rango de deficiencia según los criterios actuales (*Holick et al, 2011*). Estos niveles no mostraron estar relacionados con el tipo de FAE, tanto separándolos según el mecanismo de interacciones como en función de si eran clásicos o de nueva generación.

Por el contrario, sí que encontramos una relación con dos parámetros de interés: el IMC y la glucemia. En el grupo que recibió suplementación, detectamos una correlación negativa entre el IMC y los niveles de vitamina D tras la suplementación, mientras que en el grupo control esta relación no fue significativa.

Este hallazgo refuerza la importancia de adaptar la dosis de vitamina D suministrada a los pacientes en función de su IMC, como se recomienda en las guías de Endocrinología (*Holick et al, 2011*), y se ha comprobado en algunos estudios (*Ekwaru et al, 2014*).

Por otro lado, la glucemia se reveló como un factor de confusión extremadamente importante, incluso en pacientes que no presentaban una diabetes diagnosticada (sólo 4 pacientes en toda la muestra), y obligó a controlarlo en cada análisis realizado en este estudio. En efecto, la relación entre las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado y el metabolismo óseo es objeto de un creciente interés por parte de investigadores y clínicos. Prueba de ello son los numerosos estudios publicados al respecto en los últimos años (revisados en *Shanbhogue et al, 2015*). Hay evidencias de que la diabetes está asociada a niveles de vitamina D disminuidos, una mayor fragilidad ósea, a pesar de presentar DMOs normales, y un recambio óseo disminuido (*Starup-Linde et al, 2014*). Los mecanismos no son del todo conocidos pero se sabe de la relación entre la hiperglucemia y el incremento del riesgo de fractura (*Shanbhogue et al, 2015*).

2.2. NIVELES DE VITAMINA D Y DMO

Los niveles de vitamina D, en este estudio, se correlacionaron con la DMO femoral, pero no con la lumbar, y sólo en el grupo suplementado. Existe cierta controversia acerca de la importancia de los niveles de vitamina D para determinar la salud ósea de un individuo. Se han realizado varios metanálisis en los que la suplementación con vitamina D sola no disminuía el riesgo de fracturas (*Avenell et al, 2014*) y se han descrito déficits en la mineralización ósea con niveles de vitamina D séricos normales, en casos de bajo aporte de calcio en la dieta (*Rosen and Taylor, 2013*). En el caso de la población sometida a FAEs, hay estudios en los que sí se relaciona el déficit de vitamina D con una menor DMO (*Kumandas et al, 2006; Kim et al, 2007*), pero en otros no (*Fahrat et al, 2002; El-Hajj Fulheihan et al, 2008*), argumentando que el impacto de los FAEs en la salud ósea de los pacientes no está únicamente mediado por la vitamina D, como ya hemos analizado anteriormente en el capítulo de Introducción (sección 2).

Sin embargo, se postula que la ausencia de respuesta positiva a la suplementación con vitamina D, con o sin calcio, puede ser debida a la variabilidad interindividual de absorción y metabolización de la vitamina D exógena (*Binkley et al, 2015*). Actualmente, se aboga por intentar normalizar los niveles de vitamina D, es decir, suplementar al sujeto con vitamina D con dosis y presentaciones aún por dilucidar, hasta sobrepasar los 30 ng/ml. A partir de ahí, parece existir cierto umbral, ya que unos niveles superiores a 32 ng/ml no aportarían más beneficio (*Geller and Adams, 2008*).

3. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA D EN LA MUESTRA ESTUDIADA

3.1. AUMENTO DE NIVELES DE VITAMINA D EN EL GRUPO VITD Y EL GRUPO CONTROL

Los pacientes que recibieron 400 UI de colecalciferol y 1500 mg de carbonato cálcico diarios consiguieron incrementar sus niveles basales de vitamina D en 6,2 ng/ml, pero no alcanzaron los niveles de suficiencia (media para el grupo vitD $25,26 \pm 6,43$ ng/ml). El incremento alcanzado es el esperable para las dosis de colecalciferol administradas (*Jetter et al, 2014*). Los pacientes del grupo control que no tomaron suplementación también vieron aumentados sus niveles séricos tras los seis meses de estudio, aunque en menor cuantía. Esto pudo ser debido al cambio estacional, ya que las segundas muestras se recogieron en primavera y verano. El aumento era, en parte, previsible, debido a la latitud geográfica de la zona donde se realizó el estudio – Murcia - pero los estudios poblacionales realizados apuntaban a un mayor déficit en verano, como ya se comentó en la introducción (*Pérez-Llamas et al, 2008*). Por otro lado, el control de la exposición solar individual resulta extremadamente impreciso y poco fiable, como sabemos por estudios previos (*Binkley et al, 2007*), por lo que preferimos prescindir de este parámetro durante el diseño del estudio.

Sin embargo, a pesar de que exista una diferencia significativa entre los valores de vitamina D a los seis meses en el grupo control, los pacientes de ese grupo no mostraron mejoría en los parámetros densitométricos o en los biomarcadores de remodelación ósea, mientras que los que recibieron suplementación farmacológica con vitamina D y calcio sí lo hicieron. En efecto, se ha descrito que la suplementación **diaria** con vitamina D favorece la actividad osteoblástica sobre la osteoclástica, sin relacionarse de forma estricta con los niveles séricos de calcidiol (*Takahashi et al, 2014*).

Por otro lado, los pacientes que recibieron suplementación, aunque no llegaron, en su mayoría, a normalizar sus niveles de vitamina D, sí que alcanzaron al menos el rango de insuficiencia en su mayoría (20-29 ng/ml), y el porcentaje de pacientes con deficiencia bajó de 44% a 16%, mientras que en el grupo control no hubo cambios significativos con respecto al porcentaje de pacientes que se situaba en cada rango.

3.2. CAMBIOS EN LOS PACIENTES CON SUPLEMENTACIÓN DE VITAMINA D Y CALCIO

En el grupo que recibió suplementación observamos una mejoría en los z/t score tanto lumbar como femoral, y un aumento de la DMO, que no alcanzó la significación estadística. Los pacientes partían de una DMO basal menor, ya que ellos eran más susceptibles de recibir un tratamiento por parte de su Neurólogo responsable, según los criterios de práctica clínica habitual, y para los que no se dispone de ninguna guía específica, como ya hemos mencionado en repetidas ocasiones. Los pacientes suplementados no llegaron a equipararse con los del grupo control en cuanto a DMO lumbar o femoral, pero sí que observamos una evolución positiva en ellos, y una tendencia a la disminución de la DMO en el caso de los pacientes no suplementados. Curiosamente, esta evolución era independiente del FAE utilizado, y sólo se relacionó con la suplementación con vitamina D y calcio.

La dosis de vitamina D utilizada en todos los pacientes de este estudio se basa en los conceptos “antiguos” de suplementación con vitamina D en pacientes epilépticos o, incluso, en población general (*Mattson and Gidal, 2004; Sheth et al, 2007; Abou-Khalil, 2008*). Las recomendaciones últimas de las guías de Endocrinología apuestan por al menos 800 UI diarias (*Rosen et al, 2012*), o incluso 1500-2000 UI si hay déficit objetivado de vitamina D, y se llega a recomendar triplicar la dosis en los pacientes en tratamiento con FAEs (*Holick et al, 2011*). En nuestra muestra, observamos una mejoría de los parámetros densitométricos en los pacientes suplementados, pero, al no alcanzar los 30 ng/ml en el 72% de los pacientes, deducimos que la dosis fue, probablemente, demasiado baja, o el tiempo de suplementación demasiado corto para obtener mejores resultados, aunque estudios más prolongados con vitamina D obtuvieron resultados similares (*Mikati et al, 2006*). La explicación más probable, por lo tanto, es que la dosis de vitamina D administrada fue demasiado baja en la mayor parte de los casos.

Existe cierta controversia, además, con la necesidad de acompañar la suplementación de vitamina D con calcio (*Chel et al, 2008; Rosen et al, 2012; Gröber et al, 2013*) y las recomendaciones se limitan a la vitamina D sin calcio, siempre y cuando el aporte dietético de calcio esté garantizado. La suplementación administrada en este estudio se componía de colecalciferol y 1500 mg de carbonato cálcico y no se encontró un aumento significativo de los niveles de calcio a los seis meses, pero debemos tener en cuenta que la ingesta de calcio determinada mediante la encuesta nutricional era de 860-875 mg/día, mientras que las recomendaciones actuales se sitúan en 1000 mg/d (*Ross et al, 2011*).

Por otro lado, se eligió el parámetro z/t-score debido a las peculiaridades de la muestra a estudio. Los pacientes epilépticos suelen ser jóvenes, pero en este

estudio también analizamos pacientes mayores, y tanto hombres como mujeres, por lo que había un criterio de selección en cada caso, o bien para utilizar el t-score, o bien para el z-score (*Schousboe et al, 2013*). El parámetro FRAX® también ha demostrado utilidad en la predicción del riesgo de fractura (*Compston, 2015*), pero al utilizarlo como herramienta de seguimiento en los pacientes a los seis meses, los resultados no fueron significativos. FRAX se ha utilizado recientemente en un estudio con población epiléptica, encontrando únicamente una relación entre este parámetro y los años de epilepsia (*Beerhosrst et al, 2013b*), pero el hecho de no incluir la toma de FAEs como factor de riesgo recogido presenta una limitación importante para su uso en el tipo de pacientes que nos ocupan.

En cuanto a los biomarcadores de remodelación ósea, en el grupo suplementado disminuyeron tanto los marcadores de formación como de resorción ósea, al igual que se ha publicado en estudios realizados en otros tipos de poblaciones (*Cranney et al, 2008*). Así mismo, encontramos también en el grupo suplementado una correlación negativa entre los niveles de vitamina D y los de PTH, aunque estos últimos parecieron aumentar tras la administración de vitamina D, de forma no significativa. Se ha descrito que la PTH puede permanecer elevada a pesar de la repleción de vitamina D y calcio, y suele ser debido a un hiperparatiroidismo secundario muy prolongado (*Geller and Adams, 2008*).

3.3. CAMBIOS EN LOS PACIENTES CON DEFICIENCIA E INSUFICIENCIA DE VITAMINA D

Los pacientes que partían de niveles basales inferiores a 30 ng/ml presentaron una disminución significativa de los biomarcadores de formación ósea – OC, P1NP, y FAos – además de una reducción de uno de los marcadores de resorción – NTX -, sin tener en cuenta los FAEs con los que estaban tratados. El marcador P1NP es el biomarcador de formación ósea considerado de elección (*Vasikaran et al, 2011*), por lo que este resultado es relevante.

En el grupo control, por el contrario, lo que encontramos fue un aumento del marcador de elección de resorción ósea - β -CTX- mientras que los biomarcadores de formación se mantenían sin cambios significativos, para este subgrupo de pacientes con deficiencia o insuficiencia de vitamina D basal.

La DMO y z/t lumbares aumentaron significativamente en los pacientes del grupo suplementado, y la DMO y z/t femorales aumentaron pero no alcanzaron la significación estadística. Por el contrario, en los pacientes que partían de niveles basales bajos de vitamina D y no fueron suplementados, no hubo cambios significativos en estos y demostraron una tendencia a la disminución. Estos hallazgos refuerzan la importancia de individualizar la suplementación con vitamina

D, incidiendo principalmente en los pacientes que presentan niveles séricos disminuidos, ya que son los que más se van a beneficiar de esta terapia para mejorar su salud ósea. En los pacientes epilépticos en tratamiento con FAEs que estén en situación de suficiencia de vitamina D, la suplementación parece no tener tanto beneficio, y se podrían plantear otro tipo de terapias, tanto preventivas – ejercicio físico, modificación de hábitos de vida, abstención tabáquica –, como terapéuticas – bifosfonatos – (Fedorenko et al, 2015).

4. PAPEL DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Las frecuencias de los polimorfismos genéticos del metabolismo óseo estudiados se corresponden con las halladas en estudios poblacionales previos (Uitterlinden et al, 2006; Ralston and Uitterlinden, 2010). El único polimorfismo que influyó en los cambios tras la suplementación con vitamina D en nuestra muestra fue el del receptor estrogénico, aunque parecía comportarse más como un factor de confusión que como un factor predisponente. El alelo “p” del polimorfismo ESR1P-PVU destacó como favorecedor de una mejor respuesta a nivel densitométrico en los pacientes suplementados. No se realizaron estudios por FAEs debido al reducido tamaño muestral. Este hallazgo no ha sido descrito en la población epiléptica, aunque debe ser interpretado con precaución debido a la complejidad de las interacciones entre mecanismos hormonales en el metabolismo óseo y su relación con la transcripción genética.

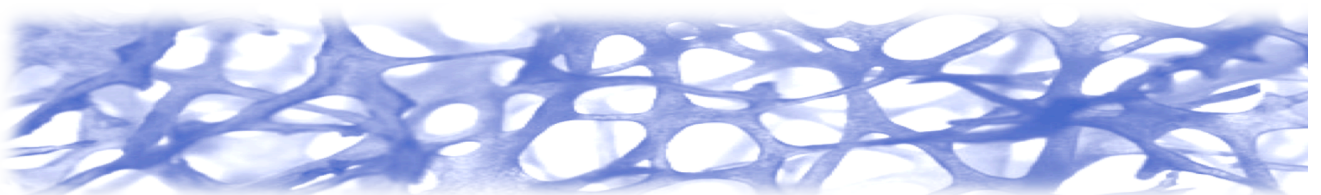
5. CONSIDERACIONES FINALES Y FUTURAS VÍAS DE INVESTIGACIÓN

La suplementación con vitamina D con o sin calcio sigue sujeta a debate, y no sólo en la población expuesta a FAEs. En este estudio hemos comprobado que las dosis que se emplean habitualmente, siguiendo criterios, en algunos casos, únicamente basados en la práctica clínica habitual, se alejan del objetivo fundamental, que es prevenir las fracturas en los pacientes epilépticos, aunque sí generan una tímida mejoría. En la muestra estudiada, observamos muy pocos casos de osteoporosis establecida, según criterios densitométricos, pero también está en entredicho la validez de estos criterios para diagnosticar la fragilidad o el estado de salud óseo en pacientes de alto riesgo, como los que nos ocupan.

La vitamina D es, además, un actor implicado en muchas otras patologías, y su deficiencia, fomentada por la administración de FAEs, podría empeorar la calidad de vida de los pacientes epilépticos, y no sólo a nivel óseo o muscular.

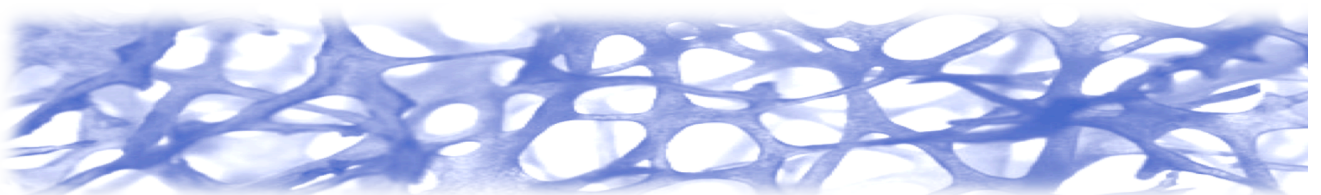
Se necesitan guías de manejo clínico y nuevas herramientas de diagnóstico que tengan en cuenta las peculiaridades de la población epiléptica, por lo que son precisos más estudios y consensos sobre el cuidado de la salud ósea y la prevención y tratamiento de la deficiencia de vitamina D en epilepsia.

CONCLUSIONES.



1. El fármaco antiepiléptico Levetiracetam no produjo cambios en la densidad mineral ósea en nuestra muestra, pero mostró un perfil similar al de los inductores enzimáticos en cuanto a déficit de vitamina D. Además, detectamos una tendencia a la disminución de la formación ósea durante los seis meses de evolución, no dependiente de la suplementación con vitamina D y calcio.
2. La suplementación con 400 UI de vitamina D y 1500 mg de carbonato cálcico diaria se asoció a un aumento de los parámetros densitométricos femorales y lumbares, siendo significativo para la z/t-score femoral, sin que el tipo de fármaco antiepiléptico influyera en ello.
3. Los pacientes que presentaban, a nivel basal, deficiencia o insuficiencia de vitamina D, se beneficiaron de forma más evidente de la suplementación con vitamina D y calcio, objetivado mediante un incremento en sus parámetros densitométricos lumbares de forma significativa, y una disminución de los marcadores de remodelación ósea.
4. La suplementación con 400 UI de vitamina D y 1500 mg de carbonato cálcico no consiguió normalizar los niveles de vitamina D séricos en la mayoría de los pacientes suplementados, por lo que dosis más elevadas e individualizadas serían probablemente necesarias para el manejo de los pacientes epilépticos.
5. Los polimorfismos del gen del receptor estrogénico se relacionaron con los cambios en los parámetros densitométricos tras la suplementación con vitamina D y calcio. La presencia del alelo "p" del polimorfismo ESR1P-PVU favoreció la mejoría del z/t-score femoral en los pacientes suplementados.

BIBLIOGRAFÍA.



- Abou-Khalil, B. W. (2008) 'When should clinicians worry about bone density for patients with epilepsy?', *Epilepsy Curr*, 8(6), pp. 148-9.
- Adler, R. A., Fuleihan, G. E., Bauer, D. C., Camacho, P. M., Clarke, B. L., Clines, G. A., Compston, J. E., Drake, M. T., Edwards, B. J., Favus, M. J., Greenspan, S. L., McKinney, R., Pignolo, R. J. and Sellmeyer, D. E. (2015) 'Managing Osteoporosis in Patients on Long-Term Bisphosphonate Treatment: Report of a Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research', *J Bone Miner Res*.
- Ali, I. I., Herial, N. A., Orris, M., Horrigan, T. and Tietjen, G. E. (2011) 'Migraine prophylaxis with topiramate and bone health in women', *Headache*, 51(4), pp. 613-6.
- Anderson, P. H., Lam, N. N., Turner, A. G., Davey, R. A., Kogawa, M., Atkins, G. J. and Morris, H. A. (2013) 'The pleiotropic effects of vitamin D in bone', *J Steroid Biochem Mol Biol*, 136, pp. 190-4.
- Andress, D. L., Ozuna, J., Tirschwell, D., Grande, L., Johnson, M., Jacobson, A. F. and Spain, W. (2002) 'Antiepileptic drug-induced bone loss in young male patients who have seizures', *Arch Neurol*, 59(5), pp. 781-6.
- Anwar, M. J., Radhakrishna, K. V., Sharma, A. and Vohora, D. (2014) 'Raloxifene preserves phenytoin and sodium valproate induced bone loss by modulating serum estradiol and TGF- β 3 content in bone of female mice', *Eur J Pharm Sci*, 62, pp. 219-26.
- Armas, L. A. and Recker, R. R. (2012) 'Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights', *Endocrinol Metab Clin North Am*, 41(3), pp. 475-86.
- Avenell, A., Mak, J. C. and O'Connell, D. (2014) 'Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures in post-menopausal women and older men', *Cochrane Database Syst Rev*, 4, pp. CD000227.
- Balvers, M. G., Brouwer-Brolsma, E. M., Endenburg, S., de Groot, L. C., Kok, F. J. and Gunnewiek, J. K. (2015) 'Recommended intakes of vitamin D to optimise health, associated circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations, and dosing regimens to treat deficiency: workshop report and overview of current literature', *J Nutr Sci*, 4, pp. e23.
- Bauer, S., Hofbauer, L. C., Rauner, M., Strzelczyk, A., Kellinghaus, C., Hallmeyer-Elgner, S., Oertel, W. H. and Rosenow, F. (2013) 'Early detection of bone metabolism changes under different antiepileptic drugs (ED-BoM-AED)--a prospective multicenter study', *Epilepsy Res*, 106(3), pp. 417-22.
- Beerhorst, K., Schouwenaars, F. M., Tan, I. Y. and Aldenkamp, A. P. (2012) 'Epilepsy: fractures and the role of cumulative antiepileptic drug load', *Acta Neurol Scand*, 125(1), pp. 54-9.
- Beerhorst, K., Tan, I. Y., De Krom, M., Verschuure, P. and Aldenkamp, A. P. (2013a) 'Antiepileptic drugs and high prevalence of low bone mineral density in a group of inpatients with chronic epilepsy', *Acta Neurol Scand*, 128(4), pp. 273-80.
- Beerhorst, K., van der Kruijs, S. J., Verschuure, P., Tan, I. Y. and Aldenkamp, A. P. (2013b) 'Bone disease during chronic antiepileptic drug therapy: general versus specific risk factors', *J Neurol Sci*, 331(1-2), pp. 19-25.
- Beniczky, S. A., Viken, J., Jensen, L. T. and Andersen, N. B. (2012) 'Bone mineral density in adult patients treated with various antiepileptic drugs', *Seizure*, 21(6), pp. 471-2.
- Bialer, M. and Soares-da-Silva, P. (2012) 'Pharmacokinetics and drug interactions of eslicarbazepine acetate', *Epilepsia*, 53(6), pp. 935-46.
- Binkley, N., Krueger, D. and Lensmeyer, G. (2009) '25-hydroxyvitamin D measurement, 2009: a review for clinicians', *J Clin Densitom*, 12(4), pp. 417-27.
- Binkley, N., Lappe, J., Singh, R. J., Khosla, S., Krueger, D., Drezner, M. K. and Blank, R.

- D. (2015) 'Can vitamin D metabolite measurements facilitate a "treat-to-target" paradigm to guide vitamin D supplementation?', *Osteoporos Int*, 26(5), pp. 1655-60.
- Binkley, N., Novotny, R., Krueger, D., Kawahara, T., Daida, Y. G., Lensmeyer, G., Hollis, B. W. and Drezner, M. K. (2007) 'Low vitamin D status despite abundant sun exposure', *J Clin Endocrinol Metab*, 92(6), pp. 2130-5.
- Binkley, N., Ramamurthy, R. and Krueger, D. (2012) 'Low vitamin D status: definition, prevalence, consequences, and correction', *Rheum Dis Clin North Am*, 38(1), pp. 45-59.
- Bischoff-Ferrari, H. A., Willett, W. C., Orav, E. J., Oray, E. J., Lips, P., Meunier, P. J., Lyons, R. A., Flicker, L., Wark, J., Jackson, R. D., Cauley, J. A., Meyer, H. E., Pfeifer, M., Sanders, K. M., Stähelin, H. B., Theiler, R. and Dawson-Hughes, B. (2012) 'A pooled analysis of vitamin D dose requirements for fracture prevention', *N Engl J Med*, 367(1), pp. 40-9.
- Boluk, A., Guzelipek, M., Savli, H., Temel, I., Ozişik, H. I. and Kaygusuz, A. (2004) 'The effect of valproate on bone mineral density in adult epileptic patients', *Pharmacol Res*, 50(1), pp. 93-7.
- Borusiak, P., Langer, T., Heruth, M., Karenfort, M., Bettendorf, U. and Jenke, A. C. (2013) 'Antiepileptic drugs and bone metabolism in children: data from 128 patients', *J Child Neurol*, 28(2), pp. 176-83.
- Cagırmaz, T., Yapıcı, C., Orak, M. M. and Guler, O. (2015) 'Bilateral femoral neck fractures after an epileptic attack: A case report', *Int J Surg Case Rep*, 6C, pp. 107-10.
- Cansu, A., Yesilkaya, E., Serdaroğlu, A., Hirfanoğlu, T. L., Camurdan, O., Gülbahar, O., Gücüyener, K. and Cinaz, P. (2008) 'Evaluation of bone turnover in epileptic children using oxcarbazepine', *Pediatr Neurol*, 39(4), pp. 266-71.
- Cebeci, A. N. and Ekici, B. (2014) 'Epilepsy treatment by sacrificing vitamin D', *Expert Rev Neurother*, 14(5), pp. 481-91.
- Chel, V., Wijnhoven, H. A., Smit, J. H., Ooms, M. and Lips, P. (2008) 'Efficacy of different doses and time intervals of oral vitamin D supplementation with or without calcium in elderly nursing home residents', *Osteoporos Int*, 19(5), pp. 663-71.
- Christiansen, C., Rodbro, P. and Lund, M. (1973a) 'Effect of vitamin D on bone mineral mass in normal subjects and in epileptic patients on anticonvulsants: a controlled therapeutic trial', *Br Med J*, 2(5860), pp. 208-9.
- Christiansen, C., Rodbro, P. and Lund, M. (1973b) 'Incidence of anticonvulsant osteomalacia and effect of vitamin D: controlled therapeutic trial', *Br Med J*, 4(5894), pp. 695-701.
- Cianferotti, L., Cricelli, C., Kanis, J. A., Nuti, R., Reginster, J. Y., Ringe, J. D., Rizzoli, R. and Brandi, M. L. (2015) 'The clinical use of vitamin D metabolites and their potential developments: a position statement from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) and the International Osteoporosis Foundation (IOF)', *Endocrine*, 50(1), pp. 12-26.
- Civitelli, R., Armamento-Villareal, R. and Napoli, N. (2009) 'Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice', *Osteoporos Int*, 20(6), pp. 843-51.
- Clarke, B. (2008) 'Normal bone anatomy and physiology', *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 Suppl 3, pp. S131-9.
- Compston, J. (2015) 'FRAX-Where are we now?', *Maturitas*.
- Coppola, G., Fortunato, D., Auricchio, G., Mainolfi, C., Operto, F. F., Signoriello, G., Pascotto, A. and Salvatore, M. (2009) 'Bone mineral density in children, adolescents, and young adults with epilepsy', *Epilepsia*, 50(9), pp. 2140-6.
- Cranney, A., Weiler, H. A., O'Donnell, S. and Puil, L. (2008) 'Summary of evidence-based

- review on vitamin D efficacy and safety in relation to bone health', *Am J Clin Nutr*, 88(2), pp. 513S-519S.
- Drake, M. T., Clarke, B. L. and Lewiecki, E. M. (2015) 'The Pathophysiology and Treatment of Osteoporosis', *Clin Ther*.
- Ekwaru, J. P., Zwicker, J. D., Holick, M. F., Giovannucci, E. and Veugelers, P. J. (2014) 'The importance of body weight for the dose response relationship of oral vitamin D supplementation and serum 25-hydroxyvitamin D in healthy volunteers', *PLoS One*, 9(11), pp. e111265.
- El-Hajj Fuleihan, G., Bouillon, R., Clarke, B., Chakhtoura, M., Cooper, C., McClung, M. and Singh, R. J. (2015) 'Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels: Variability, Knowledge Gaps, and the Concept of a Desirable Range', *J Bone Miner Res*, 30(7), pp. 1119-33.
- El-Hajj Fuleihan, G., Dib, L., Yamout, B., Sawaya, R. and Mikati, M. A. (2008) 'Predictors of bone density in ambulatory patients on antiepileptic drugs', *Bone*, 43(1), pp. 149-55.
- Elwakkad, A. S., El Elshamy, K. A. and Sibaii, H. (2008) 'Fish liver oil and propolis as protective natural products against the effect of the anti-epileptic drug valproate on immunological markers of bone formation in rats', *Epilepsy Res*, 80(1), pp. 47-56.
- Ensrud, K. E., Walczak, T. S., Blackwell, T., Ensrud, E. R., Bowman, P. J. and Stone, K. L. (2004) 'Antiepileptic drug use increases rates of bone loss in older women: a prospective study', *Neurology*, 62(11), pp. 2051-7.
- Espallargues, M., Sampietro-Colom, L., Estrada, M. D., Solà, M., del Rio, L., Setoain, J. and Granados, A. (2001) 'Identifying bone-mass-related risk factors for fracture to guide bone densitometry measurements: a systematic review of the literature', *Osteoporos Int*, 12(10), pp. 811-22.
- Farhat, G., Yamout, B., Mikati, M. A., Demirjian, S., Sawaya, R. and El-Hajj Fuleihan, G. (2002) 'Effect of antiepileptic drugs on bone density in ambulatory patients', *Neurology*, 58(9), pp. 1348-53.
- Fedorenko, M., Wagner, M. L. and Wu, B. Y. (2015) 'Survey of risk factors for osteoporosis and osteoprotective behaviors among patients with epilepsy', *Epilepsy Behav*.
- Fekete, S., Simko, J., Gradosova, I., Malakova, J., Zivna, H., Palicka, V. and Zivny, P. (2013) 'The effect of levetiracetam on rat bone mass, structure and metabolism', *Epilepsy Res*, 107(1-2), pp. 56-60.
- Feldkamp, J., Becker, A., Witte, O. W., Scharff, D. and Scherbaum, W. A. (2000) 'Long-term anticonvulsant therapy leads to low bone mineral density--evidence for direct drug effects of phenytoin and carbamazepine on human osteoblast-like cells', *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 108(1), pp. 37-43.
- Fuller, H. R., Man, N. T., Lam, I. T., Shamanin, V. A., Androphy, E. J. and Morris, G. E. (2010) 'Valproate and bone loss: iTRAQ proteomics show that valproate reduces collagens and osteonectin in SMA cells', *J Proteome Res*, 9(8), pp. 4228-33.
- Furey, T. S., Diekhans, M., Lu, Y., Graves, T. A., Oddy, L., Randall-Maher, J., Hillier, L. W., Wilson, R. K. and Haussler, D. (2004) 'Analysis of human mRNAs with the reference genome sequence reveals potential errors, polymorphisms, and RNA editing', *Genome Res*, 14(10B), pp. 2034-40.
- Geller, J. L. and Adams, J. S. (2008) 'Vitamin D therapy', *Curr Osteoporos Rep*, 6(1), pp. 5-11.
- González Macías, J., Olmos Martínez, JM. (2010) 'Fisiopatología de la osteoporosis y mecanismo de acción de la PTH', *Rev Osteoporos Metab Miner*, 2 (Supl 2), pp. S5-S17.
- Grant, W. B., Wimalawansa, S. J., Holick, M. F., Cannell, J. J., Pludowski, P., Lappe, J. M.,

- Pittaway, M. and May, P. (2015) 'Emphasizing the health benefits of vitamin D for those with neurodevelopmental disorders and intellectual disabilities', *Nutrients*, 7(3), pp. 1538-64.
- Gröber, U., Spitz, J., Reichrath, J., Kisters, K. and Holick, M. F. (2013) 'Vitamin D: Update 2013: From rickets prophylaxis to general preventive healthcare', *Dermatoendocrinol*, 5(3), pp. 331-47.
- Hagenau, T., Vest, R., Gissel, T. N., Poulsen, C. S., Erlandsen, M., Mosekilde, L. and Vestergaard, P. (2009) 'Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: an ecologic meta-regression analysis', *Osteoporos Int*, 20(1), pp. 133-40.
- Hamed, S. A., Moussa, E. M., Youssef, A. H., Abd ElHameed, M. A. and NasrEldin, E. (2014) 'Bone status in patients with epilepsy: relationship to markers of bone remodeling', *Front Neurol*, 5, pp. 142.
- Harvey, N. C., Glüer, C. C., Binkley, N., McCloskey, E. V., Brandi, M. L., Cooper, C., Kendler, D., Lamy, O., Laslop, A., Camargos, B. M., Reginster, J. Y., Rizzoli, R. and Kanis, J. A. (2015) 'Trabecular bone score (TBS) as a new complementary approach for osteoporosis evaluation in clinical practice', *Bone*, 78, pp. 216-24.
- Heckman, C. J., Chandler, R., Kloss, J. D., Benson, A., Rooney, D., Munshi, T., Darlow, S. D., Perlis, C., Manne, S. L. and Oslin, D. W. (2013) 'Minimal Erythema Dose (MED) testing', *J Vis Exp*, (75), pp. e50175.
- Heo, K., Rhee, Y., Lee, H. W., Lee, S. A., Shin, D. J., Kim, W. J., Song, H. K., Song, K. and Lee, B. I. (2011) 'The effect of topiramate monotherapy on bone mineral density and markers of bone and mineral metabolism in premenopausal women with epilepsy', *Epilepsia*, 52(10), pp. 1884-9.
- Holick, M. F. (2007) 'Vitamin D deficiency', *N Engl J Med*, 357(3), pp. 266-81.
- Holick, M. F. (2009) 'Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application', *Ann Epidemiol*, 19(2), pp. 73-8.
- Holick, M. F. (2011) 'Vitamin D: evolutionary, physiological and health perspectives', *Curr Drug Targets*, 12(1), pp. 4-18.
- Holick, M. F., Binkley, N. C., Bischoff-Ferrari, H. A., Gordon, C. M., Hanley, D. A., Heaney, R. P., Murad, M. H., Weaver, C. M. and Society, E. (2011) 'Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline', *J Clin Endocrinol Metab*, 96(7), pp. 1911-30.
- Holick, M. F., Shao, Q., Liu, W. W. and Chen, T. C. (1992) 'The vitamin D content of fortified milk and infant formula', *N Engl J Med*, 326(18), pp. 1178-81.
- Huang, Z. B., Wan, S. L., Lu, Y. J., Ning, L., Liu, C. and Fan, S. W. (2015) 'Does vitamin K2 play a role in the prevention and treatment of osteoporosis for postmenopausal women: a meta-analysis of randomized controlled trials', *Osteoporos Int*, 26(3), pp. 1175-86.
- Humphrey, E. L., Morris, G. E. and Fuller, H. R. (2013) 'Valproate reduces collagen and osteonectin in cultured bone cells', *Epilepsy Res*, 106(3), pp. 446-50.
- Iñiguez-Ariza, N. M. and Clarke, B. L. (2015) 'Bone biology, signaling pathways, and therapeutic targets for osteoporosis', *Maturitas*.
- Jeremiah, M. P., Unwin, B. K., Greenawald, M. H. and Casiano, V. E. (2015) 'Diagnosis and Management of Osteoporosis', *Am Fam Physician*, 92(4), pp. 261-8.
- Jetter, A., Egli, A., Dawson-Hughes, B., Staehelin, H. B., Stoecklin, E., Goessl, R., Henschkowski, J. and Bischoff-Ferrari, H. A. (2014) 'Pharmacokinetics of oral vitamin D(3) and calcifediol', *Bone*, 59, pp. 14-9.
- Kanis, J. A., McCloskey, E. V., Johansson, H., Cooper, C., Rizzoli, R., Reginster, J. Y. and Scientific Advisory Board of the European Society for Clinical and Economic

- Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) and the Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation (IOF) (2013) 'European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women', *Osteoporos Int*, 24(1), pp. 23-57.
- Khanna, S., Pillai, K. K. and Vohora, D. (2009) 'Insights into liaison between antiepileptic drugs and bone', *Drug Discov Today*, 14(7-8), pp. 428-35.
- Khanna, S., Pillai, K. K. and Vohora, D. (2011) 'Bisphosphonates in phenytoin-induced bone disorder', *Bone*, 48(3), pp. 597-606.
- Kim, S. H., Lee, J. W., Choi, K. G., Chung, H. W. and Lee, H. W. (2007) 'A 6-month longitudinal study of bone mineral density with antiepileptic drug monotherapy', *Epilepsy Behav*, 10(2), pp. 291-5.
- Koo, D. L., Hwang, K. J., Han, S. W., Kim, J. Y., Joo, E. Y., Shin, W. C., Lee, H. W., Seo, D. W. and Hong, S. B. (2014) 'Effect of oxcarbazepine on bone mineral density and biochemical markers of bone metabolism in patients with epilepsy', *Epilepsy Res*, 108(3), pp. 442-7.
- Koo, D. L., Joo, E. Y., Kim, D. and Hong, S. B. (2013) 'Effects of levetiracetam as a monotherapy on bone mineral density and biochemical markers of bone metabolism in patients with epilepsy', *Epilepsy Res*, 104(1-2), pp. 134-9.
- Kruse, R. (1968) '[Osteopathies in antiepileptic long-term therapy (preliminary report)]', *Monatsschr Kinderheilkd*, 116(6), pp. 378-81.
- Kumandas, S., Koklu, E., Gümüş, H., Koklu, S., Kurtoglu, S., Karakukcu, M. and Keskin, M. (2006) 'Effect of carbamazepine and valproic acid on bone mineral density, IGF-I and IGF-BP-3', *J Pediatr Endocrinol Metab*, 19(4), pp. 529-34.
- Lambrinoudaki, I., Kaparos, G., Armeni, E., Alexandrou, A., Damaskos, C., Logothetis, E., Creatsa, M., Antoniou, A., Kouskouni, E. and Triantafyllou, N. (2011) 'Bsm1 vitamin D receptor's polymorphism and bone mineral density in men and premenopausal women on long-term antiepileptic therapy', *Eur J Neurol*, 18(1), pp. 93-8.
- Lazzari, A. A., Dussault, P. M., Thakore-James, M., Gagnon, D., Baker, E., Davis, S. A. and Houranah, A. M. (2013) 'Prevention of bone loss and vertebral fractures in patients with chronic epilepsy--antiepileptic drug and osteoporosis prevention trial', *Epilepsia*, 54(11), pp. 1997-2004.
- Leidig-Bruckner, G., Roth, H. J., Bruckner, T., Lorenz, A., Raue, F. and Frank-Raue, K. (2011) 'Are commonly recommended dosages for vitamin D supplementation too low? Vitamin D status and effects of supplementation on serum 25-hydroxyvitamin D levels--an observational study during clinical practice conditions', *Osteoporos Int*, 22(1), pp. 231-40.
- Lewiecki, E. M. (2011) 'New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis', *Nat Rev Rheumatol*, 7(11), pp. 631-8.
- Liu, Y. J., Zhang, L., Papasian, C. J. and Deng, H. W. (2014) 'Genome-wide Association Studies for Osteoporosis: A 2013 Update', *J Bone Metab*, 21(2), pp. 99-116.
- Mann, V., Hobson, E. E., Li, B., Stewart, T. L., Grant, S. F., Robins, S. P., Aspden, R. M. and Ralston, S. H. (2001) 'A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality', *J Clin Invest*, 107(7), pp. 899-907.
- Maricic, M. (2008) 'Osteomalacia', *Curr Osteoporos Rep*, 6(4), pp. 130-3.
- Marini, F., Parri, S., Masi, L., Ciuffi, S., Guazzini, A., Fabbri, S., Luzi, E., Cianferotti, L. and Brandi, M. L. (2013) 'COL1A1 Sp1 variation and bone phenotypes in an Italian population', *Clin Cases Miner Bone Metab*, 10(2), pp. 133-8.
- Markoula, S., Teotonio, R., Ratnaraj, N., Duncan, J. S., Sander, J. W. and Patsalos, P. N. (2014) 'Lacosamide serum concentrations in adult patients with epilepsy: the

- influence of gender, age, dose, and concomitant antiepileptic drugs', *Ther Drug Monit*, 36(4), pp. 494-8.
- Mattson, R. H. and Gidal, B. E. (2004) 'Fractures, epilepsy, and antiepileptic drugs', *Epilepsy Behav*, 5 Suppl 2, pp. S36-40.
- Menon, B. and Harinarayan, C. V. (2010) 'The effect of anti epileptic drug therapy on serum 25-hydroxyvitamin D and parameters of calcium and bone metabolism--a longitudinal study', *Seizure*, 19(3), pp. 153-8.
- Mikati, M. A., Dib, L., Yamout, B., Sawaya, R., Rahi, A. C. and Fuleihan, G. I.-H. (2006) 'Two randomized vitamin D trials in ambulatory patients on anticonvulsants: impact on bone', *Neurology*, 67(11), pp. 2005-14.
- Mintzer, S., Boppana, P., Toguri, J. and DeSantis, A. (2006) 'Vitamin D levels and bone turnover in epilepsy patients taking carbamazepine or oxcarbazepine', *Epilepsia*, 47(3), pp. 510-5.
- Miziak, B., Błaszczuk, B., Chrościńska-Krawczyk, M., Danilkiewicz, G., Jagiełło-Wójtowicz, E. and Czuczwar, S. J. (2014) 'The problem of osteoporosis in epileptic patients taking antiepileptic drugs', *Expert Opin Drug Saf*, 13(7), pp. 935-46.
- Nissen-Meyer, L. S., Svalheim, S., Taubøll, E., Reppe, S., Lekva, T., Solberg, L. B., Melhus, G., Reinholt, F. P., Gjerstad, L. and Jemtland, R. (2007) 'Levetiracetam, phenytoin, and valproate act differently on rat bone mass, structure, and metabolism', *Epilepsia*, 48(10), pp. 1850-60.
- Ohlsson, C. and Sjögren, K. (2015) 'Effects of the gut microbiota on bone mass', *Trends Endocrinol Metab*, 26(2), pp. 69-74.
- Olmos, J. M., Hernández, J. L., García-Velasco, P., Martínez, J., Llorca, J. and González-Macías, J. (2015) 'Serum 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone, calcium intake, and bone mineral density in Spanish adults', *Osteoporos Int*.
- Onodera, K., Takahashi, A., Sakurada, S. and Okano, Y. (2002) 'Effects of phenytoin and/or vitamin K2 (menatetrenone) on bone mineral density in the tibiae of growing rats', *Life Sci*, 70(13), pp. 1533-42.
- Pack, A. M. (2011) 'Treatment of epilepsy to optimize bone health', *Curr Treat Options Neurol*, 13(4), pp. 346-54.
- Pack, A. M. (2012) 'Falls and fractures in patients with epilepsy: is there an increased risk? If so, why?', *Neurology*, 79(2), pp. 119-20.
- Pack, A. M. and Morrell, M. J. (2004) 'Epilepsy and bone health in adults', *Epilepsy Behav*, 5 Suppl 2, pp. S24-9.
- Pack, A. M., Morrell, M. J., Marcus, R., Holloway, L., Flaster, E., Doñe, S., Randall, A., Seale, C. and Shane, E. (2005) 'Bone mass and turnover in women with epilepsy on antiepileptic drug monotherapy', *Ann Neurol*, 57(2), pp. 252-7.
- Pack, A. M., Morrell, M. J., Randall, A., McMahon, D. J. and Shane, E. (2008) 'Bone health in young women with epilepsy after one year of antiepileptic drug monotherapy', *Neurology*, 70(18), pp. 1586-93.
- Pack, A. M., Olarte, L. S., Morrell, M. J., Flaster, E., Resor, S. R. and Shane, E. (2003) 'Bone mineral density in an outpatient population receiving enzyme-inducing antiepileptic drugs', *Epilepsy Behav*, 4(2), pp. 169-74.
- Pedreira-Canal, M., Moran, J. M., Vera, V., Roncero-Martin, R., Lavado-Garcia, J. M., Aliaga, I. and Pedreira-Zamorano, J. D. (2015) 'Lack of Influence of Vitamin D Receptor Bsm1 (rs1544410) Polymorphism on the Rate of Bone Loss in a Cohort of Postmenopausal Spanish Women Affected by Osteoporosis and Followed for Five Years', *PLoS One*, 10(9), pp. e0138606.
- Peppone, L. J., Hebl, S., Purnell, J. Q., Reid, M. E., Rosier, R. N., Mustian, K. M., Palesh, O. G., Huston, A. J., Ling, M. N. and Morrow, G. R. (2010) 'The efficacy of calcitriol

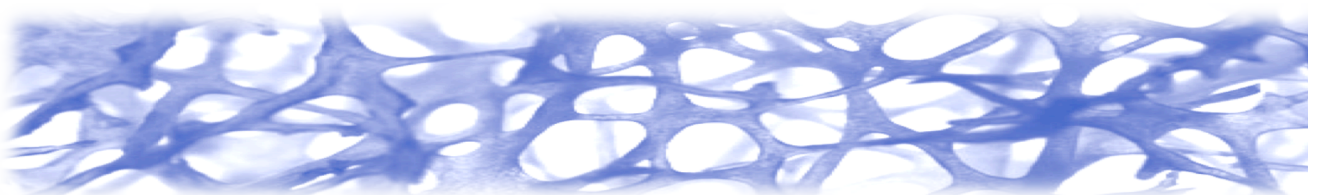
- therapy in the management of bone loss and fractures: a qualitative review', *Osteoporos Int*, 21(7), pp. 1133-49.
- Petty, S. J., Hill, K. D., Haber, N. E., Paton, L. M., Lawrence, K. M., Berkovic, S. F., Seibel, M. J., O'Brien, T. J. and Wark, J. D. (2010) 'Balance impairment in chronic antiepileptic drug users: a twin and sibling study', *Epilepsia*, 51(2), pp. 280-8.
- Phabphal, K., Geater, A., Limapichart, K., Sathirapanya, P., Setthawatcharawanich, S., Witeerungrot, N., Thammakumpee, N. and Leelawattana, R. (2013a) 'The association between Bsm1 polymorphism and bone mineral density in young patients with epilepsy who are taking phenytoin', *Epilepsia*, 54(2), pp. 249-55.
- Phabphal, K., Geater, A., Limapichat, K., Sathirapanya, P., Setthawatcharawanich, S. and Leelawattana, R. (2013b) 'Effect of switching hepatic enzyme-inducer antiepileptic drug to levetiracetam on bone mineral density, 25 hydroxyvitamin D, and parathyroid hormone in young adult patients with epilepsy', *Epilepsia*, 54(6), pp. e94-8.
- Pérez Edo, L., Alonso Ruiz, A., Roig Vilaseca, D., García Vadillo, A., Guañabens Gay, N., Peris, P., Torrijos Eslava, A., Beltrán Audera, C., Fiter Aresté, J., Arboleya Rodríguez, L., Graña Gil, J., Carbonell Abelló, J., Nolla, J. M., Holgado Pérez, S., Salas Heredia, E., Zubieta Taberner, J., Del Pino Montes, J., Blanch i Rubió, J., Caamaño Freire, M., Rodríguez Pérez, M., Castañeda, S., Cerdá, D., Gómez Vaquero, C., Calvo Catalá, J., Ciria, M., Loza, E. and Rheumatology, S. S. o. (2011) '[2011 Up-date of the consensus statement of the Spanish Society of Rheumatology on osteoporosis]', *Reumatol Clin*, 7(6), pp. 357-79.
- Pérez-Llamas, F., López-Contreras, M. J., Blanco, M. J., López-Azorín, F., Zamora, S. and Moreiras, O. (2008) 'Seemingly paradoxical seasonal influences on vitamin D status in nursing-home elderly people from a Mediterranean area', *Nutrition*, 24(5), pp. 414-20.
- Ralston, S. H. and Uitterlinden, A. G. (2010) 'Genetics of osteoporosis', *Endocr Rev*, 31(5), pp. 629-62.
- Ralston, S. H., Uitterlinden, A. G., Brandi, M. L., Balcells, S., Langdahl, B. L., Lips, P., Lorenc, R., Obermayer-Pietsch, B., Scollen, S., Bustamante, M., Husted, L. B., Carey, A. H., Diez-Perez, A., Dunning, A. M., Falchetti, A., Karczmarewicz, E., Kruk, M., van Leeuwen, J. P., van Meurs, J. B., Mangion, J., McGuigan, F. E., Mellibovsky, L., del Monte, F., Pols, H. A., Reeve, J., Reid, D. M., Renner, W., Rivadeneira, F., van Schoor, N. M., Sherlock, R. E., Ioannidis, J. P. and Investigators, G. (2006) 'Large-scale evidence for the effect of the COL1A1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study', *PLoS Med*, 3(4), pp. e90.
- Roberts, W. E. (2009) 'Skin type classification systems old and new', *Dermatol Clin*, 27(4), pp. 529-33, viii.
- Rodríguez Sangrador, M. (2006) *Influencia de la exposición solar y la dieta en el estatus nutricional de vitamina D en mujeres adolescentes y de edad avanzada: estudio OPTIFORD-Unión Europea*. doctor, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Romero Barco, C. M., Manrique Arijá, S. and Rodríguez Pérez, M. (2012) 'Biochemical markers in osteoporosis: usefulness in clinical practice', *Reumatol Clin*, 8(3), pp. 149-52.
- Rosen, C. J., Abrams, S. A., Aloia, J. F., Brannon, P. M., Clinton, S. K., Durazo-Arvizu, R. A., Gallagher, J. C., Gallo, R. L., Jones, G., Kovacs, C. S., Manson, J. E., Mayne, S. T., Ross, A. C., Shapses, S. A. and Taylor, C. L. (2012) 'IOM committee members respond to Endocrine Society vitamin D guideline', *J Clin Endocrinol Metab*, 97(4), pp. 1146-52.

- Rosen, C. J. and Taylor, C. L. (2013) 'Common misconceptions about vitamin D--implications for clinicians', *Nat Rev Endocrinol*, 9(7), pp. 434-8.
- Ross, A. C., Manson, J. E., Abrams, S. A., Aloia, J. F., Brannon, P. M., Clinton, S. K., Durazo-Arvizu, R. A., Gallagher, J. C., Gallo, R. L., Jones, G., Kovacs, C. S., Mayne, S. T., Rosen, C. J. and Shapses, S. A. (2011) 'The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know', *J Clin Endocrinol Metab*, 96(1), pp. 53-8.
- Salimipour, H., Kazerooni, S., Seyedabadi, M., Nabipour, I., Nemat, R., Iranpour, D. and Assadi, M. (2013) 'Antiepileptic treatment is associated with bone loss: difference in drug type and region of interest', *J Nucl Med Technol*, 41(3), pp. 208-11.
- Sancho Rieger, J., Mercadé Cerdá, J., Mauri Llerda, J., López González, F. and Salas Puig, X. (2012) *Guías diagnósticas y terapéuticas de la Sociedad Española de Neurología. Guía oficial de práctica clínica en epilepsia*. Madrid: Luzan.
- Sato, Y., Kondo, I., Ishida, S., Motooka, H., Takayama, K., Tomita, Y., Maeda, H. and Satoh, K. (2001) 'Decreased bone mass and increased bone turnover with valproate therapy in adults with epilepsy', *Neurology*, 57(3), pp. 445-9.
- Schiller, Y. and Najjar, Y. (2008) 'Quantifying the response to antiepileptic drugs: effect of past treatment history', *Neurology*, 70(1), pp. 54-65.
- Schmid, F. (1967) 'Osteopathien bei antiepileptischer Dauerbehandlung.', *Fortschr Med*, 85, pp. 381-382.
- Schousboe, J. T., Shepherd, J. A., Bilezikian, J. P. and Baim, S. (2013) 'Executive summary of the 2013 International Society for Clinical Densitometry Position Development Conference on bone densitometry', *J Clin Densitom*, 16(4), pp. 455-66.
- Sempos, C. T., Durazo-Arvizu, R. A., Binkley, N., Jones, J., Merkel, J. M. and Carter, G. D. (2015) 'DEVELOPING VITAMIN D DIETARY GUIDELINES AND THE LACK OF 25-HYDROXYVITAMIN D ASSAY STANDARDIZATION: THE EVER-PRESENT PAST', *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- Senn, S. M., Kantor, S., Poulton, I. J., Morris, M. J., Sims, N. A., O'Brien, T. J. and Wark, J. D. (2010) 'Adverse effects of valproate on bone: defining a model to investigate the pathophysiology', *Epilepsia*, 51(6), pp. 984-93.
- Serin, H. M., Koç, Z. P., Temelli, B. and Esen, İ. (2015) 'The bone mineral content alterations in pediatric patients medicated with levetiracetam, valproic acid, and carbamazepine', *Epilepsy Behav*, 51, pp. 221-224.
- Shanbhogue, V. V., Mitchell, D. M., Rosen, C. J. and Bouxsein, M. L. (2015) 'Type 2 diabetes and the skeleton: new insights into sweet bones', *Lancet Diabetes Endocrinol*.
- Shen, C., Chen, F., Zhang, Y., Guo, Y. and Ding, M. (2014) 'Association between use of antiepileptic drugs and fracture risk: a systematic review and meta-analysis', *Bone*, 64, pp. 246-53.
- Sheth, R. D., Binkley, N. and Hermann, B. P. (2008) 'Gender differences in bone mineral density in epilepsy', *Epilepsia*, 49(1), pp. 125-31.
- Sheth, R. D., Gidal, B. E. and Hermann, B. P. (2006) 'Pathological fractures in epilepsy', *Epilepsy Behav*, 9(4), pp. 601-5.
- Sheth, R. D. and Harden, C. L. (2007) 'Screening for bone health in epilepsy', *Epilepsia*, 48 Suppl 9, pp. 39-41.
- Shiek Ahmad, B., Hill, K. D., O'Brien, T. J., Gorelik, A., Habib, N. and Wark, J. D. (2012) 'Falls and fractures in patients chronically treated with antiepileptic drugs', *Neurology*, 79(2), pp. 145-51.
- Simko, J., Fekete, S., Malakova, J., Kremlacek, J., Horacek, J., Zivna, H., Palicka, V. and

- Zivny, P. (2014) 'The effect of lacosamide on bone tissue in orchidectomised male albino Wistar rats', *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*
- Siris, E. S., Adler, R., Bilezikian, J., Bolognese, M., Dawson-Hughes, B., Favus, M. J., Harris, S. T., Jan de Beur, S. M., Khosla, S., Lane, N. E., Lindsay, R., Nana, A. D., Orwoll, E. S., Saag, K., Silverman, S. and Watts, N. B. (2014) 'The clinical diagnosis of osteoporosis: a position statement from the National Bone Health Alliance Working Group', *Osteoporos Int*, 25(5), pp. 1439-43.
- Sjögren, K., Engdahl, C., Henning, P., Lerner, U. H., Tremaroli, V., Lagerquist, M. K., Bäckhed, F. and Ohlsson, C. (2012) 'The gut microbiota regulates bone mass in mice', *J Bone Miner Res*, 27(6), pp. 1357-67.
- Song, X. Q., Wang, Z. P., Bao, K. R., Zhang, J. M., Wu, J., Yan, C. H. and Shen, X. M. (2005) '[Effect of carbamazepine and valproate on bone metabolism in children with epilepsy]', *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 43(10), pp. 728-32.
- Souberbielle, J. C. (2014) '[Metabolism and effects of vitamin D. Definition of vitamin D deficiency]', *Biol Aujourd'hui*, 208(1), pp. 55-68.
- Souverein, P. C., Webb, D. J., Petri, H., Weil, J., Van Staa, T. P. and Egberts, T. (2005) 'Incidence of fractures among epilepsy patients: a population-based retrospective cohort study in the General Practice Research Database', *Epilepsia*, 46(2), pp. 304-10.
- Souverein, P. C., Webb, D. J., Weil, J. G., Van Staa, T. P. and Egberts, A. C. (2006) 'Use of antiepileptic drugs and risk of fractures: case-control study among patients with epilepsy', *Neurology*, 66(9), pp. 1318-24.
- Starup-Linde, J., Eriksen, S. A., Lykkeboe, S., Handberg, A. and Vestergaard, P. (2014) 'Biochemical markers of bone turnover in diabetes patients--a meta-analysis, and a methodological study on the effects of glucose on bone markers', *Osteoporos Int*, 25(6), pp. 1697-708.
- Stepanova, D. and Beran, R. G. (2014) 'Measurement of levetiracetam drug levels to assist with seizure control and monitoring of drug interactions with other anti-epileptic medications (AEMs)', *Seizure*, 23(5), pp. 371-6.
- Stewart, T. L. and Ralston, S. H. (2000) 'Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis', *J Endocrinol*, 166(2), pp. 235-45.
- Svedbom, A., Hernlund, E., Ivergård, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., McCloskey, E. V., Jönsson, B., Kanis, J. A. and IOF, E. R. P. o. (2013) 'Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports', *Arch Osteoporos*, 8, pp. 137.
- Takahashi, A., Onodera, K., Kamei, J., Sakurada, S., Shinoda, H., Miyazaki, S., Saito, T. and Mayanagi, H. (2003) 'Effects of chronic administration of zonisamide, an antiepileptic drug, on bone mineral density and their prevention with alfacalcidol in growing rats', *J Pharmacol Sci*, 91(4), pp. 313-8.
- Takahashi, N., Udagawa, N. and Suda, T. (2014) 'Vitamin D endocrine system and osteoclasts', *Bonekey Rep*, 3, pp. 495.
- Thakkinstian, A., D'Este, C., Eisman, J., Nguyen, T. and Attia, J. (2004) 'Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study', *J Bone Miner Res*, 19(3), pp. 419-28.
- Tjellesen, L., Gotfredsen, A. and Christiansen, C. (1983) 'Effect of vitamin D2 and D3 on bone-mineral content in carbamazepine-treated epileptic patients', *Acta Neurol Scand*, 68(6), pp. 424-8.
- Uitterlinden, A. G., Ralston, S. H., Brandi, M. L., Carey, A. H., Grinberg, D., Langdahl, B. L., Lips, P., Lorenc, R., Obermayer-Pietsch, B., Reeve, J., Reid, D. M., Amedei, A., Amidei, A., Bassiti, A., Bustamante, M., Husted, L. B., Diez-Perez, A., Dobnig, H.,

- Dunning, A. M., Enjuanes, A., Fahrleitner-Pammer, A., Fang, Y., Karczmarewicz, E., Kruk, M., van Leeuwen, J. P., Mavilia, C., van Meurs, J. B., Mangion, J., McGuigan, F. E., Pols, H. A., Renner, W., Rivadeneira, F., van Schoor, N. M., Scollen, S., Sherlock, R. E., Ioannidis, J. P., Investigators, A., Investigators, E., Investigators, E., Investigators, F., Investigators, L., Investigators, R. S. and Study, G. (2006) 'The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis', *Ann Intern Med*, 145(4), pp. 255-64.
- Vasikaran, S., Cooper, C., Eastell, R., Griesmacher, A., Morris, H. A., Trenti, T. and Kanis, J. A. (2011a) 'International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine position on bone marker standards in osteoporosis', *Clin Chem Lab Med*, 49(8), pp. 1271-4.
- Vasikaran, S., Eastell, R., Bruyère, O., Foldes, A. J., Garnero, P., Griesmacher, A., McClung, M., Morris, H. A., Silverman, S., Trenti, T., Wahl, D. A., Cooper, C., Kanis, J. A. and Group, I.-I. B. M. S. W. (2011b) 'Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards', *Osteoporos Int*, 22(2), pp. 391-420.
- Verrotti, A., Agostinelli, S., Coppola, G., Parisi, P. and Chiarelli, F. (2010a) 'A 12-month longitudinal study of calcium metabolism and bone turnover during valproate monotherapy', *Eur J Neurol*, 17(2), pp. 232-7.
- Verrotti, A., Coppola, G., Parisi, P., Mohn, A. and Chiarelli, F. (2010b) 'Bone and calcium metabolism and antiepileptic drugs', *Clin Neurol Neurosurg*, 112(1), pp. 1-10.
- Vestergaard, P. (2008) 'Changes in bone turnover, bone mineral and fracture risk induced by drugs used to treat epilepsy', *Curr Drug Saf*, 3(3), pp. 168-72.
- Vestergaard, P. (2015) 'Effects of antiepileptic drugs on bone health and growth potential in children with epilepsy', *Paediatr Drugs*, 17(2), pp. 141-50.
- Wacker, M. and Holick, M. F. (2013) 'Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation', *Nutrients*, 5(1), pp. 111-48.
- Weilbaecher, K. N., Guise, T. A. and McCauley, L. K. (2011) 'Cancer to bone: a fatal attraction', *Nat Rev Cancer*, 11(6), pp. 411-25.

ANEXOS.



HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

Estudio del metabolismo óseo en personas con epilepsia en tratamiento con antiepilépticos clásicos y de nueva generación y suplementos de vitamina D.

GRUPO VIT.D

SÍ

NO

EDAD: PESO: ALTURA: IMC:

SEXO:

M

H

ANTECEDENTES FAMILIARES

1. Osteoporosis sí no

ANTECEDENTES PERSONALES

HTA sí no DM sí no DLP sí no Tabaco sí no Alcohol sí no Enf. endocrinas sí no
 paq/d:..... g/d:..... (especificar)

TIPO DE PIEL	
Piel clara y pecas	I
Piel blanca	II
Piel blanca-morena	III
Piel morena	IV
Piel morena-oscura	V
Piel negra	VI

HISTORIA DE EPILEPSIA

1. Años de epilepsia:..... años

2. Tipo de crisis: GTC Focales Convulsiones bilaterales Otras

3. Etiología: Genética Estructural Etiología desconocida

4. Duración del tto actual: meses

5. Fármaco antiepiléptico actual y dosis:

LEV: dosis:.....mg/d ZNS: dosis:.....mg/d CBZ: dosis:.....mg/d VPA dosis:.....mg/d
 LCS: dosis:.....mg/d ESL: dosis:.....mg/d PHT: dosis:.....mg/d

EJERCICIO FÍSICO (aeróbico o de carga)

Basal:

Diario
 >2h,3v/sem
 1-6h/sem
 Esporádico
 No realiza

6 meses:

Diario
 >2h,3v/sem
 1-6h/sem
 Esporádico
 No realiza

TRATAMIENTOS ANTIEPILÉPTICOS PREVIOS:

TRATAMIENTOS CONCOMITANTES:

SUPLEMENTO DE VITD UTILIZADO

DOSIS:

Situación hormonal: Menstruación activa
 Postmenopausia
 Perimenopausia
 No procede

CAMBIOS EN LA MEDICACIÓN DURANTE LOS 6 MESES:

SÍ NO ESPECIFICAR:.....

NÚMERO DE CRISIS DURANTE LOS 6 MESES:.....

CLART[®] MetaBone

**GENOTIPADO DE LOS POLIMORFISMOS COL1A1-SPI, CTR-ALUI, VDRF-
FOKI, VDRB-BSMI, ESR1X-XBAI Y ESR1P-PVUII QUE PREDISPONEN
GENÉTICAMENTE A PADECER TRASTORNOS RELACIONADOS CON EL
METABOLISMO ÓSEO.**

CE-IVD

CLART® MetaBone

Extracción-Purificación y Amplificación

24 determinaciones Ref: AT-0506-24-MT

48 determinaciones Ref: AT-0506-48-MT

CLART® MetaBone

Visualización

24 determinaciones Ref: AT-0606-24

48 determinaciones Ref: AT-0606-48

Versión 3
Abril 2009

ÍNDICE:

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS

2. INTRODUCCIÓN

3. DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO

4. COMPONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT

4.1. Reactivos de extracción, purificación y amplificación

4.2. Reactivos de visualización

4.3. Otros componentes

5. MATERIAL REQUERIDO Y NO SUMINISTRADO

5.1. Reactivos y material

5.2. Equipos

6. RECOMENDACIONES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN

6.1. Recomendaciones generales

6.2. Precauciones para la visualización

7. TOMA DE MUESTRAS

7.1. Sangre total

8. PROTOCOLO DE TRABAJO

8.1. Extracción del ADN genómico a partir de sangre total

8.2. Reacción de Amplificación

8.3. Visualización del producto amplificado

9. LECTURA DE RESULTADOS

10. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

11. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Y DE FUNCIONAMIENTO

12. BIBLIOGRAFÍA

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS



Fecha de caducidad



Producto sanitario para Diagnóstico *In vitro*



Solamente para la evaluación de las prestaciones de Diagnóstico *In vitro*



Lote

2 °C

Conservar a temperatura ambiente

20°C

8°C

Conservar entre 4 °C y 8 °C

4°C

-18°C

Conservar entre -30 °C y -18 °C

-30°C

2. INTRODUCCIÓN

GENOMICA introduce un innovador sistema de array de baja densidad para detectar los polimorfismos con mayor vinculación con la pérdida de Densidad Mineral Ósea (DMO) y riesgo de fractura.

Los genes que están incluidos en **CLART® MetaBone** son los siguientes: **colágeno tipo1, receptor de la vitamina D, receptor de estrógenos y receptor de calcitonina**. El kit ofrece un diagnóstico molecular diferencial con la detección múltiple en un solo análisis de una batería de polimorfismos que están implicados en trastornos metabólicos óseos. Estos genes pueden presentar mutaciones puntuales o SNPs (**s**ingle **n**ucleotide **p**olymorphisms) localizadas en posiciones específicas del gen, responsables de los síntomas de estos trastornos.

La información de estos genes diana supone un papel fundamental en muchos casos para abordar una decisión clínica y apoyo para decidir una determinada terapéutica “medicina personalizada”.

Es conveniente que el facultativo disponga de este análisis ante las siguientes situaciones clínicas, ya que en todas ellas se ve afectada la DMO:

- Detección de pacientes con antecedentes familiares de osteoporosis.
- Pacientes con múltiples fracturas en edad temprana.
- Problemas hormonales.
- Ingesta prolongada de esteroides o anticonvulsivos.
- Evaluación pretrasplante de la patología óseo metabólica.
- Prevención ósea postrasplante.

En la tabla 1 se describen los SNPs seleccionados en estos genes que son el objeto de detección de este kit, así como las diferentes variantes alélicas que pueden aparecer.

GEN	SNP	Variante normal (Homocigoto)	Variante polimórfica (Homocigoto)	Ambas variantes (Heterocigoto)
Colágeno Tipo I	COL1A1-SPI	SS	ss	Ss
Receptor Vitamina D	VDRF-FOKI	FF	ff	Ff
Receptor Vitamina D	VDRB-BSMI	BB	bb	Bb
Receptor de calcitonina	CTR-ALUI	AA	aa	Aa
Receptor de estrógenos	ESR1X-XBAI	XX	xx	Xx
Receptor de estrógenos	ESR1P-PVUII	PP	pp	Pp

Tabla 1. SNPs y variantes alélicas de los genes relacionados con trastornos metabólicos óseos.

En la figura 1 se muestra la implicación que tiene cada variante alélica en la aparición de los síntomas de la enfermedad.

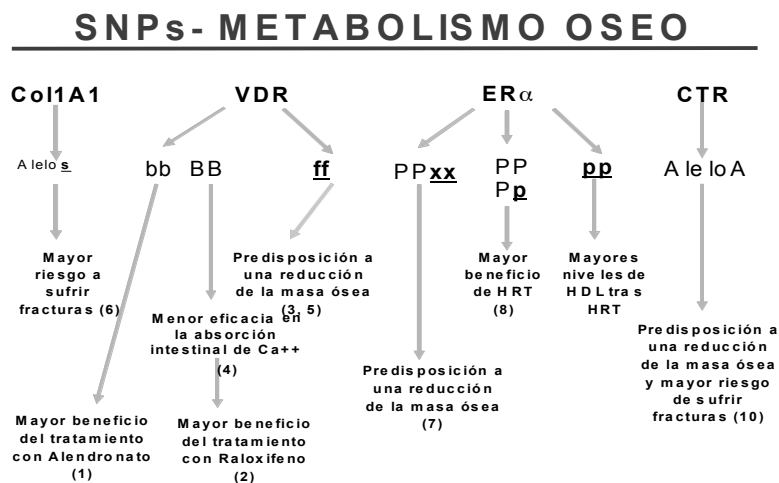


Figura 1. Relación entre las variantes alélicas y los síntomas de osteoporosis. HRT (terapia hormonal sustitutiva), HDL (lipoproteína de alta densidad). Las referencias bibliográficas se encuentran descritas en el apartado de sensibilidad diagnóstica.

Este kit para el diagnóstico *in vitro* de los polimorfismos relacionados con enfermedades metabólicas óseas se basa en la amplificación de fragmentos específicos del genoma humano y la posterior detección mediante la hibridación con sondas de captura específicas para cada gen, lo que conlleva una serie de ventajas:

- Sensibilidad: ya que permite la detección a partir de cantidades mínimas de material genómico humano.
- Especificidad: al utilizar una secuencia correspondiente a una región genómica determinada y sondas de captura específicas para cada uno de los genes implicados.
- Fácil de estandarizar en un laboratorio hospitalario.
- Rapidez: resultados de los análisis en 10 h.

3. DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO

Con el **CLART® MetaBone** se puede detectar en muestras clínicas de sangre total, la presencia de SNPs asociados a un mayor o menor riesgo de sufrir alteraciones metabólicas óseas. La información aportada por el kit permite detectar la predisposición de alguna de estas patologías de cada paciente.

La detección se lleva a cabo mediante la amplificación simultánea de 5 regiones del genoma, cada una de ellas de 150-250 pb, que contienen los 6 SNPs de interés, ver figura 2, donde las calles 1 y 2 corresponden al producto amplificado de un control positivo y uno negativo respectivamente, y las calles 3, 4, 5 corresponden a productos amplificados a partir de DNA extraído de sangre total de pacientes.

P b	Gen	SNP
246	VDR -B	BB B b bb
225	ESR	XX X x xx / PP P p pp
211	COL	SS S s ss
157	CTR	AA A a aa
154	VDRF	FF F ff

Figura 2. Bandas de amplificación de las 5 regiones del genoma que contienen los 6 SNPs.

La detección del producto amplificado por PCR se lleva a cabo mediante una nueva plataforma tecnológica basada en microarrays de baja densidad, el array en tubo (tubo AT). La plataforma AT se fundamenta en un principio muy sencillo pero a la vez muy cómodo y eficaz que consiste en incluir un microarray de baja densidad en la parte inferior de un tubo de ensayo tipo Eppendorf (Figura 3), lo que simplifica todo el proceso de hibridación y visualización frente a los sistemas de microarrays clásicos. Este tipo de tecnología permite la detección simultánea de múltiples marcadores moleculares de utilidad diagnóstica, en este caso, la detección de cada SNP conlleva un mínimo de tres sondas que detectarán la presencia de las dos variantes posibles, y una zona común del gen.

El sistema de detección de la hibridación en el kit **CLART® MetaBone** se basa en la precipitación de un producto insoluble en aquellas zonas del tubo AT en las que se produce la captura específica de los productos amplificados. Durante la PCR, los productos amplificados se marcan con biotina. Después de la amplificación, se hibridan con sus respectivas sondas específicas que están inmovilizadas en zonas concretas y conocidas del tubo AT, tras lo que se incuba con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. El conjugado se une a través de la estreptavidina con la biotina presente en los productos amplificados (que a su vez se encuentran unidos a sus sondas específicas) y la actividad peroxidasa provoca la aparición de un producto insoluble en presencia del sustrato o-Dianisidina, con lo que se produce la precipitación de éste en las zonas del tubo AT en las que ocurre la hibridación (Figura 4).

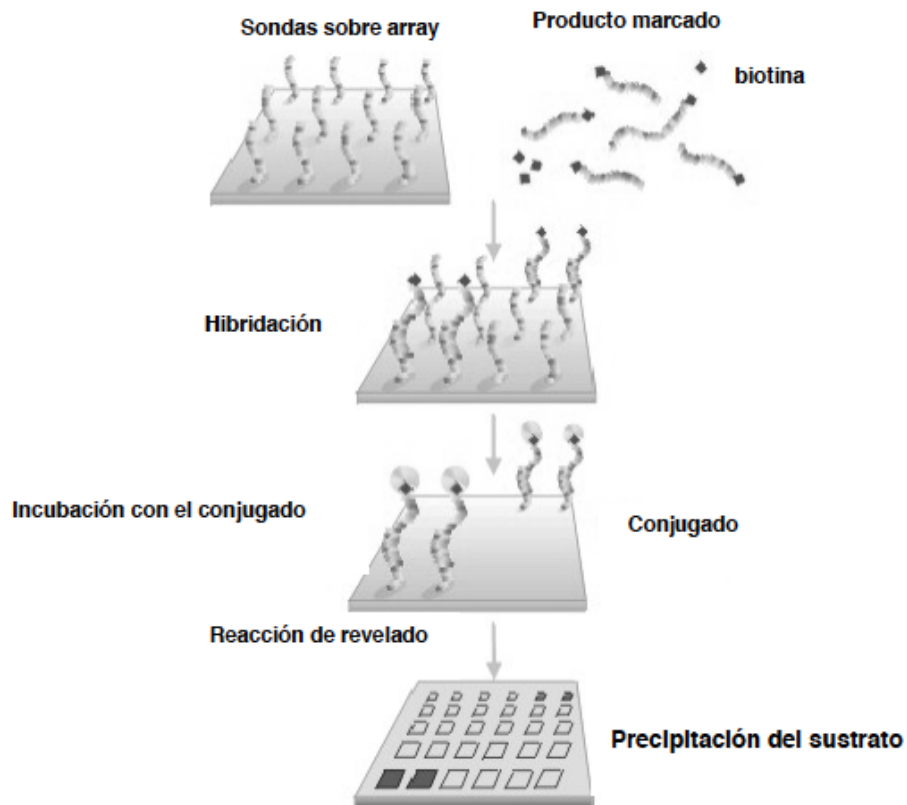


Figura 4: Esquema del método de visualización. Las sondas, inmobilizadas sobre la superficie, capturan sus productos amplificados complementarios marcados con biotina. A través de la biotina, se une el conjugado, en este caso estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano, *HorseRadish Peroxidase*). El sustrato o-Dianisidina por la acción de la HRP, produce un precipitado sobre la zona en la que se produce la hibridación.

La sensibilidad obtenida combinando amplificación genómica y visualización en tubo AT con el kit **CLART® MetaBone** es tan alta, que no es necesario hacer dobles amplificaciones (nested) evitando el riesgo de contaminación que éstas conllevan.

Uno de los inconvenientes de la detección por amplificación genómica son los falsos negativos debidos, bien a una calidad inadecuada del ADN de la muestra (por toma de cantidad insuficiente de muestra, por degradación del ADN debida a una inadecuada conservación o por pérdida del ADN de la muestra durante su extracción), o bien a la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en las muestras que se quieren analizar (hemoglobina). Con el **kit CLART® MetaBone** se han eliminado estos falsos negativos gracias a que se detecta la presencia de cada una de las 5 regiones amplificadas mediante una sonda específica, situada en una zona diferente a la que contiene el SNP, de manera, que la presencia de esta zona concreta sirve de **control de reacción de amplificación y de calidad de la muestra**.

4. COMPONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT

El kit **CLART® MetaBone** contiene suficientes reactivos para el análisis del ADN de 24 ó 48 muestras clínicas. Los reactivos incluidos en el kit se han agrupado en varias cajas, dependiendo de la temperatura a la que se han de conservar. Todos los reactivos son estables en las condiciones indicadas de conservación hasta la fecha de caducidad indicada.

4.1. Reactivos de extracción, purificación y amplificación:

El kit de Extracción y Purificación **CLART® MetaBone** se envía a 4°C/Tª ambiente. La proteinasa K una vez resuspendida debe conservarse a 4 °C.

Sus componentes son:

- Columnas de purificación acopladas a tubos de 2 ml
- Tubos de 2 ml
- Buffer B1
- Buffer B2
- Buffer B5
- Buffer BE
- Buffer BW
- Etiqueta para Buffer B3
- Proteinasa K liofilizada

Los reactivos de amplificación se envían a -20° C. Son los siguientes:

- **Tubos de Amplificación** listos para su uso. Los tubos de 0,2 ml contienen 45 µl de mezcla de reacción. Conservar a -20° C. Sólo se debe descongelar cada vez el número justo de tubos de amplificación que se vayan a procesar, conservando el resto de los tubos a -20° C. Se deben descongelar sobre hielo.

En la caja del kit se incluye un indicador adhesivo e irreversible de temperatura; la aparición de un color rojizo en la ventana de visualización indica que en algún momento los productos han sobrepasado la temperatura de conservación de -20° C y no deben utilizarse.

4.2. Reactivos de visualización:

Se envían a 4 °C. Son los siguientes:

1. **Tubos AT** (sondas específicas incluidas). Se suministran en un sobre termosellado. **Conservarlos siempre cerrados, a temperatura ambiente y protegidos de la luz.**

2. **SH** (Solución de Hibridación). **Conservar a temperatura ambiente**, en el momento de su uso **precalentar 5 min.** a 50 °C hasta la total desaparición de posibles cristales.
3. **RE** (Solución de Revelado). **Conservar a 4° C.**
4. **DC** (Diluyente de Conjugado). **Conservar a 4° C.**
5. **CJ** (Conjugado). **Conservar a 4° C.** Dar un pulso en la centrifuga antes de usar.
6. **TL** (Tampón de Lavado 5X). **Conservar a 4° C.**

¡ADVERTENCIA!: Una vez recibido el kit, los tubos AT, la solución SH y la solución RE deben conservarse a temperatura ambiente.

4.3. Otros componentes

- **Lector de tubos AT.** Este lector está fabricado por CLONDIAG Chip Technologies GmbH para uso exclusivo con los kits de diagnóstico de GENOMICA. El lector será distribuido por GENOMICA.
- **Software específico para CLART® MetaBone**, fabricado por GENOMICA. Instalado y listo para su uso.

5. MATERIAL REQUERIDO, NO SUMINISTRADO

A continuación enumeramos todo el material requerido no suministrado.

5.1. Reactivos y material

- Agua destilada (miliq autoclavada).
- Guantes desechables.
- Puntas de pipeta con filtro o desplazamiento positivo.
- Recipiente con hielo picado.
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml autoclavados.
- Gradillas para tubos de 1,5 ml.
- Soporte para tubos de 0,5 ml/0,2 ml.

5.2. Equipos

- Microcentrífuga.
- Termociclador.
- Tres micropipetas ajustables entre 1-20 µl, 20-200 µl y 200-1000 µl para el laboratorio de extracción.
- Tres micropipetas ajustables entre 1-20 µl, 20-200 µl y 200-1000 µl para el laboratorio de visualización.
- Termobloque con agitación ajustable a 37° C, 55° C y 100° C. Compatible con tubos tipo Eppendorf.

- Vortex
- Sistema de vacío (opcional)

6. RECOMENDACIONES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN

Muy importante: Leer detenidamente antes de comenzar la técnica.

6.1. Recomendaciones generales:

1. La técnica se debe realizar en dos áreas separadas físicamente, para evitar la contaminación de las muestras con el producto amplificado anteriormente. Cada una de las áreas debe tener su propio material de trabajo identificado (pipetas, puntas, tubos, gradillas, guantes, etc.) y nunca debe salir de cada una de ellas.

- **Área pre-PCR:** En esta área se hace la extracción del ADN y preparación de las muestras.
- **Área post-PCR:** En esta área se lleva a cabo la amplificación y la visualización del producto amplificado. El material de esta área nunca ha de entrar en contacto con el del área de extracción. Evitar ir al área de pre-PCR después de haber estado trabajando en el área de visualización.

2. Utilizar guantes en todo momento. Es recomendable cambiarse de guantes con cierta frecuencia.

3. Emplear siempre puntas con filtro o pipetas de desplazamiento positivo para evitar contaminaciones debidas a la micropipeta.

4. Emplear material de laboratorio desechable y autoclavado.

5. Nunca mezclar reactivos de dos tubos diferentes aunque sean del mismo lote.

6. Cerrar los tubos de reactivos inmediatamente después de su uso para evitar contaminaciones.

7. Desechar la punta de la micropipeta tras cada pipeteo.

8. GENOMICA no se hace responsable de los resultados obtenidos con el kit si se emplean otras muestras distintas a las indicadas o ADN extraído por un protocolo distinto al indicado.

6.2. Precauciones para la visualización

1. Al pipetear o al eliminar cualquiera de las soluciones utilizadas a lo largo del proceso en el tubo AT es muy importante evitar que la punta de la pipeta o del sistema de vacío toque el fondo del tubo, ya que podría dañarse el microarray situado en el fondo.
2. Añadir todas las soluciones sobre la pared lateral del tubo AT, nunca directamente sobre el microarray.
3. Tras la incubación con la solución CJ, es muy importante lavar bien el tubo AT y la tapa del tubo para evitar que queden restos de éste y reaccionen con la solución RE, produciendo un precipitado inespecífico que pueda dar lugar a interpretaciones erróneas del resultado.
4. Tras los lavados tener la precaución de retirar todo el TL, de manera que el cristal quede completamente seco antes de echar cualquier reactivo de la visualización. Esto es especialmente importante en los lavados tras el conjugado.
5. Vite que queden burbujas sobre la superficie del microarray al añadir cualquiera de las distintas soluciones.
6. Mantener limpia la base del tubo AT para evitar posibles interferencias en la lectura de resultados.
7. Al visualizar la imagen en el lector, comprobar que aparezcan los marcadores de posición y que no haya burbujas o manchas que interfieran en la lectura. En caso contrario, limpiar el fondo del tubo por fuera con un papel de celulosa y eliminar las burbujas con micropipeta.
8. Es muy importante respetar los tiempos de incubación para que no se produzcan sobrerrevelado que modifique el resultado.
9. Los ATs no deben ser golpeados en ningún momento para evitar que las sondas o el precipitado se suelten.

7. TOMA DE MUESTRAS

7.1. Sangre total

Las muestras de sangre han de tomarse en tubos que contengan EDTA o citrato como anticoagulante, nunca heparina.

Las muestras deben procesarse antes de 12 h y mientras tanto han de conservarse a 4°C. Si se van a procesar después, han de mantenerse a – 20°C.

8. PROTOCOLO DE TRABAJO

8.1. Extracción del ADN genómico

RECOMENDACIONES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN

- Preparar la solución B3: añadir el Buffer B1 al Buffer B2 y agitar. El Buffer resultante B3, ha de almacenarse protegido de la luz y a temperatura ambiente; en estas condiciones, es estable durante 5 meses.
- Disolver la proteinasa K en PB antes de usar (la cantidad de PB está indicada en el bote de proteinasa K), para alcanzar una concentración de 20 mg/ml. La proteinasa K, una vez disuelta, debe almacenarse a 4°C.
- Añadir etanol (96-100 %) al Buffer B5 antes de usar. El volumen de etanol está indicado en el bote Buffer B5.
- Calentar la Solución BE a 70°C antes de usar.
- Todas las centrifugaciones del proceso se realizarán a temperatura ambiente, a no ser que se especifique otra cosa.

Atención: Las Soluciones B3 y BW contienen hidrocloreto de guanidino. Se recomienda el uso de guantes, gafas y bata de laboratorio para su manejo.

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENOMICO

1. Añadir 25 µl de Proteinasa K a 200 µl de sangre. Añadir 200 µl de Solución B3. Mezclar en vortex durante 20 segundos e incubar a 70°C durante 30 min (durante la incubación agitar dos veces en vortex durante unos segundos).

Añadir
25 µl proteinasa K
200 µl B3

70°C, 30 min.

2. Añadir 210 μ l de etanol 96% a cada muestra y agitar en vortex inmediatamente.

Nota: No descartar ningún precipitado blanquecino que se pueda haber formado tras la adición del etanol; este precipitado debe añadirse con el resto de la solución a la columna de purificación en el siguiente paso.

3. Preparar una columna de purificación por muestra y colocarla en un tubo de recogida de 2 ml. Añadir la muestra y centrifugar durante 1 minuto a 12.000 r.p.m. Si el líquido no ha atravesado completamente la membrana, repetir la centrifugación. Descartar el fluido filtrado.

4. Añadir 500 μ l de la Solución BW a la columna. Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 1 min. Descartar el fluido filtrado.

5. Añadir 600 μ l de Solución B5 a la columna. Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 1 min. Descartar el fluido filtrado.

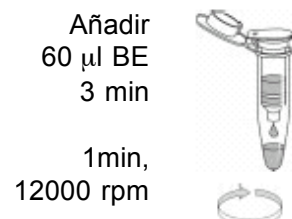
6. Reinsertar la columna en el tubo de recogida. Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 1 min. para eliminar cualquier resto de la Solución B5.

1 min
12000 rpm



Nota: El etanol residual que pueda quedar de la Solución B5 inhibe reacciones enzimáticas, por lo que se debe eliminar completamente mediante esta centrifugación.

7. Colocar la columna en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml. Añadir 60 μ l de la Solución BE (previamente calentada a 70°C) sobre el filtro sin tocarlo. Incubar esta solución caliente en la columna a temperatura ambiente durante 3 min. Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 1 min.



8. Recuperar el filtrado que contiene el ADN (aproximadamente 60 μ l) en el tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.

9. Cuantificar el ADN extraído. La concentración final mínima recomendada es de 40 ng/ μ l. Utilizar 5 μ l para la reacción de amplificación (200 ng de ADN total) y guardar el resto a -20°C.

Se recomienda verificar que el ADN extraído sea de **buena calidad**, mediante la medida de los siguientes parámetros:

- A260: 0,1-0,5, indica una buena reproducibilidad.
- A260/280: 1,7-2,0, indica que no hay contaminación con proteínas.

8.2. Reacción de amplificación

1. Descongelar un **Tubo de Reacción** por cada muestra que se va a estudiar y mantenerlos en hielo. No usar temperaturas superiores a 37°C para la descongelación.
2. Centrifugar unos segundos los **Tubos de Reacción** en la microcentrífuga para que quede todo el líquido en el fondo del tubo (si no se dispone de adaptadores de microcentrífuga para los **Tubos de Reacción**, se pueden

utilizar en su lugar tubos de un tamaño mayor a los que se les haya cortado la tapa).

3. Añadir 5 µl del ADN extraído de las muestras (recomendado 200 ng de ADN total) a los **Tubos de Reacción** y resuspender varias veces con la micropipeta. Dejar los tubos en el hielo.
4. Programar en el termociclador los siguientes ciclos de temperaturas. Si el termociclador lo permite, programarlo de tal forma que no comience el primer ciclo hasta que la tapa superior del mismo haya alcanzado los 95°C, para evitar las evaporaciones en los tubos que no llevan aceite.

Para Tubos de Reacción de 0.2 ml:

1 ciclo	95°C 12 min
40 ciclos	95°C 30 seg 55°C 40 seg 72°C 1 min
1 ciclo	60°C 30 min
20°C continuo hasta la recogida de tubos (opcional)	

5. Arrancar el programa y colocar los **Tubos de Reacción** en el termociclador. La duración de la amplificación es de unas 4 horas, aunque puede variar ligeramente dependiendo del termociclador.

8.3. Visualización del producto amplificado

8.3.1 Recomendaciones específicas antes de comenzar la visualización:

EL PROTOCOLO DESCRITO A CONTINUACIÓN SE DEBE REALIZAR SIEMPRE EN EL **ÁREA POST-PCR**. NUNCA LLEVAR EL PRODUCTO AMPLIFICADO AL ÁREA DE PRE-PCR.

- Encender el lector de ATs al comienzo del proceso. La autocalibración del equipo tarda unos minutos y debe estar listo en el momento de la lectura para evitar esperas innecesarias que produzcan un exceso de revelado.
- PREPARAR LA SOLUCIÓN DE LAVADO ANTES DE CADA ENSAYO, NO REUTILIZAR SOLUCIONES O RESTOS PREPARADAS CON ANTERIORIDAD.
 - Para **12 muestras**, añadir 1.5 ml de Solución TL a 13.5 ml de agua destilada.

- Para **24 muestras**, añadir 3 ml de Solución TL a 27 ml de agua destilada.
- Programar en el termociclador un ciclo de 10 min a 95° C, para realizar la desnaturalización de las muestras.
- Limpiar el termociclador con solución de lejía diluida al 10% antes de poner en marcha el programa de desnaturalización. Es recomendable limpiar los pocillos con un hisopo humedecido con dicha concentración de lejía y no aplicar esta directamente sobre el bloque. Colocar los tubos lo más separados posible y nunca sobrepasar los 10 min. de desnaturalización.
- Durante la visualización no hace falta utilizar puntas con filtro, **salvo en la adición de amplificadores al tubo AT donde sí es necesario.**
- **Calentar la SH (solución de hibridación) en el termomixer que se vaya a emplear a 50° C hasta que desaparezcan por completo los cristales precipitados.** Este proceso puede tardar según la T^a ambiente a la que haya estado almacenada la SH por lo que es conveniente realizarlo alrededor de media hora antes de comenzar el ensayo.
- **Preparación de las muestras:** El **producto amplificado** debe **desnaturalizarse junto** con la **solución de hibridación**. Añadir a un tubo de 0.5 ml **10µl** de producto amplificado con **90µl** de la SH (sin cristales).
- Asegurarse de que los termomixers han alcanzado la temperatura adecuada antes de introducir los tubos AT. Si no es así dejar el AT en tampón de lavado antes de retirarlo. Nunca dejar seco el cristal.
- En caso de fallo de lectura, introducir manualmente el número que aparece en el tubo AT especificado como Assay ID.

8.3.2 Realización de la visualización:

1. Desnaturalización de los productos de PCR (10 µl) previamente diluidos en la solución SH (90 µl): Incubar los tubos con las muestras preparadas a 95°C durante 10 minutos en un termociclador (ver recomendaciones específicas).
2. Pre-lavado del tubo AT: Este paso es necesario para lavar los tubos que vienen envasados, antes de añadir la muestra. Añadir 300 µl de Solución TL diluida a cada AT e invertir el tubo 4 ó 5 veces. Desechar la Solución TL diluida con pipeta o vacío.

Durante la visualización no hace falta utilizar puntas con filtro en ningún momento. Se debe dejar el tubo sin restos de la solución de lavado, para ello también secamos las tapas, pero en ningún caso se deben dejar los tubos secos durante mucho tiempo.

3. Hibridación: Justo antes de que concluya el paso de desnaturalización colocar los AT pre-lavados en el termobloque atemperado a 50°C.

Añadir a cada tubo AT, con cuidado de no tocar el cristal, 100 µl de las muestras recién desnaturalizadas (este paso ha de ser rápido para evitar que se enfríen las muestras).

Incubar los AT durante 1,5 horas a 50°C, agitando a 550 rpm.

Tras esta incubación, sacar los tubos y desechar la Solución **SH** con pipeta o vacío.

Dejar programado el termobloque a 30°C y en movimiento para su utilización posterior en el paso 6. Se puede quitar la tapa para que baje antes la temperatura.

4. Lavado: añadir 300 µl de Solución TL diluida a cada tubo AT e invertir los tubos 10 veces.

Desechar la Solución TL diluida con pipeta o vacío.

Si llegado a este paso, el termobloque no hubiera llegado a los 30°C, dejar los tubos con Solución TL diluida hasta que el termobloque alcance la temperatura.

5. Bloqueo y conjugado: 15 minutos antes de concluir la hibridación, se debe preparar la solución de conjugado y mantener en hielo. Se recomienda centrifugar la solución CJ durante 10 segundos antes de usarla. A continuación, preparar en hielo la solución CJ diluido. Para ello, mezclar en un tubo para cada AT los µl de Solución CJ y de Solución DC indicados a continuación:

Solución CJ: 1µl
Solución DC: 100µl

Preparar mezcla para un AT más por cada diez, para compensar los errores de pipeteo.

Añadir al tubo AT 100 µl de Solución CJ diluida. Incubar durante 15 minutos exactos a 30° C, agitando a 550 rpm. Tras esta incubación, desechar **rápidamente** la Solución del tubo AT con pipeta o vacío.

Bajar la temperatura del termobloque a 25 °C para su utilización en el paso 7.

Añadir 300 µl de Solución TL diluida a cada tubo AT e invertir los tubos 10 veces, desechar la solución con la pipeta o vacío. Si este **lavado no se realiza rápidamente puede causar en la lectura una señal no legible.**

6. Lavado: **Este lavado es el más importante.** Añadir 300 µl de Solución TL diluida a cada tubo AT e invertir los tubos 10 veces.

Desechar la Solución TL con pipeta o vacío. Es importante que no queden restos de Solución CJ diluida, ya que ésta reaccionaría con la Solución RE dando lugar a una señal inespecífica. No es necesario el cambio de punta para cada tubo, pero sí es importante no llegar al cristal.

7. Revelado con Solución RE: **Se debe trabajar como máximo en tandas de 12 tubos AT.**

Realizar este paso de forma seriada con todos los tubos AT, es decir:

- Quitar la solución TL a todos los tubos de una forma ordenada.
- Añadir 100 µl de solución RE a todos los tubos en el mismo orden indicado en el punto anterior.
- Incubar a 25° C durante 10 minutos en el termobloque sin agitación
- A los 10 minutos empezar a leer en el mismo orden en el que se ha ido añadiendo la solución RE.

¡Advertencia! Es muy importante utilizar el termobloque sin agitación y leer las muestras inmediatamente después de la incubación.

8. Leer en forma “Análisis seriados” en la que se toman las imágenes de todos los tubos para posteriormente ser analizados.

9. LECTURA DE RESULTADOS

El procesamiento de los datos obtenidos a partir de cada uno de los análisis, se realiza de forma automática. El equipo de lectura y análisis presentará un informe en el que se indican los resultados.

En la pantalla del equipo aparecerá una tabla con tres columnas, en la columna de la izquierda aparecerán los diferentes genes, en la del centro aparecerá el genotipo diagnosticado para cada gen concreto, y en la de la derecha aparecerá la conformidad de los controles de ADN y de amplificación.

10. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Muestras adecuadas

Gen/SNP	Resultado	Controles
Receptor Vitamina D VDRB-BSMI	BB/bb/Bb	Conforme/No conforme
Receptor de estrógenos ESR1P-PVUII	PP/pp/Pp	Conforme/No conforme
Receptor Vitamina D VDRF-FOKI	FF/ff/Ff	Conforme/No conforme
Receptor de calcitonina CTR-ALUI	AA/aa/Aa	Conforme/No conforme
Receptor de estrógenos ESR1X-XBAI	XX/xx/Xx	Conforme/No conforme
Colágeno Tipo I COL1A1-SP1	SS/ss/Ss	Conforme/No conforme

Muestras inadecuadas

Gen/SNP	Resultado	Controles
Receptor Vitamina D VDRB-BSMI	No concluyente	Conforme/No conforme

Resultado numérico de lectura en el límite de detección de la técnica.

Gen/SNP	Resultado	Controles
Receptor Vitamina D VDRB-BSMI	No conforme	No conforme

No hay amplificación del ADN genómico

11. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Y DE FUNCIONAMIENTO

Control de interferencias conocidas:

Existen sustancias que pueden interferir en la detección del Kit **CLART[®] MetaBone**. Principalmente, son sustancias que inhiben la DNA polimerasa y, por tanto, la reacción de amplificación. Las interferencias más conocidas son:

- **Utilización de muestras no adecuadas.** El análisis de cualquier otro tipo de muestra clínica distinta a las indicadas en el manual del kit **CLART[®] MetaBone**, así como una toma incorrecta de las muestras, puede conllevar que el resultado del análisis no sea concluyente. Por ejemplo, si se le añade heparina.

- **La conservación inadecuada de las muestras** puede influir en el resultado del análisis. Si las muestras se someten a condiciones que puedan resultar en una degradación del ADN que contienen, el resultado del análisis será de muestra no adecuada.

Especificaciones técnicas:

Parámetros Analíticos:

- **Sensibilidad analítica.**

La sensibilidad analítica del kit **CLART® MetaBone** se determinó mediante ensayos de detección de diluciones seriadas del ADN de muestras clínicas y de ADN comercial (línea K562). Se realizó la amplificación con las siguientes cantidades finales de ADN: 200, 20, 2, 0.2, y 0.02 ng.

Cantidad final de ADN genómico humano	Nº genomas equivalentes de células humanas
200	12539
20	1254
2	125
0.2	12
0.02	1.2

Previamente se identificaron por otras tecnologías alternativas (secuenciación o enzimas de restricción) los genotipos de cada una de las muestras clínicas, en relación a cada SNP incluido en este kit.

En la figura 5 se observa que la sensibilidad analítica de la técnica para la detección de 200 ng de ADN, que es la cantidad recomendada de uso, es de 97.4%, calculada después del análisis de 1276 genotipos. La técnica detecta hasta 2 ng de ADN con una sensibilidad del 86.5 %, lo que equivale a 125 moléculas de genomas equivalentes presentes en la muestra.

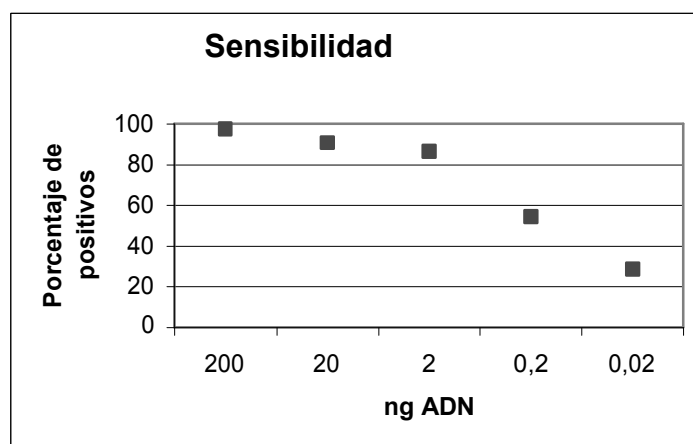


Figura 5: En esta gráfica se representa el porcentaje de casos positivos frente a los ng de ADN amplificados directamente en el tubo de reacción.

La sensibilidad analítica del Kit **CLART® MetaBone** analizada en muestras con 200 ng de ADN (como recomienda el kit) para cada genotipo en concreto sería la siguiente, donde “n” corresponde al número de muestras analizadas:

Genotipo Col1A1-SP1	% SENSIBILIDAD AT (n)
SS	94.5% (126)
Ss	96.4% (56)
ss	93% (28)
Total	95% (210)

Genotipo VDRB-BSMI	% SENSIBILIDAD AT (n)
BB	100% (70)
Bb	94% (84)
bb	98.3% (58)
Total	97.2% (212)

Genotipo VDRF-FOKI	% SENSIBILIDAD AT (n)
FF	100% (95)
Ff	100% (57)
ff	100% (62)
Total	100% (214)

Genotipo ESR1X-XBAI	% SENSIBILIDAD AT (n)
XX	98.2% (56)
Xx	96.3% (82)
xx	97.2% (72)
Total	97.1% (210)

Genotipo ESR1P-XBAI	% SENSIBILIDAD AT (n)
PP	100% (70)
Pp	93% (71)
pp	100% (71)
Total	97.6% (212)

Genotipo CTR-ALUI	% SENSIBILIDAD AT (n)
AA	100% (54)
Aa	97.1% (68)
aa	100% (84)
Total	99% (206)

- **Especificidad analítica**

Se ensayó la especificidad de las sondas impresas en el array mediante la hibridación de oligonucleótidos o sondas complementarios a los fijados al cristal, marcados con biotina. Con el Kit **CLART® MetaBone** no se produce detección inespecífica de otros genes del DNA genómico, ni se detecta hibridación cruzada entre las sondas que integran el array.

- **Sensibilidad diagnóstica**

A continuación se relaciona la presencia de un determinado alelo con la aparición de la sintomatología de osteoporosis y con la eficacia de un determinado tratamiento. La sensibilidad diagnóstica está basada en los siguientes estudios:

Interpretación de los resultados obtenidos con el perfil genético del Receptor de la vitamina D: VDRB-BSMI

a. En un estudio de 64 mujeres postmenopáusicas con osteoporosis se detectó un mayor incremento de la densidad de masa ósea (DMO) en columna lumbar en aquellas mujeres con genotipo bb frente a las que poseen genotipo BB, ($p < 0.004$) tras 12 meses de tratamiento con Alendronato (10 mg/día). Lo que indica un **mayor beneficio del tratamiento con Alendronato en los portadores del genotipo bb** frente a los portadores del genotipo BB (1).

DMO columna lumbar (g/cm ²)	VDR-B Genotipo BB	VDR-B Genotipo bb
Antes del tratamiento	0.582	0.573
Después del tratamiento*	0.602	0.618
% ▲ DMO	3.4%	7.8%

*12 meses de tratamiento con Alendronato (10mg/día), $p < 0.004$

b. En un estudio de 75 mujeres postmenopáusicas con osteoporosis se detectó un mayor incremento de la densidad de masa ósea (DMO) en aquellas mujeres con genotipo BB frente a las que poseen genotipo bb, ($p < 0.0001$) tras 12 meses de tratamiento con Raloxifeno (60 mg/día). Lo que indica un **mayor beneficio del tratamiento con Raloxifeno en los portadores del genotipo BB** frente a los portadores del genotipo bb (2).

DMO columna lumbar (g/cm ²)	VDR-B Genotipo BB	VDR-B Genotipo bb
Antes del tratamiento	0.546	0.541
Después del tratamiento*	0.569	0.549
% ▲ DMO	4.2%	1.5%

*12 meses de tratamiento con Raloxifeno (60mg/día), $p < 0.0001$

c. En un estudio realizado en parejas de gemelos y en mujeres postmenopáusicas, se asocia a los portadores del genotipo BB con los que menor DMO lumbar presentan, a los portadores heterocigotos Bb con una DMO lumbar intermedia, y a los portadores del genotipo bb con los que mayor DMO lumbar presentan. Por lo tanto, **asociamos el genotipo BB con una predisposición a la reducción de masa ósea** (3).

d. En un estudio se determinó que el incremento de ingesta cálcica de 800 a 1700 mg/día no afecta a la ganancia de la DMO en los sujetos portadores del genotipo bb, mientras que el incremento fue significativo en los portadores del genotipo Bb y BB ($p < 0.001$ y $p < 0.05$ respectivamente). Se observa también cómo en éstos últimos si se incrementa la ingesta de calcio, éstos igualan la DMO de los portadores bb. Por tanto **los sujetos con genotipo BB tienen una menor eficiencia de absorción intestinal de calcio, con el consiguiente riesgo de sufrir osteoporosis** (4).

Interpretación de los resultados obtenidos con el perfil genético del Receptor de la vitamina D: VDRF-FokI

En un estudio de 109 mujeres postmenopáusicas sin tratamiento, a las que se les realizó un seguimiento de 2 años, se detectó una mayor pérdida de la densidad de masa ósea (DMO) femoral en aquellas mujeres con genotipo ff frente a las que poseen genotipo Ff, siendo las de genotipo FF las que mayor DMO conservaban ($p=0.005$). Lo que indica que **el alelo f se asocia con una mayor predisposición a la reducción de masa ósea.** (5).

Genotipo VDRF-FokI	% menos de DMO en comparación con DMO de mujeres con genotipo FF*	%Pérdida DMO femoral en 2 años**
ff	12.8%	-4.73%
FF		-0.54%

* $p<0.01$ vs. FF, $p<0.05$ vs. Ff ** $p=0.018$ vs. FF, $p=0.005$ vs. Ff

Interpretación de los resultados obtenidos con el perfil genético del polimorfismo sp1 en el gen del Colágeno 1 A1: Col1A1

El análisis de 26 estudios publicados que incluyen 7849 participantes asocian de forma clara **la presencia del alelo ss con un alto riesgo a sufrir fractura osteopórotica** (6).

Interpretación de los resultados obtenidos con el perfil genético del Receptor de estrógenos: polimorfismos ESR1X-XBAI y ESR1P-PVUII

a. En un estudio de 238 mujeres postmenopáusicas se detectó valores significativamente mas bajos de densidad de masa ósea (DMO) tanto en columna lumbar como en cuerpo total en aquellas mujeres con genotipo PPxx frente a las que poseen el resto de combinaciones genotípicas, ($p=0.02$ en columna lumbar, $p=0.002$ en cuerpo total) (7). Lo que significa que **el genotipo PPxx muestra predisposición a una reducción de masa ósea.**

b. En un estudio de 464 mujeres postmenopáusicas, se les realizó un seguimiento durante 5 años de tal forma que 232 mujeres recibieron tratamiento hormonal y 232 no lo recibieron. Según los resultados obtenidos **las mujeres con un perfil genético PP y Pp para el polimorfismo ESR1P-PVUII responden mejor a la terapia hormonal que aquellas que poseen el genotipo pp** (8).

Interpretación de los resultados obtenidos con el perfil genético del Receptor de calcitonina (CTR): polimorfismos CTR-AluI

a. En un estudio realizado en 307 mujeres postmenopáusicas, se analizó el polimorfismo del CTR reconocido por la enzima de restricción AluI y se observó, que **las mujeres portadoras del genotipo aa tenían una DMO significativamente menor a nivel de la columna lumbar en comparación con las AA** ($p=0.01$), dicha diferencia no se observa a nivel femoral. (9). Otro estudio realizado en 663 mujeres postmenopáusicas y 52 perimenopáusicas, encontraron que **las portadoras del genotipo AA tenían una DMO significativamente menor** –ajustada por edad y peso a nivel de columna vertebral lumbar-. **Se determinó que la influencia del genotipo era mayor en las mujeres más jóvenes, lo que sugería una posible implicación de este gen en la adquisición del pico de masa ósea, más que en el proceso de pérdida de masa ósea asociado a la edad** (10).

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Effectiveness of alendronate treatment in postmenopausal women with osteoporosis: relationship with BsmI vitamin D receptor genotypes. Palomba *et al.* *Clinical Endocrinology* (2003) 58, 365-371.
2. Raloxifene administration in post-menopausal women with osteoporosis: effect of different BsmL vitamin receptor genotypes. Palomba *et al.* *Human Reproduction* (2003) 18,1, 192-198.
3. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. Morrison *et al.* *Nature* (1994) 284-287.
4. Vitamin D receptor D polymorphism and change in lumbar spine bone mineral density. Ferrari *et al.* *Lancet* (1995) 345:423-424.
5. The presence of a polymorphism at the traslation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. Coleman *et al.* *Journal of Bone and Mineral Research* (1996) 11, 12, 1850-1855.
6. Meta-Analysis of Col1A1 Sp1 polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture. Mann V., Ralston SH. *Bone* (2003). 32 (6):711-717.
7. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. Kobayashi *et al.* *Journal of bone and mineral research* (1996) 11 (3): 306- 311.
8. Early postmenopausal bone loss is associated with Pvull estrogen receptor gene polymorphism in Finnish women: effect of hormone replacement therapy. *Journal of Bone and Mineral Research*, Salmen *et al.* 15 (2000) (2): 315-321.

9. Allelic variants of human calcitonin receptor: distribution and association with bone mass in postmenopausal Italian women. Masi *et al.* Biochemical and Biophysical Research Communications (1998) 245, 622-626.

10. Association of CTR and col1A1 alleles with BMD values in peri and postmenopausal women. Calcif Tissue Int. Braga *et al.* (2000) 67, 361-366.

2 Información General

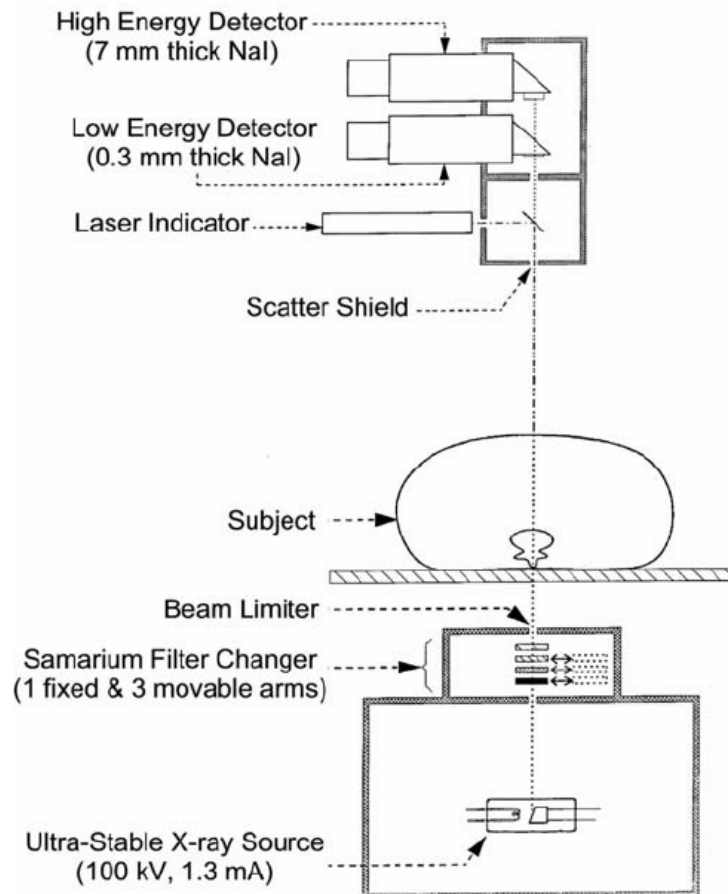
El Densitómetro Oseo Norland DEXA utiliza una técnica denominada absorciometría fotónica dual (DEXA) que sirve, para medir la densidad mineral ósea (DMO) mediante exploraciones no invasivas, El análisis realizado por el densitómetro Norland de la densidad ósea será de gran ayuda al médico en el diagnóstico y tratamiento de la osteoporosis, así como para valorar el riesgo de una posible fractura.

En las siguientes páginas se abordarán cuestiones como radioprotección y algunas de las características de manejo del programa Norland.

Al final de este capítulo se incluyen algunos ejemplos de informes de densitometría ósea.

Protección Radiológica

Hay que tener en cuenta la importancia de la protección radiológica cuando se trabaja con equipos de Rayos X. La radiación que recibe el paciente y la radiación dispersa que recibe el operador es muy baja. Sin embargo hay que tener en cuenta ciertas precauciones para garantizar un entorno seguro para el operador y los pacientes.



High Energy Detector (7mm thick NaI)	Detector de alta energía(7mm INa)
Low Energy Detector (7 mm thick NaI)	Detector de baja energía (0.3mm INa)
Laser Indicator	Indicador láser
Scatter Shield	Colimador de radiación dispersa del detector
Subject	Paciente
Beam Limiter	Colimador de la fuente de radiación
Samarium Filter Changer(1 fixed & 3 movable arms)	Filtro modular de Samario
Ultra Stable X-ray Source(100kV, 1.3 mA)	Tubo Rx ultraestable (100kV, 1.3 mA)

Permanezca Fuera del Haz de Rx

El Densitómetro Norland emite un fino haz de Rayos X, que no puede verse ni sentirse. El haz de Rayos X se emite desde la fuente de radiación situada en la mesa de exploración, atraviesa al paciente y es recogido por los detectores situados en el brazo del escáner. A pesar de que el poder de penetración del haz emitido por el Densitómetro Norland es mucho más bajo que el de un equipo de radiología convencional, no debe exponer ninguna parte de su cuerpo innecesariamente. Para ver dónde está situada la fuente de radiación consulte la imagen 15-1 del capítulo **Referencias Técnicas** (página 15-13)

Evite la Radiación Dispersa

Mientras el haz de Rayos X atraviesa al paciente, parte del haz se dispersa en todas las direcciones. La radiación dispersa es menor que el 0.1 mRem por hora a un metro de la fuente de radiación. Esta radiación dispersa sólo se produce cuando se emiten Rayos X, es decir durante el barrido del escáner. A pesar de que la radiación dispersa es relativamente baja evite exponerse siempre que le sea posible. Durante el barrido del escáner el operador debe situarse a un metro de distancia del haz de Rayos X.

Normativa Estatal

Todos los estados de los Estados Unidos deben cumplir la normativa vigente aplicada a equipos emisores de Rayos X. Para más información se recomienda encarecidamente que contacte con el Consejo de Seguridad Nuclear.

Area de Acceso Restringido

Siempre que sea posible el Densitómetro debe estar instalado en un área de acceso restringido al público general. Si esto no fuera posible, mantenga a las personas al menos a dos metros del haz de Rayos X mientras éste realiza el barrido. La normativa vigente puede variar de unos países a otros por lo que es importante cumplir con la regulación vigente de su país.



ATENCION: Para garantizar la seguridad del paciente y del operador, coloque la parte posterior del escáner (parte abierta debajo de la zona acolchada) a sólo unos centímetros de una pared para evitar el acceso de personas no autorizadas a la parte interna del equipo.

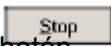

Dispositivos de Protección Contra la Radiación

Control de Exposición

La emisión de Rx está controlada únicamente por el operador. El operador

tiene que hacer clic en el botón  en la pantalla del ordenador para iniciar la emisión de Rx.

El operador puede detener en cualquier momento la exposición haciendo clic

en el botón  en la ventana **Scan** o haciendo clic en el  en el panel de control situado en el brazo del escáner.

PARA REINICIAR: para reanudar el escáner después de haber apretado el botón **HALT**, apague el escáner y enciéndalo de nuevo. Mantenga el ordenador encendido para mantener los datos del estudio que estaba llevando a cabo. Una vez reiniciado el escáner, el brazo del escáner se desplazará hasta alcanzar su posición inicial.
¡ASEGURESE DE QUE EL PACIENTE NO SE ENCUENTRE EN EL CAMINO DEL BRAZO DEL ESCANER!

Factores Técnicos


Los factores técnicos son los parámetros de operación que determinan la dosis de radiación que recibe el paciente. Hay algunos parámetros fijos, que siguen estrictamente la normativa y por tanto no son susceptibles a cambios (como kV del tubo, la corriente del tubo y el tiempo de exposición). El operador no controla ni podrá reajustar los factores técnicos.

Circuito de Vigilancia


El escáner de Norland incluye un circuito de vigilancia que monitoriza durante el barrido la comunicación entre la fuente de Rayos X y los detectores de datos situados en el brazo del escáner. Si esta comunicación falla, se detendrá la emisión de Rayos X.

Indicadores de la Exposición



El botón verde  (preparado) en el panel de control del brazo del escáner se ilumina para indicar que la fuente de Rayos X está lista.



El botón amarillo Rayos X  se ilumina sólo cuando el colimador está abierto y la fuente de Rayos X está preparada. El indicador de Rayos X se apaga cuando termina el barrido y se cierra el colimador. Si el colimador no funcionara correctamente se bloquearía automáticamente la fuente de emisión de Rayos X, para prevenir una exposición de forma no consciente a los Rayos X.

Protección Frente a la Radiación

Los niveles de radiación dispersa y de fuga son muy bajos por lo que no son necesarias barreras de protección. No será necesario blindar la sala, ni el operador deberá situarse durante el barrido detrás de una mampara de protección. El nivel de radiación a la distancia convencional, es decir, a 1m de la fuente de emisión es <math><0.1 \text{ mRem/hora}</math>. Norland recomienda que el operador se sitúe al menos a un metro del haz de Rx durante el barrido o en su defecto a la distancia que indique la normativa estatal de su país.

Señal Acústica

Una señal acústica indica que el estudio ha finalizado. Por favor, **NO DESCONECTE** los altavoces del ordenador ni ponga el volumen demasiado bajo.

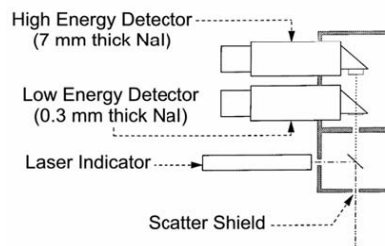
Características del Escáner

En los siguientes apartados se describirán algunas de las características innovadoras que utiliza el sistema Norland.

Haz de Doble Energía/ Tecnología DEXA (Absorciometría Fotónica Dual)

La técnica radiológica de Absorciometría Fotónica Dual mide la densidad ósea utilizando un haz de Rayos X lineal que produce dos picos distintos de energía. La dualidad de estos rayos posibilitan la distinción entre la atenuación producida por los tejidos blandos y por el hueso.

SimulCont™ garantiza una mayor precisión en la medición de la DMO. El sistema dual de cristales de centelleo de INa se utilizan para detectar por separado los dos picos de energía de los Rx.



La técnica utilizada para separar la emisión de Rx en dos niveles diferentes de energía se conoce como Filtración de capa K. En la filtración de capa K se coloca un elemento de las tierras raras en el camino del rayo, así se consigue la atenuación de los Rayos X al nivel de energía característico de cada elemento. Norland utiliza un filtro de samario que produce picos de energía que oscilan entre los 46.8 keV y los 80keV, que han resultado ser los más efectivos en la diferenciación entre el tejido blando y el óseo.

Sistema de Filtración Dinámica

El sistema de filtración dinámica **DynaFlux™** es otra de las innovaciones Norland que complementa al diseño del haz lineal. Norland ha diseñado un método mediante el cual se optimiza la detección de fotones independientemente del grosor y las características del paciente. Para ello se utiliza un filtro de samario. La selección de este filtro evita la saturación y la infraexposición de la cadena de detectores.

Tecnología QuikScan™

Todos los Densitómetros Oseo Centrales de Norland incorporan nuestra tecnología exclusiva **QuikScan™**. La tecnología QuikScan™ cuenta con una avanzada combinación de equipos mecánicos e informáticos, cuyo resultado es una mínima exposición del paciente y tiempos de barrido muy

bajos, mientras que se mantiene una precisión y exactitud óptimas.

Componentes del Equipo

El Densitómetro Oseo Norland consta de dos partes: el Módulo del Escáner y la Consola del Operador.

Módulo del Escáner

El Módulo del Escáner es una mesa especialmente construida para que el paciente se coloque en decúbito supino. La superficie de la mesa está acolchada y tapizada con un tejido muy resistente que puede retirarse para su limpieza. En la cabecera de la mesa (a la derecha si se sitúa frente a la mesa de exploración) se encuentra un dispositivo para colocar el rollo de papel que cubrirá la camilla en cada exploración. Encontrará más información en las páginas 13-2 sobre **Cómo Limpiar la Cubierta del Escáner** y en la 13-2 sobre **Cómo Limpiar la Funda de la Mesa de Exploración**.

La fuente de radiación está formada por un tubo de Rx dotado con una capa hemirreductora para obtener Rx Característicos (capa K). El tubo de Rx se encuentra embebido en una carcasa de plomo, que tiene una ventana (controlada electrónicamente) a través de la cual sale el haz de Rx. El haz de Rx está alineado con la cadena de detectores situados en el brazo del escáner. La fuente de Rx esta especialmente diseñada para realizar densitometrías, por lo que opera a bajas temperaturas lo que garantiza que el tubo tenga una larga vida.

Imagen 2-1: Módulos de Escáner de Norland



Panel de Control del Brazo del Escáner

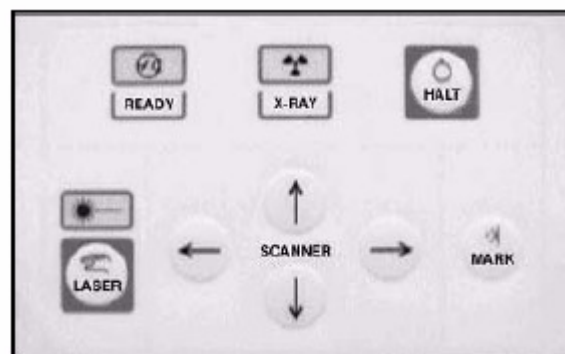
En el Brazo del Escáner está situado el **Panel de Control**. El operador accionando los diferentes botones del panel de control puede desplazar el Brazo del Escáner sobre el paciente marcando las distintas referencias anatómicas que definirán el área de barrido deseada. Las flechas arriba/abajo sirven para desplazar el Brazo del Escáner en el eje X (sobre la mesa en dirección posteroanterior). Las flechas izquierda/derecha sirven para desplazar el Brazo del Escáner en el eje Y (eje longitudinal sobre la mesa). El botón **MARK** sirve para identificar y marcar el área de barrido tanto en pacientes como sobre el fantoma. Para más información sobre los

indicadores  y  vaya a la página 2-5 **Indicadores de Exposición**. Encontrará más información sobre el botón

en la página 2-4 **Controles de Exposición**. Las funciones del botón

se explican en el siguiente apartado **Colocación del Puntero Láser** en la página 2-9.

Imagen 2-2: Panel de Control del Brazo del Escáner



Colocación del Puntero Láser

En el brazo del escáner está situada una luz láser de baja energía que indica la posición exacta del haz de Rx. La luz láser está alineada con el haz de Rx situado en la mesa de exploración y sirve para ayudar al operador a marcar y definir las referencias anatómicas. Para encender y apagar el puntero láser

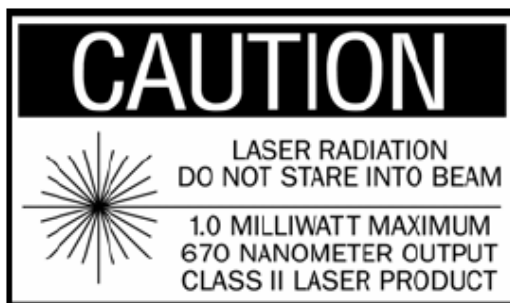


haga clic en el botón en el Panel de Control del Brazo del Escáner. Cuando el puntero láser está encendido se ilumina este indicador



situado encima del botón .

A pesar de tratarse de una luz láser de baja energía, deben tenerse en cuenta las siguientes recomendaciones:



- Precaución: No mire directamente a la luz láser.
- Precaución: No permita que la luz láser incida directamente sobre sus ojos. Si la luz láser incide en sus ojos, le deslumbrará, pero sin causarle ningún otro daño inmediato.
- Precaución: no permita que la luz láser se refleje en objetos brillantes e incida directamente en sus ojos.

Control por Ordenador

El Densitómetro Oseo está controlado/dirigido por un ordenador PC. El ordenador esta diseñado y programado para trabajar exclusivamente con el Densitómetro Oseo de Norland y no debe utilizarse con ningún otro fin. El ordenador como controlador de un equipo de Rx cuenta con el certificado del la **FDA** (Food and Drugs Administration) .

Sistema Informático

El Sistema Informático del Densitómetro Oseo Norland está diseñado, para facilitarle el uso, como un entorno de Windows con el que Ud. está ya familiarizado. Alguna de las características del sistema Norland incluyen un menú desde el que se dirigen las distintas operaciones del sistema como: la calibración del equipo, la compilación de los datos del barrido, el análisis de los resultados y la gestión de los archivos de los pacientes. También dispone de otros accesorios como:

- Monitor con pantalla a color
- Impresora a color para imprimir los informes

Un ratón que facilita el acceso a las distintas funciones del programa.

Accesorios

En los siguientes 4 apartados se recogen los accesorios que acompañan al Sistema Norland.

Estándar de Calibración QA

El Estándar de Calibración QA en 77 pasos (**EmpiriCAL™**) es una exclusiva combinación de capas de un material plástico y metálico utilizado para realizar la calibración del equipo. El Estándar de Calibración cuenta con unas asas y está etiquetado con unos valores de caracterización establecidos en fábrica.

Fantoma QC

El Fantoma anatómico QC es una fiel representación de la densidad del hueso de la columna vertebral humana y de su distribución del tejido blando. Cada fantoma (único para cada sistema) tiene un número de serie e incluye una etiqueta en la que se indica la densidad mineral ósea (DMO) asignada, el contenido mineral óseo (CMO) y los valores de desviación estándar determinados en fábrica. Dependiendo de las características de su densitómetro, el fantoma puede también incluir los valores Grasa, Desviaciones Estándar de la Grasa, Grasa Magra y Desviaciones Estándar para la Grasa Magra. Para más información vaya a la página 13-2 **Cómo limpiar el Fantoma QC**.

Dispositivos de Posicionamiento

Se proporcionan dispositivos de posicionamiento para la colocación especial del paciente en los estudios de: columna lumbar AP, cadera, columna lumbar lateral y antebrazo.

TABLA 2-1: Dispositivos de Posicionamiento

Dispositivo de Posicionamiento	Número de Referencia	Descripción
Sist. De rotación de cuellos femorales	433A134	Dispositivo utilizado para obtener mediciones más precisas y exactas en los estudios de cadera al colocar las piernas del paciente en una posición más apropiada.
Bloque separador de piernas	388D550	Utilizado en los estudios de cadera para conseguir una abducción correcta de los cuellos femorales.
Bloque para columna AP	433D132	Utilizado para levantar las piernas y corregir lordosis lumbar.
Dispositivo de fijación para el antebrazo*	433A211	Utilizado en los estudios de antebrazo. Incluye almohadillas para el codo y la mano.
Bloques para columna lateral*	433A265	Utilizados para el posicionamiento del paciente en los estudios de columna lumbar lateral. Incluye: respaldo, almohadilla para las costillas, para las extremidades y almohada para la cabeza.

*Estos dispositivos de posicionamiento son opcionales y dependen del modelo.

Rollo de Papel de Exploración

Para garantizar la higiene sobre la superficie de barrido del escáner se incluye un rollo de papel de exploración de 21 " de largo por 125 pies de largo (4799301). Para más información vaya a la página 13-3 **Cómo Cambiar el Rollo de Papel de Exploración.**

Programa de Garantía de Calidad

El equipo de Norland está configurado para ayudarle a establecer un Programa de Garantía de Calidad de forma sencilla a la vez que efectiva. La precisión y fiabilidad de los valores de densidad mineral ósea obtenidos dependen de la eficacia con que se realice el programa de garantía de calidad.



Norland recomienda encarecidamente realizar, dentro del Programa de Garantía de Calidad, la **Calibración Diaria** antes de realizar ningún estudio. La calibración corregirá/contrarrestará los pequeños cambios de espectro en la fuente de Rx, las pequeñas diferencias en el circuito de interfase, además de otras incidencias.

En el capítulo 4: **Operaciones Básicas** se explicará paso a paso cómo llevar a cabo el Programa de Garantía de Calidad diariamente. En la página 4-8 se explica en profundidad el **Proceso de Calibración Diario**. Este proceso consiste en:

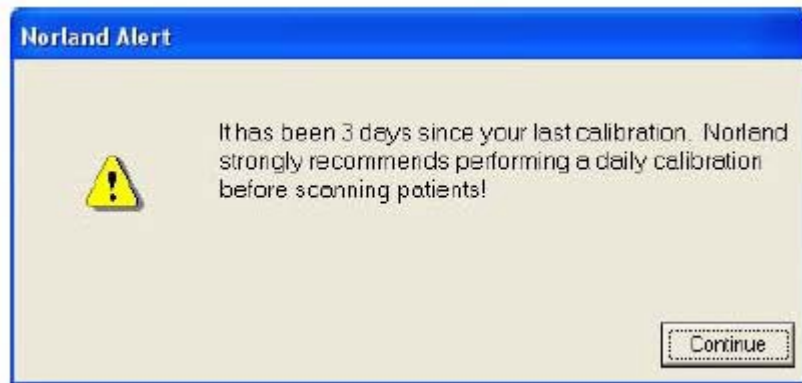
- Estabilizar el escáner
- Comprobar y localizar daños
- Realizar un barrido sobre el Estándar de Calibración QA
- Realizar un barrido sobre el fantoma QC
- Comprobación de la calibración

Una vez iniciado el proceso de calibración, éste continúa automáticamente hasta que se recogen todos los datos y hasta que los resultados del Estándar de Calibración QA y del Fantoma QC se muestran en consola.

Los resultados obtenidos del Programa de Garantía de Calidad deben imprimirse y archivarlos por si fuera necesario recurrir a ellos.

El programa Norland automáticamente envía un **Mensaje de Alerta** cuando hayan transcurrido más de 24 horas desde la última calibración. Norland recomienda encarecidamente realizar la calibración diaria antes de realizar cualquier estudio.

Imagen 2-3: Mensaje de Alerta del Programa de Garantía de Calidad (“Han transcurrido 3 días desde la última calibración. Norland recomienda encarecidamente realizar la calibración diaria antes de realizar cualquier estudio”).



Los días que no se utilice el Densitómetro Oseo Norland no será necesario calibrar el sistema.

Comparación de Pacientes

Los resultados del barrido de un paciente se compararán no sólo con los estudios densitométricos de una población de referencia, sino también con los estudios previos de dicho paciente. Se ha escrito mucho sobre las técnicas de análisis de la densidad ósea.^{1,2}

3

Comparación con la Tendencia de un Mismo Paciente

El análisis del índice de cambio en la densidad mineral ósea de un paciente proporciona al facultativo la información más fiable sobre si ese paciente está perdiendo o ganando masa ósea. Si se le han realizado estudios previos, el análisis actual se comparará con los anteriores para determinar el índice de cambio.

Se requiere un razonamiento estadístico para interpretar los resultados de un estudio densitométrico. Las diferencias obtenidas en dos estudios seriados de un mismo paciente con valores muy parecidos podrían fácilmente deberse a variantes aleatorias. Para obtener un 95% de fiabilidad ($p < 0.05$) de que la diferencia entre los valores obtenidos se deban a un cambio en DMO actual, el cambio debe ser al menos:

$$2\sqrt{2} \times \frac{\text{C.V.}}{100} \times$$

valor de la
DMO

Esta ecuación sería válida para dos estudios realizados a un mismo paciente sobre la misma región anatómica y con el mismo densitómetro Norland. Los Coeficientes de Variación (C.V.) proporcionados para cada medida sólo serán válidos para sujetos con estructuras óseas bien definidas cuyo tejido blando no esté calcificado. La siguiente tabla muestra un ejemplo de esta ecuación utilizando los valores de los C.V. facilitados por el fabricante.

Cambios en la Columna Lumbar AP	Cambios en el Cuello Femoral
C.V. del 0.9% ^a	C.V. del 1.4% ^b
Si el primer valor obtenido es 1.0 gr/cm ² el cambio debe ser de 0.025 gr/cm ²	Si el primer valor obtenido es 1.0 gr/cm ² el cambio debe ser de 0.039 gr/cm ²

a. Como se indica en la tabla 5-2 de la página 5-2

b. Como se indica en la tabla 6-2 de la página 6-2

NOTA: Los C.V. de cada centro se consideran diferentes de aquellos C.V. especificados por el fabricante, y dependen de la técnica y la experiencia cada operador.

¹ Ross, P. D., Davis, J. W., Vogel, J. M., and Wasnich, R. D.: "A Critical Review of Bone Mass and the Risk of Fractures in Osteoporosis". *Calcified Tissue International* 46:149-161, 1990.

² Melton III, J. L., Eddy, D. M., Johnson Jr., C. C.: "Screening for Osteoporosis". *Annals of Internal Medicine*. 112:516-528, 1990.

³ Assessment of Fracture Risk and its Application for Postmenopausal Osteoporosis”, WHO Technical Reports Series, No. 843.

Precisión

Precisión es el grado de reproductividad por el cual se obtiene el mismo valor cuando se repite la medición. La precisión *En vivo* del Densitómetro Oseo Norland es el grado de reproductividad que tiene un equipo para obtener el mismo valor de densidad mineral ósea cuando se repite el estudio a un paciente sobre la misma región anatómica.

Los factores que afectan a la precisión son:

- Errores inherentes al equipo.
- Técnica utilizada por el operador.
- La naturaleza *En vivo* de la medición.

Todas las especificaciones sobre la precisión que aparecen en esta guía y en los productos fabricados por Norland dan por sentado que:

- El equipo funciona correctamente.
- El sujeto sometido a estudio permanece inmóvil.
- El operador tiene experiencia.
- Las técnicas de posicionamiento y análisis sean constantes.

Se puede mejorar la precisión promediando los valores obtenidos en un determinado número de estudios repetidos. Aumentando el número de mediciones realizadas, se aumenta la precisión del valor principal, ya que aumenta el factor de la raíz cuadrada. Esta técnica es la que se utiliza con los fantasmas para valorar la exactitud del sistema.

Exactitud

La exactitud es el grado por el cual el valor medido reproduce el valor actual de la cantidad que está siendo medida.

A pesar de que la exactitud de una medición incluye la imprecisión de realizar una única medición, habitualmente se indica la exactitud del equipo eliminando este factor de imprecisión. Se denomina "exactitud media" porque tomando el valor medio de muchas mediciones se minimiza el factor de imprecisión. Las especificaciones sobre la exactitud del Densitómetro Oseo Norland están establecidas en términos de exactitud media.

Algunos fabricantes utilizan fantasmas compuestos de hidroxiapatita y epoxina. La calibración de los equipos Norland se lleva a cabo con fantasmas de hidroxiapatita basados en las especificaciones hechas por White (White, D.R., Martin, R.J. y Darlison, R.: "Epoxy resin based tissue substitutes." Brit.J.Radiol.50, 814-821, 1977).

Desviaciones Estándar

El término Desviaciones Estándar se utiliza para especificar la precisión. En la distribución normal de una curva de Gauss (forma de campana), el 68% de todas las mediciones se situarán dentro de una desviación estándar de la media y el 95% de todas las mediciones se situarán dentro de dos desviaciones estándar de la media.

Comparación con el Conjunto de Referencia

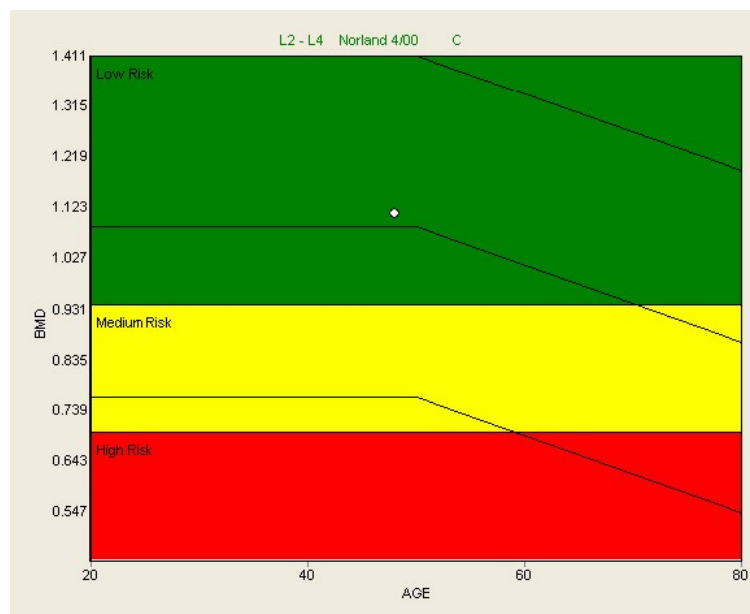
La densidad mineral ósea (DMO) obtenida al realizar el estudio a un paciente se compara con la de una población de referencia sana que coincide con el sexo, raza y edad del paciente. La diferencia entre los valores de densidad mineral ósea (DMO) del paciente respecto al valor medio de la población de referencia se expresa gráficamente y se denomina derivaciones estándar. El programa de Norland contiene muchos conjuntos de referencia para realizar la comparación, y las pautas para crear conjuntos de referencia basados en la población local.

Se le facilitaran las actualizaciones de los conjuntos de referencia poblacionales sin ningún coste adicional según su disponibilidad.

Los conjuntos de referencia aparecen recogidos en una tabla y reflejan el valor medio de DMO de la población de referencia para la región anatómica prescrita. Muchas de estas tablas están codificadas por colores para indicar la Predicción de Riesgo de Fractura. Adjuntamos un ejemplo de esta tabla en la figura 2-4.

La línea media representa los valores medios de DMO para las edades indicadas en la tabla. Las líneas situadas por encima y por debajo de la línea media están dos desviaciones estándar por encima (+2) o por debajo (-2) del valor medio.

Figura 2-4 Ejemplo del gráfico que compara el riesgo de fractura del paciente con el Conjunto de Referencia Poblacional.



Norland incorpora en su programa la tabla de criterios de riesgo de fractura realizada por la **OMS: ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (WHO World Health Organization)** para determinar el riesgo de fractura (ver tabla).

Tabla 2-2: Tabla de Criterios de Riesgo de Fractura Realizada por la OMS

<p style="text-align: center;">BAJO RIESGO</p>	<p>Representa el rango de valores definidos por la OMS como “normales”(tienen una densidad mineral normal). En esta región los valores de la Escala T están situados por encima de -1 DE y corresponden al valor medio de la masa ósea máxima obtenida en individuos jóvenes sanos del conjunto poblacional de referencia. Un paciente cuyos valores se encuentren dentro de este rango no hay un riesgo reconocible de fractura.</p>
<p style="text-align: center;">RIESGO MEDIO</p>	<p>Representa el rango de valores definidos por la OMS como “osteopenia” (tienen una densidad mineral baja). En esta región los valores de la Escala T están comprendidos entre -1 y -2.5 DE. Un paciente cuyos valores se encuentren dentro de este rango empieza a desarrollar el riesgo de fractura.</p>
<p style="text-align: center;">ALTO RIESGO</p>	<p>Representa el rango de valores definidos por la OMS como “osteoporosis” (tienen una densidad mineral muy reducida. En esta región los valores de la Escala T están situados por debajo de -2.5 DE respecto al valor medio obtenido en individuos jóvenes sanos. Un paciente cuyos valores se encuentren dentro de este rango tienen muchas probabilidades de sufrir una fractura espontánea.</p>

Informes Densitométricos

Al final de cada capítulo se adjuntan ejemplos de los tres tipos de informes que se pueden obtener. Los tres tipos de informes son: *Informe Radiológico* (Bone Exam Report), *Informe para el Paciente* (Patient's Report) e *Informe para el Médico Especialista* (Referring Physician's Report). En las siguientes páginas también se incluyen ejemplos de cada uno de estos informes para facilitarle su consulta.

Informe Radiológico

El análisis de los resultados incluye una imagen de la región escaneada, gráficos y la información numérica en un informe con un formato característico de dos páginas. A este tipo de informe le llamaremos Informe Radiológico "**Bone Exam Report**" (antes conocido como "Resultados Página 1". Al final de este capítulo encontrará ejemplos de este tipo de informe.

En la cabecera de la primera página del Informe Radiológico aparece la información básica del paciente (aquella que introdujo el operador en la ventana Ficha Paciente "*Patient Demographics*" al realizar el registro del paciente).

Debajo aparece una imagen de la región escaneada. A la derecha aparece en un recuadro los valores de DMO.

A continuación, debajo de los gráficos, aparecen en una tabla los valores numéricos de DMO, CMO, y el AREA. Para su información la cantidad de masa ósea aparece recogida como Densidad Mineral Osea (DMO), Contenido Mineral Oseo (CMO) y Area. La DMO es igual al cociente entre el CMO partido por el Area expresado en gramos/centímetro cuadrado.

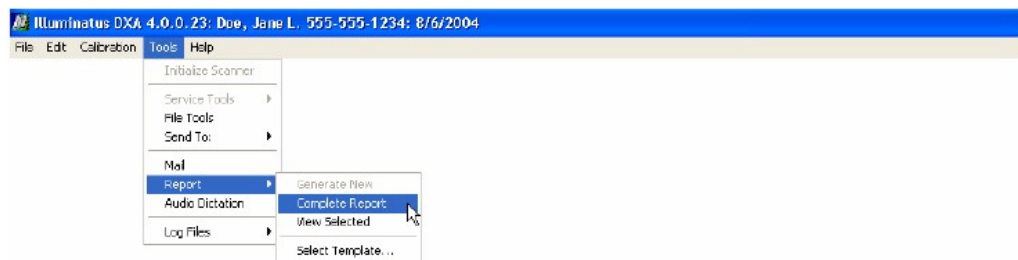
Esta tabla incluye también los datos del barrido, información de referencia y /o la tendencia de las regiones sobre las que se ha realizado el barrido, y las características básicas del barrido. También incluye información detallada y los datos numéricos de las regiones sobre las que se ha realizado el barrido. Además aparecen los valores de Escala T y Escala Z.

En la última línea de esta tabla (para los estudios de Columna Lumbar AP y Cadera) aparece el valor de DMO Total. Las medidas utilizadas para medir la región de interés son gr/cm^2 . Para su información la cantidad de masa ósea aparece recogida como Densidad Mineral Osea (DMO), Contenido Mineral Oseo (CMO) y Area. La DMO es igual al cociente entre el CMO partido por el Area expresado en gramos/centímetro cuadrado.

En los Estudios Densitométricos de Cuerpo Entero (opcional) además aparecen reflejados los valores de masa corporal magra y grasa del tejido blando (expresados en gramos); así como el porcentaje de la grasa corporal total y los valores equivalentes de la determinación del peso por inmersión en agua. Para su información: el *Committee for Standards* en DEXA estableció las ecuaciones equivalentes en 1995 para la Columna Lumbar AP y en 1997 para la Cadera.

El valor estandarizado DMOs y NHANES III se utilizan exclusivamente en estudios de cadera realizados en mujeres caucásicas. El valor estandarizado DMOs (Densidad Mineral Osea Estándar) proporcionan al facultativo los valores de Escala T y Escala Z para cualquier estudio de cadera realizado con un conjunto de valores de referencia estandarizado, donde se incluye el NHANES III. Puede encontrar más información en el capítulo 16, **Valores Poblacionales de Referencia**.

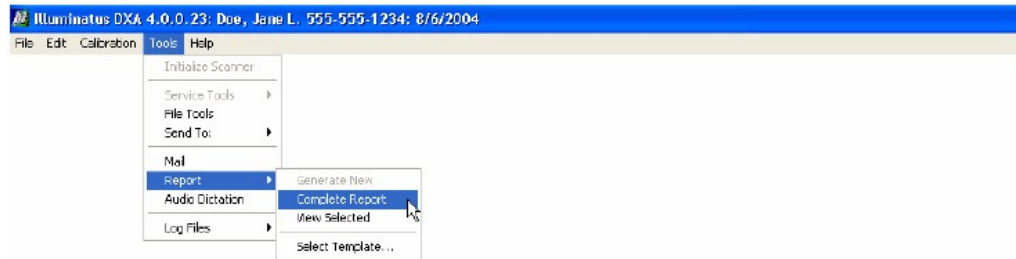
Al final de la primera página aparece un área de comentarios "**Comments**". Este apartado del informe es una entrada de texto que puede rellenar al crear el informe. Para introducir/modificar posteriormente el texto añadido seleccione Herramientas> Informe > Completar Informe (**Tools>Report> Complete Report**) .



La segunda página del Informe Radiológico contiene información personal del paciente, así como información específica de los parámetros de barrido como tipo de barrido, resolución y velocidad. También contiene los cuadros de referencia y tendencia con sus valores numéricos. El texto introducido previamente en el apartado "Comments" (Comentarios) en la ventana Ficha Paciente (Patient Demographic) aparece debajo de la información personal del paciente.

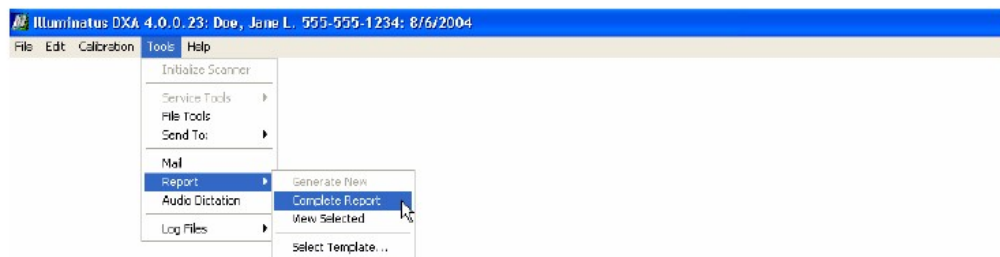
Informe Para el Paciente

En este tipo de informe aparece un área de comentarios “**Comments**”. Este apartado del informe es una entrada de texto que puede rellenar al crear el informe. Para introducir/modificar posteriormente el texto añadido seleccione Herramientas> Informe > Completar Informe (**Tools>Report> Complete Report**) .



Informe Para el Médico Especialista

En este tipo de informe aparece un área de comentarios “**Comments**”. Este apartado del informe es una entrada de texto que puede rellenar al crear el informe. Para introducir/modificar posteriormente el texto añadido seleccione Herramientas> Informe > Completar Informe (**Tools>Report> Complete Report**) .

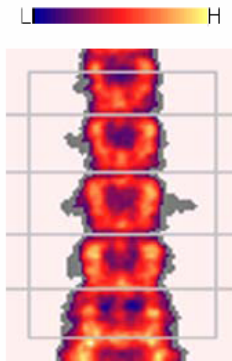


Ejemplo de Informe Radiológico para Estudio Densitométrico de Columna AP

Para una rápida consulta incluimos una muestra de un **Informe Radiológico** en dos páginas para el estudio de Columna Lumbar AP.

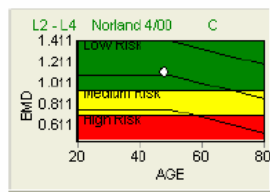
Name: Doe, Jane L.
ID: *AMLS
Age: 48 years
Sex: Female

Ethnic: Caucasian
Height: 155
Weight: 110

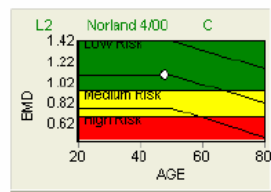


Bone image not for diagnosis.

AP Spine on: 8/6/2004 12:35



L2 - L4 Norland 4/00 C
 1.411
 1.211
 1.011
 0.811
 0.611



L2 Norland 4/00 C
 1.42
 1.22
 1.02
 0.82
 0.62

Young Ref. (%)	100.8	Young Ref. (%)	99.5
T-Score	0.05	T-Score	-0.04
Age Match (%)	102.2	Age Match (%)	99.7
Z-Score	0.14	Z-Score	-0.02

Manual Cursor Placement

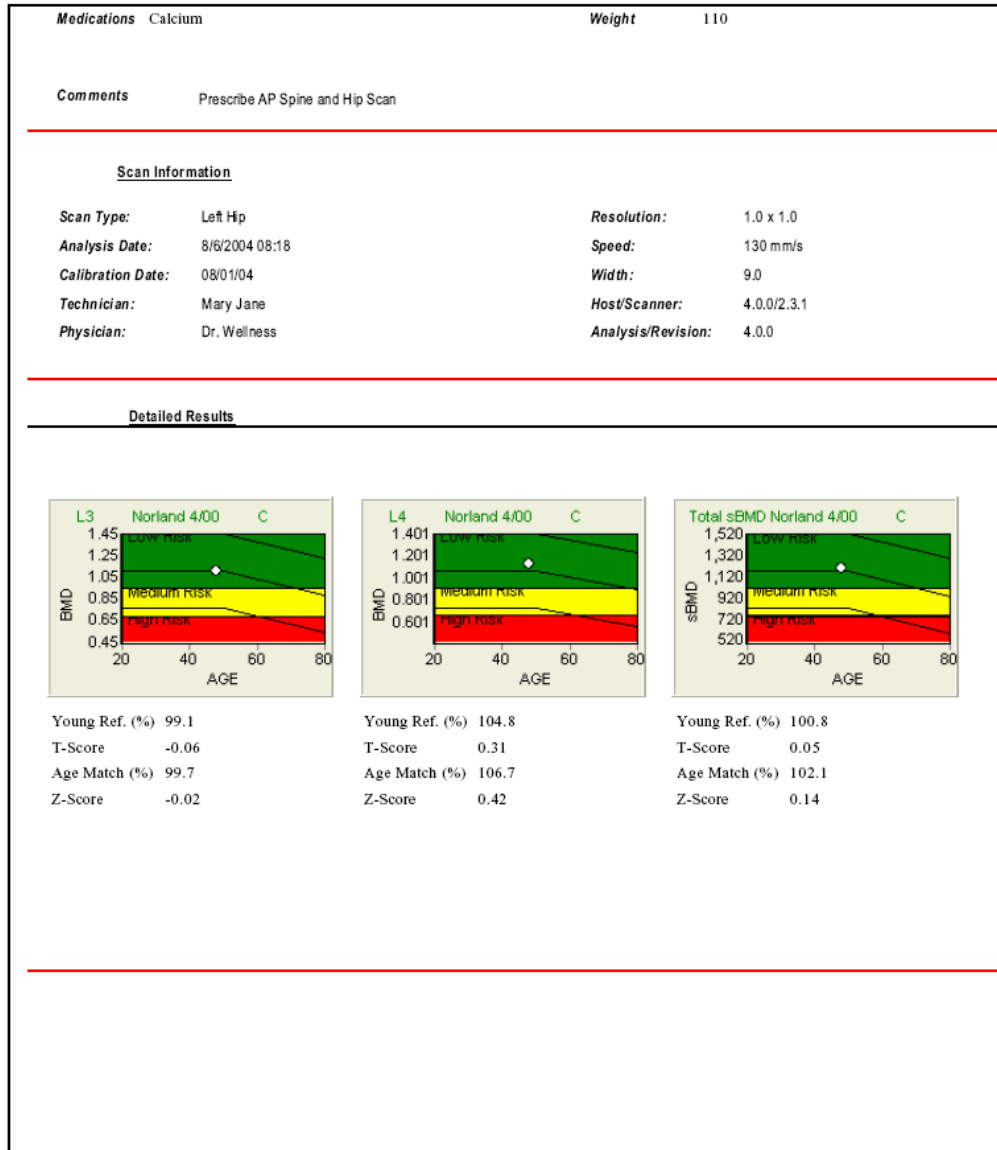
Region	BMD (g/cm ²)	BMC (g)	Area (cm ²)	Length (cm)	Width (cm)	T-Score	Young Ref. (%)	Z-Score	Age Match (%)	ST Change (%)	ST Change (%/yr)	LT Change (%)	LT Change (%/yr)
L2 - L4	1.110	42.46	38.23	9.15	12.0	0.05	100.8	0.14	102.2	*****	*****	*****	*****
L2	1.091	12.77	11.70	3.00	12.0	-0.04	99.5	-0.02	99.7	*****	*****	*****	*****
L3	1.105	15.38	13.92	3.30	12.0	-0.06	99.1	-0.02	99.7	*****	*****	*****	*****
L4	1.134	14.30	12.61	2.85	12.0	0.31	104.8	0.42	106.7	*****	*****	*****	*****
Total sBMD	1195mg/cm ²	45686mg	38.23	9.15	12.0	0.05	100.8	0.14	102.1	*****	*****	*****	*****
L23	1.095	66.16	60.41	13.9	9.90	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

STD CVs for L2-L4 BMD: 1.0 BMC: 1.5 See Guide for other CVs.
 1.5 mm X 1.5 mm, 130 mm/s, 120.00 cm, Rev. 4.0/2.3.1 Calib. 08/01/04 SN 8128

Comments:

comments field in Bone Exam Report

Muestra de la segunda página de un **Informe Radiológico** para el estudio de Columna Lumbar AP:



Ejemplo de Informe Radiológico para Estudio Densitométrico de Cadera

Para una rápida consulta incluimos una muestra de un **Informe Radiológico** en dos páginas para el estudio densitométrico de Cadera.

Name: Doe, Jane L. Ethnic: Caucasian
 ID: *AMLS Height: 155
 Age: 48 years Weight: 110
 Sex: Female

Left Hip on: 8/8/2004 12:44

Bone image not for diagnosis.

Region	BMD (g/cm ²)	BMC (g)	Area (cm ²)	Length (cm)	Width (cm)	T-Score	Young Ref. (%)	Z-Score	Age Match (%)	ST Change (%)	ST Change (%/yr)	LT Change (%)	LT Change (%/yr)
Fem Neck	0.9956	4.647	4.667	1.50		0.07	100.9	0.99	113.1	*****	*****	*****	*****
Troch	0.6828	8.277	12.12			-0.96	86.8	-0.20	97.0	*****	*****	*****	*****
Total sBMD	1007mg/cm ³	31333mg	31.11			0.42	105.4	0.82	111.1	*****	*****	*****	*****

STD CVs for Neck BMD: 1.2 BMC: 1.7 See Guide for other CVs.
 1.0 mm X 1.0 mm, 90 mm/s, 90.00 cm, Rev. 4.0.0/2.3.1 Calib. 08/01/04 S/N 8128

Comments:

Bone Exam Report Comments field.

Muestra de la segunda página de un **Informe Radiológico** para el estudio densitométrico de Cadera:

<i>treatment</i>	Exercise, calcium	<i>height</i>	155
<i>Medications</i>	Calcium	<i>Weight</i>	110

Comments Prescribe AP Spine and Hip Scan

Scan Information

<i>Scan Type:</i>	Left Hip	<i>Resolution:</i>	1.0 x 1.0
<i>Analysis Date:</i>	8/6/2004 08:18	<i>Speed:</i>	90 mm/s
<i>Calibration Date:</i>	08/01/04	<i>Width:</i>	9.0
<i>Technician:</i>	Mary Jane	<i>Host/Scanner:</i>	4.0.0/2.3.1
<i>Physician:</i>	Dr. Wellness	<i>Analysis/Revision:</i>	4.0.0

Detailed Results

The graph plots Total sBMD NHANES III C against Age. The y-axis represents sBMD with values 602, 802, 1,002, and 1,202. The x-axis represents Age with values 25, 45, 65, and 85. Three risk levels are indicated: Low Risk (green area, top), Medium Risk (yellow area, middle), and High Risk (red area, bottom). A patient data point is shown at Age 45 with a value of 1,002, which falls within the Low Risk region.

Young Ref. (%)	105.4
T-Score	0.42
Age Match (%)	111.1
Z-Score	0.82

Informe Radiológico para el Médico Especialista

Muestra de un **Informe Radiológico para el Médico Especialista** (página 1):

Referral Report -- Bone Density Test

Referred By: Dr. Evans
 Patient Name: Doe Jane
 Patient ID: AP Spine
 Age: 50 years
 Gender: Female
 Test Date: 10/12/2004 16:40

Dear Dr. Evans,

Thank you for referring Jane Doe to our practice.

The results of the Bone Density Test performed on Jane Doe are as follows:

	L2 - L4	L2	L3	L4
Density (g/cm) ³	1.371	1.384	1.388	1.344
T-Score	1.66	1.76	1.59	1.55
Z-Score	1.75	1.78	1.64	1.67

This test was performed using the Norland XR-46 DXA Bone Densitometer. The XR-46 uses the industry standard dual energy x-ray absorptiometry (DXA) technique to estimate bone density non-invasively. This test includes values called the T-score and the Z-score. The T-score compares the current study to bone density of a young healthy population and the Z-score compares the current study to an age and gender matched reference population.

The T-score can be evaluated according to the criterion established by the World Health Organization (WHO) as follows:

If the T-score is:	The subject may be:
-1 or above	Normal (adequate bone density)
between -1 and -2.5	Osteopenic (reduced bone density)
below -2.5	Osteoporotic (severely reduced bone density)

The WHO criterion are especially useful when assessing the condition of postmenopausal women, men over 65 years of age and men between 50 and 65 years of age with risk factors that may lead to excessive bone loss.

Although very useful, this test is not the sole determinant of your bone health. There are other factors to consider, which we can discuss if you wish. Examples of other risk factors for bone loss which need to be considered in a general assessment include genetic influences such as a family history of osteoporosis, environmental factors which may originate from nutrition or physical activity, the influence of endogenous hormones or chronic disease, failure to achieve peak bone mass in youth and a history of excessive aging related bone loss.

In reviewing this Bone Density Test, my specific recommendations are:

Página : Muestra de un **Informe Radiológico para el Médico Especialista:**

That you explain these test results to your patient in light of their overall medical history.

Perform a repeat Bone Density Test in 24 months.

Finally, a review of this study indicates that extraosseous calcification may technically limit the usefulness of these study interpretations.

Please feel free to call with any questions you may have.

Sincerely,

Dr. James Smith

Informe para el Paciente

Esta es una muestra de un Informe Densitométrico que se enviaría al paciente (página 1):

Patient Report -- Bone Density Test

Patient Name: Doe Jane
 Patient ID: AP Spine
 Age: 50 years
 Gender: Female
 Test Date: 10/12/2004 16:40

Dear Jane Doe,
 This is the result of your recent Bone Density Test.

	L2 - L4	L2	L3	L4
Density (g/cm) ²	1.371	1.384	1.388	1.344
T-Score	1.66	1.76	1.59	1.55
Z-Score	1.75	1.78	1.64	1.67

Your test was performed using the Norland XR-46 DXA Bone Densitometer. The XR-46 uses the industry standard dual energy x-ray absorptiometry (DXA) technique to estimate your bone density non-invasively. Your test includes values called the T-score and the Z-score. The T-score compares the current study to bone density of a young healthy population and the Z-score compares the current study to an age and gender matched reference population.

Your T-score can be evaluated according to the criterion established by the World Health Organization (WHO) as follows:

If your T-score is:	You may be:
-1 or above	Normal (adequate bone density)
between -1 and -2.5	Osteopenic (reduced bone density)
below -2.5	Osteoporotic (severely reduced bone density)

The WHO criterion are especially useful when assessing the condition of postmenopausal women, men over 65 years of age and men between 50 and 65 years of age with risk factors that may lead to excessive bone loss.

Página 2: Muestra de un Informe Densitométrico que se enviaría al paciente:

A follow-up consultation for this test within 12 months.

A repeat Bone Density Test in 24 months.

Finally, a review of this study indicates that extraosseous calcification may technically limit the usefulness of these study interpretations.

Please feel free to call with any questions you may have.

Sincerely,

Dr. James Smith

Informe de Garantía de Calidad

A continuación se incluyen muestras de Informes de Garantía de Calidad

Como se indicará más adelante en este manual, deberá realizarse la calibración diaria del sistema antes de realizar un estudio para garantizar la calidad de las mediciones de la densidad ósea.

Durante este procedimiento, primero se realiza un barrido sobre el Estándar de Calibración QA. A continuación se realiza un barrido sobre el Fantomas QC (ya sea el Fantomas Transparente o el Fantomas Negro). Su equipo contará con un fantomas transparente o un fantomas negro dependiendo del modelo o la opción.

Tras el barrido, se realizarán automáticamente, sin que el operador intervenga, los Test Diagnósticos del Sistema.

Una vez que terminan estos barridos se ofrece al operador la posibilidad de imprimir los resultados. Estos informes denominados “*QC Results*” deben archivarse en una carpeta como se indica en el apartado 7. Para más información vaya a **Visualización e Impresión de los Resultados de la Calibración** en la página 4-23.

Por favor tenga en cuenta de que si utiliza el Fantomas Transparente sólo se imprimirá un **Informe QC**:

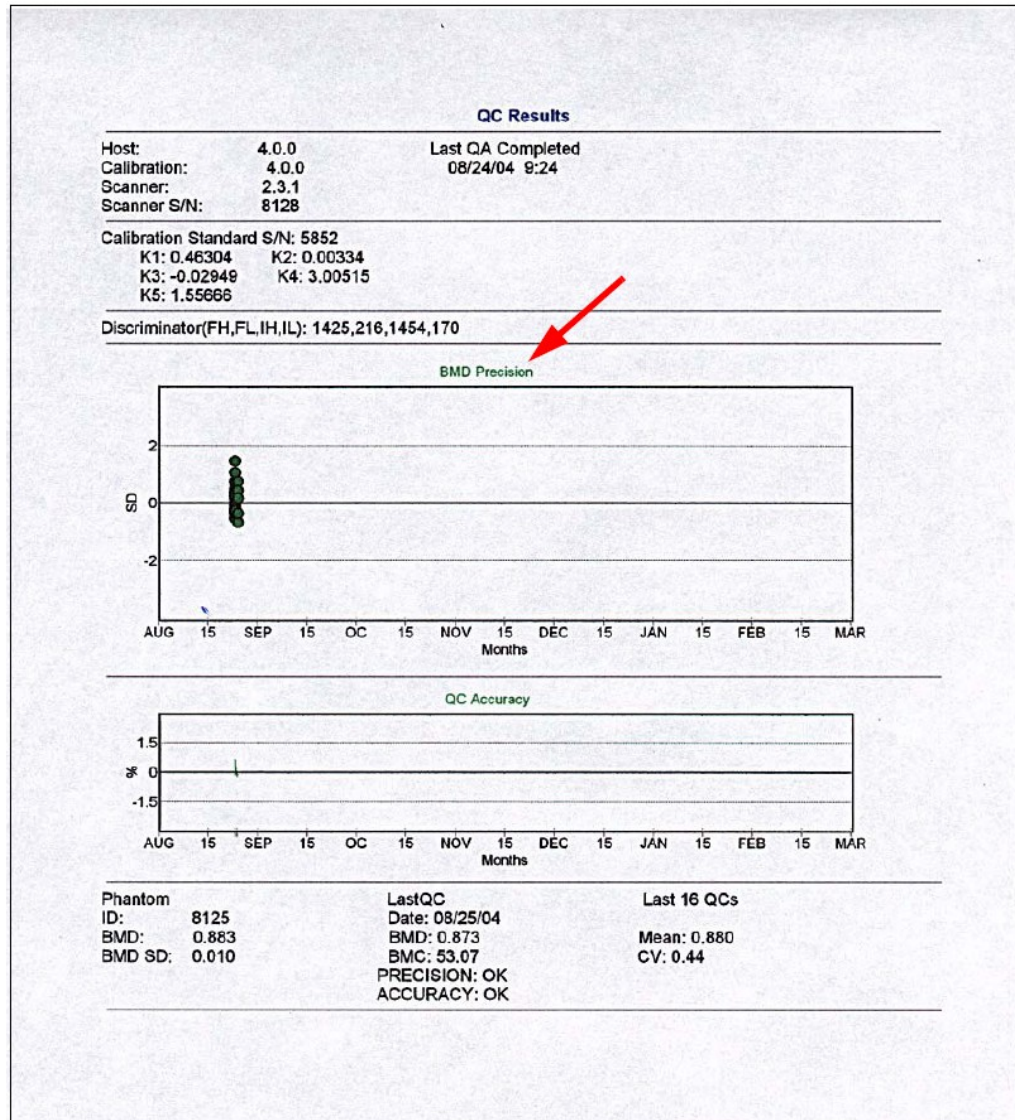
- Precisión DMO

Si utiliza el Fantomas Negro se imprimirán tres Informes QC:

- Precisión DMO
- Precisión grasa
- Precisión magra

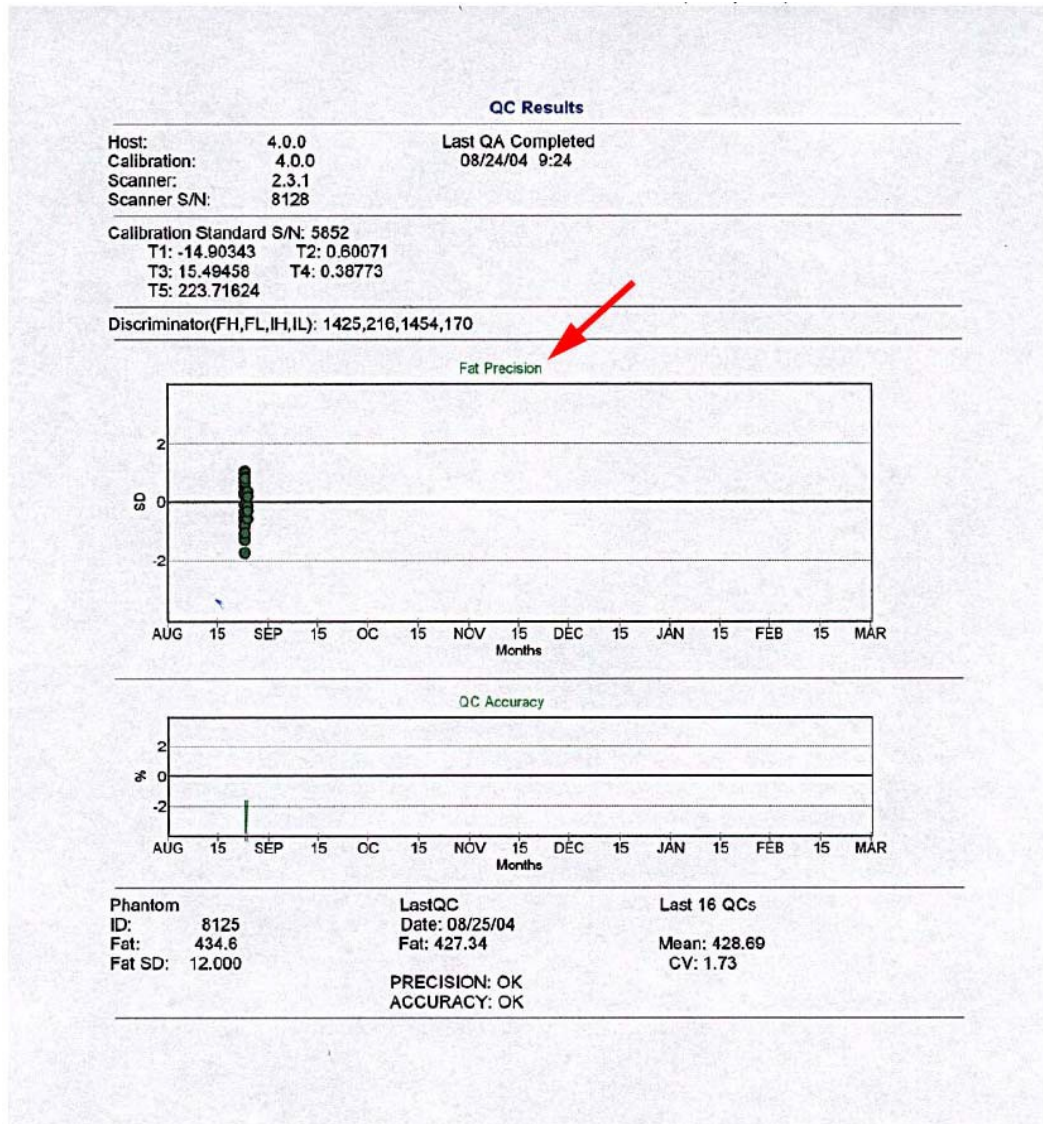
Ejemplo de Informe de Garantía de Calidad- DMO

Imagen 2-5: Informe QC- Precisión DMO



Ejemplo de Informe de Garantía de Calidad- Precisión grasa

Imagen 2-6: Informe QC- Precisión grasa (opcional)



Ejemplo de Informe de Garantía de Calidad- Precisión magra

Imagen 2-7: Informe QC- Precisión magra (opcional)

