



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Remodelado Óseo en Pacientes  
Epilépticos: Estudio de  
Biomarcadores y Polimorfismos**

**D<sup>a</sup>. Irene de Miguel Elízaga**

**2018**



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**



**TESIS DOCTORAL**

**REMODELADO ÓSEO EN PACIENTES  
EPILÉPTICOS: ESTUDIO DE BIOMARCADORES Y  
POLIMORFISMOS**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

**Irene de Miguel Elízaga**

Bajo la dirección de los Doctores:

*D<sup>a</sup>. Miriam Martínez Villanueva*

*D. José Antonio Noguera Velasco*

**Murcia, 2018**



A mi familia,  
por estar siempre cerca aunque yo esté lejos.



## AGRADECIMIENTOS

Llevo tiempo viendo como amigos y compañeros iban leyendo sus Tesis Doctorales pero veía lejos el momento en el que me tocase a mí. Pero ese momento por fin ha llegado, y me siento tremendamente afortunada y orgullosa. Muchas son las personas que me han acompañado durante este largo camino y por eso me gustaría agradecerles su apoyo.

En primer lugar me gustaría darles las gracias a mis directores de Tesis, la Dra. Miriam Martínez Villanueva y el Dr. José Antonio Noguera Velasco, por confiar en mí para llevar a cabo este proyecto. Gracias por haber aceptado mis “idas y venidas” después de acabar la Residencia y por haber trabajado conmigo en este último y definitivo “empujón” final. Por fin todo el trabajo y tiempo dedicados verán la luz.

Agradecer enormemente también el trabajo de la Dra. Irene Villegas Martínez, neuróloga durante unos años en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, sin la cual este proyecto no hubiese podido salir adelante. Gracias por tus horas de trabajo y tus sonrisas. ¡Al final las dos “Irenes” pudimos con esto!

A mi amiga y “hermana” Carla, ¡mil gracias por allanarme el camino! Gracias por haber leído tu Tesis y haberme dado envidia, ¡me diste la fuerza que yo necesitaba! Y gracias por todas las charlas, durante y después de la residencia, espero que duren para siempre.

Muchas gracias a TODOS los integrantes del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia, porque aunque no todos habeis participado en esto directamente sí lo habeis hecho de forma indirecta. Gracias a los Facultativos por haberme enseñado tanto durante los años de residencia, vosotros pusisteis la base de mi carrera profesional. Y en especial gracias a mi tutora, Tere, porque tuve la suerte de que fueras tutora de Bioquímica y de que me acompañaras de cerca durante los cuatro años. Gracias por compartir tantas charlas y desahogos, creo que nuestro corazón madrileño nos unió! Gracias a todo el personal Técnico, por todo lo que me enseñasteis y por todos los ratos y risas compartidos. Las horas de guardia daban para mucho! Y por último y no menos importante, a los residentes. Gracias por acogerme, por hacerme formar parte de esta gran familia murciana y por hacer que estos años en Murcia hayan sido una de las épocas más felices

de mi vida. Murcia me ha dado mucho, pero lo más importante es que me ha dado amigos. No hace falta que lo diga pero espero que haya donde nos lleve esta “vida loca” que nos ha toca vivir, podamos seguir compartiéndola.

Muchas muchas gracias a mis amigas madrileñas, porque a pesar de estar lejos es genial volver a casa y sentir que no hubiese pasado el tiempo. Gracias por lo reencuentros en los que no nos daba tiempo a ponernos al día y por intentar sincronizar agendas aunque la mayoría de las veces no lo consiguiésemos. Gracias por los viajes y escapadas que tanta fuerza me daban. Y gracias por el apoyo que me habeis dado en estos últimos meses, sé que confiabais en mí y aunque a veces sea un poco desastre para las llamadas y me pierda en mis cosas, os tenía muy presentes!!!

Gracias a todas las personas que durante algún momento de mi vida han confiado en mí y han creído que sería capaz de sacar este proyecto adelante. Al personal del laboratorio de Unilabs de Elche y sobretodo de Torrevieja. Porque con compañeros como ellos es fácil trabajar, aunque sea a destajo. Gracias.

Gracias a Pablo, por aparecer y por empujar conmigo durante estos últimos meses. Gracias por hacerme tomar aire cada día que pasamos juntos y darme fuerzas para seguir. Por animarme cuando todo estaba un poco negro y hacerme reir siempre. Porque espero que después de esto todo tengamos nuestra recompensa, nos lo merecemos.

Y gracias infinitas a mi familia (aunque algunos no lleven mi misma sangre), incluídos los que ya no están. Por haber confiado en mí desde el principio, cuando el BIR me parecía algo casi imposible para mí. Por alegraros conmigo cuando dije que me alejaba de Madrid y me venía para Murcia, aún sabiendo lo que eso significaba. Por haberme acompañado durante todos estos años y todas estas aventuras y por haber celebrado conmigo todos mis éxitos, incluído este último y tan grande logro. Gracias por seguir confiando en mí. En definitiva, por haber hecho que me sintiera cerca aunque no lo estuviera.

A todos, gracias.



## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>AC</b>	Anhidrasa Carbónica
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ALP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>ALPo</b>	Fosfatasa alcalina específica de hueso
<b>AT</b>	Array en tubo
<b>BMU</b>	<i>Basic Multicellular Unit</i> o Unidad Multicelular Básica
<b>BZD</b>	Benzodiazepinas
<b>β-CTX</b>	βeta-CrossLaps,
<b>Ca<sup>+</sup></b>	Calcio
<b>CBZ</b>	Carbamazepina
<b>CE</b>	Colesterol esterasa
<b>cHDL</b>	Colesterol HDL
<b>CHOD</b>	Colesterol oxidasa
<b>CLB</b>	Clobazam
<b>cLDL</b>	Colesterol LDL
<b>CREA</b>	Creatinina
<b>CTR</b>	Receptor de calcitonina
<b>CTX</b>	Telopectido carboxi terminal del colágeno tipo I
<b>CYP450</b>	Citocromo P-450
<b>CZP</b>	Clonazepam
<b>DBP</b>	Proteína plasmática de unión a la vitamina D
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DEXA</b>	Absorciometría con rayos X de energía doble
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos-trifosfato
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DMO</b>	Densidad mineral ósea
<b>DPD</b>	Deoxipiridinolinas
<b>ECLIA</b>	Inmunoensayo de electroquimioluminiscencia
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético tripotásico
<b>EEG</b>	Electroencefalograma
<b>ER</b>	Receptor de estrógenos
<b>ESL</b>	Acetato de eslicarbazepina
<b>ESM</b>	Etosuximida
<b>FAE</b>	Fármaco antiepiléptico
<b>FATR</b>	Fosfatasa ácida tartrato resistente
<b>FBM</b>	Felbamato
<b>FRAX<sup>®</sup></b>	<i>Fracture Risk Assessment Tool</i>
<b>FRIDEX</b>	Factores de Riesgo y Densitometría por DEXA
<b>FSH</b>	Hormona folículo estimulante
<b>GBP</b>	Gabapentina
<b>GGT</b>	Gamma glutaMil transferasa
<b>GH</b>	Hormona del crecimiento
<b>GK</b>	Glicerolquinasa
<b>GOT</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>GPO</b>	Glicerol fosfato oxidasa
<b>GPT</b>	Alanino aminotransferasa
<b>HDACs</b>	Histonas deacetilasas
<b>HDI</b>	Inhibidores de HDACs

<b>HP</b>	<i>Hip fracture</i>
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>IAC</b>	Inhibidores de la Anhidrasa Carbónica
<b>ICTP</b>	Telopéptido carboxiterminal del procolágeno tipo I
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento insulínico
<b>IGFBP</b>	<i>IGF binding proteins</i> o proteínas transportadoras de IGF
<b>IL</b>	Inteleuquina
<b>ILAE</b>	Liga Internacional Contra la Epilepsia
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>K<sup>+</sup></b>	Potasio
<b>LCM</b>	Lacosamida
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>LES</b>	Lupus eritomatoso sistémico
<b>LEV</b>	Levetiracetam
<b>LTG</b>	Lamotrigina
<b>LPL</b>	Lipoprotin lipasa
<b>M-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de monocitos/macrófagos
<b>MDH</b>	Malato deshidrogenasa
<b>MO</b>	<i>Major osteoporotic</i>
<b>MPs</b>	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i> o proteínas morfogenéticas óseas
<b>MRO</b>	Marcadores de remodelado óseo
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodio
<b>NOF</b>	National Osteoporosis Foundation
<b>NTX</b>	Telopectido amino terminale del colágeno tipo I
<b>OC</b>	Osteocalcina
<b>OHP</b>	Hidroxiprolina
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPG</b>	Osteoprotegerina
<b>OXC</b>	Oxcarbapina
<b>PB</b>	Fenobarbital
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PGB</b>	Pregabalina
<b>PHT</b>	Fenitoína
<b>PICP</b>	Propéptico C-terminal del procolágeno tipo I
<b>PINP</b>	Propéptico N-terminal del procolágeno tipo I
<b>POD</b>	Peroxidasa
<b>PRM</b>	Primidona
<b>PRX</b>	Receptor X de pregnano
<b>PTH</b>	Hormona paratiroidea
<b>PYD</b>	Piridinolinas
<b>RANK</b>	Receptor activador del factor nuclear kappa $\beta$
<b>RANKL</b>	Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa $\beta$
<b>RFM</b>	Rufinamida
<b>RM</b>	Resonancia magnética
<b>SAC</b>	S-Adenosil-cisteína
<b>SAH</b>	S-adenosil-homocisteína
<b>SDMO</b>	DMO estandarizada
<b>SEN</b>	Sociedad Española de Neurología

<b>SHBG</b>	Globulinas transportadoras de hormonas sexuales
<b>SNP</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (cambio de nucleótido simple)
<b>T4L</b>	Tiroxina libre
<b>TAC</b>	Tomografía axial computarizada
<b>TGB</b>	Tiagabina
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i> (Factor de crecimiento tumoral $\beta$ )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>TPM</b>	Topiramato
<b>TRI</b>	Triglicéridos
<b>TSH</b>	Tirotropina
<b>VDR</b>	Receptor de Vitamina D
<b>VGB</b>	Vigabatrina
<b>VPA</b>	Ácido valproico
<b>ZNS</b>	Zonisamida



# ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>1.1.</b>	<b>EPILEPSIA</b> .....	3
1.1.1.	Definición y tipos.....	3
1.1.2.	Fisiopatología .....	5
1.1.3.	Epidemiología de la epilepsia.....	9
1.1.4.	Diagnóstico .....	12
1.1.5.	Tratamiento .....	13
1.1.5.1.	Mecanismo de acción de los fármacos antiepilépticos.....	17
1.1.5.2.	Efectos adversos de los fármacos antiepilépticos.....	18
<b>1.2.</b>	<b>OSTEOPOROSIS</b> .....	20
1.2.1.	Concepto .....	20
1.2.2.	Epidemiología de la osteoporosis .....	21
1.2.3.	Clasificación.....	22
1.2.4.	Factores de riesgo .....	24
1.2.5.	Osteoporosis y genética.....	26
1.2.6.	Patogénesis de la osteoporosis .....	32
1.2.6.1.	El hueso y sus componentes. Fisiología del metabolismo óseo .....	32
1.2.6.2.	Remodelado óseo .....	35
1.2.6.3.	Regulación del metabolismo óseo.....	37
1.2.6.4.	Sistema RANK/RANKL/OPG .....	42
1.2.6.5.	Vía de señalización Wnt .....	44
1.2.7.	Evaluación del estado óseo. Diagnóstico de osteoporosis .....	45
1.2.7.1.	Estudios de imagen.....	45
1.2.7.2.	Herramientas para calcular el riesgo de fractura ósea: FRAX® .....	48
1.2.7.3.	Marcadores de metabolismo óseo .....	52
1.2.7.3.1.	Marcadores de formación ósea .....	54
1.2.7.3.2.	Marcadores de resorción ósea.....	56
1.2.7.3.3.	Marcadores de osteoclastogénesis.....	59
1.2.8.	Tratamiento de la osteoporosis .....	60
1.2.8.1.	Medidas generales .....	60
1.2.8.1.1.	Eliminación de hábitos tóxicos.....	60

1.2.8.1.2.	Actividad física.....	60
1.2.8.1.3.	Nutrición.....	60
1.2.8.2.	Tratamiento farmacológico.....	61
1.2.8.2.1.	Bisfosfonatos.....	62
1.2.8.2.2.	Moduladores selectivos del receptor de estrógenos.....	62
1.2.8.2.3.	Denosumab.....	62
1.2.8.2.4.	Análogos de hormona paratiroidea.....	63
1.2.8.2.5.	Ranelato de estroncio.....	63
1.3.	OSTEOPOROSIS ASOCIADA AL TRATAMIENTO CON FAE.....	63
1.3.1.	Mecanismos fisiopatológicos de las alteraciones óseas asociados a FAE.....	64
1.3.1.1.	Déficit de vitamina D.....	65
1.3.1.2.	Déficit de calcitonina.....	67
1.3.1.3.	Disminución de los niveles de estrógenos.....	68
1.3.1.4.	Aumento de los niveles de Homocisteína.....	68
1.3.1.5.	Déficit de vitamina K.....	68
1.3.1.6.	Efectos del ácido valproico sobre el metabolismo óseo.....	69
1.3.1.7.	Efecto de los FAE de segunda generación sobre el metabolismo óseo.....	71
1.3.1.8.	Efecto de los FAE de tercera generación sobre el metabolismo óseo.....	73
1.4.	GENÉTICA DE LA OSTEOPOROSIS ASOCIADA A PACIENTES EPILEPTICOS.....	74
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	77
2.1.	Hipótesis del estudio.....	77
2.2.	Objetivos.....	78
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	83
3.1.	POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	83
3.1.1.	Criterios de inclusión.....	83
3.1.2.	Criterios de exclusión.....	83
3.1.3.	Grupo de estudio.....	84
3.2.	RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS Y TOMA DE MUESTRAS.....	84
3.2.1.	Recogida de datos clínicos.....	85
3.2.2.	Estudio densitométrico y riesgo de fractura.....	87
3.2.3.	Toma de muestras.....	88
3.3.	ESTUDIO BIOQUÍMICO.....	89
3.3.1.	Parámetros bioquímicos de la función renal.....	89

3.3.2.	Parámetros bioquímicos de función hepática .....	90
3.3.3.	Parámetros bioquímicos del metabolismo lipídico.....	92
3.3.4.	Parámetros bioquímicos de función tiroidea .....	95
3.3.5.	Otros parámetros bioquímicos .....	96
3.3.6.	Parámetros bioquímicos del metabolismo fosfo-cálcico.....	99
3.3.7.	Parámetros bioquímicos de remodelado óseo .....	101
3.3.7.1.	Parámetros de formación.....	101
3.3.7.2.	Parámetros de resorción .....	103
3.4.	<b>ESTUDIO GENÉTICO DE POLIMORFISMOS</b> .....	105
3.4.1.	Extracción y purificación del ADN.....	106
3.4.2.	Amplificación del ADN .....	107
3.4.3.	Hibridación y visualización del ADN .....	108
3.4.4.	Lectura de los resultados .....	109
3.5.	<b>ESTUDIO ESTADÍSTICO</b> .....	110
3.6.	<b>CONFIDENCIALIDAD DEL ESTUDIO</b> .....	112
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	115
4.1.	<b>OBJETIVO 1: Análisis descriptivo de las características demográficas y clínicas de una población de pacientes epilépticos de la Región de Murcia.</b> .....	115
4.2.	<b>OBJETIVO 2: Determinar la frecuencia genotípica de los polimorfismos de los genes VDR, ER, CTR y COL1A1 en pacientes epilépticos y compararlas con las frecuencias genotípicas encontradas en la población general y/o en pacientes con otras patologías.....</b>	120
4.3.	<b>OBJETIVO 3: Determinar la posible influencia del tratamiento a largo plazo con FAE sobre el metabolismo fosfocálcico, metabolismo lipídico y la función renal de los pacientes del estudio en función del genotipo presentado.....</b>	128
4.3.1.	Estudio del metabolismo fosfocálcico .....	128
4.3.2.	Estudio del metabolismo lipídico .....	136
4.3.3.	Estudio de la función renal .....	138
4.4.	<b>OBJETIVO 4: Evaluar el estado de la masa ósea al inicio del estudio así como su evolución a lo largo del transcurso del mismo a través de la realización de una densitometría ósea mediante DEXA, calcular el riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX® y analizar la correlación de los datos obtenidos con los valores de los marcadores de remodelado óseo y con la presencia/ausencia de los polimorfismos estudiados. ....</b>	139
4.4.1.	<b>Evaluación del estado de la masa ósea al inicio del estudio y evolución de la misma durante el transcurso del mismo. Cálculo del riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX®.....</b>	139
4.4.2.	<b>Correlación del estado de la masa ósea con los marcadores de remodelado óseo y la presencia/ausencia de los polimorfismos estudiados .....</b>	145

4.4.2.1. Marcadores de remodelado óseo: evolución temporal y correlación con los datos de DMO obtenidos mediante densitometría. ....	145
4.4.2.2. Polimorfismos genéticos y su correlación con la DMO.....	152
4.4.2.3. Polimorfismos genéticos y su correlación con los marcadores de remodelado óseo	156
<b>4.5. OBJETIVO 5: Establecer la combinación más adecuada de marcadores de remodelado óseo y SNPs con las variables clínicas para el diagnóstico y seguimiento de la patología ósea en pacientes epilépticos. ....</b>	<b>157</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>171</b>
<b>5.1. Análisis descriptivo de las características demográficas y clínicas de una población de pacientes epilépticos de la Región de Murcia. ....</b>	<b>172</b>
<b>5.2. Determinar la frecuencia genotípica de los polimorfismos de los genes VDR, ER, CTR y COL1A1 en pacientes epilépticos y compararlas con las frecuencias genotípicas encontradas en la población general y/o en pacientes con otras patologías. ....</b>	<b>179</b>
5.2.1. Polimorfismos del receptor de la vitamina D.....	180
5.2.2. Polimorfismos del receptor de estrógenos.....	182
5.2.3. Polimorfismo del receptor de calcitonina.....	184
5.2.4. Polimorfismo del gen del colágeno.....	185
<b>5.3. Determinar la posible influencia del tratamiento a largo plazo con FAE sobre el metabolismo fosfocálcico, metabolismo lipídico y la función renal de los pacientes del estudio en función del genotipo presentado.....</b>	<b>186</b>
<b>5.4. Evaluar el estado de la masa ósea al inicio del estudio así como su evolución a lo largo del transcurso del mismo a través de la realización de una densitometría ósea mediante DEXA, calcular el riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX® y analizar la correlación de los datos obtenidos con los valores de los marcadores de remodelado óseo y con la presencia/ausencia de los polimorfismos estudiados. ....</b>	<b>194</b>
5.4.1. Evaluación de la DMO mediante densitometrías.....	194
5.4.2. Estudio del riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX®.....	199
5.4.3. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo y su relación con la DMO.....	201
5.4.4. Polimorfismos genéticos y su relación con la DMO.....	206
5.4.4.1. Gen del colágeno tipo I (COL1A1).....	206
5.4.4.2. Gen del receptor de calcitonina (CTR).....	208
5.4.4.3. Gen del receptor de vitamina D (VDR).....	209
5.4.4.4. Gen del receptor de estrógenos (ER).....	211
<b>5.4.5. Polimorfismos genéticos y su relación con los marcadores bioquímicos de remodelado óseo.....</b>	<b>213</b>
5.4.5.1. Gen del colágeno tipo I (COL1A1).....	213
5.4.5.2. Gen del receptor de calcitonina (CTR).....	213



5.4.5.3.	Gen del receptor de la vitamina D (VDR) .....	214
5.4.5.4.	Gen del receptor de estrógenos (ER) .....	216
5.5.	Establecer la combinación más adecuada de marcadores de remodelado óseo y SNPs con las variables clínicas para el diagnóstico y seguimiento de la patología ósea en pacientes epilépticos.....	216
5.6.	Limitaciones del estudio .....	223
6.	CONCLUSIONES.....	227
7.	BIBLIOGRAFIA.....	231



## I. INTRODUCCIÓN



## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. EPILEPSIA**

#### **1.1.1. Definición y tipos**

La epilepsia se compone de un conjunto heterogéneo de condiciones clínicas con una elevada prevalencia y repercusión socio-sanitaria. La Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) la define como una alteración cerebral crónica caracterizada por una predisposición mantenida a generar crisis epilépticas y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de dicha alteración (1).

Las crisis epilépticas pueden definirse como eventos clínicos paroxísticos y transitorios que resultan de una descarga anormal, excesiva y sincrónica de un grupo de neuronas ubicadas predominantemente en la corteza cerebral. Generalmente son procesos breves, con una duración de segundos a minutos, y caracterizados por una alteración súbita del comportamiento con aparición de convulsiones. El término convulsión se refiere a la realización de movimientos musculares involuntarios, más o menos violentos, que pueden afectar a una parte del cuerpo (convulsiones parciales) o a su totalidad (convulsiones generalizadas) y que a veces se acompañan de pérdida de la conciencia y del control de los esfínteres. Dichas convulsiones pueden observarse también en individuos sanos como resultado de una serie de alteraciones transitorias; convulsiones febriles, convulsiones secundarias a hipoglucemia, hipocalcemia o hiponatremia, o inducidas por ciertas drogas son ejemplos de convulsiones ocasionales y que no implican que el individuo sea diagnosticado de epilepsia. Por tanto, el concepto clínico y epidemiológico según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la ILAE requiere la aparición de dos o más crisis epilépticas no provocadas, excluyendo así al 10% de la población mundial que sufre algún tipo de convulsión a lo largo de su vida (2).

Según la clasificación internacional de las crisis epilépticas (Comisión para la Clasificación y Terminología de la ILAE (ILAE-1981)) existen dos tipos de crisis epilépticas (2):

- Crisis parciales o focales: son aquellas en las cuales la descarga eléctrica se origina en un grupo más o menos localizado de neuronas corticales, conocido como foco epileptogénico.
- Crisis generalizadas: se caracterizan por una activación simultánea y sincrónica de ambos hemisferios cerebrales, especialmente la corteza frontocentral, con participación de estructuras diencefálicas, sobre todo ciertos núcleos talámicos, y las conexiones tálamo-corticales.

En función de los síntomas o signos de cada tipo de crisis epiléptica se puede hacer una clasificación detallada de las mismas (3):

**Tabla 1.** *Clasificación Internacional de las crisis epilépticas (Commission on Classification and Terminology of the ILAE, 1981)*

1. Crisis parciales o focales
  - a. Crisis parciales simples
    - i. Con signos motores
    - ii. Con síntomas somatomotores o sensoriales especiales
    - iii. Con signos o síntomas autonómicos
    - iv. Con síntomas psíquicos
  - b. Crisis parciales complejas
    - i. Crisis parciales simples seguidas de alteración de la conciencia
    - ii. Con empeoramiento de la conciencia desde el inicio
  - c. Crisis parciales con evolución hacia crisis generalizadas
    - i. Crisis parciales simples que evolucionan a crisis generalizadas
    - ii. Crisis parciales complejas que evolucionan a crisis generalizadas
    - iii. Crisis parciales simples que evolucionan a crisis parciales complejas y después a crisis generalizadas
2. Crisis generalizadas (convulsivas y no convulsivas)
  - a. Crisis de ausencia
    - i. Ausencias típicas
    - ii. Ausencias atípicas
  - b. Crisis mioclónicas
  - c. Crisis clónicas
  - d. Crisis tónicas
  - e. Crisis tónico-clónicas
  - f. Crisis atónicas (crisis astáticas)
3. Crisis epilépticas inclasificables.

Aunque la existencia de un componente genético en la etiología de la epilepsia ya fue postulada en la época de Hipócrates ha sido el desarrollo de las nuevas tecnologías en el ámbito de la biología molecular lo que ha permitido demostrar el papel de los genes en el desarrollo de la enfermedad. En las últimas décadas se han identificado un número creciente de mutaciones genéticas asociadas a epilepsia, en concreto mutaciones en genes específicos que en su mayoría codifica proteínas de subunidades de canales iónicos de las neuronas cerebrales y otra gran parte codifica ciertos receptores de neurotransmisores o moléculas que intervienen en la comunicación intercelular. Sin embargo, el papel de los factores genéticos en la etiología de las crisis epilépticas reviste una gran complejidad ya que su herencia no sigue un patrón mendeliano clásico, lo cual nos lleva a pensar que existen otros factores adicionales que intervienen en el desarrollo de la patología y que por tanto, la etiología de las crisis epilépticas es multifactorial. Entre los factores adquiridos más frecuentes se encuentran las causas estructurales, entre ellas la presencia de tumores, daño cerebral postraumático, accidentes cerebrovasculares, infecciones y/o estados tóxico-metabólicos, etc... (4,5). Por todo esto, la clasificación más reciente propuesta por la ILAE es la siguiente: epilepsias genéticas, aquellas que son resultado directo de un defecto genético y cuyas crisis constituyen el síntoma principal del proceso; epilepsias de causa estructural o metabólica, aquellas en las que hay evidencia de una alteración estructural o metabólica definida y asociada a un mayor riesgo de padecer crisis epilépticas; y epilepsias idiopáticas o de causa desconocida en las que se desconoce su origen (2)

### **1.1.2. Fisiopatología**

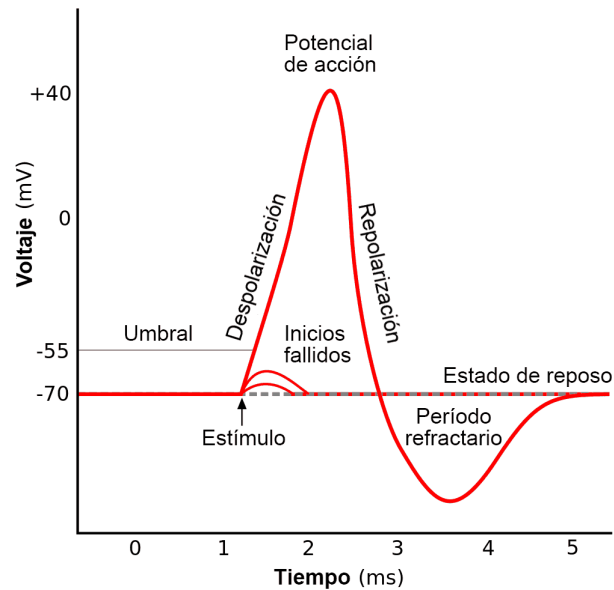
Las crisis epilépticas se producen por disparos sincronizados de determinadas poblaciones neuronales del sistema nervioso central. En la corteza cerebral encontramos dos tipos de neuronas: las neuronas de proyección o neuronas principales, que envían información a neuronas distantes, y las interneuronas que participan en circuitos locales y modulan la actividad de neuronas cercanas. La mayor parte de las neuronas principales constituyen sinapsis excitadoras sobre las neuronas postsinápticas, y gran parte de las interneuronas forman sinapsis inhibitorias sobre neuronas principales y otras neuronas inhibitorias. La comunicación neuronal normal está regulada a través de un complejo equilibrio entre las señales excitadoras y las señales inhibitorias que reciben las neuronas; si este equilibrio se altera pueden producirse descargas

descontroladas de impulsos excitadores que den lugar a una crisis epiléptica.

La función neuronal normal supone el mantenimiento de cierta diferencia del potencial transmembrana (60-80 mV) con negatividad intracelular, debido a la diferencia de concentración de determinados iones intra y extracelulares. Cuando una neurona recibe un impulso nervioso se desencadena un proceso denominado potencial de acción que no es más que cambios breves e intensos del potencial de membrana que se propagan sin decremento a lo largo de las membranas. Dichos cambios del potencial de membrana son debidos a cambios en la conductancia a los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  como consecuencia de la apertura y cierre de canales específicos para estos iones y que son dependientes de voltaje. Cuando el potencial de membrana se altera y alcanza un nivel crítico de despolarización, denominado potencial umbral, se desencadena el potencial de acción; por debajo de este nivel crítico de excitación se desencadenan respuestas locales (potencial local).

La fase de despolarización rápida de la membrana es consecuencia de la apertura de canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje que determinan un brusco y transitorio aumento de conductancia para este ión. Esta entrada masiva de cargas positivas a favor de gradiente de concentración reduce la diferencia de potencial transmembrana y finalmente la invierte. La fase de repolarización se inicia tras la inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  y como consecuencia se produce una caída de la conductancia para este ión debido a que se reduce la fuerza impulsora como consecuencia del acercamiento al potencial de equilibrio del  $\text{Na}^+$ . Al mismo tiempo se abren canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje aumentando la conductancia para este ión, ya que en este momento se encuentra alejado del potencial de equilibrio. El cierre tardío de estos canales provoca una hiperpolarización momentánea de la membrana (Fase de hiperpolarización). Finalmente se restablece el potencial de membrana en reposo gracias a la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . También están implicados en el proceso los canales de  $\text{Ca}^+$  dependientes de voltaje que actúan reforzando la fase de repolarización iniciada por la entrada de  $\text{Na}^+$  e incluso pueden llegar a ser los únicos implicados en esta fase (Figura 1).





**Figura 1.** Fases del potencial de acción

(<https://bioquimicadental.wordpress.com/2016/01/21/potencial-de-accion/>)

Por tanto, tras recibir el impulso nervioso se produce en la membrana neuronal un proceso de despolarización que al alcanzar cierto umbral desencadena un potencial de acción; pero si por el contrario se altera el equilibrio entre el potencial postsináptico excitatorio y el potencial postsináptico inhibitorio no se produce un potencial de acción normal sino que aparece la llamada despolarización paroxística.

La excitabilidad neuronal aumentada puede deberse a:

- ❖ Alteración estructural o funcional de los canales iónicos dependientes de voltaje localizados en la membrana neuronal de manera que se modifica su permeabilidad. Los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^+$  son clave en la generación de descargas anormales, mientras que la alteración de la conductancia al  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  puede explicar fallos en la inhibición neuronal. Dichos desórdenes parecen tener una base genética y deberse a mutaciones puntuales en los genes que codifican dichos canales.
- ❖ Regulación anormal de la concentración extracelular de iones. Esta anomalía puede conducir a una despolarización excesiva de las membranas neuronales; es probable que las células gliales desempeñen un papel crucial en este proceso ya que dichas células son las que controlan, fundamentalmente, el microambiente

celular en lo que respecta a la composición iónica, los niveles de neurotransmisores y el suministro de citoquinas y otros factores de crecimiento.

- ❖ Anomalías estructurales de las conexiones sinápticas que den lugar a una descompensación entre el número de neuronas pre y postsinápticas.
- ❖ Cambios en las concentraciones de neurotransmisores excitadores y/o inhibidores. Los neurotransmisores liberados al espacio sináptico se unen a receptores específicos de la membrana postsináptica determinando el aumento de la permeabilidad a ciertos iones, con los consiguientes cambios de polaridad. El neurotransmisor excitatorio por excelencia es el glutamato, en tanto que los neurotransmisores inhibitorios predominantes son el ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) y la glicina. Los cambios en las concentraciones de dichas sustancias pueden deberse a defectos en los procesos de producción, liberación, degradación o recaptación.
- ❖ Alteración de los receptores postsinápticos, ya sea a nivel estructural, funcional, o a nivel de su concentración relativa, pueden inducir el desequilibrio de las señales excitatorias e inhibitorias. Los receptores glutamatérgicos excitatorios son de dos tipos, los NMDA y no-NMDA (AMPA y Kainato). La unión del glutamato a los primeros provoca la apertura de los canales tanto de  $\text{Na}^+$  como de  $\text{Ca}^+$ , favoreciendo de esta manera la despolarización de la membrana neuronal. Dentro de los receptores para el GABA encontramos los receptores GABA-a y GABA-b. La unión del GABA a los receptores GABA-a produce la apertura de los canales de  $\text{Cl}^-$  permitiendo la entrada de este ión al interior celular y dando lugar así a una hiperpolarización. Los receptores GABA-b determinan de forma indirecta y no a través de un ionóforo, un incremento en la conductancia del  $\text{K}^+$ .

Además de la excitabilidad neuronal aumentada es indispensable para la generación de crisis epilépticas que se produzca sincronización neuronal, lo cual supone la participación simultánea de un gran número de neuronas que normalmente descargan de forma asincrónica (6).

### 1.1.3. Epidemiología de la epilepsia

La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más frecuentes, junto con las cefaleas, el ictus y la enfermedad de Alzheimer, presente en todas las sociedades y grupos de edad. La OMS calcula que en la actualidad alrededor de 50 millones de personas en todo el mundo padecen o han padecido epilepsia en algún momento de su vida. La proporción estimada de la población general con epilepsia activa (es decir, con ataques continuos o necesidad de tratamiento) oscila entre 4 y 10 por cada 1000 personas. Sin embargo, algunos estudio realizados en países subdesarrollados sugieren una proporción mayor, entre 7 y 14 personas por cada 1000 (OMS, Febrero 2017).



*Figura 2. Distribución de epilepsia a nivel global (OMS, 2017)*

Según estimaciones, se diagnostican unos 2,4 millones de casos de epilepsia al año en el mundo. En los países con mayores ingresos aparecen entre 30-50 casos por cada 100.000 habitantes/año en población general, mientras que en países con ingresos bajos o medios esta cifra puede llegar a ser hasta dos veces más alta (OMS, Febrero 2017). Algunos estudios afirman que la incidencia de epilepsia en países en desarrollo oscila entre 49.3 y 190 por cada 100.000 personas (7). Esta mayor tasa de incidencia puede ser atribuible al mayor riesgo de padecer ciertas enfermedades endémicas como paludismo o neurocisticercosis, traumatismos craneales, la morbilidad perinatal así como la dificultad de implantación de programas de prevención y acceso a tratamientos farmacológicos efectivos (8). Según algunos autores cerca del 80% de las personas que sufren epilepsia viven en países en vías de desarrollo (9).

En nuestro país se han llevado a cabo escasos trabajos acerca de la epidemiología de la epilepsia, estando además todos ellos geográficamente limitados y alguno de ellos referido a un grupo etario concreto. El primer estudio fue publicado en 1991 y recogía los datos de una población de escolares de entre 6 y 14 años de la ciudad de Valladolid. Sus autores obtuvieron una prevalencia estimada de epilepsia a lo largo de la vida de 5,72 por 1000 habitantes y de epilepsia activa de 3,82, con una prevalencia levemente mayor en varones (10). En el año 2001, *Luengo et al* llevaron a cabo un estudio limitado a cuatro municipios de la zona norte de la Comunidad de Madrid con una población total de 98405 sujetos del cual se extrajeron los siguientes datos: la prevalencia de epilepsia a lo largo de la vida fue de 4,12 por 1000 habitantes, mientras que de epilepsia activa fue de 4,0 por 1000. En este caso no se encontraron diferencias en cuanto al sexo (11). El primer estudio de incidencia publicado en España fue realizado durante los años 2002-2005 en población infantil menor de 15 años de la Comunidad de Navarra. En este trabajo se recogieron todos los casos nuevos de epilepsia registrados en el hospital de referencia de Neuropediatría encontrándose una incidencia de 62,6 casos por 100000 habitantes, siendo máxima en el primer año de vida y disminuyendo progresivamente hacia la adolescencia (12). Posteriormente, en el año 2009, *Benavente et al* realizaron en la provincia de Huesca un estudio de prevalencia de la epilepsia en población adolescente. En él encontraron una prevalencia de epilepsia activa de 6,3 por 1000 habitantes (13). En el trabajo llevado a cabo en la provincia de Málaga en el que se incluyeron 2281 pacientes sus autores encontraron una prevalencia de epilepsia activa de 4,70 por 1000 habitantes (14).

Recientemente, la SEN en colaboración con el Grupo de Estudio de Epilepsia de la SEN y la Sociedad Andaluza de Epilepsia, han llevado a cabo un estudio epidemiológico que fue publicado en el año 2015 denominado Epiberia y cuyo objetivo fue determinar la tasa de prevalencia de epilepsia en España. El estudio se desarrolló en tres áreas geográficas españolas distantes entre sí y con diferentes características socio-económicas, demográficas y culturales, Zaragoza, Sevilla y Almería, intentando de esta manera conseguir una población representativa del total nacional. En el proyecto, llevado a cabo durante los años 2012 y 2013, se incluyeron 1741 personas de las cuales 216 fueron finalmente diagnosticadas de epilepsia según los criterios de la ILAE. Del estudio se deduce que la prevalencia estimada, ajustada por edad y sexo por cada 1000 personas, fue de 14,87. La prevalencia de epilepsia activa fue de 5,79 y de epilepsia

inactiva de 9,08 por cada 1000 personas (15).

En cuanto a la prevalencia de epilepsia en población española respecto al género, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres, aunque algunas publicaciones sí reflejan una prevalencia ligeramente mayor en el sexo femenino (13,97/1000) que en el masculino (ratio 1,4:1) (15). Sin embargo, otros autores afirman que, a pesar de no existir diferencias entre sexos los hombres presentan mayor riesgo de desarrollar crisis epilépticas no provocadas, variando la relación entre 1,1 a 1,7 para la mayoría de estudios (16).

Respecto a la distribución de epilepsia por rangos de edad algunos estudios muestran una incidencia mayor entre los niños de entre 6 y 14 años, adolescentes y ancianos (en edades por encima de 60 años la incidencia se sitúa en 134 por 100000 habitantes) que en sujetos de edades medias (11,17). Sin embargo, estudios más recientes no encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad establecidos aunque sí una prevalencia ligeramente menor en pacientes con edades comprendidas entre 18-39 años (15).

Como ya se ha comentado anteriormente, la epilepsia es una enfermedad crónica que supone un gran impacto en la población, especialmente en aquellos casos que es farmacorresistente. El hecho de que el 5-10% de la población experimente una crisis a lo largo de su vida, que del total de ingresos hospitalarios los que ocurren por epilepsia suponen 35 pacientes por cada 100.000 enfermos dados de alta en un hospital y que el coste total de la epilepsia prevalente según datos del año 2000 puede suponer alrededor del 5% del presupuesto total de Sanidad, nos permiten afirmar que la epilepsia es una enfermedad neurológica que supone un gran impacto sociosanitario en la población española. Además del impacto económico que supone, los enfermos presentan importantes problemas médicos y sociales en relación a las crisis recurrentes, la enfermedad neurológica subyacente, los efectos secundarios de la medicación y la estigmatización social. Todo esto hace que dichos enfermos sufran una limitación importante en las actividades de la vida diaria, una reducción en la calidad de vida percibida y un incremento en la morbilidad y mortalidad (17). Según la OMS el riesgo de muerte prematura de las personas con epilepsia es entre dos y tres veces más alto que el de la población general en los países de ingresos altos, y más de seis veces superior en los países de ingresos bajos o medianos.

#### **1.1.4. Diagnóstico**

La elaboración de una historia clínica detallada es una de las herramientas fundamentales para el diagnóstico de la epilepsia. En ella se debe incluir toda la información posible acerca de la crisis epiléptica: afectación o no del estado de conciencia, aparición de síntomas motores, sensitivos, sensoriales y/o verbales, duración aproximada de la crisis, recuperación del estado de normalidad, etc... El examen físico y, en particular, el examen neurológico es un componente importante en la evaluación de un paciente con sospecha de epilepsia.

El registro de la actividad eléctrica cerebral mediante la realización de un electroencefalograma (EEG) es de gran ayuda en el diagnóstico, clasificación y seguimiento de un paciente con sospecha clínica de epilepsia; no obstante hay que destacar que la incidencia de actividad epileptiforme en el EEG de población sana es del 2-3% en el adulto y de un 5% en niños y que por tanto, en aquellos casos en los que no haya una clara sospecha clínica de epilepsia u otra patología con síntomas neurológicos la realización de un EEG no está indicada debido a que puede dar falsos positivos (18,19).

Las dos técnicas de imagen aplicables en el diagnóstico de pacientes con crisis epilépticas o epilepsia son la resonancia magnética (RM) y la Tomografía Axial Computarizada (TAC), cuya finalidad es proporcionar información de las posibles anomalías estructurales y funcionales (metabolismo, alteración del flujo cerebral...) relacionadas con el foco epileptogénico y la posible etiología subyacente a las crisis epilépticas. La RM es una técnica que mediante la aplicación de campos magnéticos y ondas de radiofrecuencia obtiene imágenes con buena diferenciación tisular, y que debido a su clara superioridad a la hora de detectar y tipificar lesiones estructurales debe considerarse la técnica de elección para el estudio de estos pacientes. El TAC es una técnica que obtiene imágenes del paciente mediante la utilización de radiaciones ionizantes y que puede ser superior a la anterior si lo que se desea es descartar calcificaciones o hemorragias, por lo que es la más indicada en situaciones de urgencia (20).

Además de los anteriormente citados, existen una serie de pruebas complementarias que pueden ayudar al clínico a establecer el diagnóstico definitivo. Entre ellas se encuentran (3):

- ❖ Realización de una analítica básica. Las guías de práctica clínica aconsejan su realización antes de iniciar un tratamiento, no tanto para ayudar al diagnóstico sino para evaluar los posibles efectos adversos del tratamiento, aunque también es útil en determinados casos para descartar una causa sintomática de la crisis epiléptica, como pueden ser las alteraciones en los niveles de glucemia o sodio.
- ❖ Electrocardiograma.
- ❖ Test neuropsicológicos para evaluar alteraciones cognitivas, en particular en las áreas del lenguaje y de la memoria.
- ❖ Test genéticos, ya que en los últimos años se han detectado alteraciones genéticas en un gran grupo de epilepsias, tanto parciales como generalizadas.

### **1.1.5. Tratamiento**

Una vez establecido el diagnóstico de epilepsia debe iniciarse un tratamiento con fármacos antiepilépticos (FAE) de acuerdo con el tipo de crisis y síndrome epiléptico, así como con su etiología. Además, deben tenerse en cuenta las características del paciente (co-morbilidades, edad y género entre otros factores), mecanismo de acción de los FAE, farmacocinética y posibles interacciones y reacciones adversas. En un principio, todas las guías recomiendan comenzar el tratamiento con un solo fármaco (monoterapia) y se va aumentando de forma gradual en función de la respuesta clínica. Si las crisis continúan pese a que la dosis de la droga se ha llevado al límite de toxicidad, el fármaco debe suspenderse gradualmente y reemplazarse por otro de segunda elección. Esta estrategia de monoterapia secuencial puede intentarse con dos o tres fármacos diferentes. Las ventajas de la monoterapia son la menor incidencia de los posibles efectos adversos colaterales y evitar interacciones medicamentosas. Si aún así el paciente continúa con crisis, los FAE pueden combinarse (politerapia) recomendándose siempre asociar aquellos fármacos con mecanismos de acción diferentes.

Como ya se ha mencionado, en la actualidad se dispone de una gran variedad de fármacos anticonvulsivantes con diferentes mecanismos de acción y dianas terapéuticas. La elección del FAE más apropiado no sólo tiene como objetivo controlar la aparición de convulsiones sino también evitar los efectos secundarios del tratamiento y restaurar la calidad de vida del paciente. Se estima que con el tratamiento adecuado

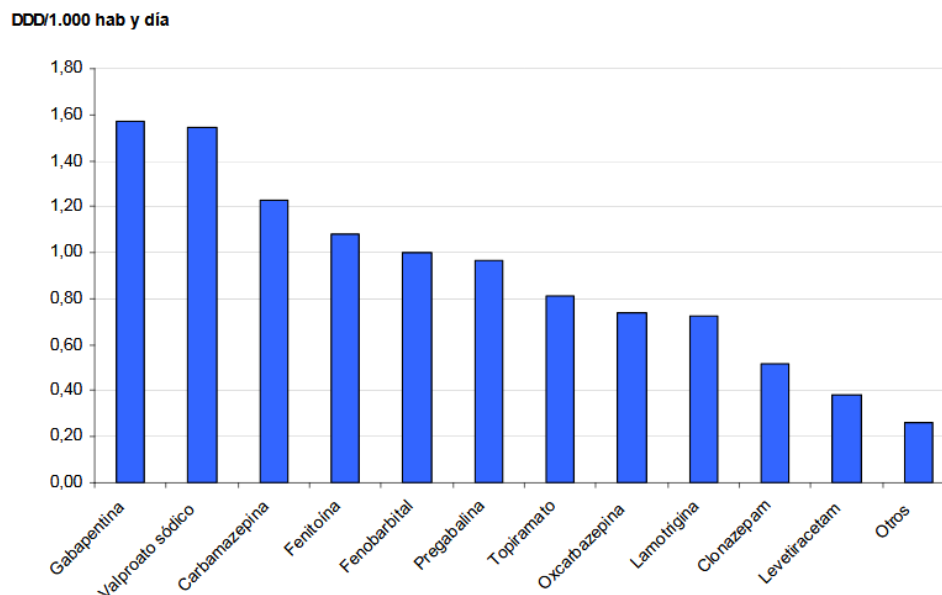
aproximadamente el 70% de los pacientes epilépticos lleva un control satisfactorio de su enfermedad; no obstante aún queda un número importante de personas cuyas crisis no son adecuadamente controladas o que sufren efectos adversos indeseables (OMS, Febrero 2017). Esto ha motivado una continua investigación para el desarrollo de nuevos agentes anticonvulsivantes y la mejora del conocimiento de los ya existentes para intentar superar tales dificultades.

Desde el punto farmacocinético el FAE más apropiado es aquel que tiene una absorción rápida y completa por vía oral, que no se liga a proteínas plasmáticas, no metabolización hepática, ausencia de metabolitos activos, ausencia de interacciones, cinética lineal (relación entre la dosis administrada y la concentración plasmática), vida media de eliminación prolongada, eliminación renal y rango terapéutico definido (21). Cabe señalar que los FAE clásicos con metabolismo hepático (isoenzimas del citocromo P-450) son los que presentan mayor número de interacciones. Los FAE de segunda y tercera generación presentan menos o ninguna interacción con el resto de los FAE. De acuerdo con sus características farmacodinámicas el FAE ideal presenta un amplio espectro terapéutico, eficacia clínica demostrada, buena tolerabilidad a corto y largo plazo y ausencia de efectos adversos graves (21).

Desde la introducción de los Bromuros por Locock en 1857 hasta la actualidad han surgido multitud de fármacos empleados en el tratamiento de la epilepsia y las crisis convulsivas (22). Los FAE de primera generación o “clásicos” son fenobarbital (PB), fenitoína (PHT), etosuximida (ESM), primidona (PRM), carbamazepina (CBZ) y ácido valproico (VPA), y se incorporaron al tratamiento a humanos entre los años 1912 y 1963. Estos fármacos dominaron la terapéutica antiepiléptica durante gran parte del último tercio del siglo XX hasta la aparición de otro gran grupo de FAE, los FAE de segunda generación, entre los que encontramos felbamato (FBM), gabapentina (GBP), lamotrigina (LTG), levetiracetam (LEV), oxcarbazepina (OXC), tiagabina (TGB), topiramato (TPM), vigabatrina (VGB) y zonisamida (ZNS) (Figura 3) . Estos nuevos antiepilépticos aumentaron la posibilidad de tratamiento de crisis y epilepsias que eran particularmente resistentes a los FAE de primera generación, y a pesar de que ofrecieron un mejor perfil de efectos secundarios y menor interacción medicamentosa, con el tiempo se ha visto que su rango de control total o parcial de crisis epilépticas no ha variado mucho respecto a los FAE de primera generación ya que sigue habiendo alrededor de un 30% de pacientes que siguen sin controlar la aparición de crisis (23,24).



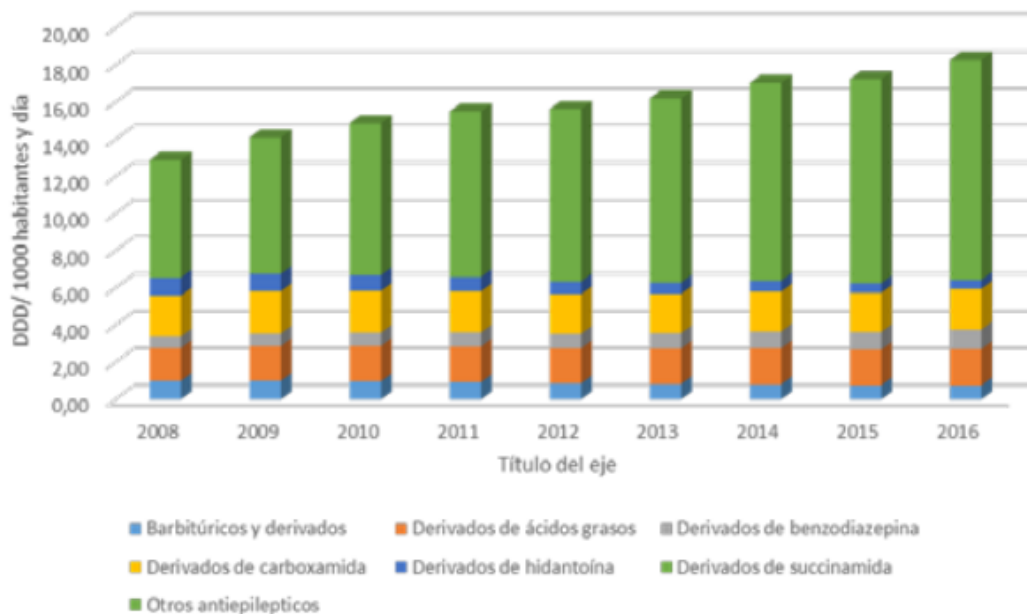
En dichos pacientes la opción terapéutica más apropiada es probablemente la administración combinada de dos o más FAE o el tratamiento con los FAE posteriormente descubiertos englobados bajo el nombre de FAE de tercera generación. Estos FAE tienen diversos mecanismos moleculares de acción y por tanto, podrían ofrecer un enfoque novedoso y ventajoso para el tratamiento de la epilepsia, especialmente en pacientes con crisis refractarias. Además, los FAE de tercera generación parece que ofrecen una mejor tolerabilidad, efectos secundarios más leves, menos interacciones farmacológicas y hormonales y características farmacocinéticas mejoradas en comparación con los FAE de primera y segunda generación. En este grupo se incluyen veinte nuevos fármacos, algunos de ellos análogos o derivados de los ya conocidos previamente, como la fosfenitoína (FPHT), el DP-VPA o el acetato de eslicarbazepina (ESL), y otros que corresponden a moléculas nuevas con propiedades anticonvulsivas, destacando la lacosamida (LCM) o la pregabalina (PGB) (25).



**Figura 3.** Uso de los principios activos mayoritarios en el año 2006. Datos del Sistema Nacional de Salud.

El uso de FAE ha aumentado en los últimos años, tal y como se puede ver en la figura 4, aunque este aumento no sólo es debido al tratamiento de pacientes epilépticos, sino que algunos de estos fármacos tienen indicaciones adicionales; por ejemplo el PB se emplea en casos de insomnio, la CBZ en trastornos bipolares y el TPM en pacientes con migraña. Según datos de la Agencia española del medicamento y productos

sanitarios el uso de los medicamentos antiepilépticos en España ha aumentado un 41,52% desde el año 2008 hasta el 2016 (26). Y no simplemente es que haya aumentado si no que la aparición de los distintos tipos de FAE a lo largo del tiempo ha hecho que su uso haya ido variando notablemente. Así, en la figura 4 se puede observar que según datos ofrecidos por la Agencia Española del Medicamento a finales del año en 2017 el número de DHD (Dosis diarias definidas por 1000 habitantes) de los distintos subgrupos de antiepilépticos muestran un comportamiento interanual similar para todos los grupos con un aumento general progresivo, siendo más evidente para el subgrupo de “Otros antiepilépticos”, que incluye entre otros el LEV, la LTG o la ZNS. Sin embargo, el consumo de FAE del grupo de los barbitúricos (fundamentalmente PB) y derivados de hidantoína (mayormente PHT) ha mostrado una tendencia descendente durante el pasado año. Por principios activos, los más consumidos han sido la PGB (24,85 % del consumo en 2016) seguida de LEV (13,63%), GBP (10,95 %) y VPA (10,51%) (26).



**Figura 4.** Uso de los principales principios activos en entre 2006-2016. Datos del Sistema Nacional de Salud. (DDD: Dosis diarias definidas). Dentro de cada grupo de FAE encontramos: Barbitúricos y derivados (PB, PRM); derivados de carboxamida (CBZ, ESL, OXC, Rufinamida); derivados de ácidos grasos (TGB, VPA, VGB, Valpromida); derivados de benzodiazepinas (Clonazepan); Derivados de hidantoína (PHT); derivados de la succinimida (ESM) y otros (LTG, TPM, LEV, GBP, LCM, PGB, ZNS).

### 1.1.5.1. Mecanismo de acción de los fármacos antiepilépticos

Con independencia de la etiología concreta, la epileptogénesis tiene siempre tres elementos comunes: 1) la capacidad de determinadas neuronas de experimentar cambios paroxísticos de despolarización; 2) la disminución del tono inhibitor gabaérgico; y 3) el incremento del tono excitador glutamatérgico.

En el inicio de la descarga paroxística intervienen los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje y los receptores glutamatérgicos NMDA y Kainato. La descarga se sincroniza y se mantiene gracias a los canales de Ca<sup>+</sup> dependientes de voltaje y a los receptores glutamatérgicos NMDA, AMPA y Kainato. Y dicha descarga se propaga y amplifica hasta dar lugar a la crisis epiléptica o se detiene sin tener repercusión clínica, en tal caso gracias a la intervención de los canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje y de los receptores gabaérgicos GABA-A y GABA-B (3,27).

Con tales premisas, podemos dividir los FAE en función de los distintos mecanismos de acción en diferentes grupos:

- ❖ Fármacos que actúan principalmente sobre canales iónicos, ya sea mediante la inhibición o bloqueo de los canales de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>+</sup> o mediante la potenciación de los canales de K<sup>+</sup>. Dentro de este grupo encontramos los siguientes FAE: PHT, CBZ, LTG, TPM, VPA, ZNS, OXC, ZNS, LCM, ESL, PGB, etosuximida (ESM), rufinamida (RFM) y retigabina (RTG).
- ❖ Fármacos que actúan potenciando el tono GABA-érgico mediante los receptores GABA-A y GABA-B, incluyendo PB, VGB, TGB, clobazam (CLB) y clonazepam (CZP).
- ❖ Fármacos que actúan a través de múltiples mecanismos de acción: GBP, TPM, VPA y FBM.
- ❖ Antiepilépticos que actúan por otros mecanismos de acción: LEV.

Sin embargo, dicha clasificación es poco útil ya que muchos antiepilépticos actúan por múltiples mecanismos de acción y, en ocasiones, no se sabe con seguridad cuál de ellos es el más relevante en su acción anticonvulsiva.

### 1.1.5.2. Efectos adversos de los fármacos antiepilépticos

Puesto que diversos FAE muestran con frecuencia una eficacia similar, el perfil de efectos indeseables y la repercusión clínica de los mismos puede ser un factor determinante en la elección del fármaco. La frecuencia de los distintos efectos adversos está determinada por diferentes factores a menudo no modificables como la edad, el sexo, patologías asociadas, etc... o relacionados con la presencia de tratamientos farmacológicos concomitantes. En términos generales podemos diferenciar entre las reacciones adversas relacionadas con la farmacología del FAE, principalmente con su mecanismo de acción, y que por tanto serán dosis dependientes, y aquellas no relacionadas con dicho mecanismo (idiosincrásicas).

Las primeras aparecen generalmente al inicio del tratamiento y con frecuencia se desarrolla tolerancia parcial a las mismas. Su presentación aumenta con los incrementos de dosis y habitualmente sólo requieren un ajuste de la misma, siendo excepcional la retirada del FAE. Dentro de este grupo son comunes a todos los FAE las reacciones de neurotoxicidad, fundamentalmente la somnolencia o afectaciones cognitivas, estas últimas especialmente deletéreas cuando ocurren durante la infancia y el envejecimiento. Debe tenerse en cuenta también que algunos efectos adversos dependientes del mecanismo de acción del FAE pueden aparecer de forma insidiosa y tras la exposición prolongada al fármaco; son las llamadas reacciones adversas crónicas, que aunque están relacionadas con las dosis de fármaco administrada no suelen presentar fenómeno de tolerancia y no son reversibles de forma rápida tras la retirada del fármaco. Entre las más comunes están aquellas que afectan a la esfera cognitiva del paciente, antiestéticas (hiperplasia gingival, hirsutismo, ganancia ponderal...), trastornos visuales (reducción del campo visual, hiperpigmentación retiniana), alteraciones endocrinológicas (déficit de vitamina D, osteomalacia) o urológicas (litiasis renal) (28,29). El impacto de los FAE sobre la densidad mineral ósea y el riesgo de fractura ha sido uno de los aspectos más ampliamente estudiados en los pacientes en tratamiento antiepiléptico.

Los efectos adversos idiosincrásicos son menos frecuentes que los anteriores pero su morbilidad y mortalidad son superiores y suelen requerir la retirada inmediata del FAE. Dichos efectos ocurren de forma impredecible y pueden ser causados por citotoxicidad directa del FAE o sus metabolitos, reacciones de hipersensibilidad autoinmunes o

interacción con órganos diana erróneos. Entre los efectos adversos idiosincrásicos más relevantes se encuentran las reacciones cutáneas, siendo el síndrome de hipersensibilidad a los FAE uno de los más graves. Se presenta con una frecuencia de 1/1000 a 1/10000 pacientes expuestos a distintos FAE (CBZ, LTG, OXC, PB y PHT) y se caracteriza clínicamente por la aparición de fiebre alta, rash y linfadenopatías, pudiendo llegar a alcanzar un fracaso multisistémico con tasas de mortalidad de hasta un 50%. El síndrome de Stevens-Johnson y la epidermólisis tóxicas son dos entidades cutáneas que también se asocian al uso de FAE y que pueden llegar a ser potencialmente fatales (30). Está demostrado que la propensión a desarrollar tanto el síndrome de Stevens-Johnson como la epidermólisis tóxica está muy aumentada en pacientes de ascendencia asiática o del sudeste asiático que presentan el alelo HLA-B\*1502. Por tanto, en estos grupos étnicos se recomienda el genotipado de dicho HLA previo a comenzar el tratamiento con FAE (31). Las reacciones idiosincrásicas potencialmente fatales pueden afectar a otros órganos y tejidos, por ejemplo, puede desarrollarse anemia aplásica inducida por FB, hepatotoxicidad inducida por VPA o FB, más frecuente en pacientes pediátricos, y pancreatitis inducida por VPA. Los efectos adversos idiosincrásicos son más frecuentes entre los FAE clásicos y la LTG.

Pueden diferenciarse tres grupos de FAE en función de los efectos adversos que producen: 1) FAE con riesgo elevado: CBZ, CLB, CZP, PB, PHT, PRM; 2) FAE con riesgo medio: TPM, ZNS, VPA; 3) FAE con riesgo bajo: GBP, LEV, LTG, PGB, VGB (18). En términos generales se puede decir que los FAE clásicos con metabolismo hepático (a través del citocromo P-450) son los que presentan un mayor número de interacciones y por tanto, suelen asociarse a una mayor frecuencia de aparición de efectos indeseados.

A día de hoy, la aparición de efectos adversos sigue siendo la principal causa de fracaso del tratamiento y uno de los factores más determinantes de la mala calidad de vida del paciente epiléptico. Durante los últimos cuarenta años se ha avanzado mucho para intentar minimizar estos inconvenientes. Por un lado, se han identificado algunos de los perfiles de pacientes asociados con un mayor riesgo de desarrollar reacciones indeseadas mediante estudios epidemiológicos y de farmacogenómica. Y por otro, se han ido incorporando diferentes FAE al arsenal terapéutico que presentan una menor carga de toxicidad asociada, perfiles de tolerabilidad mejorados y un potencial reducido de interacción con otros fármacos.

Por tanto, teniendo en cuenta que el consumo de FAE en la población se está extendiendo cada vez más y que a pesar de los continuos avances en el tema siguen apareciendo efectos adversos asociados al tratamiento con los mismos, se hace necesario seguir estudiando las posibles causas y rutas metabólicas implicadas para así poder atajarlas, mejorando con esto la calidad de vida del paciente epiléptico.

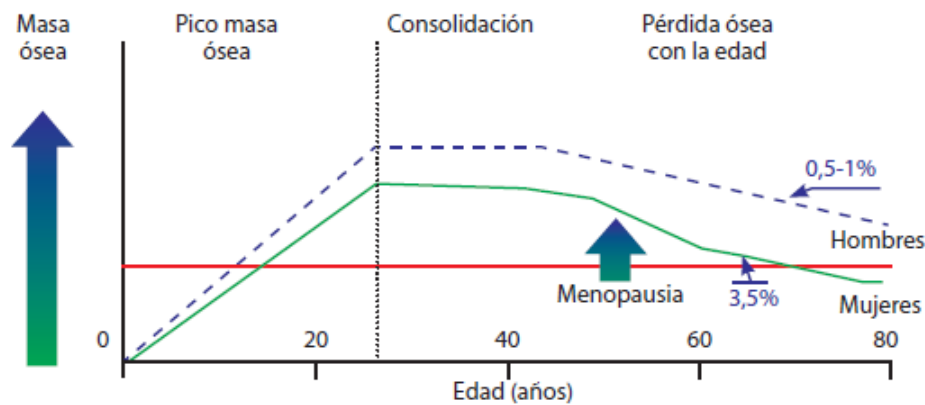
## 1.2. OSTEOPOROSIS

### 1.2.1. Concepto

En 1993 la OMS definió la osteoporosis como “una enfermedad sistémica caracterizada por una disminución de la masa ósea y un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo que incrementa la fragilidad del mismo, con el consiguiente aumento del riesgo de fractura”. Posteriormente en el año 2001, el Panel de Consenso del National Institute of Health dio un paso más y la definió como una “enfermedad esquelética caracterizada por una disminución de la resistencia ósea que predispone al paciente a un mayor riesgo de fractura”, integrando en el concepto “resistencia ósea” dos componentes fundamentales, la cantidad y la calidad del hueso (32).

La **Densidad Mineral Ósea (DMO)** es la cantidad de tejido óseo expresada en gramos de mineral por área de superficie ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) o volumen ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ). Va aumentando progresivamente durante la infancia y la juventud hasta alcanzar un “pico máximo de masa ósea” alrededor de la tercera década de la vida, factor que va a ser determinante en la DMO de etapas posteriores de la vida ya que a partir de este momento, y teniendo en cuenta también la tasa de pérdida de masa ósea, empieza a declinar de forma progresiva (Figura 5).

La pérdida de masa ósea que ocurre con el envejecimiento es un fenómeno universal que afecta tanto a hombres como a mujeres, aunque de una forma desigual. La mujer tiene de por sí entre un 10 y un 25% menos de masa ósea que el varón y además experimenta una pérdida más acelerada de la misma tras la menopausia; en el hombre sin embargo, la pérdida de masa ósea tiene lugar a una velocidad constante (0,5% anual) y se triplica en las mujeres (33).



**Figura 5.** Cambios en la masa ósea a lo largo de la vida (33).

Se estima que entre un 60 y un 80% de la variabilidad de la masa ósea se explica por factores genéticos. Se ha comprobado que la DMO es más baja en hijas de mujeres con osteoporosis y en hombres y mujeres con parientes de primer grado con dicha afectación ósea. Estudios gemelares sugieren también que la predisposición genética determina hasta un 80% del pico máximo de masa ósea, identificándose más de 70 *loci* implicados. El 20-40% restante está modulado por factores endocrinos y ambientales como la nutrición, especialmente la ingesta de calcio y vitamina D, el ejercicio físico y el estilo de vida, haciendo especial hincapié en el consumo de tóxicos como alcohol o tabaco (34).

El concepto de calidad ósea integra varios componentes, todos ajenos a la masa ósea, incluyendo la macro y microarquitectura ósea, la capacidad de recambio óseo, el grado de mineralización de la matriz ósea, la capacidad de reparación de microfracturas, etc... La alteración de alguno de estos conceptos provoca una disminución importante de la capacidad de resistencia mecánica del hueso, mayor fragilidad del mismo y como consecuencia, un mayor riesgo de sufrir una fractura ósea.

### 1.2.2. Epidemiología de la osteoporosis

La osteoporosis es la patología metabólica ósea más frecuente en países occidentales y constituye un importante problema de salud pública. Su prevalencia es difícil de calcular ya que durante los primeros años es una enfermedad silenciosa y no es hasta pasado un tiempo cuando empiezan a aparecer los primeros síntomas, incluidas las

fracturas óseas, momento en el cual la enfermedad ya puede estar bastante avanzada. Las complicaciones clínicas asociadas a las fracturas incluyen incremento en el riesgo de padecer nuevas fracturas y en la morbi-mortalidad del paciente, y suponen un impacto importante a nivel clínico, social y económico (35).

Se estima que la prevalencia de osteoporosis en España según los criterios de la OMS es del 26-30% en las mujeres mayores de 50 años (36), porcentaje que se eleva al 50% en aquellas con edades superiores a 70 años (37), de modo que una de cada tres mujeres y uno de cada cinco varones mayores de 50 años va a sufrir una fractura por fragilidad a lo largo de su vida. A pesar de la elevada prevalencia menos del 30% de los pacientes están diagnosticados y menos del 10% reciben el tratamiento adecuado.

Es importante tener en cuenta que puesto que la osteoporosis se asocia con la edad es un problema de salud que va a ir en aumento debido a la mayor esperanza de vida de la población. Se calcula que en España en menos de treinta años el número de personas mayores de 65 años se va a duplicar, con lo que la frecuencia de aparición de fracturas osteoporóticas será mucho mayor. En este aumento de prevalencia también influyen los cambios en el estilo de vida que se han producido en los últimos años, sobre todo el aumento del sedentarismo y la menor actividad física, por lo que las guías clínicas recomiendan encarecidamente seguir hábitos de vida saludables como una dieta con un aporte adecuado de calcio y la realización de ejercicio físico adecuado (38).

También existen diferencias étnicas en la DMO y la incidencia de fracturas osteoporóticas. Las mujeres de raza blanca caucásica tienen una mayor incidencia de fracturas que las hispanas y que las afroamericanas y a su vez, las mujeres asiáticas tienen la mitad de riesgo de sufrir fractura de cadera que las mujeres de raza blanca caucásica (39).

### 1.2.3. Clasificación

A día de hoy se pueden diferenciar dos tipos de osteoporosis:

- **Osteoporosis primaria:** es aquella en la que no se identifica ninguna patología responsable de la pérdida de resistencia ósea y que sólo puede asociarse a la menopausia y el envejecimiento.



- **Osteoporosis secundaria:** incluye aquellas condiciones patológicas, medicaciones y hábitos, previamente establecidas e identificadas, que reducen la masa ósea y aumentan el riesgo de fractura osteoporótica, de forma independiente a la edad y el déficit estrogénico. Se trata, por tanto, de un proceso prevenible y tratable. Sin embargo, la falta de signos de alerta previos a la aparición de la fractura hace que pocos pacientes sean diagnosticados a tiempo y tratados de forma efectiva.

Dentro de cada tipo de osteoporosis podemos encontrar diferentes subtipos que se recogen en la siguiente tabla:

**Tabla 2.** Clasificación de los tipos de Osteoporosis.

Tipos de Osteoporosis	
<b>Primaria</b>	
Idiopática juvenil	Es muy rara. Suele comenzar entre los 8-14 años de edad y remitir de manera espontánea o una vez alcanzada la pubertad
Idiopática del adulto joven	Aparece en varones jóvenes y mujeres pre-menopáusicas. Evolución variable con episodios de fracturas recidivantes característicos
Tipo I. Post-menopáusica	En mujeres post-menopáusicas de 50-75 años. Se caracteriza por una pérdida acelerada de hueso trabecular (remodelado óseo elevado) y un aumento de la porosidad a nivel cortical
Tipo II. Senil o involutiva	Consecuencia de un déficit de la función osteoblástica (bajo remodelado óseo) que aparece con la edad. Afecta tanto al hueso trabecular como cortical y a ambos sexos
<b>Secundaria</b>	
Asociada a patologías múltiples	Endocrinas: Diabetes Mellitus, estados hipogonadales, hiperparatiroidismo, acromegalia, etc. Gastrointestinales: malabsorción, celaquía. Genéticas: osteogénesis imperfecta, hemocromatosis, etc Hematológicas: mieloma, leucemia, linfomas Reumatológicas: artritis reumatoide Trasplante de órganos
Asociada a fármacos y drogas	Anticoagulantes, glucocorticoides, inmunosupresores, alcohol

#### 1.2.4. Factores de riesgo

La patogénesis de la fractura osteoporótica o por fragilidad es multifactorial. Una baja DMO se considera un factor de riesgo relevante de fractura, pero sin embargo, la sensibilidad y el valor predictivo positivo de ésta para predecir una fractura son bajos en general. En realidad, menos de un tercio del riesgo de fractura se puede atribuir al valor de DMO y hay que tener en cuenta que la mayor parte de fracturas se producen en personas sin osteoporosis densitométrica.

Se han descrito diferentes factores de riesgo además de la DMO, denominados factores de riesgo clínicos, que hacen que en combinación con la DMO la estimación del riesgo de fractura sea más precisa. Esta combinación les confiere mayor sensibilidad y especificidad, y permite seleccionar con más precisión a los candidatos a los que se deben realizar pruebas diagnósticas e instaurar medidas preventivas, optimizando de esta manera los recursos existentes

Podemos dividir los factores de riesgo en dos grupos (40–43):

- **Factores de riesgo no modificables**

- **Edad:** es uno de los factores de riesgo más importantes. El incremento de edad se asocia a una progresiva disminución de la DMO y a un aumento del riesgo de caídas. La probabilidad de sufrir una fractura aumenta de manera exponencial a partir de los 50 años.

- **Sexo femenino:** las mujeres tienen un menor tamaño óseo, sufren una mayor pérdida de masa ósea a partir de la menopausia debido al déficit estrogénico que tiene lugar a partir de la misma y tienen además una mayor expectativa de vida, hechos que facilitan el desarrollo de mayor fragilidad ósea.

- **Raza blanca:** las mujeres de raza blanca, al igual que las asiáticas, tienen un riesgo de sufrir fractura por fragilidad incrementado en 2,5 con respecto a otras razas.

- **Genética:** debido a que el 70-80% del pico máximo de masa ósea viene determinado genéticamente, el hecho de tener familiares de primer grado con osteoporosis multiplica por dos el riesgo de fractura, para cualquier DMO.

- **Factores de riesgo modificables**

- **Bajo peso** (IMC < 19): confiere un riesgo sustancial para cualquier fractura por fragilidad, independientemente de la edad y el sexo. Mujeres altas aún siendo jóvenes, tienen mayor riesgo de fractura de cadera.

- **Hipogonadismo**: el déficit estrogénico en la mujer, ya sea por presentar menopausia precoz (< 45 años) o amenorreas prolongadas (> 1 año), o el hipogonadismo en el varón (Síndrome de Klinefelter, hiperprolactinemia o castración quirúrgica o farmacológica) están asociados a una mayor pérdida de masa ósea.

- **Factores nutricionales y dietéticos**: un aporte adecuado de calcio y vitamina D es necesario para alcanzar un buen pico de masa ósea y prevenir la pérdida acelerada de hueso, por lo que una dieta equilibrada con un aporte adecuado de todos los nutrientes es fundamental para un desarrollo correcto del esqueleto.

- **Consumo de tóxicos**. Los pacientes fumadores presentan una menor DMO, efecto dosis dependiente pero también reversible de modo que el riesgo aumentado de fractura ósea disminuye al cesar el hábito tabáquico y se normaliza pasados diez años. El consumo de alcohol ( $\geq 3$  unidades/día o  $\geq 21$  unidades/semana, considerando una unidad 8-10 gramos de alcohol) presenta efectos directos sobre las células óseas e indirectos sobre el sistema endocrino, el páncreas y diferentes citoquinas. Además, el consumo excesivo de alcohol puede asociarse con una nutrición deficiente con bajos niveles de calcio y vitamina D, disminución del IMC y aumento del riesgo de caídas. La abstinencia de alcohol mejora la situación pasados dos meses aproximadamente.

- **Inactividad física**. Se ha comprobado que existe una relación directa y positiva entre la práctica de ejercicio físico habitual, tanto en el presente como en la infancia o juventud, con la DMO; disminuye la pérdida de masa ósea y ayuda a preservarla, además de proporcionar una buena forma física y mayor agilidad que permiten una mejor respuesta ante las caídas.

- **Enfermedades y tratamientos osteopenizantes**. Hay diversos fármacos que se han asociado a la pérdida de masa ósea, entre ellos los corticosteroides,

metotrexato, tiroxina, anticonvulsivantes, etc... Los glucocorticoides son el principal grupo farmacológico relacionado con el descenso de la DMO y la producción de fracturas por fragilidad y constituyen la causa más común de osteoporosis secundaria. Los glucocorticoides inhiben la absorción de calcio, reducen el número y la actividad de los osteoblastos e incrementan la resorción ósea. Además inducen debilidad muscular e hipogonadismo. La pérdida ósea es mayor durante el primer año de tratamiento y afecta especialmente al hueso esponjoso (vertebras). El riesgo disminuye después de interrumpir el tratamiento, normalizándose a los 2 años. Además, como hemos visto anteriormente, existe una serie de enfermedades que pueden ser la causa de una osteoporosis secundaria: enfermedades inflamatorias, enfermedades gastrointestinales, endocrinas, etc... (Tabla 2).

**- Historia personal de fractura previa por traumatismo de bajo impacto.**

La fractura por fragilidad a partir de los 40-45 años constituye uno de los principales factores de riesgo para sufrir una nueva fractura. Supone una inusual susceptibilidad a una nueva fractura y predice de manera importante fracturas futuras. El incremento del riesgo oscila entre 1,5 y 9,5 veces, dependiendo de la edad del paciente, número de fracturas previas y localización de estas, y es independiente de la masa ósea, lo que implica que el antecedente de fractura puede ser indicativo de un mayor riesgo de caídas o defectos de la resistencia ósea no detectados por densitometría. Este antecedente podría ser una clara indicación para posteriores evaluaciones y posible intervención terapéutica. Afecta a los dos sexos, aunque es más acentuado en varones. El riesgo permanece aumentado al menos durante los siguientes cinco años tras la fractura inicial, siendo la fractura mejor estudiada es la fractura vertebral.

### **1.2.5. Osteoporosis y genética**

Como ya se ha dicho anteriormente, la osteoporosis tiene un fuerte componente genético que va quedando demostrado gracias a los múltiples estudios realizados durante las últimas décadas. Sin embargo el conocimiento de nuevos factores genéticos heredables en pacientes con osteoporosis no permite realizar una asociación clara con los efectos sobre la masa ósea en dicha enfermedad, debido en parte al fuerte impacto

que tienen los efectos ambientales sobre la DMO.

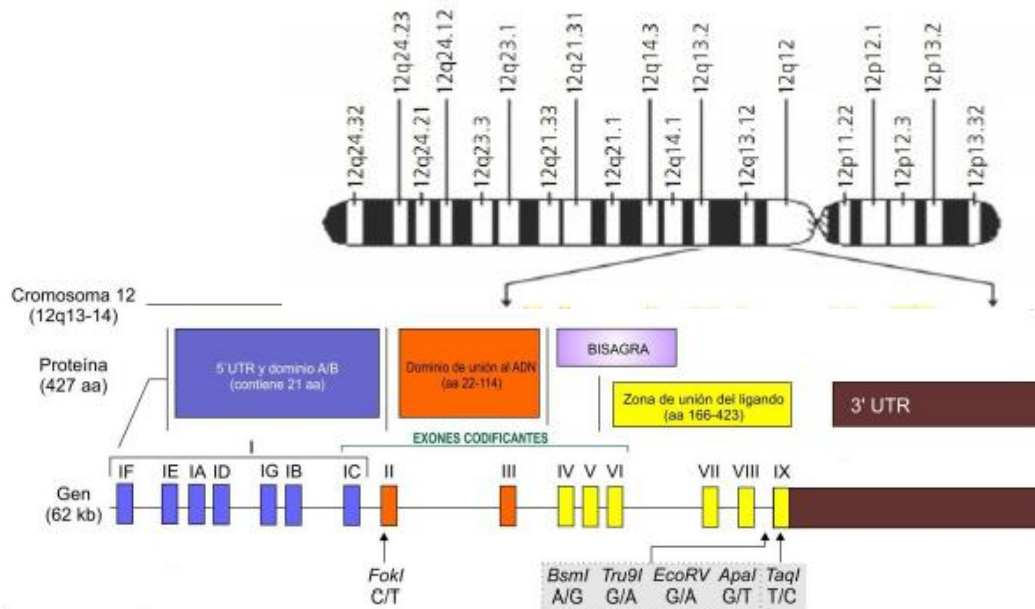
Las estrategias más empleadas para el estudio de la influencia genética en la osteoporosis son el estudio de parejas de hermanos (analizando polimorfismos de marcadores genéticos, sobre todo empleando los microsátélites cuyos alelos se caractericen por tener diferentes longitudes en una secuencia de nucleótidos repetida) y los estudios de asociación (basados en el estudio de polimorfismos localizados en genes candidatos y su asociación con la masa ósea y riesgo de fractura). Los principales procesos estudiados son los implicados en el desarrollo de la enfermedad, entre ellos aquellos que determinan el pico de masa ósea, el proceso de remodelado y la pérdida de hueso.

Los estudios realizados hasta el momento atribuyen entre un 60-80% de peso al componente genético de la masa ósea, pero por el momento se desconoce qué gen o genes son los principales responsables de la misma. Lo que sí se sabe actualmente y se ha puesto de manifiesto en análisis de segregación en familias, es que no hay un solo gen responsable de grandes efectos sino más bien un complejo multifactorial de muchos genes con efectos modestos cada uno de ellos. El objetivo no es llegar a conocerlos todos, sino más bien encontrar aplicación clínica a cada descubrimiento y ser capaces de poner en manos del clínico herramientas fiables para detectar grupos de riesgo, entender las causas-efectos y para poder aplicar terapias que beneficien al paciente (44).

Los genes más ampliamente estudiados hasta el momento son: el receptor de vitamina D (VDR), el receptor de estrógenos tipo  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) y tipo  $\beta$  (ER $\beta$ ), el receptor de calcitonina (CTR) y el del colágeno tipo I (COL1A1) (45).

- **Gen del receptor de la Vitamina D (VDR).** Las acciones biológicas de la vitamina D y sus metabolitos se llevan a cabo a través de la unión a su receptor (VDR), el cual se distribuye ampliamente por los distintos tejidos, fundamentalmente en aquellos implicados en la homeostasis del calcio, como intestino, paratiroides y riñón. Se localizan también en osteoblastos, donde la vitamina D promueve su diferenciación y regula la producción de proteínas tales como el colágeno, la fosfatasa alcalina y la OC. El gen del VDR está localizado en el cromosoma 12, concretamente en la región 12q13.11, y tiene 9 exones y 4 regiones polimórficas. Dicho gen fue uno de los primeros en ser estudiados y de entre todos los polimorfismos descritos, los cuatro polimorfismos de cambio de

nucleótido único (SNP) más estudiados que se nombran con la enzima de restricción que permitió su identificación son: *FokI*, *BsmI*, *ApaI* y *TaqI*, localizados en el exón 2, intrón 8 y exón 9, respectivamente (46) (Figura 6).



**Figura 6.** Estructura del gen y de la proteína VDR, junto con los polimorfismos más comunes. Adaptado de "Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus". *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2008 (47).

El polimorfismo ***FokI*** es un polimorfismo funcional del gen VDR que se encuentra en el exón 2 y que debido al cambio de una Timina (T) por una Citosina (C) se pierde el codón de iniciación (ATG) y da lugar a una proteína de mayor tamaño, pudiendo afectar por tanto a la actividad del receptor (48). Algunos autores afirman que el polimorfismo *FokI* del gen de VDR se correlaciona significativamente con la disminución de la DMO en columna lumbar y con un incremento de la pérdida de masa ósea en cadera en sujetos con el genotipo *ff* (49,50).

El polimorfismo ***BsmI*** se encuentra en la zona no codificante del extremo 3', en el intrón 8 y contiene el cambio de una adenina (A) por una guanina (G), de manera que los posibles genotipos encontrados serán homocigotos *BB*, *bb*, y el heterocigoto *Bb*. Los primeros estudios realizados sobre *BsmI* fueron publicados

en 1994 y mostraban relación con la DMO, de modo que aquellos pacientes con genotipo homocigoto *BB* mostraban una menor DMO que aquellos con genotipo homocigoto *bb* o heterocigoto *Bb*, mayores niveles plasmáticos de OC y menor absorción intestinal de calcio (51). A raíz de dicha publicación han sido llevados a cabo multitud de estudios sobre el tema, analizando dicho polimorfismo en distintas poblaciones de estudio (pacientes sanos, mujeres pre y postmenopáusicas, mujeres de avanzada edad, mujeres con y sin osteoporosis e incluso comparando mujeres de raza blanca y negra) obteniéndose resultados contradictorios. Sin embargo, a pesar de las grandes discrepancias, los resultados de la mayoría de los estudios se han agrupado en dos metaanálisis que concluyen que el genotipo homocigoto *bb* está asociados a una mayor DMO (52,53).

El polimorfismo *Apal* también está ubicado en el intrón 8 del gen VDR y en este caso se debe a un cambio de una adenina (A) por una citosina (C), dando lugar a los genotipos homocigotos *AA* y *aa* y genotipo heterocigoto *Aa*. Los resultados de los diferentes estudios realizados sobre el polimorfismo *Apal* también muestran contradicciones: en algunos de ellos se encuentra asociación entre el genotipo heterocigoto *Aa* y una mayor DMO y el alelo A y un aumento del riesgo de fracturas (54) pero en otros no se encuentra ninguna asociación evidente (55).

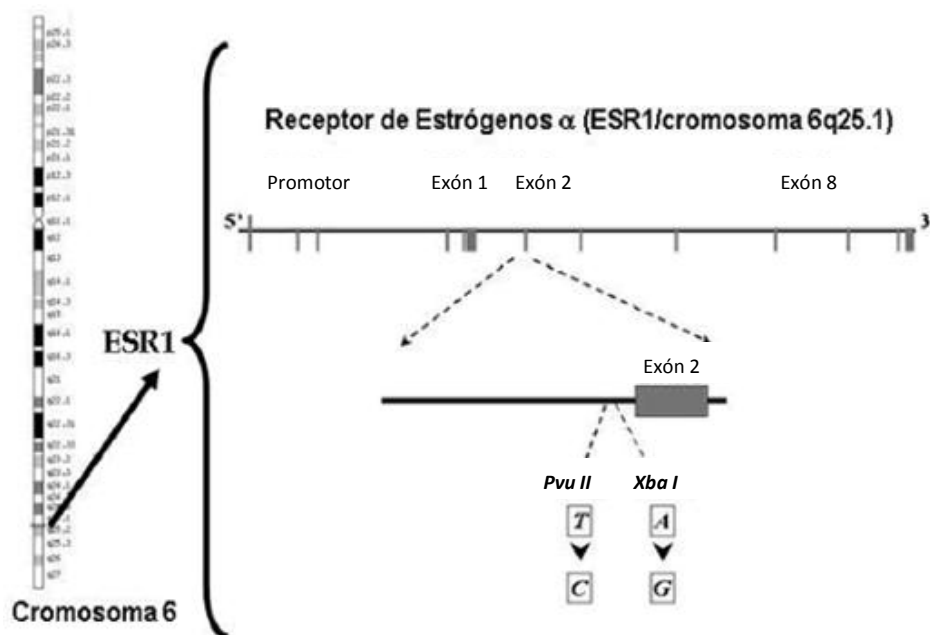
El polimorfismo *TaqI* está localizado en el codón 352 del exón 9 del gen VDR. El cambio de una Citosina (C) por una (T) da lugar a un codón silencioso de manera que no se produce ningún cambio en la secuencia de la proteína. Se han llevado a cabo diversos estudios quedando patente en alguno de ellos la asociación entre el genotipo *TT* y una mayor DMO (56), y mostrando ausencia de asociación en otros (57).

- **Gen del receptor de estrógenos (ESR).** Está demostrado que los estrógenos juegan un importante papel en la homeostasis del hueso y el recambio óseo y, por tanto, en el mantenimiento de la masa ósea. Los efectos de los estrógenos sobre la estructura del esqueleto están mediados a través de su unión a dos tipos de receptores codificados por los genes *ESR- $\alpha$*  y *ESR- $\beta$* , localizados en los cromosomas 6 (6q 25.1) y 14 (14q), respectivamente. Las dos isoformas del ESR

están altamente expresadas en el hueso, siendo el ESR $\alpha$  el más predominante en el hueso cortical y el que parece tener un efecto más predominante sobre el metabolismo óseo (58,59).

El concepto de que la deficiencia de estrógenos es fundamental para la patogénesis de la osteoporosis se basó inicialmente en el hecho de que las mujeres postmenopáusicas, cuyos niveles de estrógenos disminuyen de forma natural, tienen un mayor riesgo de presentar la enfermedad y de que el tratamiento hormonal sustitutivo reduce drásticamente la descompensación ósea que tiene lugar en ellas.

La mayoría de variantes polimórficas descritas en el ESR $\alpha$  se localizan en el intrón 1 del cromosoma 6, siendo las más estudiadas los polimorfismos de restricción *PvuII* y *XbaI*, que corresponden a SNP ubicados en la región cercana al exón 2 (Figura 7).



**Figura 7.** Gen del ESR- $\alpha$  y polimorfismos más frecuentes (*PvuII* y *XbaI*)(60).

El polimorfismo *PvuII* se produce por un cambio de una Timina (T) por una Citosina (C) de modo que los genotipos obtenidos serán homocigotos *PP* y *pp* y heterocigoto *Pp*. *Salmen et al* encontraron una asociación clara entre la presencia



del alelo *P* y una mayor pérdida de masa ósea, estableciendo un riesgo de fractura ósea mayor en aquellos pacientes con genotipo *PP*. Además, aquellos individuos con un alelo *P* obtendrían mayor beneficio frente al tratamiento con los tratamientos hormonales sustitutivos (61).

El polimorfismo *XbaI* se produce por un cambio de una Adenina (A) por una Guanina (G), obteniéndose los genotipos homocigotos *XX* y *xx* y heterocigoto *Xx*. *Gennari et al* describieron la asociación entre el genotipo *xx* y la mayor predisposición a la pérdida de masa ósea (62). En el año 2004 se llevó a cabo un metaanálisis en el que se incluían los datos de cerca de 19.000 personas de toda Europa, que concluía que las personas homocigotas *XX* tenían menor riesgo de fracturas pero sin embargo no mostró asociación entre dicho genotipo y la DMO (63), diferente de lo encontrado por *Ioannidis et al*, que si que encontraron relación entre el genotipo *XX* y la mayor DMO (64) . Sin embargo, otro metaanálisis posteriormente publicado sugiere que en las mujeres chinas el polimorfismo *PvuII* estaría asociado, pero débilmente, a la DMO, mientras que el *XbaI* no tendría ninguna relación (65).

Multitud de estudios de asociación acerca de la relación de los polimorfismos del gen *ESR* con la DMO y/o el desarrollo de osteoporosis han sido realizados en las últimas décadas, arrojando resultados contradictorios y no concluyentes *a priori*.

- **Gen del receptor de calcitonina (CTR).** El gen del receptor de la calcitonina se encuentra localizado en el cromosoma 7, concretamente en la región 7q21.3, y consta de 13 exones. Existe un SNP que consiste en la sustitución de una Timina (T) por una Citosina (C) que altera una diana de restricción de la enzima *AluI*, de la que el SNP toma su denominación clásica y que da lugar a los genotipos *AA*, *aa* y *Aa*. Esta sustitución provoca un cambio conformacional de la proteína que se traduce en una alteración de su funcionalidad. La calcitonina ejerce su acción uniéndose a dichos receptores. La gran riqueza de éstos en los osteoclastos explica, en parte, la acción biológica de la calcitonina, que actúa como un potente inhibidor de la actividad osteoclástica y, por consiguiente, disminuye la resorción ósea y con ella la concentración de calcio sanguíneo (66).

*Nakamura et al* demostraron que individuos japoneses portadores del alelo *A* mostraban una mayor predisposición a la disminución de la masa ósea, y por tanto, se asociaban a un mayor riesgo de sufrir fracturas (67), al igual que otro estudio realizado años más tarde en mujeres postmenopáusicas se demostró que el genotipo *AA* se asociaba a una menor DMO y a un mayor riesgo de sufrir osteoporosis (68).

- **Gen del colágeno tipo I.** El colágeno tipo I es la principal proteína estructural del hueso. Está codificado por dos genes, **COL1A1** y **COL1A2**, que son candidatos a ser estudiados, ya que juegan un papel importante en la determinación genética de la masa ósea. El gen **COL1A1** está localizado en el cromosoma 17, región 17q21-22 y presenta 51 exones. Uno de los polimorfismos más ampliamente estudiado es el denominado ***Sp1*** (rs1800012), 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 (69).

El alelo implicado en la disminución de masa ósea es el alelo *s* y está asociado con un aumento en la transcripción y un incremento anormal en la producción del RNAm del **COL1A1** y de su proteína (70). Esto produce un desequilibrio en la producción de las cadenas **COL1A1** y **COL1A2** que contribuye a un estrechamiento del hueso y reduce la DMO en los portadores del alelo *s*, impidiendo una correcta mineralización ósea (71). Es por ello que los portadores del alelo *s* presentan disminución de la DMO a nivel de columna lumbar y cuello femoral y presentan mayor riesgo de sufrir fracturas vertebrales, tal y como reflejan distintos estudios (70,72). El estudio GENOMOS realizado por *Ralston et al* en más de 20.000 participantes demuestra que los individuos con genotipo homocigoto *ss* presentan menor DMO, de manera que cada copia del alelo *s* supone un incremento del 40% en el riesgo de fractura ósea (72).

## 1.2.6. Patogénesis de la osteoporosis

### 1.2.6.1. El hueso y sus componentes. Fisiología del metabolismo óseo

El tejido óseo es un tipo especializado de tejido conjuntivo compuesto por células y

matriz extracelular. Esta última consta de un componente orgánico y un componente inorgánico. La matriz orgánica está formada fundamentalmente por fibras de colágeno, en su mayoría de tipo I, que suponen el 90-95 % de las proteínas del hueso y proteínas no colágenas (como proteoglicanos, fosfoproteínas y glicoproteínas, entre las que destacan la osteocalcina (OC), osteonectina, sialoproteína y osteopontina). La fase mineral de la matriz extracelular supone aproximadamente un 70% del total y está compuesta por calcio y fósforo, que se organizan formando cristales de cristales de hidroxiapatita cálcica  $[3Ca_3(PO_4)_2(OH)_2]$ . Dicha mineralización aporta rigidez mecánica y resistencia de carga al hueso, característica que distingue al tejido óseo del resto de los tejidos conjuntivos del organismo. Además, debido a este alto contenido mineral el tejido óseo sirve también como depósito de calcio y fosfato, de manera que ambos componentes pueden ser movilizados de la matriz ósea y captados por la sangre según las necesidades del organismo, para mantener las concentraciones adecuadas de ambos (73).

El componente celular óseo está formado por tres tipos de células osteoprogenitoras (74):

1. **Osteoblastos:** son células de revestimiento que proceden de células madre pluripotenciales mesenquimales. Son responsables de la síntesis de la mayor parte del componente orgánico de la matriz ósea (colágeno, OC, glicosaminoglicanos, etc...) y controlan el depósito de las sales de calcio y fósforo, es decir, controlan el proceso de mineralización ósea. La matriz secretada inicialmente por los osteoblastos que todavía no está calcificada recibe el nombre de osteoide.

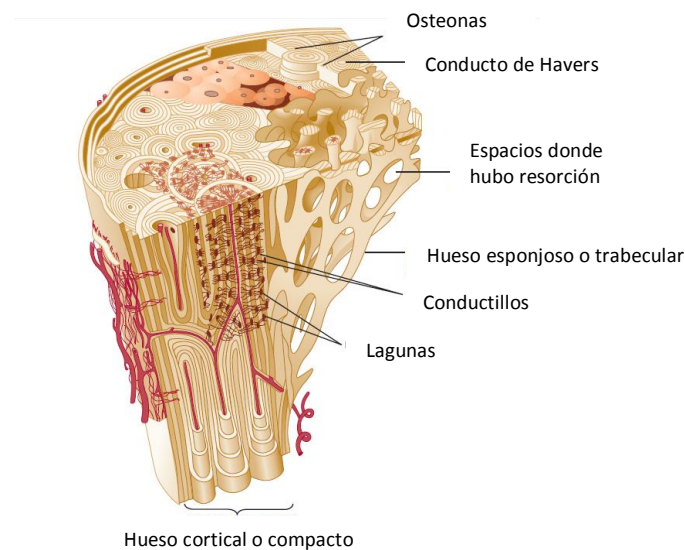
2. **Osteocitos:** son osteoblastos maduros que quedan empaquetados en la matriz ósea que ellos mismos han sintetizado, es decir, son osteoblastos diferenciados. Son las células más abundantes del hueso y son responsables del mantenimiento de la matriz ósea, mediante su actividad sintética y resorptiva. A través de una gran red de canalículos, los osteocitos comunican los osteoblastos de la superficie del hueso con el interior y permiten importantes intercambios de nutrientes y minerales, factores hormonales y estímulos fisicoquímicos.

3. **Osteoclastos:** son grandes células multinucleadas que derivan del sistema mononuclear- fagocítico y que poseen un citoplasma rico en dos enzimas, anhidrasa carbónica (AC) y fosfatasa ácida tartrato resistente (FATR). Son las células encargadas

de llevar a cabo la resorción de la matriz ósea calcificada, dando lugar a las denominadas lagunas de resorción.

Desde la perspectiva de su organización macroscópica, podemos distinguir dos tipos de tejido óseo:

- **Hueso cortical** (o compacto): se encuentra fundamentalmente en la diáfisis de los huesos largos y constituye aproximadamente el 80% del hueso total del esqueleto. Es un hueso denso y sólido que consiste en el depósito de láminas óseas concéntricas alrededor de un canal central (osteonas), cuya principal función es proporcionar soporte mecánico al esqueleto (75) (Figura 8).
- **Hueso trabecular** (o esponjoso): supone el 20% restante del esqueleto y se encuentra en los huesos cortos y en la epífisis y metáfisis de los huesos largos. Presenta una disposición tridimensional de trabéculas con médula ósea en su interior. Además de proporcionar un adecuado soporte mecánico, es el más activo metabólicamente, presentando una tasa de renovación anual diez veces superior a la del hueso compacto. En consecuencia, el hueso trabecular, que es más sensible a cambios bioquímicos, hormonales y nutricionales, también es más susceptible de sufrir mayores pérdidas de tejido, motivo por el cual la mayor parte de fracturas osteoporóticas suceden en los huesos con más cantidad de este tipo de tejido óseo (75) (Figura 8).



**Figura 8:** Tipos de hueso: cortical o compacto y esponjoso o trabecular. (Ganong, *Fisiología médica*, 25 Ed.)

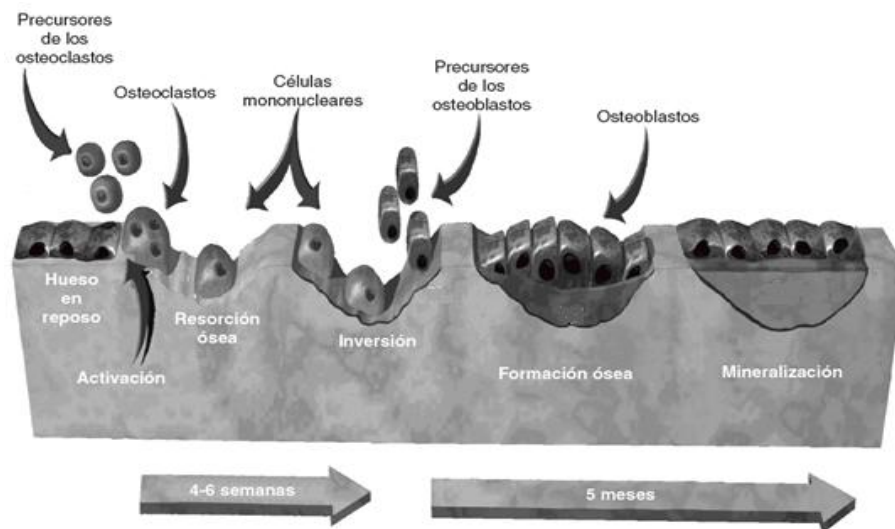
### 1.2.6.2. Remodelado óseo

El hueso es uno de los tejidos más dinámicos del organismo, que está en constante proceso de renovación; en un adulto, cerca del 20% del tejido óseo es renovado anualmente dependiendo de la localización y el tipo de hueso (76). Este proceso se lleva a cabo gracias a la acción coordinada o acoplamiento entre osteoclastos y osteoblastos sobre una misma superficie ósea.

Cada ciclo de remodelado consta de varias fases (77) (Figura 9):

- **Fase de activación:** Proceso por el cual diferentes factores locales y sistémicos estimulan a los osteoblastos, que a su vez, favorecen la expresión de los denominados “factores de diferenciación osteoclástica” dando lugar a la activación, migración y diferenciación de células hematopoyéticas precursoras de la estirpe osteoclástica. Entre otros, cabe destacar el papel del ligando del receptor activador del factor nuclear kappa  $\beta$  (RANKL).
- **Fase de resorción:** en ésta, un grupo de osteoclastos diferenciados a partir de sus precursores (preosteoclastos), erosiona una superficie ósea dando lugar a una cavidad denominada **laguna de Howship**. El proceso, que se produce gracias a la acción de la fosfatasa ácida y enzimas proteolíticas como la catepsina, dura entre 1 y 3 semanas.  
Los productos de la resorción ósea sirven como factores de crecimiento de los osteoblastos, que se desplazan a las lagunas resorptivas para sintetizar hueso nuevo. También, el osteoblasto produce **osteoprotegerina** (OPG), cuyo papel es poner un límite a la actividad resorptiva del osteoclasto. Una vez cumplido el período resorptivo el osteoclasto entra en apoptosis (75).
- **Fase de reposo o inversión:** es un periodo de aparente inactividad que dura aproximadamente 1-2 semanas, durante el cual se deposita sobre la superficie resorbida una delgada capa de material rico en glicoproteínas que se denomina “línea de cementación” y que servirá de asiento a los osteoblastos.
- **Fase de formación:** en ella un grupo de osteoblastos, diferenciados a partir de sus precursores (células osteoprogenitoras), rellena con hueso la zona excavada por los osteoclastos y depositan matriz ósea no mineralizada (**osteóide**). Las sales de

calcio que se depositan en primer lugar son compuestos amorfos (no cristalinos), constituidos por una mezcla de sales que a lo largo de un período de semanas o meses, van sufriendo cambios en su composición y estructura convirtiéndose finalmente en cristales de hidroxapatita. A este proceso se le denomina **maduración de la matriz**. Sin embargo, un pequeño porcentaje de ésta puede persistir de manera amorfa, aspecto importante ya que dichas sales amorfas podrán reabsorberse con rapidez cuando exista una necesidad adicional de calcio en el organismo (78).



**Figura 9.** Proceso de remodelado óseo con sus distintas fases (79).

El conjunto de osteoclastos y osteoblastos que actúan de manera coordinada en una superficie ósea durante un ciclo de remodelado recibe el nombre de **unidad multicelular básica** (*Basic Multicellular Unit: BMU*). Las BMU se activan de manera sincrónica, por lo que mientras unos ciclos de remodelado se hallan en fase de resorción, otros se encuentran en fase de reposo o formación (80).

El hecho de que el depósito y la resorción de hueso sean fenómenos continuos es importante a nivel fisiológico; por una parte, el hueso adapta su resistencia al grado de tensión al que se encuentra sometido en cada momento, de manera que aumenta en espesor cuando está sometido a cargas importantes; y por otra, el hueso va incorporando nueva matriz orgánica, ya que ésta se va degenerando con el tiempo y haciendo que el hueso se vuelva cada vez más frágil y débil. De esta manera, tanto la dureza como la resistencia del hueso se mantienen tras el paso del tiempo. De hecho, los huesos de los

niños, en los que las velocidades de depósito y resorción son rápidas, son poco frágiles en comparación con los de las personas de edad más avanzada, en quienes esas velocidades de depósito y resorción son más lentas.

Se denomina **recambio óseo (bone turnover)** al volumen total de hueso que es renovado por unidad de tiempo mediante el proceso de remodelado, y es directamente proporcional al número de ciclos de remodelado en curso, es decir, al número de BMU activas. La diferencia entre el volumen de hueso formado y el de hueso reabsorbido por unidad de tiempo se denomina balance óseo. Si la formación y la resorción son idénticas, el balance es igual a cero y el volumen total de hueso no variará, pero si la formación y la reabsorción no son iguales, la masa ósea se modificará en sentido positivo o negativo, es decir, se formará o se destruirá hueso. En condiciones normales, excepto en los huesos en crecimiento, el balance óseo es cero, es decir, las tasas de depósito y de resorción de hueso son iguales entre sí de forma que la masa ósea total permanece constante (80).

### **1.2.6.3. Regulación del metabolismo óseo**

La regulación del proceso de remodelado óseo es un proceso complejo en el que intervienen diversos estímulos, entre otros factores genéticos, mecánicos, hormonales y diferentes citoquinas y factores de crecimiento. Muchos de estos factores ejercen su efecto sobre osteoblastos y osteoclastos, o bien actúan estimulando a su vez cascadas de señales.

- **Factores genéticos:** como ya se ha dicho anteriormente diversos estudios atribuyen hasta un 60-80% de peso al componente genético de la masa ósea; sin embargo hasta el momento no se puede hablar de un único gen como principal responsable sino más bien de un complejo multifactorial de muchos genes con efectos modestos cada uno.
- **Factores mecánicos:** la influencia de los factores mecánicos sobre el proceso de remodelado es responsable de la pérdida de masa ósea inducida por la falta de actividad física, así como el ejercicio físico moderado o intenso tiene un efecto positivo sobre la misma. En el mecanismo por el cual el hueso detecta los estímulos físicos y los detecta en señales biológicas y de expresión génica juegan

un papel fundamental los osteocitos que actúan como mecanosensores (81). La carga mecánica estimula la transformación de las células del endostio en osteoblastos además de estimular factores de transcripción proporcionalmente a la carga. Así mismo, los microdaños causados por fatiga inducen la apoptosis de los osteocitos de las zonas adyacentes seguida de la resorción de los sitios afectados (82).

- **Factores hormonales.** La regulación hormonal juega un papel primordial en el metabolismo óseo. La regulación del metabolismo fosfo-cálcico se realiza principalmente mediante tres hormonas: la hormona paratiroidea (PTH), la 1-25 OH colecalciferol o calcitriol (metabolito activo de la vitamina D), y en menor medida la calcitonina. Además, intervienen también hormonas sexuales y otras hormonas como la hormona del crecimiento (GH), hormonas tiroideas o glucocorticoides (Figura 10).

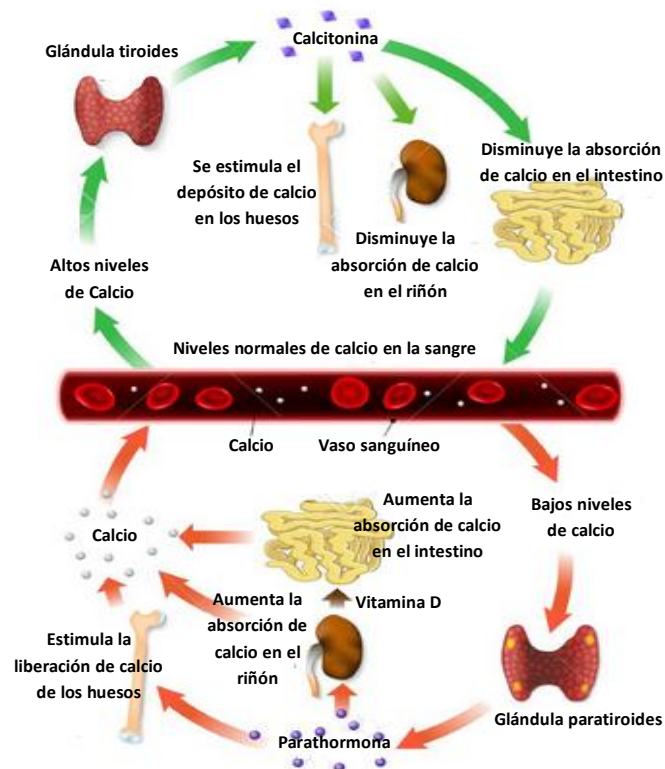
❖ **PTH:** es la hormona hipercalcemiante por excelencia. Sintetizada en las glándulas paratiroides realiza su acción a tres niveles: actúa directamente sobre el hueso y el riñón e indirectamente sobre el intestino. A nivel óseo estimula los osteoclastos favoreciendo así la resorción ósea (acción ligada a la vitamina D); en el riñón, incrementa la reabsorción tubular del calcio; y en el intestino, estimula la síntesis de calcitriol que, a su vez, potencia la absorción de calcio a nivel intestinal. Además, la PTH induce la secreción del ligando del receptor activador del factor nuclear kappa  $\beta$  (RANKL), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I) e interleucinas (IL) 6 y 11 por los osteoblastos, lo que activa la diferenciación y función osteoclástica, e inhibe la producción de OPG. Sin embargo, si la tasa de administración de PTH es intermitente, la hormona tiene efectos anabólicos ya que promueve la transformación de osteocitos en osteoblastos activos y el aumento de su vida media mediante la disminución de su apoptosis (83).

❖ **1-25 OH colecalciferol:** metabolito activo de la vitamina D sintetizado en el riñón, en el cual actúa aumentando la reabsorción tubular de calcio. A nivel óseo y en presencia de PTH, estimula la diferenciación de los osteoclastos y, por tanto, la resorción ósea, posibilitando una mineralización adecuada. Sin



embargo, la acción principal de la vitamina D se da a nivel intestinal, favoreciendo la absorción del calcio dietético (84).

- ❖ **Calcitonina:** péptido de 32 aminoácidos con acción hipocalcemiante producido por las células C del tiroides. Contribuye a la homeostasis del calcio por inhibición directa de la resorción ósea mediada por osteoclastos y el aumento de la excreción renal, efectos logrados por la alta afinidad a su receptor, receptor de calcitonina (CTR). Los osteoclastos son el blanco principal de la acción hormonal, calculándose la existencia de cerca de un millón de receptores en cada célula. Su efecto sobre dicha célula es doble, por un lado inhibe la actividad del osteoclasto maduro y por otro inhibe la diferenciación de los precursores osteoclastísticos, lo cual conduce a una disminución de la resorción ósea y, como consecuencia, del remodelado óseo. Puede por tanto considerarse como una hormona “protectora” del tejido óseo (85). Sobre el riñón actúa promoviendo la excreción de calcio por inhibición de la reabsorción tubular renal. Su secreción está activada por la calcemia, a través de la activación del receptor de calcio, y por hormonas gastrointestinales, como la gastrina (86).



**Figura 10:** Homeostasis del metabolismo fosfo-cálcico (<https://es.123rf.com>)

- ❖ **Hormonas sexuales:** desempeñan un papel importante tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de la masa ósea. Tanto estrógenos como testosterona, independientemente del sexo, ejercen un efecto positivo sobre la masa ósea ya que inhiben la resorción ósea y estimulan la formación. El efecto antirresortivo de los estrógenos es más potente, y aunque ambos estimulan la formación ósea, la testosterona actúa fundamentalmente sobre osteoblastos maduros y osteocitos, mientras que los estrógenos regulan la actividad osteoblástica en distintas fases de su desarrollo.

El papel de los estrógenos es la inhibición del desarrollo de los osteoblastos, favoreciendo su apoptosis por estímulo de la producción del factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) por los osteoblastos, además de inhibir la producción de IL-6, el principal estímulo para la resorción. Previenen además la apoptosis de los osteoblastos así como estimulan la producción de OPG (proteína inhibidora de la resorción producida por los osteoblastos) y suprimen la de RANKL. Dicho papel queda de manifiesto en la pérdida de masa ósea que ocurre en los primeros años en las mujeres postmenopáusicas tras el cese de actividad estrogénica, lo que ocasiona un aumento del remodelado debido a la elevación de distintas citoquinas proresortivas como la IL-1, factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

Los principales efectos de los andrógenos tanto en varones como en mujeres son incrementar el tamaño óseo y estimular la formación, con un discreto efecto de inhibición de la resorción ósea. Tiene lugar un efecto estimulador de la proliferación y diferenciación osteoblástica, a la vez que inhibe su apoptosis mediante la acción de TGF- $\beta$  e IGF-1 junto a una inhibición de IL-6. Además, los andrógenos son responsables de una mayor masa muscular en los varones, lo que determina mayor tamaño óseo y carga mecánica pudiendo causar también una mayor tasa de remodelado óseo (87).

- ❖ **Hormona del crecimiento (GH):** esta hormona actúa directamente sobre los osteoblastos estimulando la síntesis de colágeno, OC y fosfatasa alcalina (ALP) por parte de estos, así como de IGF-I y II, factores que promueven la proliferación y diferenciación osteoblástica, aumentando por tanto su número y función.

- ❖ **Hormonas tiroideas:** poseen dos acciones contrapuestas. Por un lado, estimulan la síntesis de matriz osteoide por los osteoblastos y su mineralización, favoreciendo la síntesis de IGF.I, y por otro se produce el efecto contrario, estimulando la resorción ósea al aumentar el número y actividad de los osteoclastos.
- ❖ **Glucocorticoides:** tienen efectos catabólicos sobre el hueso ya que inhiben la síntesis de IGF-I por parte de los osteoblastos, de manera que se interrumpe la síntesis de matriz ósea y colágeno por su parte (88).
- **Factores locales:** numerosos factores locales, paracrinos y autocrinos, influyen en el proceso de remodelado óseo entre los que destacan los factores de crecimiento, las citoquinas y las propias proteínas de la matriz ósea. Las células óseas también juegan un papel importante por la producción de prostaglandinas y óxido nítrico.
- ❖ **Factores de crecimiento:** son polipéptidos producidos por las propias células óseas u otros tejidos, que actúan como moduladores de las funciones celulares, fundamentalmente sobre el crecimiento, diferenciación y proliferación celular. Entre ellos destacan:
  - **IGF-I (Insulin-like Growth Factor I):** Los factores de crecimiento análogos a la insulina son polipéptidos sintetizados por el hígado y los osteoblastos, que se hallan en gran concentración en la matriz osteoide. Incrementan el número y función de los osteoblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno. Tanto la GH, como los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben. Destaca la acción del IGF-1, el cual estimula la replicación de precursores osteoblásticos, su activación y la síntesis de la matriz y el colágeno, y además ha demostrado inhibir su apoptosis. Las células óseas producen también los seis tipos de proteínas transportadoras de IGF (IGF binding proteins (IGFBP)). Se sabe que la IGF-BP4 tiene un papel inhibitorio de la replicación y diferenciación de los osteoblastos, mientras que la IGF-BP 5 sería estimuladora (89).
  - **TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ):** Los factores de crecimiento transformantes  $\beta$  son una superfamilia de proteínas muy abundantes en el

tejido óseo. TGF- $\beta$  es un potente estimulador de la formación ósea, potenciando la diferenciación osteoblástica y la síntesis de la matriz osteoide e inhibiendo la síntesis de proteasas (fundamentalmente la metaloproteasa de la matriz (MMP), enzima que degrada la misma). Asimismo, inhibe la resorción ósea al reducir la formación y diferenciación de los osteoclastos, así como la actividad de los osteoclastos maduros y estimular su apoptosis (90). Estimula además la síntesis de OPG, por lo que se considera una señal crucial entre las células que mantienen el remodelado óseo y desempeña un importante papel en la reparación de fracturas.

- **BMPs (Bone Morphogenetic Proteins o proteínas morfogenéticas óseas):** son un grupo de 15 proteínas de la familia del TGF  $\beta$  que estimulan la diferenciación osteoblástica e inducen la formación ósea durante la embriogénesis. Actualmente se considera que son los factores más potentes para la diferenciación osteoblástica. Característicamente, inducen la diferenciación de células del tejido conectivo en células osteoprogenitoras, por lo que se consideran osteoinductivas (91).
  
- ❖ **Citoquinas:** son polipéptidos sintetizados en células linfocíticas y monocíticas con múltiples funciones celulares. En el hueso destacan las siguientes:
  - **IL-1:** Estimula directamente la resorción, incrementando la proliferación y diferenciación de los pre-osteoclastos así como la actividad osteoclástica e inhibiendo la apoptosis de los osteoclastos (92).
  - **IL-6:** estimula precursores hematopoyéticos, lo que de forma indirecta estimula la formación osteoclástica. Se sintetiza en respuesta a PTH, IL-1 y calcitriol.
  - **IL-11:** estimula la producción de RANKL por los osteoblastos e induce la osteoclastogénesis.

#### 1.2.6.4. Sistema RANK/RANKL/OPG

La función del sistema RANK/RANKL/OPG es regular la interacción entre los miembros de la BMU, induciendo la diferenciación y activación de osteoclastos y osteoblastos de manera que equilibra el ciclo de remodelado entre la formación y la

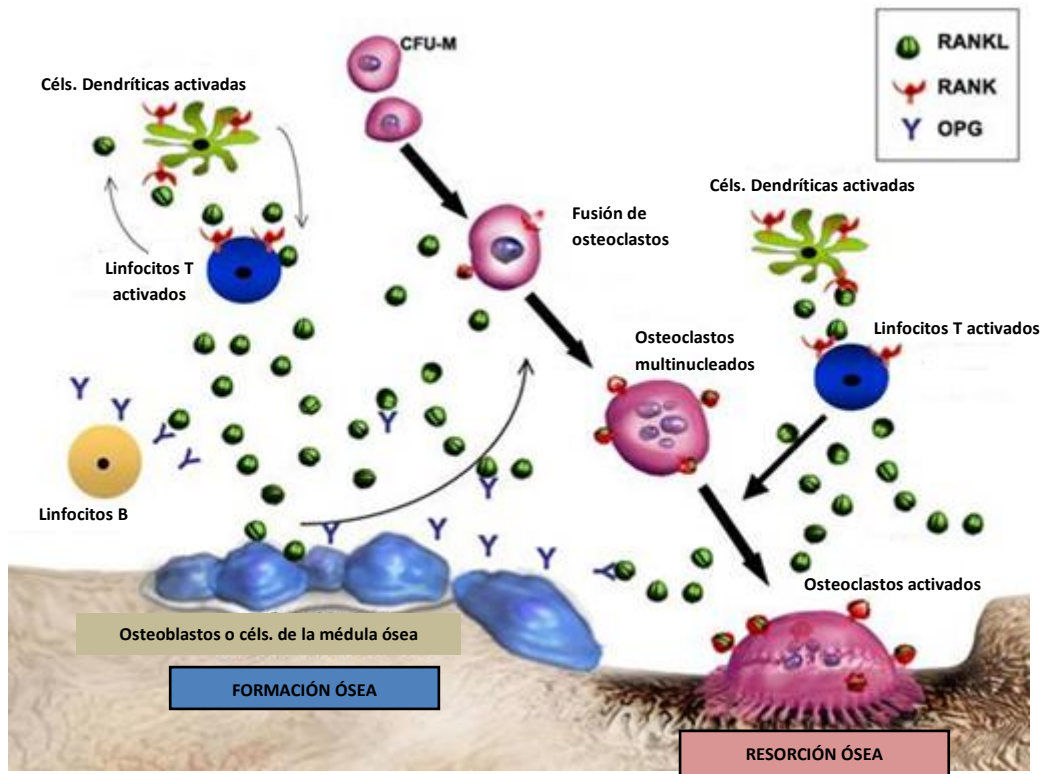
resorción ósea.

El receptor activador del factor nuclear kappa  $\beta$  (RANK) es una proteína transmembrana de 616 aminoácidos miembro de la superfamilia del TNF expresada en la membrana de osteoclastos y la superficie de otras células como linfocitos B y T, fibroblastos y células dendríticas. El ligando del receptor activador del factor nuclear kappa  $\beta$  (RANKL) es también una proteína transmembrana de la superfamilia del TNF pero expresada por osteoblastos y sus precursores, así como en células mesenquimales, compuesta por 317 aminoácidos. La OPG, conocida como factor inhibidor de la diferenciación de osteoclastos, es una proteína soluble de 401 aminoácidos secretada por osteoblastos y células estromales de la médula ósea (93).

RANKL es el factor crítico para la diferenciación osteoclástica y en presencia del M-CSF se une a su receptor natural RANK en la superficie de los osteoclastos activando la vía de señalización intracelular NF- $\kappa$ B y, como resultado, promueve la diferenciación de los preosteoclastos en osteoclastos maduros, la adherencia de estos al hueso, activa su función y aumenta su supervivencia al evitar la apoptosis, facilitando con todo la resorción de hueso. La OPG, que actúa como “receptor señuelo”, se une a RANKL de modo que impide su unión a su receptor natural RANK. De este modo bloquea cada una de las acciones de RANKL, produciendo una disminución del número de osteoclastos y aumentando así su apoptosis, es decir, inhibe la osteoclastogénesis y la actividad osteoclástica. Por todo esto se dice que la OPG tiene una alta actividad protectora del tejido óseo (94).

Entre los agentes pro-resortivos que estimulan la expresión de RANKL están la PTH, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , glucocorticoides y vitamina D. Por otro lado, muchas moléculas inhiben la resorción ósea promoviendo la síntesis de OPG por los osteoblastos, como los estrógenos, calcitonina, el TGF- $\beta$  y las IL-4 e IL-13 (95).

Teniendo en cuenta los efectos antagónicos de las proteínas RANKL y OPG es fácil entender que la remodelación ósea dependa en última instancia del equilibrio entre ambas que, a su vez, está influido por múltiples factores. Así, la llamada “Teoría de la convergencia” considera que el sistema RANK/RANKL/OPG es el efector final de la mayoría de los factores reguladores del remodelado óseo (96).



**Figura 11.** Sistema RANK/RANKL/OPG. Adaptado de “Advances in prevention and treatment of bone metastases in prostate cancer. Role of RANK/RANKL inhibition”, 2013. (97)

Por tanto, el sistema RANK/RANKL/OPG funciona como regulador de la proporción formación/resorción ósea. Así, un desequilibrio en la expresión o función de cualquiera de los componentes de este sistema conlleva la desregulación del ciclo de remodelado pudiendo generar modificaciones en la DMO que se traducen en el desarrollo de diferentes enfermedades óseas, entre ellas la osteoporosis (Figura 11).

#### 1.2.6.5. Vía de señalización Wnt

Esta vía de señalización es compleja y está integrada por numerosos componentes, incluyendo ligandos, receptores de membrana, efectores intracelulares y antagonistas. Los mecanismos mejor conocidos de transmisión de la señal de los ligandos Wnt se incluyen en la llamada vía canónica, en la cual la  **$\beta$ -catenina** desempeña un papel central. Los resultados de diversos estudios clínicos y experimentales realizados durante los últimos años ponen de manifiesto la importancia del papel de la vía Wnt (*wingless*) en la modulación de la diferenciación y actividad de las células óseas y la implicación de la misma en diferentes trastornos esqueléticos como la osteoporosis o la artrosis.

La **esclerotina** es una glicoproteína codificada por el gen SOST que se sintetiza casi exclusivamente en los osteocitos. Las **proteínas Wnt** constituyen una familia de proteínas implicadas en el crecimiento, diferenciación y apoptosis celular que juegan una importante función en el desarrollo y remodelado de la masa ósea. La activación de la ruta de señalización celular dependiente de proteínas Wnt tiene como resultado final un incremento de la masa ósea gracias a que dichas proteínas ejercen las siguientes acciones bioquímicas: 1) estimulan la maduración de los osteoblastos; 2) inhiben la apoptosis de los osteoblastos; 3) inhiben la apoptosis de los osteocitos, células en las que se sintetiza la esclerotina, proteína que inhibe la ruta de señalización celular Wnt/b-catenina. La esclerotina actúa como mecanismo de contraregulación frente a una excesiva activación de la ruta y lo hace gracias a que impide la proliferación de los osteoblastos y disminuye su función, disminuyendo de esta manera la síntesis de hueso (98). El acontecimiento clave en esta vía de señalización es la acumulación de la  $\beta$ -catenina en el citoplasma y su ulterior translocación al núcleo celular, donde modula la transcripción de diferentes genes cuya expresión dará lugar a los componentes de la vía (99).

Además, aunque la mayor parte de los estudios acerca de la influencia de la vía Wnt en el hueso se han centrado en su influencia sobre los osteoblastos, existen datos experimentales que indican que esta vía puede modular también la actividad osteoclástica. En general, la activación de la vía Wnt inhibe la formación de osteoclastos, puesto que tiende a disminuir la producción de RANKL y a aumentar la de OPG por parte de los osteoblastos (100).

### **1.2.7. Evaluación del estado óseo. Diagnóstico de osteoporosis**

#### **1.2.7.1. Estudios de imagen**

La técnica de referencia o “*gold standard*” para el estudio de la masa ósea de un paciente es la biopsia, es decir, la realización de un estudio histiológico del hueso. Sin embargo, a pesar de ser la única prueba que aporta información diagnóstica fiable de la masa ósea y que permite estudiar la microestructura y actividad metabólica del tejido, actualmente está en desuso debido principalmente a que es una técnica cruenta y dolorosa. Actualmente, el método de elección para evaluar el estado del esqueleto es la

medida de la DMO mediante densitometría ósea, que permite cuantificar el contenido y la densidad de las sales minerales depositadas en los huesos.

Bajo el término densitometría ósea se engloban todas aquellas pruebas diagnósticas no invasivas que miden la masa ósea en distintas localizaciones corporales, ya sea mediante el empleo de técnicas ionizantes o técnicas no ionizantes. De todas las técnicas disponibles, la absorciometría con rayos X de energía doble (DEXA) es la más adecuada, ya que con ella el paciente recibe la menor cantidad de radiación (1-3 mRem) y durante un periodo de exposición más corto (3-7 min). Por tanto, la DEXA es la técnica de elección tanto para el diagnóstico como para la monitorización de los pacientes que sufren alteraciones óseo-metabólicas, entre ellas la osteoporosis.

La DEXA se basa en el principio de que la densidad de un material se puede conocer, siempre que conozcamos su naturaleza, mediante el cálculo de la atenuación que experimenta un haz de radiación de baja energía al atravesar dicho material. Esta atenuación o absorción parcial de la radiación se puede relacionar con el tipo de átomos y moléculas que componen el material, ya que cada componente atómico tiene una capacidad de atenuación determinada.

En el organismo hay dos tipos de componentes, el tejido óseo y los tejidos blandos, de manera que utilizando dos energías distintas puede conocerse la densidad del tejido óseo y la cantidad de tejidos blandos. El calcio absorbe mucha más energía que el resto de componentes de los tejidos blandos. La medición de la radiación absorbida refleja el contenido mineral óseo o grado de mineralización del tejido que, dividido por el área proyectada o por el volumen de hueso medido, es igual a la DMO. De esta forma se puede calcular con gran precisión el contenido mineral óseo y la DMO (101).

La densitometría ósea se puede realizar, dependiendo de la técnica empleada, en diferentes zonas como el esqueleto apendicular o periférico (radio o calcáneo), esqueleto axial (columna o cadera) y el esqueleto total o cuerpo entero. Se suelen estudiar las zonas con mayor incidencia de fracturas osteoporóticas: columna lumbar, fémur proximal o cadera (cuello, trocánter, región intertrocantérea y triángulo de Ward) y en menor grado el antebrazo distal. El triángulo de Ward es una región que se corresponde con la intersección de tres grupos de trabéculas óseas en el cuello femoral. A la hora de la interpretación de los resultados densitométricos, las guías recomiendan tener en consideración una serie de características particulares de cada región, que



pueden influir en el valor final de la prueba (102).

Para que los resultados de la medición de la DMO en un paciente tengan utilidad clínica deben compararse con los valores medios de DMO obtenidos en la población sana de referencia. El resultado se expresa como el número de desviaciones estándar (DE) que se aleja de ésta, teniendo en cuenta siempre edad, sexo y raza.

- **Puntuación T (T-score):** desviación de los resultados de un paciente comparándolos con la DMO media de la población adulta joven, de alrededor de 30 años (se presupone que a esa edad se ha alcanzado el máximo pico de masa ósea).
- **Puntuación Z (Z-score):** valora la DMO del paciente frente a la DMO media de población sana de similares características, en cuanto a edad, sexo y etnia.

En 1994 la OMS estableció las categorías o criterios diagnósticos de osteoporosis sobre la base de criterios epidemiológicos que tienen en cuenta la evolución de los valores de DMO evaluados por densitometría y la prevalencia e incidencia de fracturas osteoporóticas en mujeres postmenopáusicas de raza blanca. Así la OMS propone la clasificación de la población en base al T-score, proporcionando una base sobre la cual clasificar a los pacientes ya que cada disminución de una desviación estándar incrementa de 2 a 2,5 veces el riesgo de fractura (103). Se definen cuatro categorías:

- Normal: valores de DMO superiores a -1 DE con relación a la media de adultos jóvenes (T-score  $> -1$ ).
- Osteopenia, valores de DMO entre 1 y 2,5 DE por debajo de la DMO promedio de la población adulta joven sana (T-score entre -1 y -2,5).
- Osteoporosis: valores de DMO inferiores a 2,5 DE por debajo de la DMO promedio de la población joven adulta sana (T-score inferior a -2,5).
- Osteoporosis establecida: cuando junto con las condiciones previas se asocia una o más fracturas osteoporóticas.

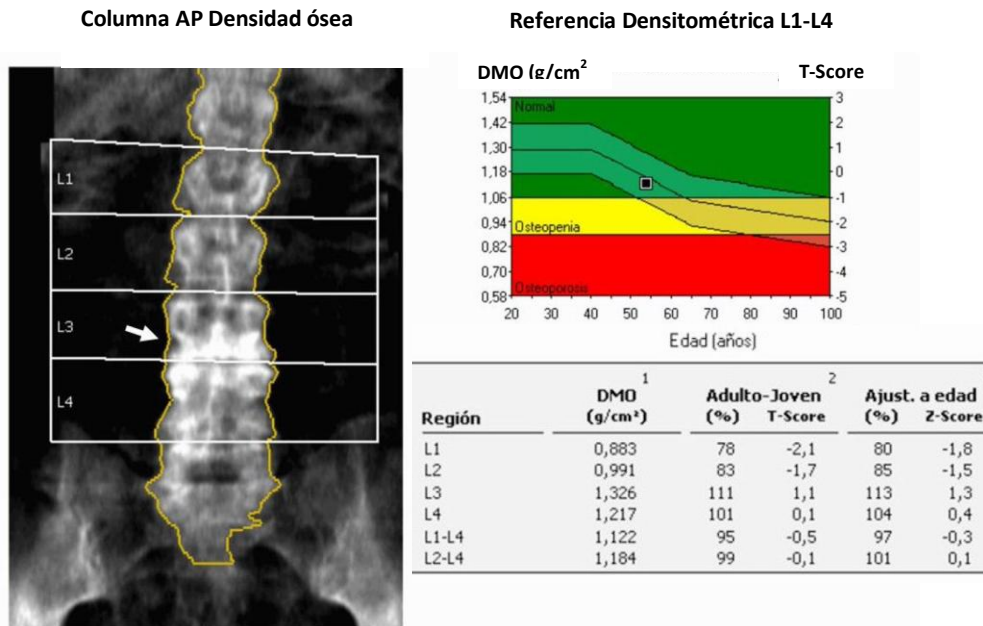


Figura 12: Ejemplo de densitometría ósea mediante DEXA a nivel de la columna lumbar.

Hasta la fecha, esta clasificación densitométrica está universalmente aceptada como criterio diagnóstico a pesar de presentar varias limitaciones ya que, de manera estricta, sólo es adecuada para mujeres postmenopáusicas de raza blanca, no tiene en cuenta el componente cualitativo del hueso sino solo el cuantitativo y su aplicación principal es en columna vertebral y cadera.

### 1.2.7.2. Herramientas para calcular el riesgo de fractura ósea: FRAX<sup>®</sup>

Sin embargo, la DMO posee una baja sensibilidad y un bajo valor predictivo de fractura. Así pues, una decisión clínica basada únicamente en el resultado de la DMO permitiría identificar un porcentaje de pacientes que finalmente padecerán una fractura, pero también podría sugerir tratar un conjunto nada menospreciable de mujeres que jamás padecerán una fractura. La combinación de los factores de riesgo clínicos de fractura por fragilidad con la medida de la DMO es el método que hasta el momento ha demostrado ser más eficaz para la valoración del riesgo de fractura. Con la idea de combinar todos estos datos la OMS desarrolló en el año 2008 el modelo FRAX<sup>®</sup> (*Fracture Risk Assessment Tool*), una herramienta de evaluación del riesgo de fractura para hombres y mujeres de entre 40 y 90 años (104). Los algoritmos del modelo son

confidenciales aunque existe una aplicación en internet (<http://www.shef.ac.uk/FRAX/tool.aspx?lang=sp>) que permite calcular la probabilidad de fractura por fragilidad, y específicamente también de cadera, a 10 años. Dicha herramienta fue desarrollada a partir de nueve grandes cohortes poblacionales que incluían alrededor de 60.000 sujetos procedentes de Europa (incluida una cohorte española), Norteamérica, Asia y Australia y en su modelo final el FRAX<sup>®</sup> calcula el riesgo de fractura en hombres y mujeres teniendo en cuenta la edad en años, el índice de masa corporal (IMC) computado según altura y peso (kg/m<sup>2</sup>), y las variables de riesgo independientes, tales como fractura previa por fragilidad, antecedentes de fractura de cadera en los progenitores, tabaquismo actual, uso prolongado de glucocorticoides orales en alguna ocasión, artritis reumatoide, otras causas de osteoporosis secundaria y consumo diario de alcohol equivalente a 3 ó más unidades por día. También se puede incluir la DMO del cuello del fémur (cadera), preferentemente como un T-score (105) (Figura 13).

FRAX<sup>®</sup> Herramienta de Evaluación de Riesgo de Fractura

Inicio Herramienta de Cálculo Tablas FAQ Referencias Español

### Herramienta de Cálculo

Por favor responda las preguntas siguientes para calcular la probabilidad de fractura a diez años sin DMO o con DMO.

país: Reino Unido Nombre/ID:  Sobre los Factores de riesgo

**Cuestionario:**

1. Edad (entre 40-90 años) o fecha de nacimiento  
Edad:  Fecha de Nacimiento: A:  M:  D:

2. Sexo  Hombre  Mujer

3. Peso (kg)

4. Estatura (cm)

5. Fractura previa  No  Sí

6. Padres con Fractura de Cadera  No  Sí

7. Fumador Activo  No  Sí

8. Glucocorticoides  No  Sí

9. Artritis Reumatoide  No  Sí

10. Osteoporosis secundaria  No  Sí

11. Alcohol, 3 o más dosis por día  No  Sí

12. DMO de Cuello Femoral  
Seleccione BMD

Borrar Calcular

**Peso Conversión**  
libras  kg

**Conversión Altura**  
pulgadas  cm

**05569601**  
Individuals with fracture risk assessed since 1st June 2011

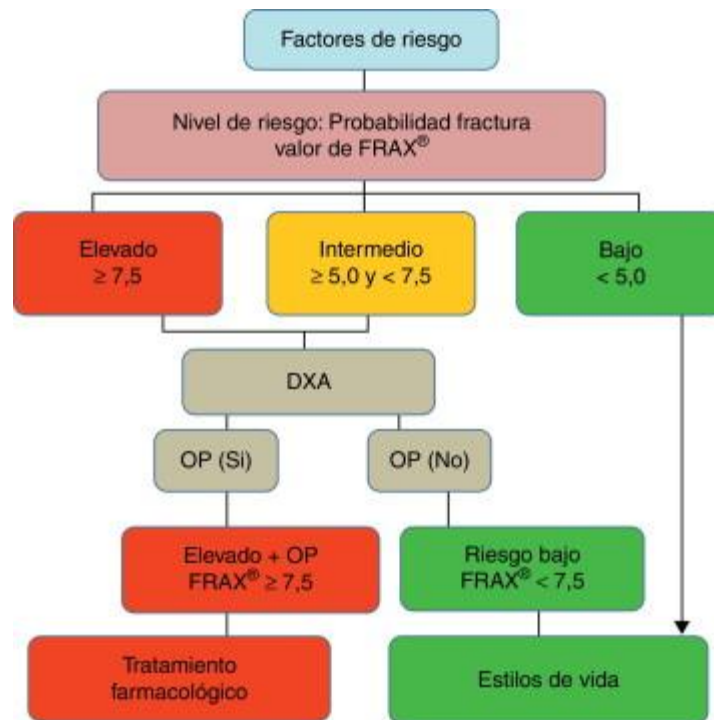
**Figura 13.** Cuestionario para calcular el FRAX<sup>®</sup> en versión española. Acceso mediante el enlace (<http://www.shef.ac.uk/FRAX/tool.aspx?lang=sp>).

El rendimiento de FRAX<sup>®</sup> ha sido evaluado en once cohortes independientes de Europa, América del Norte, Australia y Japón que no participaron en la elaboración del modelo, lo cual demuestra que FRAX<sup>®</sup> es una herramienta de amplio alcance.

El resultado ofrecido por la herramienta FRAX<sup>®</sup> no realiza por sí mismo ninguna recomendación sobre cuándo solicitar una densitometría ósea o cuándo comenzar un tratamiento antirresortivo. Por ello, es necesario realizar ajustes o calibraciones sobre esta herramienta en cada país para su validación, motivo por el cual se han realizado diferentes estudios de coste-efectividad con el objetivo de determinar cuál es el umbral más eficiente para dar ese paso en el manejo de la osteoporosis.

En España, uno de los primeros y más relevantes estudios realizados hasta el momento es el estudio FRIDEX (Factores de Riesgo y Densitometría por absorción dual de rayos X) que propone un modelo con los puntos de corte del FRAX<sup>®</sup> que permiten estratificar la cohorte estudiada de mujeres de entre 40 y 90 años en tres grupos de riesgo de sufrir una fractura principal. Este estudio establece los grupos de riesgo en base a los resultados reales de fractura sufrida durante 10 años (bajo <10%; intermedio 10-20%; alto > 20%) y también haciendo una valoración coste-efectiva comparando el modelo con la práctica clínica habitual. Los puntos umbrales de FRAX<sup>®</sup> que establecen el modelo más coste-efectivo para este grupo de estudio son: <5% bajo riesgo; ≥ 5% y <7,5% riesgo intermedio; ≥ 7,5% riesgo alto. El diagrama de decisiones basado en este modelo se puede observar en la figura 14 y propone un umbral del 5% de riesgo de fractura osteoporótica mayor para solicitar una densitometría y un umbral del 7.5% para iniciar el tratamiento farmacológico.

Según este modelo y dichos umbrales de FRAX<sup>®</sup> se podría reducir un 82% las densitometrías realizadas y un 35% los tratamientos farmacológicos, reduciendo el gasto un 29% para detectar el mismo número de mujeres que sufren fractura a 10 años en el modelo de práctica médica actual. Los umbrales que propone la calibración FRIDEX tienen su interés, ya que se basan en población española y en estudios de coste efectividad con consideraciones nacionales, por lo que sería más recomendable el uso de dichos umbrales que los británicos (106).



**Figura 14.** Diagrama de decisiones del modelo Fredix (106)

Sin embargo, y a pesar de las ventajas que aporta la utilización de esta herramienta usando los umbrales establecidos por el estudio FRIDEX, a día de hoy no existe consenso sobre el umbral por encima del cual se debe considerar alto riesgo de sufrir una fractura en la población española (107), por lo que los umbrales más ampliamente aceptados son los recomendados por la National Osteoporosis Foundation (NOF), que consideran bajo riesgo de fractura mayor a diez años cuando el resultado del FRAX<sup>®</sup> es <10% y el riesgo de fractura de cadera es <3% (108).

Pese a las indudables ventajas de la herramienta FRAX<sup>®</sup>, se han descrito diferentes inconvenientes de la misma, entre ellos: 1) carácter dicotómico de las respuestas, sin posibilidad de gradación. Varios de los factores de riesgo clínicos tenidos en cuenta en el modelo no consideran la respuesta a la dosis, sino que dan las relaciones de riesgo para una dosis o exposición promedio. El consumo de alcohol y el uso de glucocorticoides son buenos ejemplos mientras que existen pruebas sólidas de que el riesgo asociado con el consumo excesivo de alcohol y el uso de glucocorticoides es mayor a dosis más altas; 2) empleo de la DMO del cuello femoral sin tener en cuenta otras localizaciones, como la columna lumbar; 3) no valora la ingesta de calcio y los niveles

de vitamina D, siendo dos aspectos muy importantes en la regulación del metabolismo fosfo-cálcico; 4) no tiene en cuenta algunos factores de riesgo relacionados con las caídas, aún cuando es bien conocido que el riesgo de fractura aumenta progresivamente con el número de fracturas previas, o el tratamiento con determinados medicamentos como los fármacos anticonvulsivantes ; 5) no tiene en cuenta los valores de los marcadores de recambio óseo, fiel reflejo del proceso de remodelado que sufre el esqueleto constantemente (109). Toda esta ausencia de datos podría traducirse en la obtención de un valor del riesgo de fracturas que podría estar subestimado, por lo que es fundamental tener en cuenta que el valor del FRAX<sup>®</sup> de manera aislada no debe suponer la base para la toma de decisiones por parte del clínico, sino que debe considerarse como una herramienta más, junto a la valoración clínica y los factores de riesgo del paciente, a la hora de valorar el riesgo de fractura ósea y la decisión de iniciar un tratamiento farmacológico (110).

Posteriormente se ha publicado otro algoritmo para la estimación del riesgo individual de fractura de cadera u osteopórotica a 10 años, el QFractureScore, desarrollado a raíz de una amplia y representativa cohorte británica. Se identificaron una serie de variables, en su mayoría clínicas, altamente predictivas e independientemente asociadas al riesgo de fractura (111). Comparado con el FRAX<sup>®</sup>, los estadísticos de contraste resultaron similares o mejores con este nuevo algoritmo. Esta herramienta hace una valoración más detallada de la ingesta de tabaco y alcohol, cuyos efectos óseos son dosis dependientes, e incluye más factores de riesgo clínicos por lo que puede dar una valoración más individualizada del riesgo de fractura. Destaca entre ellos la recogida de caídas, terapia hormonal sustitutiva, otros tratamientos médicos concomitantes y antecedentes médicos entre los que se incluye la epilepsia o la toma de FAE. Sin embargo, esta escala está aún pendiente de ser validada para otras poblaciones fuera del Reino Unido y a día de hoy no hay datos que avalen la aplicabilidad de estos hallazgos a España.

### **1.2.7.3. Marcadores de metabolismo óseo**

Como ya se ha mencionado anteriormente, el hueso es un tejido metabólicamente activo sometido a un remodelado continuo a través de los procesos de formación y resorción ósea. En condiciones normales ambos procesos están estrechamente

acoplados entre sí, de manera que la cantidad de hueso formado es igual a la cantidad de hueso eliminado. En el momento en el que se produzca el desacoplamiento entre dichos procesos metabólicos se producirán una serie de cambios tanto en la estructura como en la fuerza y la masa ósea que darán lugar a una mayor síntesis o degradación ósea, que en ciertos momentos podrían dar lugar a alteraciones esqueléticas. Si bien la estructura y la fuerza óseas son parámetros difíciles de determinar, no lo es tanto el estudio de la masa ósea, la cual puede evaluarse mediante técnicas densitométricas, aportando información estática, o mediante el estudio de marcadores bioquímicos del remodelado óseo (MRO), que dan información dinámica del proceso.

Los MRO son enzimas u otras proteínas secretadas por los osteoblastos u osteoclastos durante la formación o resorción del hueso, o bien sustancias producidas durante la formación o la degradación del colágeno tipo 1, principal proteína de la matriz orgánica del hueso. Estas proteínas son liberadas al torrente sanguíneo durante los procesos de formación y/o resorción ósea, pudiendo ser cuantificadas posteriormente en sangre y/u orina. Idealmente, un MRO debería reflejar solo la actividad de osteoblastos u osteoclastos; sin embargo, la formación y resorción ósea suelen estar estrechamente acopladas en tiempo y espacio y, por tanto, cualquier marcador va a reflejar la tasa global de recambio óseo. Ciertos MRO pueden reflejar diferentes etapas de formación y resorción, pero no pueden reflejar procesos específicos de la enfermedad ósea o, por ejemplo, distinguir entre las actividades en el hueso cortical o trabecular (112).

En los últimos años, los MRO se han categorizado como biomarcadores de formación ósea, resorción u osteoclastogénesis. Los marcadores de formación ósea son subproductos de los osteoblastos o derivados del metabolismo del colágeno, mientras que los marcadores de resorción ósea son los productos de degradación de los osteoclastos o la degradación del colágeno. Además, varios reguladores de la actividad de las células óseas y, por lo tanto, del recambio óseo también pueden usarse como biomarcadores.

Con el tiempo se han ido desarrollado ensayos rápidos, fiables, no invasivos y rentables con alta sensibilidad y especificidad para la determinación de MRO, de manera que su cuantificación ofrece la posibilidad de evaluar las condiciones de recambio óseo, así como de monitorizar la respuesta temprana a terapias antirresortivas

y agentes formadores de hueso, brindando una justificación para su uso en un entorno clínico (113).

#### **1.2.7.3.1. Marcadores de formación ósea**

Los marcadores de formación ósea son productos directa o indirectamente relacionados con el desarrollo y actividad de los osteoblastos y todos son medidos en suero o plasma. Los más ampliamente utilizados son:

❖ **Fosfatasa alcalina (ALP):** pertenece a una familia de enzimas ubicuas asociadas a la membrana con un peso molecular de aproximadamente 140 kDa. Hay cuatro isoenzimas de ALP en la circulación: intestinales, placentarias, células germinales y una forma no específica que se expresa en numerosos tejidos, entre ellos los huesos, riñones e hígado. La isoforma ósea predomina durante la infancia y la adolescencia, mientras que en adultos sanos las isoenzimas hepática y ósea suponen un 95% de la ALP total, estando presentes en proporciones casi iguales (114).

La fosfatasa alcalina específica de hueso (ALPo), una glucoproteína tetramérica producida específicamente por los osteoblastos, se ancla en la membrana plasmática de éstos y se libera a la circulación en forma de dímero por escisión de una fosfolipasa durante la formación ósea. Está involucrada en el proceso de mineralización ósea y su producción se correlaciona positivamente con la tasa de formación ósea. Tiene una vida media de uno o dos días por lo que es menos sensible a la variación circadiana, y no está influenciada por la disfunción renal ya que se metaboliza a nivel hepático. Sus valores en plasma y suero son más altos en afecciones óseas como la enfermedad de Paget, la osteomalacia y después de fracturas o formación de hueso ectópico (115).

❖ **Osteocalcina (OC):** es la proteína no colágena más abundante de la matriz ósea y es expresada por osteoblastos, osteocitos, odontoblastos y condrocitos hipertróficos. Es una pequeña proteína de 49 aminoácidos cuya síntesis depende de la presencia tanto de metabolitos activos de vitamina D, especialmente 1,25-dihidroxitamina D, como de vitamina K. La mayoría de OC recién sintetizada se integra en la matriz ósea, pero el 20-30% llega a la circulación donde puede ser detectada. Una vez en la circulación su vida media es corta y se degrada rápidamente en fragmentos de manera que



aproximadamente un tercio de la OC circulante está intacta y el resto se encuentra en forma de fragmentos. Es metabolizada en el hígado y eliminada por los riñones por lo que, debido a su aclaramiento renal, se observan concentraciones más altas en situaciones de disfunción renal (116).

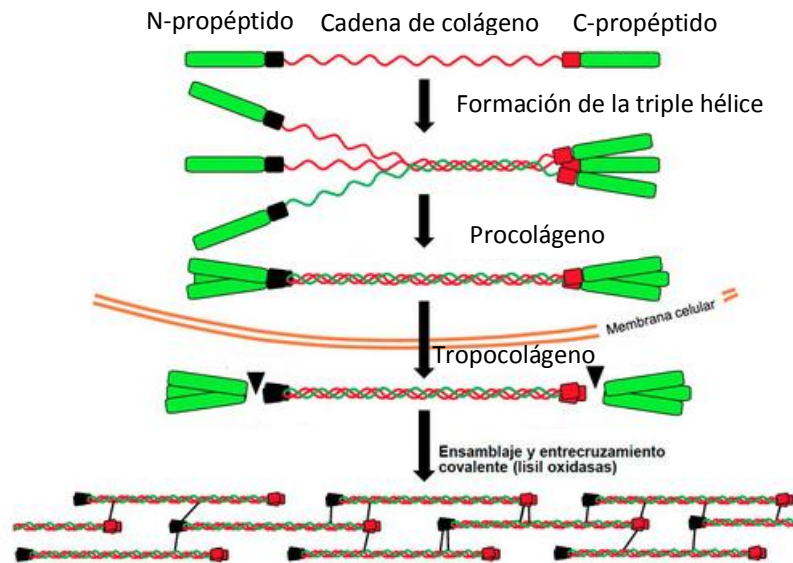
Debido a la presencia de tres residuos de gamma-carboxiglutamato en la molécula la OC es capaz de unirse al calcio, característica fundamental que explica su alta afinidad por la hidroxiapatita. Así, en presencia de calcio la OC se une a la hidroxiapatita acumulándose en la matriz ósea, llevando a cabo su papel como molécula organizadora de la matriz ósea, es decir, interviniendo en el proceso de mineralización ósea (117).

Por tanto, la OC sérica se considera un marcador específico tardío de la actividad de los osteoblastos y su nivel sérico refleja la tasa de formación de hueso. Así, la concentración de OC en suero será mayor en niños, especialmente durante el período de crecimiento activo, así como en adultos que presenten una mayor tasa de formación ósea, como por ejemplo, en el hipertiroidismo, la enfermedad de Paget o las metástasis óseas. Y además de su papel en el metabolismo óseo, estudios recientes han demostrado que existe una regulación endocrina del metabolismo energético por parte del hueso, actuando la OC como factor estimulante de la secreción de insulina por el páncreas (118).

❖ **Propéptidos Amino y Carboxi terminales del procolágeno tipo I.** La molécula de procolágeno contiene fragmentos peptídicos Amino y Carboxi-terminales, que se eliminan enzimáticamente durante el procesamiento extracelular del colágeno de tipo I recién sintetizado. Estos péptidos liberados se denominan Propéptido N-terminal del procolágeno tipo I (PINP) y Propéptico C-terminal del procolágeno tipo I (PICP) y son los encargados de guiar el proceso de plegamiento helicoidal del colágeno (Figura 15).

Aunque hay otros tejidos del organismo en los que está presente el colágeno tipo I, la tasa de recambio de éste en el hueso es más rápida que en el resto de tejidos de modo que se considera que las variaciones en la concentración de PINP y PICP reflejan cambios en la síntesis del colágeno del hueso (119). En este sentido se detectarán niveles aumentados de estos marcadores durante el crecimiento y en procesos metabólicos que cursan con aumento del remodelado óseo, como ocurre en la

enfermedad de Paget, y en respuesta a la hormona del crecimiento.



**Figura 15.** Síntesis de colágeno y obtención de los fragmentos N y C terminales (PINP y PICP). Adaptado de “Collagen cross-linking: insights on the evolution of metazoan extracellular matrix”, 2016. (120)

Actualmente el PINP se considera el biomarcador más sensible de la tasa de formación ósea y, por lo tanto, es particularmente útil para monitorizar la terapia ósea anabólica y las terapias antirresortivas (tratamiento con estrógenos y bifosfonatos) (121).

### 1.2.7.3.2. Marcadores de resorción ósea

La mayoría de los marcadores clásicos de resorción ósea son productos de degradación del colágeno, excepto la fosfatasa ácida tartrato resistente (FATR).

❖ **Hidroxiprolina (OHP):** es un aminoácido que deriva de la hidroxilación postraduccional de la prolina presente en el colágeno. Fue utilizado por primera vez en la práctica clínica en la década de 1960 como un marcador de resorción ósea. Sin embargo, la OHP está presente en otros tejidos distintos al hueso que también contienen colágeno, como el cartílago y la piel, por lo que no se puede considerar un marcador específico de la resorción ósea. Además, dicho aminoácido también es liberado a la circulación, aunque en menor proporción, durante la síntesis de hueso a partir de

péptidos de procolágeno recién sintetizados (10%). Por tanto, la OHP no es un marcador específico ni de tejido óseo ni del proceso de resorción por lo que ha sido reemplazado gradualmente por otros biomarcadores más sensibles y específicos (122).

❖ **Piridinolinas (PYD) y Deoxipiridinolinas (DPD).** La estructura de las fibrillas de colágeno se estabiliza mecánicamente mediante enlaces covalente intra e intermoleculares de piridinolina (PYD) y desoxipiridinolina (DPD). Los enlaces cruzados de colágeno se forman durante la maduración extracelular del colágeno y se liberan a la circulación durante la resorción ósea cuando el colágeno es catabolizado. Son estructuras muy resistentes y tras la acción osteoclástica no son degradadas, sino que se eliminan intactas en la orina como enlaces cruzados libres (40%) o unidas a péptidos de colágeno cortos (50%). Por tanto, pueden medirse tanto en suero como en orina. El PYD se encuentra en cartílago, huesos, ligamentos y vasos sanguíneos, mientras que el DPD se encuentra casi exclusivamente en los huesos y la dentina, por lo que el DPD es un marcador más específico y sensible que el PYD (123).

Expresan bien situaciones de cambios en el metabolismo óseo: se elevan en la niñez, menopausia, osteomalacia, hiperparatiroidismo e hipertiroidismo, y descienden bajo el tratamiento con estrógenos y bisfosfonatos.

Los ensayos para los enlaces cruzados se desarrollaron en la década de 1980 y fueron ampliamente utilizados en la década posterior. Inicialmente la determinación de PYD se realizaba mediante HPLC pero posteriormente se han ido desarrollando inmunoensayos que miden tanto PYD libre como unida a péptidos en orina. En la actualidad también existen inmunoensayos con anticuerpos monoclonales para la detección de DPD o métodos de electroquimioluminiscencia automatizados (123). Las concentraciones de enlaces cruzados de colágeno se miden con mayor precisión en orina. No obstante, ambos marcadores están actualmente en desuso ya que han sido reemplazados por otros biomarcadores con mayor rendimiento diagnóstico.

❖ **Fosfatasa ácida tartrato resistente (FATR).** Es miembro de un grupo heterogéneo de enzimas lisosómicas. Hay dos isoformas en circulación: FATR5a y FATR5b. Ambas son estructural y antigénicamente iguales, pero la isoenzima FATR5b carece de ácido siálico y funciona a un pH óptimo más alto que la isoenzima 5a.

FATR5b es específica de los osteoclastos y liberada durante la resorción ósea hacia las lagunas de resorción para ejercer su actividad hidrolítica, por lo que se considera que refleja la tasa de resorción ósea (124). Sin embargo, datos más recientes demuestran que, más que la actividad osteoblástica, lo que refleja con mayor precisión es el número de osteoclastos (125).

Una vez en la circulación, el 95% de la FATR es hidrolizada por proteasas dando lugar a fragmentos que son metabolizados en el hígado y excretados en orina. Los niveles circulantes de FATR5b no se ven afectados por la función renal y el efecto de la ingesta de alimentos es insignificante por lo que las principales indicaciones de la determinación de FATR5b son los pacientes con función renal reducida, como pacientes en diálisis. Además, FATR5b es relativamente estable en muestras de suero.

Se han descrito niveles elevados de FATR5b en situaciones de recambio óseo acelerado como la enfermedad de Paget y la metástasis ósea. Aunque durante los últimos años la determinación de FATR5b estaba en desuso recientemente, debido a la evolución del ensayo, FATR5b se está convirtiendo en uno de los MRO utilizados para la predicción de una alta renovación ósea con una correlación significativa con la pérdida de DMO (126).

❖ **Telopeptidos Amino (NTX) y Carboxi (CTX) terminales del colágeno tipo I.** Son telopeptidos derivados de la degradación enzimática de las regiones amino y carboxi terminales de la molécula de colágeno tipo I durante el proceso de resorción ósea. La forma nativa del CTX ( $\alpha$ -CTX) experimenta una isomerización  $\beta$  espontánea y lenta de un enlace peptídico dando lugar al  **$\beta$ -CTX o  $\beta$ eta-CrossLaps**, fenómeno que se atribuye al envejecimiento de la proteína. En el adulto, aproximadamente un 70% de las moléculas de colágeno tipo I del tejido óseo se encuentran en su forma  $\beta$ -CrossLaps. Por este motivo, la presencia de  $\alpha$ -CTX en la orina sería indicativa de resorción del hueso joven recién sintetizado y su cuantificación es muy adecuada para controlar la eficacia de los fármacos antirresortivos, incluidos los diferentes bifosfonatos; mientras que la presencia de  $\beta$ -CTX reflejaría la resorción de hueso viejo (127). Actualmente,  $\beta$ -CrossLaps es quizás el ensayo de enlace cruzado más comúnmente utilizado, demostrando ser un buen marcador de resorción ósea en la mayoría de las patologías óseas a excepción de la enfermedad de Paget, donde es aconsejable cuantificar la

isoforma  $\alpha$  debido a la deficiente isomerización del colágeno en el tejido óseo de estos pacientes (128).

La obtención de estos fragmentos refleja diferentes vías enzimáticas de degradación ósea, ya sea mediante la acción de la catepsina K o bien de la metaloproteinasa de matriz-1 (MMP-1). NTX y CTX son liberados por escisión del colágeno tipo I por la catepsina K y el telopéptido carboxiterminal del procolágeno tipo I (ICTP) es un fragmento más grande producido por acción de la MMP-1. NTX y CTX se pueden medir en suero u orina. Los niveles séricos están influenciados por el ritmo circadiano (que es más pronunciado para CTX) y la ingesta de alimentos por lo que el momento de la obtención de la muestra es fundamental. La recolección de orina de 24 horas tiene la ventaja de superar los cambios circadianos y es menos sensible a las interferencias dietéticas (76), aunque tiene como desventaja la gran cantidad de errores que se producen durante la recogida y manipulación de la muestra.

#### **1.2.7.3.3. Marcadores de osteoclastogénesis**

Dentro de este grupo hay que destacar el sistema RANK/RANKL/OPG, que como ya se ha mencionado previamente, desempeña un papel principal en la regulación de la osteoclastogénesis actuando sus componentes como moduladores de la diferenciación de los precursores en osteoclastos multinucleados, así como la activación y supervivencia de los mismos (129).

Sin embargo, y a pesar de la importancia de dicho sistema en la regulación del metabolismo óseo, la cuantificación de RANKL y OPG sigue siendo un desafío ya que sus niveles circulantes son muy bajos y es poco probable que reflejen adecuadamente el microambiente óseo. Estas limitaciones pueden explicar los datos contradictorios sobre la asociación de OPG y RANKL con la DMO y los marcadores bioquímicos del recambio óseo en mujeres postmenopáusicas (130). Por tanto, son necesarios rigurosos ensayos así como la identificación de las fuentes de variabilidad de dichos marcadores antes de que se puedan adaptar a la práctica clínica habitual.

Sin embargo, el conocimiento del sistema OPG/RANK/RANKL sí ha ayudado al desarrollo de nuevas terapias antirresortivas como es el caso del Denosumab.

### **1.2.8. Tratamiento de la osteoporosis**

El objetivo fundamental de la prevención y tratamiento de la osteoporosis es reducir el número de fracturas óseas. Para ellos se dispone de una serie de medidas generales no farmacológicas aplicables a la población en general, y medidas farmacológicas, enfocadas a pacientes con mayor riesgo de sufrir osteoporosis o con osteoporosis ya establecida.

#### **1.2.8.1. Medidas generales**

Dentro de este primer grupo se engloban una serie de medidas preventivas encaminadas a mantener la masa ósea, por lo que deben aplicarse a toda la población. Se debe insistir especialmente en aquellas personas con factores de riesgo de fractura y en aquellas que ya estén en tratamiento. Se incluyen:

##### **1.2.8.1.1. Eliminación de hábitos tóxicos.**

Debe evitarse principalmente el consumo de tabaco y alcohol, ya que favorecen la pérdida de masa ósea. El tabaco tiene un efecto tóxico directo sobre las células óseas y, además, altera la absorción del calcio a nivel intestinal. El alcohol presenta acción inhibitoria sobre los osteoblastos, además de aumentar el número de caídas por inestabilidad. Respecto al café, la cafeína produce un incremento en la pérdida urinaria de calcio.

##### **1.2.8.1.2. Actividad física.**

Es útil tanto para favorecer el pico de masa ósea como para disminuir la pérdida de hueso; presenta también efectos positivos sobre la función muscular, los reflejos, el equilibrio y el alivio del dolor.

##### **1.2.8.1.3. Nutrición.**

Se recomienda seguir una dieta equilibrada con una ingesta adecuada de proteínas, evitar el exceso de sal y una exposición solar moderada. Es importante seguir una dieta con aporte de calcio adecuado para mantener una correcta salud esquelética. Según la guía del Sistema Nacional de Salud del año 2010, se recomienda una ingesta diaria de

calcio para mujeres postmenopausicas mayores de 50 años de 1.000-1.200 mg/día, aunque esta aumenta a 1.500 mg/día en casos de osteoporosis establecida o ante tratamiento con glucocorticoides de forma continuada.

Se recomienda también un aporte adecuado de vitamina D a toda la población, ya sea mediante la dieta (consumo de pescado azul, hígado, yema de huevo...) y la exposición solar adecuada o recurriendo a suplementos. En pacientes con riesgo de déficit de vitamina D la dosis recomendada es de 800 UI/día (131).

Existe cierta evidencia sobre los beneficios de los suplementos con vitamina K2 en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis. Esta vitamina parece jugar un papel importante en la mineralización ósea a través de la carboxilación de la OC y mantiene el número de osteoblastos inhibiendo su apoptosis (132). Sin embargo, su uso en población general todavía no está consensuado.

Por otro lado, se ha relacionado la alteración de la microbiota intestinal con una alteración del equilibrio RANKL/OPG (133), por lo que según esta teoría el uso de probióticos que ayuden a mejorar la flora intestinal bacteriana podría ser una nueva diana terapéutica aplicada al tratamiento de la osteoporosis (134).

### 1.2.8.2. Tratamiento farmacológico

Existen varios grupos terapéuticos aprobados en España para prevenir las fracturas óseas. Los principales fármacos se encuentran recogidos en la tabla.

**Tabla 3.** Mecanismos de acción de los diferentes tipos de fármacos empleados para prevenir la osteoporosis

Mecanismo de acción	Fármacos
<b>Antirresortivos</b>	Calcio y Vitamina D Bisfosfonatos (alendronato, risedronato, ibandronato y zoledronato) Moduladores selectivos del receptor de estrógenos: raloxifeno y bazedoxifeno Denosumab (neutralizador de RANKL)
<b>Anabólicos</b>	Teriparatida Hormona paratiroidea (PTH)
<b>Acción mixta</b>	Ranelato de estroncio.

#### **1.2.8.2.1. Bisfosfonatos**

Reducen la resorción ósea ya que actúan sobre los osteoclastos, disminuyendo su formación y su ciclo de vida, así como su actividad. Son fármacos de primera línea en el tratamiento de la osteoporosis y, actualmente, los más utilizados dado que su eficacia antifractura ha quedado ampliamente demostrada y en general son bien tolerados. El perfil general de seguridad de los bisfosfonatos es aceptable. Algunos de los posibles, pero infrecuentes, efectos adversos a los que pueden asociarse son: osteonecrosis de los maxilares y las fracturas atípicas (subtrocanterea y/o diafisarias de fémur), fibrilación auricular, cáncer de esófago, dolor osteomuscular, daño renal y hepatotoxicidad, siendo estos tres últimos excepcionales.

#### **1.2.8.2.2. Moduladores selectivos del receptor de estrógenos**

Actúan uniéndose al receptor de estrógenos y realizan acciones agonistas o antagonistas sobre ellos, dependiendo del órgano diana. Tanto el raloxifeno como el bazedoxifeno presentan efectos positivos sobre la masa ósea lumbar y de cadera; asimismo, hay evidencia en la prevención de fracturas vertebrales en mujeres con osteoporosis y osteopenia (135). Entre los efectos secundarios más frecuentes se cuentan la presencia de sofocos, la aparición de edema periférico o calambres en las extremidades inferiores y los más graves, el riesgo de trombosis venosa profunda y embolismo pulmonar.

#### **1.2.8.2.3. Denosumab**

El Denosumab es un anticuerpo IgG monoclonal humano de alta afinidad y especificidad para RANKL aprobado para el tratamiento de la osteoporosis. Al unirse a RANKL, Denosumab evita la interacción de RANKL con RANK y, por lo tanto, inhibe la diferenciación, activación y supervivencia de los osteoclastos y con ello la resorción ósea. La especificidad de Denosumab para RANKL es muy superior a las moléculas recombinantes OPG o RANK previamente probadas, lo que resulta en un efecto antirresortivo potente y prolongado (136). En el estudio FREEDOM (Evaluación de la reducción de la fractura osteoporótica tras administración de Denosumab), un ensayo clínico de mujeres postmenopáusicas a las que se les administró Denosumab o placebo durante seis meses, se registró una reducción de la resorción ósea del 86% tras un mes



de tratamiento acompañada de una supresión de los MRO, efecto mayor al observado tras el uso de otros medicamentos antirresortivos. La disminución de los niveles plasmáticos de CTX fue más pronunciada y más rápida que la disminución de PINP. Además, se observó una correlación significativa entre la reducción de CTX y el aumento de la DMO. Respecto a los efectos adversos, su uso se asocia con un aumento leve de las infecciones cutáneas y urinarias, del dolor lumbar, del dolor en extremidades o muscular, o de la hipercolesterolemia (137,138).

#### **1.2.8.2.4. Análogos de hormona paratiroidea**

Son sustancias con efecto osteoformador debido al aumento tanto del número como de la actividad de los osteoblastos. Se incluyen la Teriparatida, que es el fragmento 1-34 de la PTH y la PTH intacta (1-84).

#### **1.2.8.2.5. Ranelato de estroncio**

Molécula con acción dual que disminuye la actividad osteoclástica y aumenta la osteoblástica. Está indicado en mujeres postmenopausicas ya que produce un aumento de la masa ósea y una reducción de fracturas tanto vertebrales como no vertebrales a los 3 años de tratamiento. Se asocia con un leve aumento del riesgo de trombosis venosa profunda y embolismo pulmonar, aunque los efectos adversos más frecuentes son las nauseas y la diarrea.

Sin embargo, el uso de algunos de estos fármacos presentan una limitación temporal, por lo que no serían la herramienta más adecuada en el caso pacientes jóvenes con osteoporosis secundaria en los que se prevee un tratamiento muy a largo plazo (139).

### **1.3. OSTEOPOROSIS ASOCIADA AL TRATAMIENTO CON FAE**

La epilepsia es una enfermedad que afecta predominantemente a niños y personas de edad avanzada y cuyas consecuencias van más allá de la aparición de convulsiones. Al comienzo de la era del tratamiento farmacológico de la epilepsia los FAEs de los que se disponía eran fundamentalmente PHT, PB, PRM y CBZ. En esta época se prestaba poca

atención a los cambios metabólicos asociados al tratamiento a largo plazo con FAEs; fue a finales de los años 60 cuando se pusieron de manifiesto por primera vez los efectos secundarios de los FAEs asociados al metabolismo óseo, describiendo la aparición de osteomalacia en pacientes sometidos a tratamientos prolongados con PHT y PRM (140,141). Poco después, *Christiansen et al* corroboraron estos hallazgos al demostrar que aquellos pacientes en tratamiento con PHT, PB o ambos, presentaban una menor DMO medida mediante densitometría en los antebrazos que individuos controles sanos (142) presentando como consecuencia una mayor riesgo de fractura ósea. Como ya se ha mencionado anteriormente, distintos FAE fueron surgiendo durante las siguientes décadas, siendo los más frecuentemente usados las CBZ y el VPA; sin embargo, ni éstos ni muchos de los otros FAE empleados en el tratamiento de las crisis epilépticas estaban exentos de causar efectos secundarios relacionados con la salud ósea y ya a principios del siglo XXI comenzaron a publicarse multitud de trabajos en los que quedaba demostrada la asociación del tratamiento con FAEs y el desequilibrio producido en el metabolismo óseo (143–145). Del mismo modo, y a pesar de los esfuerzos empleados en mejorar el perfil de efectos secundarios de cada nuevo FAE, algunos de los fármacos surgidos más recientemente, como la LTG o la OXC también se han relacionado con efectos negativos en la calidad ósea (140).

### **1.3.1. Mecanismos fisiopatológicos de las alteraciones óseas asociados a FAE**

Los factores de riesgo asociados a las alteraciones del metabolismo óseo se presentan en ocasiones en un mismo paciente y como ya se ha descrito previamente incluyen: la edad avanzada, género femenino, salud ósea alterada previa al inicio del tratamiento antiepiléptico, estado nutricional inadecuado, consumo de tóxicos, inactividad física, etc. Se incluye además dentro de los factores de riesgo el tratamiento epiléptico en politerapia, ya que se ha visto que aquellos pacientes en tratamiento con más de un FAE presentan una menor DMO y un aumento del riesgo de fractura de 1.61 respecto a los que únicamente son tratados en monoterapia. Sin embargo, más allá de estos factores de riesgo, y de si el paciente cursa o no con epilepsia, el simple consumo de FAEs aumenta el riesgo entre dos y tres veces de sufrir fracturas óseas en comparación con individuos que no los consumen (147).

Los mecanismos fisiopatológicos conocidos hasta el momento involucrados en la

enfermedad ósea inducida por los FAE incluyen la deficiencia de vitamina D y calcitonina, los bajos niveles de estrógenos y la hiperhomocisteinemia, entre otros (Figura 17).

#### **1.3.1.1. Déficit de vitamina D**

El mecanismo por el cual los FAEs se asocian con enfermedad ósea es aún controvertido, aunque una de las primeras y más aceptadas teorías está relacionada con la vía del Citocromo P450 (CYP450). El CYP450 es un cromóforo celular constituido por una superfamilia de enzimas codificadas por 57 genes diferentes que tiene gran importancia en las rutas metabólicas implicadas en la detoxificación de los fármacos en general y los FAE en particular, y de otras sustancias químicas exógenas. Además, tiene un papel fundamental en procesos metabólicos endógenos como la biosíntesis de ácidos biliares y colesterol, la síntesis de Vitamina D<sub>3</sub>, síntesis de hormonas sexuales o el metabolismo e hidroxilación del ácido retinoico.

FAEs clásicos como la CBZ, PHT o PB se consideran FAEs inductores enzimáticos que presentan capacidad inductora del CYP450 y, por tanto, son responsables de una gran cantidad de alteraciones metabólicas, entre ellas la alteración del metabolismo óseo. Para entender este efecto deletéreo hay que tener claros los componentes que participan en el metabolismo de la vitamina D y sus interacciones.

La vitamina D o Calciferol se obtiene de fuentes y precursores diferentes: la vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) y la vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol). La vitamina D<sub>3</sub> se puede obtener de la dieta (10%) o de la producción endógena (90%) mediante la conversión del 7-dehidrocolesterol a previtamina D<sub>3</sub>, la cual por exposición a rayos ultravioleta del sol sufre un proceso de isomerización no enzimática formando la vitamina D<sub>3</sub>. La vitamina D<sub>2</sub> no se produce en los humanos sino que se obtiene a partir del precursor ergosterol proveniente de las membranas celulares de las plantas y hongos ingeridos en la dieta y después de la exposición a rayos UV. La actividad de la vitamina D<sub>2</sub> es un tercio respecto de la vitamina D<sub>3</sub>.

La vitamina D no es biológicamente activa por lo que debe sufrir una serie de modificaciones enzimáticas para ejercer su función. Estos procesos son llevados a cabo por las enzimas pertenecientes a la superfamilia de la familia de la CYP450. Una vez

formada, la vitamina D es transportada por la proteína plasmática de unión a la vitamina D (DBP; *vitamin D binding protein*) hasta el hígado, lugar en el que se produce la primera hidroxilación en el carbono 25, dando lugar a la 25-hidroxi vitamina D<sub>3</sub> (25OH-D<sub>3</sub>). En este proceso participan varias enzimas del CYP450 siendo la CYP2R1 (25-hidroxilasa) la más importante. La 25OH-D<sub>3</sub> es la principal forma circulante de la Vitamina D<sub>3</sub> y es útil como indicador de los niveles de esta proteína. Una vez formada, es transportada por la DBP hacia el túbulo proximal del riñón, donde por acción de la enzima CYP27B1 (1 $\alpha$ -hidroxilasa) se produce la segunda hidroxilación en el carbono 1 para completar el proceso de activación y dar lugar a la 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>3</sub> (1,25OH-D<sub>3</sub>), que es la forma activa.

El riñón es determinante en la regulación de las acciones de la vitamina D<sub>3</sub> mediante la acción de la enzima CYP24A1 (24-hidroxilasa), que da lugar al metabolito inactivo 24,25-dihidroxi vitamina D<sub>3</sub> a partir de la hidroxilación de la 25OH-D<sub>3</sub>, disminuyendo así la cantidad disponible de ésta para la 1 $\alpha$ -hidroxilación. Además, limita la cantidad de 1,25-OH-D<sub>3</sub> en los tejidos diana mediante su hidroxilación por dos vías: a) la vía C-24, que conduce a la formación de la 1,24,25-trihidroxi D<sub>3</sub>, la cual es rápidamente transformada por esta misma enzima a ácido calcitroico, metabolito inactivo de la vitamina D que es excretado por la orina; b) la vía C-23, que conduce a la formación de la 1, 23, 25-trihidroxi vitamina D<sub>3</sub>, que fácilmente se convierte en 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>3</sub>-23,26-lactona, sin actividad biológica (Figura 16).

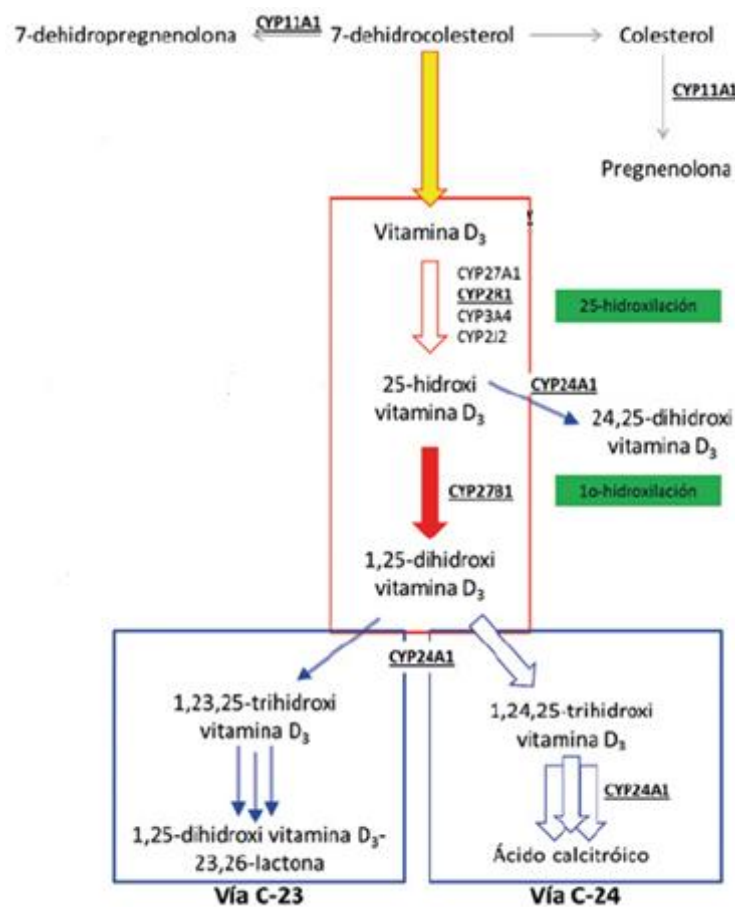
El receptor X de pregnano (PRX), un factor de transcripción de la familia de los receptores nucleares, es activado por los FAE e induce la hiperexpresión de la CYP24A1, hecho que conduce al rápido metabolismo de la forma activa de la vitamina D y que causa disminución de sus niveles y, por tanto, alteraciones en la mineralización de los huesos que dan lugar a la osteomalacia. También se ha establecido que los FAE activan el VDR debido al alto grado de homología que presenta con el PRX. La activación del VDR conduce a la expresión de proteínas en el osteoblasto como RANKL que por interacción con RANK induce la actividad osteoclástica que conlleva el aumento del remodelado óseo (148).

El déficit de vitamina D conduce además a la disminución de los niveles circulantes de calcio y, en compensación, al aumento de los niveles de PTH, dando lugar a un hiperparatiroidismo secundario que afectará también a la salud ósea. Por un lado, la

PTH activa la molécula de RANKL, que se traduce en la activación del osteoclasto y el aumento de la resorción ósea. Además, el PB genera deterioro en la respuesta celular a la PTH lo que favorece el aumento en la concentración de esta hormona, independientemente de los niveles de calcio circulantes (149).

### 1.3.1.2. Déficit de calcitonina

Los FAEs, por mecanismos no suficientemente claros por el momento, generan una disminución de los niveles circulantes de calcitonina relacionados con la pérdida de masa ósea. Parece ser que los FAEs bloquean de forma directa los receptores sensores de calcio de las células C del folículo tiroideo, impidiendo la liberación de calcitonina de manera independiente de los niveles plasmáticos de calcio, lo que conduce a un aumento de los niveles de PTH, que ejerce los efectos a nivel óseos ya mencionados.



**Figura 16.** Metabolismo de la vitamina D y participación de las enzimas CYP450 (150).

### **1.3.1.3. Disminución de los niveles de estrógenos**

En el osteoblasto, la vitamina D<sub>3</sub> aumenta la expresión de aromatasa (CYP3A4), la cual cataliza el paso de esteroides (19 carbonos) a estrógenos (18 carbonos); estos últimos ejercen una acción paracrina y autocrina en el hueso no sólo induciendo la diferenciación de los osteoblastos, sino también inhibiendo la osteoclastogénesis y promoviendo la apoptosis de los osteoclastos. Los FAEs, al generar el déficit de vitamina D, producen la reducción en la expresión de la aromatasa conduciendo a un estado de hipostrogenismo a nivel local; este déficit estrogénico conduce a la pérdida de protección contra moléculas antioxidantes y al aumento en la producción local de IL-7 en el hueso, lo cual desencadena eventos inflamatorios y el aumento de producción de radicales libres, los cuales en su conjunto aumentan los niveles de TNF, producen la liberación de RANKL y, por tanto, la inducción de la osteoclastogénesis (151). Tras un hipostrogenismo detectado, aumentan los niveles de hormona folículo estimulante (FSH), hecho que se relaciona con el aumento de la expresión de TNF, molécula con una importante actividad osteoclastogénica. Además, la hipovitaminosis D se acompaña de un aumento de los niveles de globulinas fijadoras de hormonas sexuales (SHBG) que resulta en la disminución de los esteroides disponibles para la formación de estrógenos, y aumentan los procesos catabólicos de éstos, reduciendo igualmente sus niveles.

### **1.3.1.4. Aumento de los niveles de Homocisteína**

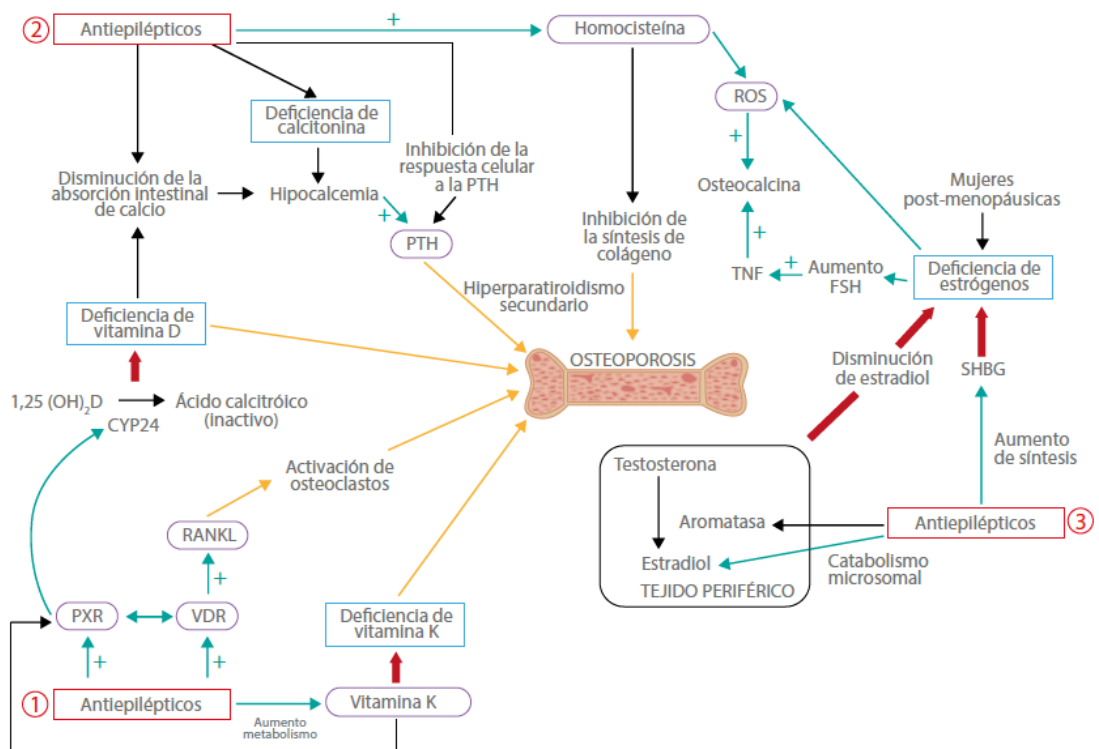
Aunque hasta el momento no estén claros los mecanismos moleculares responsables, parece haber una relación positiva entre el tratamiento con VPA y la disminución niveles de ácido fólico, esencial para el metabolismo de la homocisteína. La hiperhomocisteinemia resultante da lugar a la alteración de los procesos de entrecruzamiento del colágeno durante la mineralización ósea, favoreciendo por tanto la osteoclastogénesis y la producción de radicales libres a nivel local, que interfieren con la DMO (152).

### **1.3.1.5. Déficit de vitamina K**

Aunque la vitamina K es más conocida por sus funciones en el proceso de coagulación, también tiene su importancia en el metabolismo óseo. La vitamina K es necesaria para el proceso de  $\gamma$ -carboxilación de la OC, hecho que permite el correcto

funcionamiento de la misma y, por tanto, fundamental para el proceso de mineralización ósea.

Parece ser que el tratamiento con FAEs interfiere en el metabolismo de la vitamina K reduciendo los niveles de la forma activa de la vitamina, hecho que genera una pobre mineralización de la matriz ósea que se expresa estructuralmente como osteomalacia (149).



**Figura 17.** Fisiopatología de las alteraciones del metabolismo óseo por el tratamiento con FAEs (150).

### 1.3.1.6. Efectos del ácido valproico sobre el metabolismo óseo

Mención aparte se merece el VPA, un FAE ampliamente utilizado cuyo mecanismo de acción es diferente al de CB, PHT o PB al no tener efecto inductor enzimático, es decir, no afecta a la vía del CYP450. A pesar de todo, multitud de estudios han asociado el tratamiento crónico con dicho fármaco con la alteración del metabolismo óseo, conduciendo a una disminución de la DMO y a un aumento del recambio óseo (153) y en última instancia, a un aumento del riesgo de fracturas (154).

A día de hoy, el mecanismo responsable por el cual el tratamiento con VPA se relaciona con la alteración del metabolismo óseo no está del todo claro, pero parece explicarse por una parte por un funcionamiento inapropiado de los osteoblastos y por otra por un aumento de la actividad osteoclástica.

Las histonas deacetilasas (HDACs) son un grupo de enzimas implicadas en la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina tanto de histonas como de proteínas no histonas. Es de sobra conocido que el estado de acetilación de las histonas determina la conformación de la cromatina así como el grado de transcripción genética de cierta región cromosómica. Es decir, la acetilación de histonas juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica. Por otro lado, la función, actividad y estabilidad de ciertas proteínas no histonas puede estar controlada por modificaciones postraduccionales, de las cuales la fosforilación es la más conocida; sin embargo, la acetilación, aunque es un mecanismo menos estudiado, es de gran importancia en este proceso de regulación.

El VPA se engloba dentro de un grupo de compuestos denominados inhibidores de HDACs (HDIs), compuestos que pueden alterar el grado de acetilación de determinadas proteínas, histonas y no histónicas, y así incrementar o reprimir su actividad. En este contexto, el VPA parece regular la expresión de genes que promueven la diferenciación y maduración de osteoblastos, de modo que el efecto negativo que éste tiene sobre el hueso esté relacionado con su actividad de HDI (155). En esta línea se pueden encuadrar también los hallazgos encontrados por *Fuller et al.* Por su función de HDI el VPA también es usado frecuentemente en el tratamiento de pacientes con atrofia muscular espinal (AME). Dichos autores observaron, mediante estudios de proteómica, que en la línea celular con AME en tratamiento con VPA había una reducción llamativa de la cantidad de colágeno tipo I y VI en comparación con la línea celular sin tratamiento, lo cual sugiere que el VPA afecta a la síntesis de ambos. Además, la osteonectina fue una de las proteínas que también se redujeron significativamente tras el tratamiento. La osteonectina, glicoproteína segregada por los osteoblastos, es una de las proteínas no colágenas más importantes de la matriz ósea con un importante papel en el proceso de mineralización (156). Todo esto hace pensar en un mal funcionamiento de los osteoblastos, células responsables tanto de la síntesis de colágeno tipo I como de la osteonectina, responsables de las alteraciones óseas que ocurren en pacientes en tratamiento crónico con VPA.



Otra de las teorías acerca del posible mecanismo fisiopatológico del VPA sobre la salud ósea es la hipocarnitinemia que produce. EL VPA o ácido 2-propil-pentanoico, es un ácido graso ramificado que es metabolizado en su mayor parte (80%) en el hígado mediante glucoronización. El 20% restante se elimina por excreción libre a través de la orina (3%) o a través de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, la misma vía que utilizan los ácidos grasos. Esto significa que el VPA utiliza la misma vía de entrada a la mitocondria que usan los ácidos grasos, la L-carnitina, de modo que interfiere en el proceso (157). Como la L-carnitina es un cofactor importante en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y tiene efectos beneficiosos sobre el hueso, el VPA puede ocasionar la pérdida ósea reduciendo los niveles séricos de L-carnitina (158).

Otra de las hipótesis que se postula pueda explicar el efecto deletéreo del VPA sobre el metabolismo óseo es el aumento de la actividad osteoclástica promovida por éste. Este efecto metabólico se asocia a un estado de hiperparatiroidismo que desencadena toda una serie de procesos metabólicos, entre ellos: 1) promueve la diferenciación de osteoclastos gracias al aumento de los niveles de RANKL sintetizadas por los osteoblastos; 2) inhibe la traducción del ARNm de la OPG con lo que disminuyen los niveles de la misma. Además de esto, el tratamiento con VPA parece que promueve la secreción de IL-18, una IL con actividad antitumoral y proinflamatoria que estimula la síntesis de RANKL de una forma dosis-dependiente, así como la formación de osteoclastos gracias a un *feed-back* positivo con RANKL. En conjunto, todos estos efectos causados por el tratamiento con VPA conducen a la disminución de la DMO (159)

#### **1.3.1.7. Efecto de los FAE de segunda generación sobre el metabolismo óseo**

Los FAE englobados bajo el término FAE de segunda generación, incluidos Lamotrigina (LTG), Oxcarbazepina (OXC), Topiramato (TPM) y Zonisamida (ZNS) son fármacos que surgieron después de haber quedado demostrados los efectos secundarios de los FAE clásicos, de modo que se intentó que presentaran un perfil farmacológico más seguro, mostrando menos interacciones medicamentosas y menos efectos adversos. Sin embargo, con el tiempo se ha demostrado que el tratamiento a largo plazo con la mayoría de ellos también se acompaña de efectos secundarios en cuanto a la salud ósea se refiere.

El parecido estructural de algunos FAE como el TPM o la ZNS, con una fracción de los Inhibidores de la Anhidrasa Carbónica (IAC) explicaría que estos fármacos tengan éste entre sus mecanismos de acción antiepiléptico. Sin embargo, al margen de su acreditada acción anticonvulsivante, la inhibición de la Anhidrasa carbónica (AC) también puede tener otras consecuencias metabólicas, entre ellas, la génesis de una situación de acidosis metabólica que puede manifestarse de forma aguda o crónica. Las manifestaciones clínicas de la acidosis metabólica aguda incluyen hiperventilación, fatiga, anorexia, náuseas, delirio y dolor muscular y articular. La acidosis metabólica crónica tiene su expresión clínica fundamental en la afectación del metabolismo óseo, siendo responsable de osteopenia y osteoporosis. Esto se debe a que dicha enzima está directamente implicada en los procesos de recambio óseo al aportar bicarbonato y protones como metabolitos necesarios en el proceso de resorción ósea. Además, acelera el catabolismo de las proteínas musculares, pudiendo producir atrofia muscular. Por último, los mecanismos de excreción ácida renal son activados en respuesta a la acidosis metabólica crónica, lo cual puede conducir a una situación de insuficiencia renal en pacientes con mala función renal previa así como al desarrollo de nefrocalcinosis y nefrolitiasis. Es importante destacar que el desarrollo de acidosis metabólica durante el tratamiento con TPM o ZNS no es dosis dependiente. Diversos autores han podido demostrar este efecto adverso al demostrar que pacientes en tratamiento con TPM de más de un año muestran un aumento del recambio óseo y unos menores niveles de calcio plasmático aunque sin poder llegar a conocer las consecuencias clínicas (160,161).

Respecto al tratamiento con ZNS, fármaco con el mismo mecanismo de acción que el TPM y por tanto, similares perfiles de efectos secundarios, sí se ha llegado a demostrar que existe una relación con la pérdida de hueso que se explica por una resorción acelerada del mismo acompañada de una inhibición de la síntesis ósea (162).

En cuanto al efecto de la OXC sobre la salud ósea se encuentran en la bibliografía distintos estudios que muestran una disminución de los niveles de vitamina D tras más de un año de tratamiento (163) acompañados en algunos casos de disminución en la DMO (164). Lo que sí parece deducirse de los hallazgos encontrados hasta el momento es que se produce un aumento de la tasa de recambio óseo (165) aunque no siempre acompañado de una menor DMO. Esto nos lleva a pensar que la OXC presenta unos efectos similares a la CB en cuanto al metabolismo óseo se refiere, pudiendo explicarse

esto porque la OXC presente un ligero efecto inductor enzimático o porque ejerza un efecto directo sobre la proliferación de los osteoblastos.

Los pocos estudios publicados acerca del metabolismo óseo en pacientes tratados con LTG demuestran que este fármaco no se asocia a efectos adversos a este nivel cuando se toma en monoterapia, tal y como demostraron *Pack et al* en un grupo de mujeres adultas, sugiriendo por tanto que la LTG presentaba un perfil favorable a nivel del metabolismo óseo. No ocurre lo mismo cuando la LTG se emplea en politerapia asociada a otros fármacos como el VPA, situación que conlleva una menor formación de hueso y, por tanto, una menor DMO (166).

#### **1.3.1.8. Efecto de los FAE de tercera generación sobre el metabolismo óseo**

En los últimos años han llegado al mercado algunos FAEs denominados de tercera generación entre los que se incluyen Levetiracetam (LEV), Lacosamida (LCM) y Acetato de eslicarbazepina (ESL), que a pesar de ser ampliamente utilizados por el momento se tienen pocos datos acerca de su perfil de efectos secundarios.

De entre todos ellos el fármaco sobre el que se han centrado la mayor parte de estudios es el LEV, demostrando en gran parte de ellos que no parece tener efectos nocivos a nivel del metabolismo óseo, al menos en pacientes en tratamiento durante un año (167,168). Otros autores que han estudiado el efecto del LEV en ratas, sin embargo, sí detectan una disminución en los parámetros de fuerza y tasa de formación ósea, como la disminución de los niveles de OC, pero que no se reflejan en una alteración de la masa ósea (169,170). En contra de todos ellos ha sido publicado un estudio reciente en el que *Hakami et al* muestran un efecto perjudicial del tratamiento con LEV sobre el metabolismo óseo, admitiendo que tanto el LEV como el tratamiento con otros fármacos clásicos (CBZ o VPA) conducen a una disminución de la DMO (171). Por todo, es necesario un mayor número de estudios que nos ayuden a comprender el posible efecto del tratamiento a largo plazo con LEV.

En cuanto al efecto de LCM y ESL sobre la salud ósea todavía no han sido apenas publicados estudios al respecto. Únicamente un estudio realizado en ratas orquiectomizadas asumió un mayor riesgo de desarrollar alteraciones óseas tras un tratamiento con LCM acompañado de una disminución significativa de los niveles de PINP, lo cual estaría reflejando una menor tasa de síntesis de hueso (172). Sin embargo,

son necesarios más estudios para confirmar estos hallazgos y poder compararlos con otros FAE.

#### **1.4. GENÉTICA DE LA OSTEOPOROSIS ASOCIADA A PACIENTES EPILÉPTICOS**

Como ya hemos visto hasta ahora, los pacientes epilépticos tienen una mayor probabilidad de sufrir osteopenia u osteoporosis, ya sea por los efectos de la propia enfermedad que conlleva inestabilidad y predispone a caídas, o por los efectos del tratamiento con FAE que suele ser a largo plazo e incluso crónico, cuyos efectos secundarios conducen a una mayor pérdida de masa ósea. Todo esto hace que los pacientes en tratamiento con FAE tengan una probabilidad mayor al resto de población general de sufrir fracturas osteoporóticas. A todo esto se suma el fuerte componente genético que, como ya hemos visto, presenta la osteoporosis por lo que siguiendo esta dirección se ha abierto una nueva línea de investigación que pretende estudiar la asociación de los polimorfismos relacionados con el metabolismo óseo con la mayor predisposición de pacientes en tratamiento con FAE de desarrollar osteoporosis.

De los polimorfismos descritos previamente hay pocos estudios realizados en pacientes epilépticos, y casi todos realizados sobre el gen del VDR. En el año 2011 *Lambrinoudaki et al* publicaron un estudio en el que estudiaban la asociación entre el metabolismo óseo de pacientes epilépticos en tratamiento crónicos con FAE y el polimorfismo BsmI del gen VDR. Estos autores hallaron una asociación entre la presencia del alelo B del gen VDR, especialmente en homocigosis, y la disminución de la DMO a nivel lumbar en un grupo de 73 pacientes bajo tratamiento antiepiléptico, acompañados de niveles disminuidos de vitamina D (173). Unos años más tarde *Phabphal et al* encontraron también asociación entre la presencia de dicho polimorfismo en un grupo de pacientes en tratamiento con PHE y la disminución de la DMO expresada mediante el t y z-score tanto a nivel lumbar como femoral. Igualmente, aquellos pacientes con el polimorfismo BsmI presentaban niveles inferiores de vitamina D que los pacientes con genotipo salvaje (174).

Respecto al resto de polimorfismos asociados a osteoporosis en la población general no se ha descrito asociación ninguna en pacientes en tratamiento antiepiléptico. Por eso, diversos estudios son necesarios para determinar la posible asociación entre ambos.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis del estudio**

La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más frecuentes en la población que afecta a personas de todos los grupos etarios, necesitando más de un tercio de los afectados tratamiento farmacológico de por vida. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que dichos pacientes presentan un riesgo aumentado de sufrir una pérdida de masa ósea acelerada que les conduce al desarrollo de la osteoporosis y, por último, a un mayor riesgo de fracturas en comparación con la población general. Multitud de factores pueden explicar esta mayor predisposición, entre ellos la inactividad física, el envejecimiento, la ingesta dietética inadecuada o insuficiente de nutrientes fundamentales para el metabolismo óseo como el calcio y/o la vitamina D, la exposición reducida al sol, etc... Sin embargo, en las últimas décadas ha quedado demostrado que no solo dichos factores influyen negativamente sobre la salud ósea de estos pacientes, sino que también los propios FAE que se administran para evitar las crisis epilépticas llevan asociados ciertos efectos adversos, alguno de los cuales puede afectar a la salud ósea.

Con el tiempo, y con el objetivo último de potenciar el efecto anticonvulsivo así como de minimizar los efectos adversos indeseados, han ido surgiendo una gran variedad de FAE que actualmente están disponibles en el mercado. Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos invertidos, no todos los nuevos FAE surgidos parecen estar exentos de provocar reacciones desfavorables y siguen surgiendo estudios que así lo demuestran, relacionando el tratamiento con ciertos FAE con una disminución de la DMO y un mayor riesgo de fracturas.

Por otro lado, teniendo en cuenta el fuerte componente genético asociado a la osteoporosis, sería de gran ayuda conocer la predisposición genética de los pacientes epilépticos de sufrir dicha patología ósea y poder identificar con antelación aquellos que de por sí, presentan una mayor tendencia a la pérdida de masa ósea en comparación con la población general, que se estaría agravando con el tratamiento antiepiléptico recibido.

De este modo, conociendo la predisposición genética al desarrollo de la osteoporosis de cada paciente mediante el análisis de determinados polimorfismos relacionados con el metabolismo óseo, y basándose en pruebas objetivas que reflejan la salud ósea como

la densitometría (*gold standard*) y la cuantificación de los marcadores bioquímicos del remodelado óseo, el clínico podría identificar a aquellos pacientes con un mayor riesgo de sufrir patología ósea y en ellos instaurar un tratamiento antirresortivo con el objetivo de evitar la fractura osteoporótica y, por tanto, mejorar la calidad de vida y la morbimortalidad del paciente epiléptico.

## 2.2. Objetivos

El objetivo general del estudio es evaluar el estado óseo de los pacientes epilépticos así como la posible pérdida de masa ósea que puedan sufrir a lo largo del estudio, teniendo en cuenta los polimorfismos óseos estudiados. De esta manera se pretende dar un paso más en la medicina personalizada que tendrá como beneficios la prevención-detección temprana de la osteopenia/osteoporosis en dichos pacientes, la posibilidad de seleccionar el tratamiento antirresortivo y dosificación óptimos para cada paciente, incrementar la adherencia terapéutica, disminuir los efectos adversos y como resultado, incrementar la calidad de vida del paciente y reducir el gasto total de la atención de la salud. Para ello se establecen los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis descriptivo de las características demográficas y clínicas de una población de pacientes epilépticos de la Región de Murcia.
2. Determinar la frecuencia genotípica de los polimorfismos de los genes VDR, ER, CTR y COL1A1 en pacientes epilépticos y compararlas con las frecuencias genotípicas encontradas en la población general y/o en pacientes con otras patologías.
3. Determinar la posible influencia del tratamiento a largo plazo con FAE sobre el metabolismo fosfocálcico, metabolismo lipídico y la función renal de los pacientes del estudio en función del genotipo presentado.
4. Evaluar el estado de la masa ósea al inicio del estudio así como su evolución a lo largo del transcurso del mismo a través de la realización de una densitometría ósea mediante DEXA, calcular el riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX<sup>®</sup> y analizar la correlación de los datos obtenidos con los valores de los marcadores de remodelado óseo y con la presencia/ausencia de los polimorfismos estudiados.



5. Establecer la combinación más adecuada de los marcadores de remodelado óseo y de los SNPs con las variables clínicas para el diagnóstico y seguimiento de la patología ósea en pacientes epilépticos.



### III. MATERIAL Y MÉTODOS



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Se ha llevado a cabo un estudio longitudinal prospectivo en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia, en el que se han incluido 64 pacientes con trastornos epilépticos. La selección de los participantes y su seguimiento se ha realizado en la consulta de Neurología del mismo hospital. Para ello se han establecido una serie de criterios tanto de inclusión como de exclusión, que han permitido seleccionar a los integrantes del grupo de estudio.

##### **3.1.1. Criterios de inclusión**

- Pacientes diagnosticados de epilepsia genética, estructural o desconocida según la clasificación de la ILAE. El diagnóstico se realizó en base a criterios clínicos, apoyados en datos encefalográficos y radiológicos
- Pacientes mayores de edad (>18 años)
- Firma voluntaria del consentimiento informado para participar en el estudio
- Capacidad de seguir el estudio y entender sus procedimientos
- Pacientes en tratamiento con FAE en monoterapia durante más de 12 meses, y sin cambios de dosificación en el último mes. Los FAE incluidos en el estudio son FAE clásicos como Fenitoína (PHT), CBZ (Carbamazepina) y Acido valproico (VPA), y FAE de nueva generación como Levetiracetam (LEV), Lacosamida (LCM) o Acetato de eslicarbazepina (ESL)

##### **3.1.2. Criterios de exclusión**

- Pacientes con antecedentes de tratamiento con fármacos que pueden alterar el metabolismo óseo como: corticoides, bifosfonatos, diuréticos, benzodiazepinas, anticoagulantes orales o calcitonina, y/o tratados con suplementos alimenticios de calcio o vitamina D
- Pacientes previamente diagnosticados de osteoporosis primaria
- Pacientes con alteraciones endocrinas o metabólicas que afectan al metabolismo óseo como enfermedad tiroidea, renal, síndromes de malabsorción, etc...

- Embarazo o lactancia
- Limitación de la actividad física o la movilidad
- Consumo de drogas
- Incapacidad o ausencia de voluntad para aceptar y firmar el consentimiento informado

### **3.1.3. Grupo de estudio**

Aplicando los criterios de inclusión y exclusión citados se han seleccionado un total de 64 pacientes en dos períodos, de Noviembre de 2012 a Marzo de 2013, y de Noviembre de 2013 a Abril de 2014, para asegurar de esta manera unas condiciones de exposición solar homogéneas en la visita inicial. De los 64 pacientes seleccionados, 42 son hombres y 22 mujeres.

## **3.2. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS Y TOMA DE MUESTRAS**

Una vez seleccionados los pacientes se programan dos visitas y una serie de procedimientos a realizar en cada una de ellas, comunes a todos los participantes.

### **❖ 1ª visita o situación basal**

- Recogida de una serie de variables demográficas y clínicas de cada paciente a través de una exhaustiva entrevista personal y realización de historia clínica completa (Anexo I).
- Toma de muestras para estudio de parámetros bioquímicos, tanto básicos como referentes a la salud ósea y genotipado de polimorfismos relacionados con el metabolismo óseo.
- Realización de una densitometría para valorar el estado óseo y a partir de sus datos realizar el cálculo de riesgo de fractura con la herramienta informática FRAX<sup>®</sup>.

### **❖ 2ª visita, a los seis meses**

- Recogida de variables demográficas y clínicas mediante entrevista personal (Anexo I).
- Toma de muestras para estudio de parámetros bioquímicos.
- Realización de densitometría ósea de control y cálculo del riesgo de fractura

mediante la herramienta informática FRAX®.

### 3.2.1. Recogida de datos clínicos

Tanto en la visita basal como en la de control se recogen una serie de datos para la realización de una historia clínica completa que se exponen a continuación:

- Datos demográficos, clínicos y antropométricos
  - Edad (años) y sexo (hombre/mujer)
  - Talla (m) y Peso (kg)
  - Cálculo del Índice de Masa Corporal (IMC) según la fórmula:  $IMC = \text{peso (kg)} / \text{talla}^2 (\text{m}^2) (\text{kg}/\text{m}^2)$
  - Tipo de piel clasificándola según la escala de fototipos de Fitzpatrick

*Tabla 4. Clasificación de la piel según los seis fototipos de Fitzpatrick.*

FOTOTIPO	Características de la piel
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

- Antecedentes personales
  - Hipertensión arterial (Tensión Arterial Sistólica  $\geq 140$  mmHg y/o Tensión Arterial Diastólica  $\geq 90$ mmHg. ): sí/no
  - Diabetes Mellitus: sí/no
  - Dislipemia: sí/no
  - Tabaquismo activo: sí/no. En caso afirmativo, anotar el número de cigarrillos/día
  - Hábito enólico activo: sí/no. En caso afirmativo, anotar unidades de alcohol/día.
  - Enfermedades endocrinas no incluidas en los criterios de exclusión: sí/no
- Antecedentes familiares de osteoporosis: sí/no/desconocido.

- Historia de epilepsia
  - Tiempo desde el diagnóstico de epilepsia (años)
  - Etiología: genética, estructural, desconocida (según la ILAE)
  - Tipo de crisis: generalizadas, focales, convulsiones bilaterales (según la ILAE)
  - Fármaco antiepiléptico actual: PHT, CBZ, VPA, LEV, LCM, ESL.
  - Dosis de FAE (mg)
  - Duración del tratamiento actual (meses)
  - Medicación antiepiléptica anterior: sí/no. En caso afirmativo anotar FAE
  - Número de crisis presentadas (para la 2ª visita)
  
- Medicación concomitante (no recogida entre los criterios de exclusión): hormonas antitiroideas, estatinas, antihipertensivos, otros)
  
- En mujeres, situación hormonal actual: menarquia activa, perimenopausia o postmenopausia.
  
- Actividad física realizada. Para su categorización se emplea la siguiente clasificación:

*Tabla 5. Clasificación de los pacientes en función de la cantidad de ejercicio realizado*

<b>Clasificación</b>	<b>Tipo de ejercicio</b>
<b>I</b>	>1 h diaria o > 3h/día durante 3 días/semana
<b>II</b>	>2 h durante 3 días/semana
<b>III</b>	1-6 h /semana
<b>IV</b>	Esporádico (no más de 1h /semana)
<b>V</b>	No realiza

- Realización de una encuesta nutricional en cada una de las visitas. Dicha encuesta, a modo de formulario, es rellenada por el paciente y recoge los alimentos ingeridos durante los tres días previos a la visita. Posteriormente, los datos aportados se integran en un programa online y son analizados por un nutricionista, obteniendo como resultado una estimación de la cantidad de calcio (mg) y vitamina D ( $\mu\text{g}$ ) ingeridas en la dieta por día.



### 3.2.2. Estudio densitométrico y riesgo de fractura

En los 7-10 días posteriores a la visita, tanto basal como de control, se realiza una densitometría ósea mediante DEXA en un densitómetro *Norland Excell Plus*, intentando emplearse el mismo aparato para cada paciente en las dos visitas para así minimizar las variaciones analíticas implícitas al mismo.

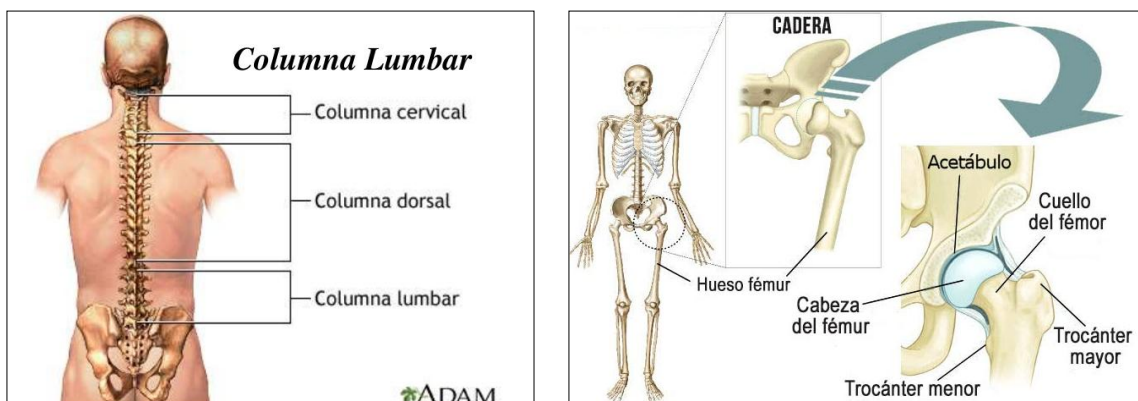
La densitometría se realiza a dos niveles: columna lumbar, con proyección anteroposterior, y cuello femoral izquierdo (Figura 18), expresando la DMO de ambas localizaciones en  $\text{g}/\text{cm}^2$ . Se obtienen los siguientes parámetros:

- DMO lumbar L2-L4 ( $\text{g}/\text{cm}^2$ )
- DMO estandarizada (sDMO) lumbar total (L2-L4) ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ )
- DMO cuello femoral izquierdo ( $\text{g}/\text{cm}^2$ )

Así mismo, se determinan tanto el T-score como el Z-score a ambos niveles, comparando los datos obtenidos de cada paciente con las bases de datos proporcionadas por el fabricante, expresando los resultados en DE.

Una vez obtenidos los datos de DMO se calcula el riesgo de fractura ósea mediante la herramienta informática del FRAX<sup>®</sup>, obteniéndose los siguientes parámetros:

- Riesgo de fractura osteoporótica mayor a 10 años (%) (MO: *major osteoporotic*)
- Riesgo de fractura de cadera a 10 años (%) (HP: *hip fracture*)



**Figura 18.** Localizaciones del esqueleto estudiadas mediante densitometría por DEXA. (ADAM education)

### 3.2.3. Toma de muestras

Tanto en la primera como en la segunda visita se recogen las siguientes muestras:

- Muestra de sangre periférica en tubo seco de 10 ml sin anticoagulante, a partir de la cual y tras la retracción del coagulo, se extrae el suero mediante centrifugación a 3500 rpm/10 minutos. Esta muestra es empleada para el estudio de todos los parámetros bioquímicos, incluyendo los marcadores bioquímicos de remodelado óseo y aquellas que no se procesen en el mismo momento serán alicuotadas y congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  evitando así la posible degradación de los marcadores.
- Muestra de orina de 24 horas recogida en frasco estéril, anotando el dato de la diuresis (volumen de orina en 24h). Estas muestras se centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos y aquellas que no sean procesadas en el momento, serán alicuotadas y congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la determinación de marcadores bioquímicos de remodelado óseo.

Además, en la primera visita se extrae una muestra de sangre total recogida en un tubo de 5 ml con EDTA-K3 (ácido etilendiaminotetraacético tripotásico) como anticoagulante. La muestra se procesa el mismo día de la recogida, y en caso contrario, se mantiene a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento, hasta un máximo de 7 días. A partir de esta muestra se extrae el ácido desoxirribonucleico (ADN) para el posterior estudio de los polimorfismos, el cual será conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Todas las muestras son recogidas y tratadas en las mismas condiciones:

1. Son recogidas entre las 8 y las 10 de la mañana, tras un ayuno de 12 horas, para intentar evitar así la variación circadiana propia de algunos marcadores
2. Son obtenidas mediante punción venosa antecubital
3. En caso de no ser analizadas en el mismo momento de su recogida, serán sometidas a un solo ciclo de congelación-descongelación previo a la determinación de los marcadores
4. Todas las técnicas empleadas son correctamente calibradas y controladas antes de la descongelación de los sueros con el objetivo de asegurar la calidad de los resultados

### 3.3. ESTUDIO BIOQUÍMICO

A partir de la muestra de sangre se realiza un estudio bioquímico básico, en el que se incluyen pruebas de función renal (urea, creatinina) y hepática (GOT, GPT, GGT, ALP), metabolismo lipídico (triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL) así como marcadores de función tiroidea (TSH y T4L) y otros parámetros (glucosa, vitamina B12, Ácido fólico u homocisteína). Además, se realizan determinaciones más específicas del metabolismo fosfo-cálcico (calcio, fósforo, vitamina D y PTH) y marcadores específicos de remodelado óseo.

#### 3.3.1. Parámetros bioquímicos de la función renal

- Creatinina (suero)
- Urea (suero)

**Creatinina en suero (Crea).** Para su determinación cuantitativa se utiliza un método espectrofotométrico realizado en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®), basado en el método de Jaffé. En una solución alcalina, la creatinina forma un complejo amarillo-anaranjado con el picrato. La tasa de formación de colorante es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. La prueba emplea la determinación del blanco para minimizar la interferencia por bilirrubina. Para corregir las reacciones inespecíficas por cromógenos no-creatinina en suero y plasma, como las proteínas y cetonas, los resultados para suero o plasma se corrigen en -0.3 mg/dl.

- Límite de detección: 0,17 mg/dl
- Intervalo de medición: suero/plasma (0,17-24,9 mg/dl)
  - Valores de referencia (población adulta): suero/plasma: mujeres (0.50-0.90 mg/dl), hombres (0.70-1.20 mg/dl).

**Urea en suero.** Se emplea un método enzimático con ureasa y glutamato deshidrogenasa (GLDH) realizado en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). La urea presente en la muestra es hidrolizada por la ureasa a amonio y carbonato. En una segunda reacción, el 2-oxoglutarato reacciona con amonio y la coenzima NADH, en presencia de GLDH, para producir L-glutamato. En esta reacción,

por cada mol de urea hidrolizada se oxidan dos moles de NADH a NAD<sup>+</sup>. La velocidad con que la concentración de NADH disminuye es directamente proporcional a la concentración de urea en la muestra y se mide fotométricamente a una longitud de onda (sub/princ) 700/340 nm.

- Límite de detección: suero/plasma (3,0 mg/dl)
- Intervalo de medición: suero/plasma (3,0-240 mg/dl)
- Valores de referencia (población adulta). suero/plasma (16,6-48,5 mg/dl)

### 3.3.2. Parámetros bioquímicos de función hepática

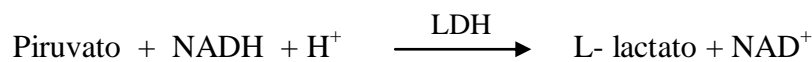
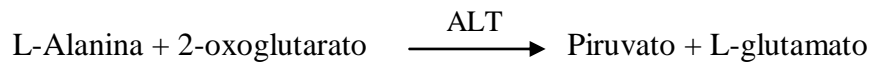
- Aspartato aminotransferasa (AST o GOT)
- Alanino aminotransferasa (ALT o GPT)
- Gamma glutamil transferasa (GGT)
- Fosfatasa alcalina (ALP)

**Aspartato aminotransferasa (GOT).** La GOT presente en la muestra cataliza la transferencia de un grupo amino entre el L-aspartato y 2-oxoglutarato para obtener oxaloacetato y L-glutamato. A continuación, y en presencia de la malato deshidrogenasa (MDH), el oxaloacetato reacciona con NADH para formar NAD<sup>+</sup>. La velocidad de oxidación de NADH es directamente proporcional a la actividad catalítica de la GOT. Se determina midiendo la reducción de la absorbancia. La prueba se realiza en autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®).



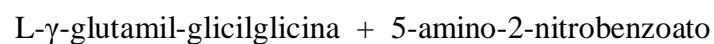
- Límite inferior de detección: 5 U/L
- Intervalo de medición: 5-700 U/L
- Valores de referencia: Hombres hasta 40 U/L  
Mujeres hasta 32 U/L

**Alanino aminotransferasa (ALT).** Prueba realizada en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®) en la cual la ALT cataliza la reacción entre la L-alanina y el 2-oxoglutarato. El piruvato formado es reducido por NADH en una reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH) para formar L-lactato y NAD<sup>+</sup>. La velocidad inicial de oxidación de NADH es directamente proporcional a la actividad catalítica de la ALT. Se determina midiendo la reducción de la absorbancia.



- Límite inferior de detección: 5 U/L
- Intervalo de medición: 5-700 U/L
- Valores de referencia: Hombres hasta 41 U/L  
Mujeres hasta 33 U/L

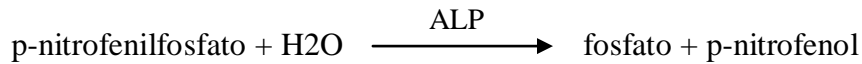
**Gamma glutamil transferasa (GGT).** Reacción enzimática realizada en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®) en la que la  $\gamma$ -glutamilttransferasa transfiere el grupo  $\gamma$ -glutamil de la L- $\gamma$ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida a la glicilglicina. La cantidad de 5-amino-2-nitrobenzoato liberada es proporcional a la actividad de la GGT en la muestra. Se determina por fotometría midiendo el aumento de la absorbancia.



- Límite inferior de detección: 3 U/L
- Intervalo de medición: 3-1.200 U/L
- Valores de referencia: Hombres hasta 60 U/L  
Mujeres hasta 40 U/L

**Fosfatasa alcalina (ALP).** Se emplea una prueba colorimétrica automatizada según un método estandarizado en un autoanalizados Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). En

presencia de iones de magnesio y de cinc, las fosfatasa desdoblan el p-nitrofenilfosfato a fosfato y p-nitrofenol. El p-nitrofenol liberado es directamente proporcional a la actividad catalítica de la ALP. Se determina midiendo el aumento de la absorbancia.



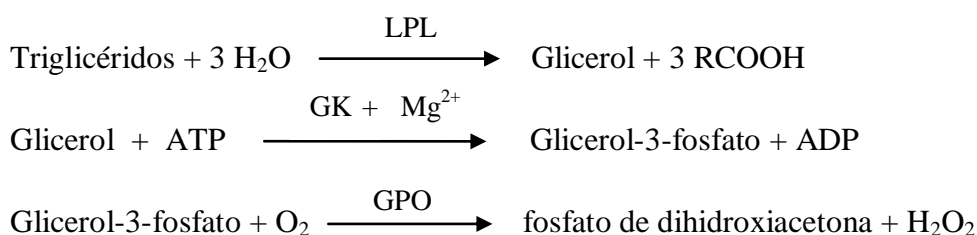
- Límites inferiores de medición: 5 U/L
- Intervalo de medición: 5-1.200 U/L
- Valores de referencia: Hombres 40-130 U/L

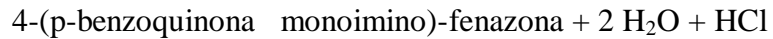
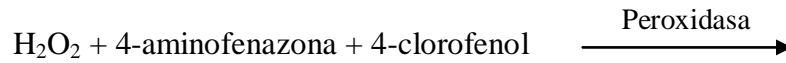
Mujeres 35-105 U/L

### 3.3.3. Parámetros bioquímicos del metabolismo lipídico

- Triglicéridos (suero)
- Colesterol (suero)
- Colesterol HDL (cHDL) (suero)
- Colesterol LDL (cLDL) (suero)

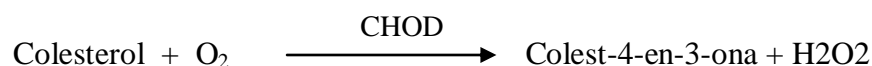
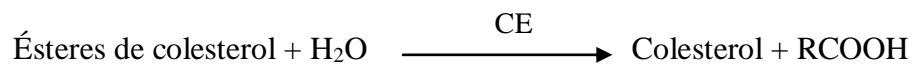
**Triglicéridos en suero:** Se utiliza un test enzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de triglicéridos en suero en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). Se basa en el trabajo de Wahlefeld empleando una lipasa lipoproteica (LPL) obtenida de microorganismos para hidrolizar completa y rápidamente triglicéridos a glicerol, con la oxidación subsiguiente a dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno (en estas reacciones intervienen las enzimas glicerolquinasa (GK) y glicerol fosfato oxidasa (GPO)). El peróxido de hidrógeno formado reacciona bajo la acción catalítica de la peroxidasa con la 4-aminofenazona y 4-clorofenol para formar un colorante rojo en una reacción de punto final. La intensidad cromática del colorante rojo formado es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos y puede medirse fotométricamente a una longitud de onda (sub/princ) 700/505 nm.





- Límite de detección: 8,85 mg/dl
- Intervalo de medición: 8,85-885 mg/dl
- Valores de referencia: < 200 mg/dl

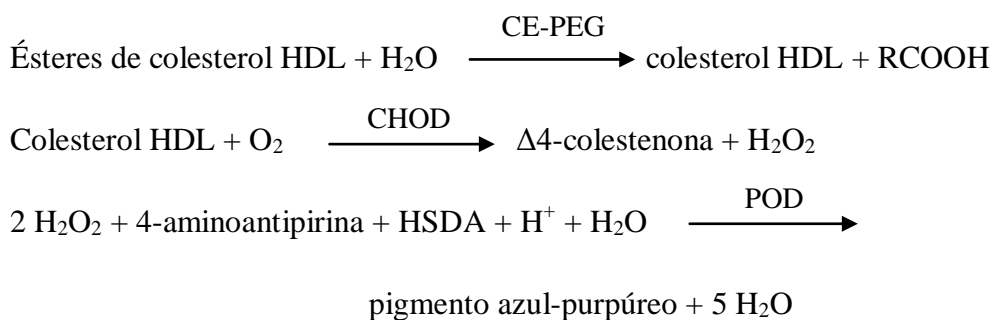
**Colesterol en suero.** Prueba automatizada basada en un método enzimático colorimétrico realizada en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). Los ésteres de colesterol se desdoblan por la acción de la colesterol esterasa (CE) a colesterol libre y ácidos grasos. La colesterol oxidasa (CHOD) cataliza entonces la oxidación de colesterol a colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD), el peróxido de hidrógeno formado produce la unión oxidativa del fenol y la 4-aminofenazona (4-AAP) para formar un colorante rojo de quinona-imina. La intensidad cromática del colorante formado es directamente proporcional a la concentración de colesterol. Se determina midiendo el aumento de la absorbancia a una longitud de onda (sub/princ) 700/505 nm.



- Límite de detección: 3,86 mg/dl
- Intervalo de medición: 3,86-800 mg/dl
- Valores de referencia: < 200 mg/dl

**Colesterol HDL (cHDL) en suero.** Se emplea un test colorimétrico enzimático homogéneo en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). En presencia de iones de magnesio, el sulfato de dextrano forma complejos hidrosolubles, selectivamente con LDL, VLDL y quilomicrones resistentes contra las enzimas modificadas con polietilenglicol (PEG). La concentración del cHDL se determina

enzimáticamente mediante la acción de la CE y la CHOD acopladas con PEG a los grupos amínicos (aproximadamente 40 %). La CE provoca el desdoblamiento de los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos. En presencia de oxígeno, el colesterol es oxidado por la colesterol oxidasa a  $\Delta 4$ -colestenoa y peróxido de hidrógeno. Bajo la acción catalítica de la POD, el peróxido de hidrógeno formado reacciona con 4-aminoantipirina y N-(2-hidroxi-3-sulfopropilo)-3,5-dimetoxianilina sódica (HSDA) para formar un colorante purpúreo azul. La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración de colesterol que se mide fotométricamente a una longitud de onda (sub/princ) 700/600 nm.



- Límite de detección: 3 mg/dl
- Intervalo de medición: 3-120 mg/dl
- Valores de referencia: Hombres >55 mg/dl  
Mujeres >65 mg/dl

**Colesterol LDL (cLDL).** Es un parámetro calculado que se obtiene al aplicar la conocida fórmula de Friedewald, en la que debemos conocer los valores de colesterol total y su fracción cHDL, así como el valor de los triglicéridos. Es por tanto un método indirecto, pero sensible.

$$\text{cLDL (mg/dl)} = \text{Colesterol total} - \text{cHDL} - \text{triglicéridos}/5$$

Se ha estimado que el valor de triglicéridos/5 corresponde a la concentración de VLDL. Sin embargo, en individuos con valores de triglicéridos por encima de 400 mg/dl o que presentan una disbetalipoproteinemia, dicha fórmula no puede ser aplicada ya que el valor de VLDL no correspondería al valor de triglicéridos/5.

- Valores de referencia (adultos): 50-200 mg/dl



### 3.3.4. Parámetros bioquímicos de función tiroidea

- Tirotropina (TSH) (suero)
- Tirotoxina libre (T4L) (suero)

**Tirotropina en suero (TSH).** Se utiliza un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) que se lleva a cabo en un inmunoanalizador Cobas E602 (Roche Diagnostics®). Es una técnica tipo sándwich con tres fases: 1) Incubación de 50 µl de muestra con un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-TSH y un anticuerpo monoclonal específico anti-TSH marcado con quelato de rutenio; las tres moléculas forman un complejo sándwich. 2) Incorporación de micropartículas recubiertas de estreptavidina, de manera que el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina. 3) La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente mediante la adición de un detergente. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

- Límite de detección: 0,005 µUI/ml
- Intervalo de medición: 0,005-100 µUI/ml
- Valores de referencia: 0,270-4,20 µUI/ml

**Tirotoxina libre en suero (T4L).** Se aplica un inmunoensayo ECLIA realizado en un inmunoanalizador Cobas E602 (Roche Diagnostics®). Es un método competitivo en el cual se incuban 15 µL de muestra con un anticuerpo específico anti-T4 marcado con quelato de rutenio. A continuación se añaden T4 marcada con biotina y micropartículas recubiertas de estreptavidina de modo que los puntos de fijación aún libres del anticuerpo marcado se ocupan formando un complejo anticuerpo-hapteno. El complejo total se fija a la fase sólida por la interacción entre la biotina y la estreptavidina. La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se

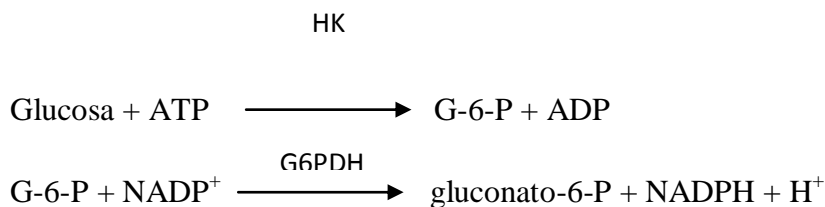
eliminan posteriormente añadiendo un detergente. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

- Límite de detección: 0,023 ng/dl
- Intervalo de medición: 0,023-7.77 ng/dl
- Valores de referencia en eutiroideos: 0,93-1,7 ng/dl

### 3.3.5. Otros parámetros bioquímicos

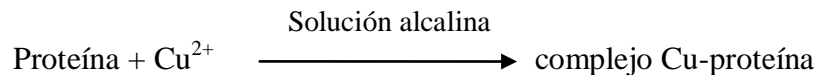
- Glucosa (suero)
- Proteínas totales (suero)
- Vitamina B12 (suero)
- Acido fólico (suero)
- Homocisteína (suero)

**Glucosa en suero.** Se determina utilizando un método enzimático automatizado en el analizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). El test emplea la hexoquinasa (HK), enzima que cataliza la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato por ATP. En una segunda reacción la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) oxida la glucosa-6-fosfato en presencia de NADP a gluconato-6-fosfato. La velocidad de formación de NADPH durante la reacción, es directamente proporcional a la concentración de glucosa y se determina fotométricamente a una longitud de onda (sub/princ) 700/340 nm.



- Límite de detección: 2 mg/dl
- Intervalo de medición: 2-750 mg/dl
- Valores de referencia: 74-106 mg/dl

**Proteínas totales en suero.** Se determinan mediante un test colorimétrico que se realiza en el autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). En solución alcalina, el cobre bivalente reacciona con el enlace peptídico de las proteínas formando el característico complejo biuret purpúreo. Con tartrato sódico-potásico se impide la precipitación de hidróxido de cobre y con yoduro potásico se inhibe la autoreducción del cobre. La intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración de proteína y puede medirse fotométricamente.



**Vitamina B12.** El test para la determinación de vitamina B12 se basa en el principio de competición y emplea el factor intrínseco específico de la vitamina B12. La vitamina B12 de la muestra compete con la vitamina B12 añadida marcada con biotina por los puntos de fijación del complejo del factor intrínseco marcado con rutenio. La técnica se realiza en un Cobas E602 (Roche Diagnostics®) y tiene lugar en diferentes fases: en el primer paso se incuban 15 µl de muestra con los reactivos de pretratamiento para la vitamina B12 (detergentes), de modo que se libera la vitamina B12 fijada. A continuación, se incuba la muestra pretratada con la proteína de fijación del factor intrínseco marcada con rutenio, de manera que se forma un complejo entre la vitamina B12 y la proteína de fijación, cuya cantidad depende de la concentración de analito de la muestra. En el tercer paso, al añadir micropartículas recubiertas de estreptavidina y vitamina B12 marcada con biotina, se ocupan los puntos de fijación aún vacantes del factor intrínseco marcado con rutenio formando un complejo biotinilado de factor intrínseco marcado con rutenio y vitamina B12. El complejo total se fija a la fase sólida por la interacción entre la biotina y la estreptavidina. Finalmente, la mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente mediante la adición de un detergente. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

- Límites de detección: 30 pg/ml

- Intervalo de medición: 30-2000 pg/mL
- Valores de referencia: 191-663 pg/ml

**Ácido fólico en suero.** Al igual que la vitamina B12 la determinación de ácido fólico en suero se basa en un ensayo competitivo que se realiza en un Cobas E602 (Roche Diagnostics®). El test utiliza proteínas fijadoras naturales específicas del folato de modo que el folato de la muestra compite con el folato biotinilado añadido por ocupar los puntos de fijación de la proteína fijadora específica del folato marcada con rutenio. La reacción tiene lugar en diferentes etapas: 1) la muestra (25 µl) se incuban con los reactivos de pretratamiento de folato para liberar el folato de las proteínas de fijación; 2) Incubación de la muestra pretratada con la proteína de fijación del folato marcada con rutenio de manera que se forma un complejo de folato, cuya cantidad depende de la concentración de analito en la muestra; 3) Tras añadir micropartículas recubiertas de estreptavidina y folato biotinilado se ocupan los puntos de fijación aún libres de la proteína de fijación del folato marcada con rutenio formándose un complejo de folato marcado con rutenio y biotina. El complejo total se fija a la fase sólida por la interacción entre la biotina y la estreptavidina; 4) La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con un detergente. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

- Límite de detección: 0,640 ng/mL
- Intervalo de medición: 0,640-20,0 ng/mL
- Valores de referencia: Hombres 4,6-18,7 ng/ml  
Mujeres 5,3-19,3 ng/ml

**Homocisteína.** La homocisteína de la muestra es reducida a homocisteína libre y, posteriormente, transformada a S-adenosil-homocisteína (SAH). La S-adenosil-cisteína (SAC) conjugada añadida al comienzo de la reacción, compite con la SAH de la muestra en la unión a los anticuerpos Anti-SAH unidos a partículas de poliestireno. En presencia de SAH o no hay agregación o sólo hay una agregación muy débil de

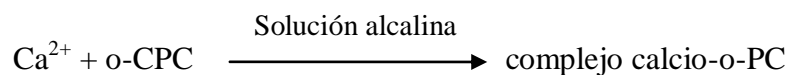
partículas. En ausencia de SAH tiene lugar la agregación de las partículas de poliestireno por medio de la SAC conjugada. Cuanto más alto es la concentración de SAH en la mezcla de reacción, más pequeña va a ser la señal de la luz dispersada. El ensayo se realiza en un Nefelómetro BN ProSpec System (Siemens Healthineers®).

- Límite de detección: 2 µmol/L
- Intervalo de medición: 2-64 µmol/L
- Valores de referencia: hasta los 60 años: 5-15 µmol/L  
Mayores de 60 años: 5-20 µmol/L

### 3.3.6. Parámetros bioquímicos del metabolismo fosfo-cálcico

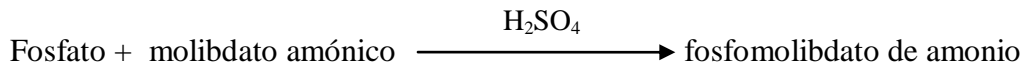
- Calcio (suero y orina)
- Fósforo (suero y orina)
- PTH (suero)
- 25-OH vitamina D (suero)

**Calcio en suero y en orina.** La cuantificación de calcio, tanto en suero como en orina, se realiza en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®), empleando un método espectrofotométrico. En condiciones alcalinas, los iones de calcio reaccionan con la o-cresolftaleína complexona (o-CPC) formando un complejo de color violeta. La adición de 8-hidroxiquinolina previene interferencias debido al magnesio y al hierro. La intensidad cromática del complejo formado es directamente proporcional a la concentración de calcio y se mide por fotometría a una longitud de onda (sub/princ) 376/340 nm.



- Límite de detección: 0,4 mg/dl (suero); 0,6 mg/dl (orina)
- Intervalo de medición: 0,4-20,0 mg/dl (suero); 0,6-30 mg/dl (orina)
- Valores de referencia (adultos): 8.6-10.2 mg/dl (suero); 6,8-21,3 mg/dl (orina)

**Fósforo en suero y orina.** Para la cuantificación de fósforo se emplea un método espectrofotométrico realizado en un autoanalizador Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). En presencia de ácido sulfúrico, el fósforo inorgánico forma un complejo de fosfomolibdato de amonio con el molibdato de amonio que se expresa con la fórmula  $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$ . La concentración del fosfomolibdato formado es directamente proporcional a la concentración de fosfato inorgánico y se mide fotométricamente a una longitud de onda (sub/princ) 700/340 nm.



- Límite de detección: 0,31 mg/dl (suero); 3,4 mg/dl (orina)
- Intervalo de medición: 0,31-20,0 mg/dl y orina (3,4-285 mg/dl)
- Valores de referencia (adultos): 2,5-4,5 mg/dl (suero); 40-136 mg/dl (orina)

**25OH vitamina D en suero.** Se cuantifica mediante un inmunoensayo ECLIA (kit de Diasorin®) realizado en un autoanalizador Liaison®. En el test un anticuerpo específico para la vitamina D recubre las partículas magnéticas (fase sólida) y la vitamina D es conjugada con un derivado de isoluminol. Durante la fase de incubación, la 25OH-vitamina D de la muestra compite por los sitios de unión del anticuerpo con la vitamina D marcada y tras esta fase de incubación, el material no unido se elimina mediante un ciclo de lavado. A continuación, mediante la adición de los reactivos Starter, comienza una reacción de quimioluminiscencia instantánea. La señal luminosa, que un fotomultiplicador mide en unidades relativas de luz (RLU), es inversamente proporcional a la concentración de 25-OH-D presente en la muestra.

- Límite de detección: 4,0 ng/ml
- Intervalo de medición: 4,0 - 150 ng/ml
- Valores de referencia (adultos): Deficiencia: 0-10 ng/ml  
Insuficiencia: 10-30 ng/ml  
Suficiencia: 30-100 ng/m  
Toxicidad >100 ng/ml

**Hormona paratiroidea en suero (PTH).** La cuantificación de la PTH en suero se lleva a cabo en un autoanalizador de Liaison® utilizando un test de Diasorin® que emplea la técnica de radioinmunoensayo (RIA). En el test se utiliza un anticuerpo

vacuno contra la secuencia 65-84 de la PTH humana y un trazador que aumenta la sensibilidad de la técnica. La muestra y el primer anticuerpo se incuban durante 16-24 horas (opción A) o 4 horas (opción B) a 2-8°C. Después se agrega el trazador, seguido de una segunda incubación durante 16-24 horas a 2-8°C. La separación se logra mediante el uso de un anticuerpo doble pre-precipitado que se acelera con una solución de polietilenglicol. Este anticuerpo se añade como un solo reactivo con una incubación posterior de dos horas. El cálculo de resultados se realiza a través de una curva de calibración que relaciona el grado de unión con las concentraciones logarítmicas indicadas en los calibradores empleados.

- Límite de detección: 0,1 pg/ml
- Rango de referencia (adultos): 15-65 pg/ml

### 3.3.7. Parámetros bioquímicos de remodelado óseo

#### 3.3.7.1. Parámetros de formación

- Fosfatasa alcalina ósea (suero)
- Osteocalcina (OC) (suero)
- Propéptido Amino-terminal del procolágeno tipo I (P1NP) (suero)

**Fosfatasa alcalina ósea (ALPo).** Para la cuantificación de la ALPo se utiliza el ensayo Liaison<sup>®</sup> BAP OSTASE<sup>®</sup> de Diasorin que consiste en un inmunoensayo por quimioluminiscencia de tipo sandwich que emplea dos anticuerpos monoclonales de ratón purificados para capturar y detectar la ALPo. La muestra se incuba con partículas paramagnéticas recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-ALPo y tras esto se añade un segundo anticuerpomonoclonal conjugado con isoluminol, dejando incubar 1 mezcla brevemente. Tras la incubación se realiza un lavado para eliminar el material libre y se añaden unos reactivos iniciadores que hacen que comience la reacción quimioluminiscente. La señal luminosa se mide en unidades lumínicas relativas (RLU) en un fotomultiplicador, la cual será proporcional a la concentración de ALPo presente en la muestra.

- Límite de detección: 1,5 µg/l

- Intervalo de medición: 1,5 - 120 µg/l
- Valores de referencia: 5,5 – 24,6 µg/l

**Osteocalcina en suero (OC).** Para su cuantificación se emplea un inmunoensayo ECLIA que se lleva a cabo en el autoanalizador Cobas411 (Roche Diagnostics®) y que emplea anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra los epítomos del fragmento N-MID y del fragmento N-terminal de la molécula de OC. El fragmento N-MID de la OC es el fragmento N-terminal de la molécula que comprende los aminoácidos 1-43, fragmento mucho más estable que el fragmento C-terminal (aminoácidos 43-49) e incluso que la OC intacta (aminoácidos 1-49). Como hemos dicho, el test empleado para la cuantificación de la OC en suero usa anticuerpos dirigidos contra el fragmento N-MID asegurándonos de esta manera la detección del fragmento estable de la OC como la OC intacta. El ensayo es un ensayo tipo sándwich en el que la muestra es incubada primeramente con un anticuerpo monoclonal biotinilado específico contra la OC N-MID y un anticuerpo monoclonal específico anti N-MID marcado con quelato de rutenio, dando lugar a un complejo sándwich. A continuación se incorporan partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina de modo que el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina. La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo y los elementos no fijados se eliminan tras la adición de un detergente. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador.

- Límite de detección: < 0,500 ng/ml
- Intervalo de medición: 0,500-300 ng/ml
- Valores de referencia:
  - Hombres: 18-29 años: 24-70 ng/ml  
51-70 años: 14-42 ng/ml  
70 años: 14-46 ng/ml
  - Mujeres: Premenopausia (>20 años) 11-43 ng/ml  
Postmenopausia: 15-46 ng/ml  
Pacientes con osteoporosis: 13-48 ng/ml



**Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I en suero (P1NP).** La determinación cuantitativa del PINP en suero se realiza mediante un inmunoensayo de ECLIA en un autoanalizador Cobas E411 (Roche Diagnostics®). El test Elecsys P1NP detecta tanto la estructura trimérica como la monomérica, por lo tanto se considera un análisis del P1NP total. El test utiliza una técnica tipo sandwich en la que, durante una primera etapa, se incuba la muestra con un anticuerpo biotinilado monoclonal específico anti-P1NP. A continuación se añaden micropartículas marcadas con estreptavidina y un anticuerpo monoclonal anti-P1NP marcado con quelato de rutenio dando lugar a la formación de un complejo tipo sándwich que se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina. La mezcla de reacción es trasladada entonces a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo y los elementos no fijados se eliminan tras la adición de un detergente. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster.

- Límite de detección: 5ng/ml
- Intervalo de medición: 5-1200 ng/ml
- Valores de referencia: Hombres: 11,4 - 80,6 ng/ml  
Mujeres premenopáusicas: 4,5 - 55,7 ng/ml  
Mujeres postmenopáusicas: 19,6 - 61,2 ng/ml

### 3.3.7.2. Parámetros de resorción

- Beta-CrossLaps ( $\beta$ -CTX) (suero)
- Telopéptido N-terminal del colágeno tipo I (NTX) (suero)

**Beta-CrossLaps ( $\beta$ -CTX).** Determinación cuantitativa de la concentración de Beta-CrossLaps mediante un inmunoensayo de ECLIA en un autoanalizador Cobas E411 (Roche Diagnostics®). Es una técnica tipo sandwich en la que la especificidad del test está garantizada por la utilización de dos anticuerpos monoclonales que reconocen los octapéptidos lineares  $\beta$ -8AA (EKAHD- $\beta$ -GGR). El test Elecsys  $\beta$ -CrossLaps/serum cuantifica así todos los fragmentos de la degradación del colágeno de tipo I que

contienen el octapéptido  $\beta$ -8AA isomerizado ( $\beta$ -CTX) por partida doble. La técnica conlleva diferentes fases: 1) Incubación de la muestra con un anticuerpo monoclonal anti  $\beta$ -CrossLaps biotinilado, liberándose de los componentes séricos el antígeno de la muestra. 2) Adición de un anticuerpo específico monoclonal anti  $\beta$ -CrossLaps marcado con quelato de rutenio, dando lugar a la formación de un complejo sandwich que, con ayuda de micropartículas recubiertas de estreptavidina, se fija a la fase sólida por la interacción de la biotina y la estreptavidina. 3) La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo y los elementos no fijados se eliminan posteriormente con un detergente. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster.

- Límite de detección: 0,01 ng/ml
- Intervalo de medición: 0,010-6,00 ng/ml
- Valores de referencia: Hombres: 0-0.30 ng/ml

Mujeres premenopáusicas (>20 años): 0 - 0,30 ng/ml

Mujeres postmenopáusicas: 0 - 0,56 ng/ml

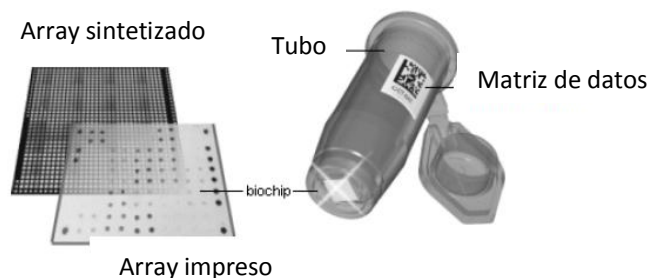
**Telopéptido N-terminal del colágeno tipo I (NTX) en suero.** Se cuantifica utilizando un kit de Osteomark<sup>®</sup> de Alere<sup>®</sup> en un autoanalizador DS2 (Dynex Technologies<sup>®</sup>). Osteomark<sup>®</sup> es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de inhibición competitivas que utiliza micropocillos como fase sólida, en la cual se ha adsorbido NTX. El NTX de la muestra compete con el NTX de la fase sólida por los sitios de unión a un anticuerpo monoclonal anti-NTX marcado con peroxidasa de rábano. Tras un ciclo de lavado, la cantidad de anticuerpo marcado unido se cuantifica colorimétricamente añadiendo sustrato de la peroxidasa. Por tanto, la cantidad de anticuerpos ligados a la fase sólida es inversamente proporcional a la cantidad de NTX en la muestra. La cuantificación de la concentración de NTX de la muestra se determina espectrofotométricamente (450nm) y se calcula en base a una curva de calibración estándar. Los valores se expresan como nanomoles equivalentes de colágeno óseo por litro (nM BCE).

- Límite de detección: 3,2 nM BCE
- Intervalo de medición: 3,2 – 40,0 nM BCE
- Valores de referencia: Hombres: 5,4 – 24,2 nM BCE  
Mujeres: 6,2 – 19,0 nM BCE

### 3.4. ESTUDIO GENÉTICO DE POLIMORFISMOS

Para el diagnóstico *in vitro* de los polimorfismos relacionados con el metabolismo óseo se emplea un kit comercial (CLART<sup>®</sup> 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 para cada gen. Este método tiene como ventajas una alta sensibilidad, que permite la detección del polimorfismo a partir de cantidades mínimas de material genómico humano, y una alta especificidad, ya que utiliza una secuencia correspondiente a una región genómica determinada y sondas de captura específicas para cada uno de los genes implicados.

El estudio se lleva a cabo mediante la amplificación simultánea de 5 regiones del genoma, cada una de ellas de 150-250 pares de bases (pb), que contienen los 6 SNPs de interés. La detección del producto amplificado por PCR se lleva 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 de cada SNP conlleva un mínimo de tres sondas que detectarán la presencia de dos variantes posibles, y una zona común del gen.



**Figura 19.** Esquema de la plataforma AT. El microarray tiene unas dimensiones de 3x3 mm

La posible interferencia en los resultados por la aparición de falsos negativos se elimina debido a que el kit detecta la presencia de cada una de las cinco regiones amplificadas mediante una sonda específica, situada en una zona diferente a la que contiene el SNP, de manera que la presencia de dicha zona concreta sirve de control de la reacción de amplificación y de control de calidad de la muestra.

El flujo de trabajo para el estudio de los polimorfismos conlleva cinco etapas sucesivas: extracción y purificación del ADN genómico, amplificación del ADN mediante PCR, hibridación de los productos amplificados, lectura del array en el lector de tubos AT e interpretación de los resultados mediante un software específico. Los polimorfismos que mediante esta técnica se van a estudiar son los siguientes:

- Gen del Colageno tipo 1 (COL1A1): SNP COL1A1-SPI: Genotipos SS, Ss, ss.
- Gen del receptor de vitamina D (VDR): SNP VDR-BsmI: Genotipos BB, Bb, bb.
- Gen del receptor de vitamina D (VDR): SNP VDR-FokI: Genotipos FF, Ff, ff
- Gen del receptor de calcitonina (CTR): SNP CTR-AluI: Genotipos AA, Aa, aa
- Gen del receptor de estrógenos (ER): SNP ESR1-PvuII: Genotipos PP, Pp, pp
- Gen del receptor de estrógenos (ER): SNP ESR1-XbaI: Genotipos XX, Xx, xx.

### **3.4.1. Extracción y purificación del ADN**

Para la extracción de ADN se parte del tubo de sangre total con EDTA-K3 extraído durante la primera visita y se emplea el kit comercial Blood DNA Purification Kit para Maxwell<sup>®</sup> 16 Clinical Instrument de Promega<sup>®</sup>. Los pasos seguidos durante el proceso son los siguientes:

1. Lisis de la muestra (400µl) en presencia de un agente caotrópico y detergente
2. Unión de los ácidos nucleicos a partículas de sílice magnetizadas
3. Lavado de las partículas separándolas del resto de componentes celulares
4. Recogida de los ácidos nucleicos en un tampón de elución

Una vez extraído el ADN se determina su concentración y pureza mediante espectrofotometría. La concentración del ADN purificado debe medirse por absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) y la pureza confirmase midiendo la proporción entre la absorbancia a 260 y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), empleando en ambos casos el equipo de Thermo Scientific,

Nanodrop 1000.

- $A_{260}$ : 0,1-0,5 Indica una buena reproducibilidad
- $A_{260/280}$ : 1,7-2,0 refleja que no hay contaminación con proteínas

La concentración mínima recomendada de obtención de ADN tras la extracción y purificación es de 40 ng/ $\mu$ l. Del volumen total obtenido se emplean 5 $\mu$ l para la el proceso de amplificación y el resto se almacenan a -20°C hasta el momento de su análisis.

### 3.4.2. Amplificación del ADN

Se lleva a cabo mediante la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para lo cual se emplean tubos de reacción que ya incluyen todos los elementos necesarios: primers o cebadores específicos, cloruro magnésico ( $MgCl_2$ ), una mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTPs), buffer o tampón y ADN polimerasa. Se añaden 5 $\mu$ l del ADN amplificado (se recomienda que haya una concentración total aproximada de 200 ng) y tras resuspender bien la mezcla se introducen los tubos en el termociclador, el cual ya tendrá configurado el programa adecuado, con las temperaturas y tiempos de cada ciclo (Tabla 6).

*Tabla 6. Programa específico del termociclador para la amplificación del ADN.*

	Desnaturalización	Procesado			Enfriamiento
Nº de ciclos	1	40			1
Temperatura (°C)	95	95	55	72	60
Tiempo (hh:mm:ss)	0:12:00	00:00:30	00:00:40	00:01:00	00:30:00

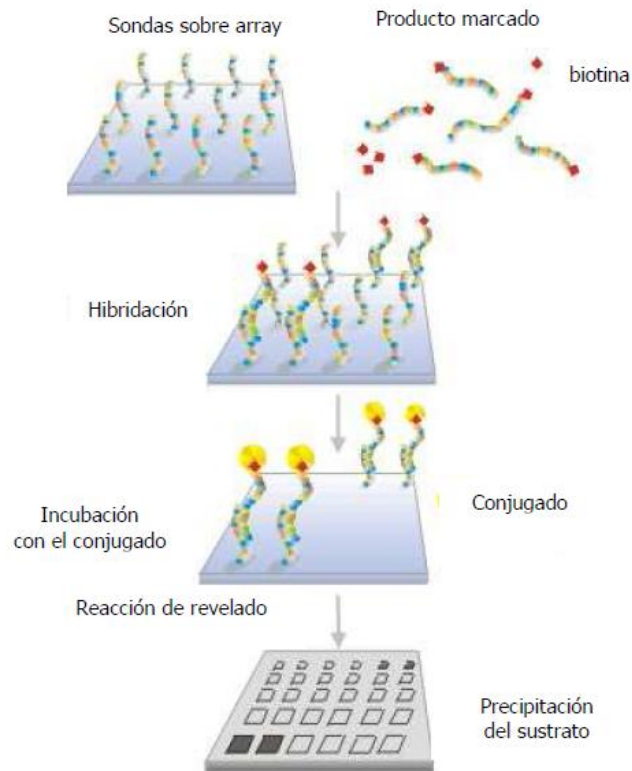
Una característica de este proceso es que durante el mismo los productos amplificados se marcan con biotina, aspecto importante en el procesamiento posterior de las muestras. Una vez terminada la amplificación, las muestras se guardan a -20°C hasta el momento en que vayan a ser procesadas.

### 3.4.3. Hibridación y visualización del ADN

Se basa en la precipitación de un producto insoluble en aquellas zonas del tubo AT en las que se produce la captura específica del producto amplificado. El proceso consiste en lo siguiente (figura 20):

- Tras la amplificación, los fragmentos de ADN marcados con biotina hibridan con sus respectivas sondas específicas inmovilizadas en zonas concretas y conocidas del array.
- A continuación, se incuba con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa, de manera que dicho conjugado se une a través de la estreptavidina a la biotina presente en los productos amplificados, que a su vez se encuentran unidos a las sondas específicas.
- En presencia del sustrato o-Dianisidina, la actividad peroxidasa del conjugado provoca la formación de un producto insoluble que aparece, únicamente, en las zonas del array en las que ha tenido lugar la hibridación.

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 haber obtenido una cantidad insuficiente o por producirse la degradación del ADN debida a una inadecuada conservación), o bien a la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en las muestras, como la hemoglobina. Con el kit empleado (CLART® MetaBone) se eliminan 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.



*Figura 20. Esquema del proceso de hibridación y visualización.*

#### 3.4.4. Lectura de los resultados

El procesamiento de los resultados obtenidos a partir de cada uno de los arrays se realiza de forma automática en un lector de tubos AT (Clondiag Chip Technologies GmbH), y la interpretación de los mismos se lleva a cabo a través de un Software específico para CLART<sup>®</sup> MetaBone (Tabla 7).

Tabla 7. Datos ofrecidos por el lector de tubos AT

Gen/SNP	Resultado	Controles
Receptor Vitamina D VDR-BsmI	<b>BB/bb/Bb</b>	Conforme/No conforme
Receptor de estrógenos ESR1-PvuII	<b>PP/pp/Pp</b>	Conforme/No conforme
Receptor Vitamina D VDR-FokI	<b>FF/ff/Ff</b>	Conforme/No conforme
Receptor de calcitonina CTR-AluI	<b>AA/aa/Aa</b>	Conforme/No conforme
Receptor de estrógenos ESR1-XbaI	<b>XX/xx/Xx</b>	Conforme/No conforme
Colágeno tipo I COL1A1-Sp1	<b>SS/ss/Ss</b>	Conforme/No conforme

### 3.5. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis estadístico de los resultados ha sido necesario procesarlos en una base de datos de Microsoft Excel y, posteriormente, exportarlos al programa estadístico SPSS para Windows, versión 15.0 (Chicago, Illinois, USA).

Para comprobar la distribución Normal de las variables se ha aplicado la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*. En aquellas que no seguían esta distribución se aplicarán test no paramétricos mientras que en las variables normales se aplicarán test paramétricos.

Se analizan las distintas variables de estudio mediante el cálculo de estadísticos descriptivos básicos. Las variables normales se expresan mediante la media y desviación típica, mientras que las que no siguen una distribución normal se expresan mediante la mediana y el rango intercuartílico. Así mismo, las variables de tipo cualitativo se expresan mediante frecuencias, expresadas en porcentaje (%).

La comparación de las frecuencias genotípicas obtenidas en nuestro grupo de estudio así como la comparación de los datos obtenidos en nuestra población respecto a los datos de otras poblaciones consideradas de referencia se ha realizado mediante el test *Chi cuadrado* ( $\chi^2$ ).

El estudio comparativo entre las concentraciones de distintas magnitudes



bioquímicas, ya sean parámetros bioquímicos básicos como marcadores bioquímicos de remodelado óseo, y los datos obtenidos en las densitometrías a lo largo de los meses del estudio se realiza mediante un test *T de Student* para datos apareados. Asimismo se ha aplicado un test *T de Student* para comparar las concentraciones de dichos parámetros bioquímicos entre pacientes bajo tratamiento con FAE clásicos vs FAE de nueva generación o FAE inductores enzimáticos vs FAE no inductores enzimáticos.

El efecto del genotipo para los distintos polimorfismos analizados sobre los parámetros bioquímicos estudiados (parámetros del metabolismo lipídico y metabolismo fosfocálcico, parámetros que reflejan función renal así como parámetros bioquímicos del remodelado óseo) se realiza mediante un análisis de la varianza (ANOVA).

Los datos de riesgo de fractura a diez años obtenidos a través de la aplicación informática FRAX<sup>®</sup> no siguen una distribución Normal por lo que el estudio comparativo de los datos del FRAX<sup>®</sup> entre hombres y mujeres y entre pacientes bajo tratamiento con distintos FAE se lleva a cabo mediante el test no paramétrico *U de Mann Whitney*. Para estudiar la evolución temporal de los datos del FRAX<sup>®</sup> a lo largo del estudio se aplica un test de *Wilcoxon*.

Se ha realizado un estudio de correlaciones para estudiar la relación de las variables continuas entre sí, aplicando el coeficiente de correlación de *Pearson* o *Spearman*, según siguieran o no una distribución Normal.

Además, se ha llevado a cabo un análisis de regresión logística binaria, considerando como variable dependiente el diagnóstico de osteopenia/osteoporosis y como covariables o variables independientes diversos factores clínicos de riesgo o relacionados con la epilepsia así como diferentes biomarcadores. Inicialmente se realiza un análisis univariado de regresión logística en el que se estudian las diferentes covariables y, aquellas en las que se obtiene una  $p < 0,15$  son incluidas en un análisis multivariado. De esta manera se pretende obtener un modelo matemático que sea capaz de predecir el riesgo de desarrollar patología ósea con el menor número de variables sin compromiso del rendimiento diagnóstico. Asimismo se ha calculado el índice de discriminación integrado (IDI) para cada modelo así como la *Odds Ratio* y su intervalo de confianza. El IDI se define como la diferencia de las medias de las probabilidades del evento (en nuestro caso, patología ósea), estimada por los diferentes modelos en los

pacientes que hacen el evento (pacientes que tienen patología ósea), menos la misma diferencia en aquellos que no hacen el evento. Representa lo que mejora el nuevo modelo diagnóstico obtenido en cuanto a la predicción de nuevos eventos, descontando lo que empeora por la predicción de falsos eventos.

En todos los casos, el nivel de significación estadística utilizado en los contrastes de hipótesis fue de  $p < 0,05$ .

### **3.6. CONFIDENCIALIDAD DEL ESTUDIO**

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Anexo II).

Todos los pacientes seleccionados para el estudio han sido informados de forma detallada sobre los procedimientos a seguir durante el mismo, así como de los potenciales riesgos y beneficios que de él se extrajeran.

Cada uno de los pacientes ha sido codificado mediante una numeración específica a la cual únicamente han tenido acceso los participantes del estudio, tanto del Servicio de Neurología como del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia, asegurando de esta manera la confidencialidad del estudio.

## IV. RESULTADOS



## 4. RESULTADOS

### 4.1. OBJETIVO 1: Análisis descriptivo de las características demográficas y clínicas de una población de pacientes epilépticos de la Región de Murcia.

Se ha llevado a cabo un estudio prospectivo en una población formada por 64 pacientes epilépticos (42 hombres, 22 mujeres) en tratamiento crónico con FAE durante más de 12 meses y en seguimiento por la Unidad de Epilepsia del Servicio de Neurología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia.

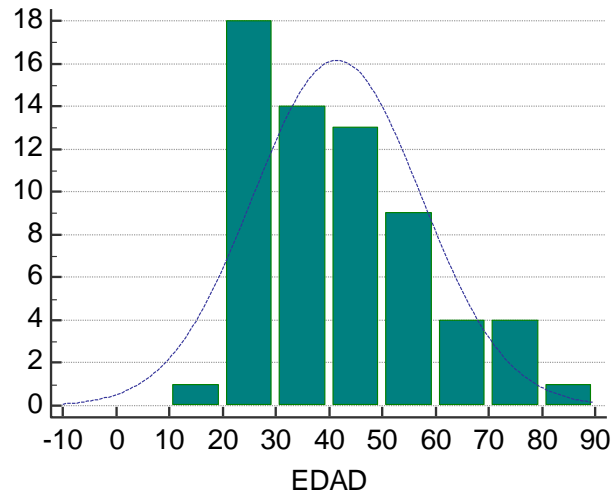
Las características generales de los pacientes, en función del sexo, se muestran en la siguiente tabla (Tabla 8), expresándose como Media y DT por seguir una distribución Normal.

*Tabla 8. Características generales del grupo de estudio, en función del sexo.*

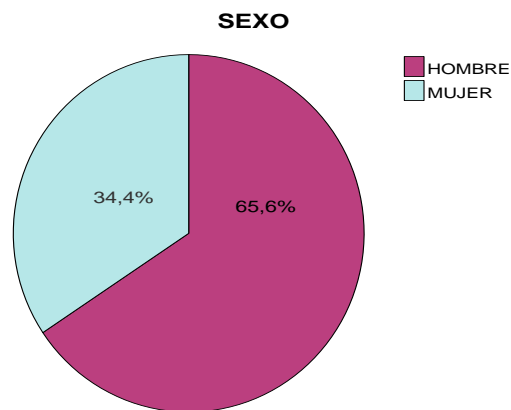
	<b>Características</b>	<b>Media ± DT</b>	<b>Mín-Máx</b>
<b>Hombres (n = 42)</b>	<b>Edad (años)</b>	40,45 ± 16,32	19-82
	<b>IMC</b>	27,49 ± 4,24	19,45-37,18
<b>Mujeres (n = 22)</b>	<b>Edad (años)</b>	43,64 ± 14,91	22-72
	<b>IMC</b>	26,22 ± 6,77	18,75-45,23

La media de edad del grupo ha sido de 41,55 años siendo discretamente mayores las mujeres que participaron en el estudio, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Aunque las edades de los participantes fueron entre 19 y 82 años, la mayor proporción de participantes rondaron los 20-50 años, tal y como puede verse en la Figura 21.

En cuanto a la distribución por sexo, la proporción de hombres fue mayor (65,6%) que la de mujeres (34,4%) (Figura 22).



**Figura 21.** Distribución por edades de los participantes del estudio.



**Figura 22.** Distribución por sexos del grupo de estudio.

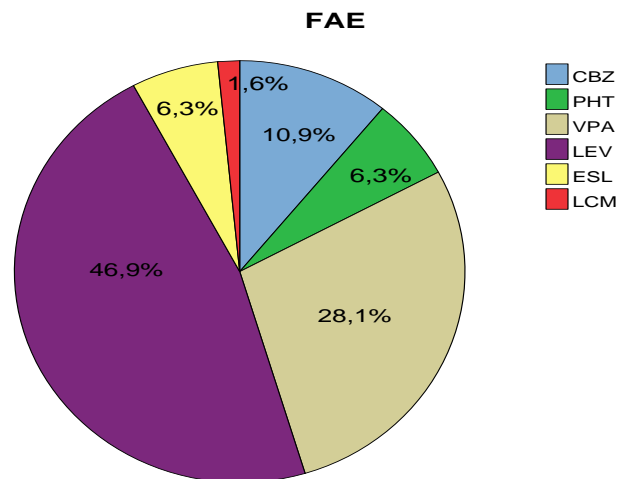
El IMC es mayor en los hombres (27,49) que en las mujeres (26,22), pero dicha diferencia no es estadísticamente significativa ( $p=0,205$ ). Estudiando el total de los pacientes en función del tipo de FAE que estuvieran tomando, clásicos o de nueva generación, tampoco se han encontrado diferencias significativas respecto al IMC ( $p=0,470$ ) (Tabla 8).

Las variables clínicas referentes a la historia de epilepsia recogidas en la encuesta durante la primera visita de cada paciente se presentan en la siguiente tabla (Tabla 9). Las variables “Tiempo de diagnóstico” y “Tiempo de tratamiento” no siguen una distribución Normal por lo que se expresan como Mediana y Rango intercuartílico, el

cual engloba los datos comprendidos entre los percentiles 25 y 75.

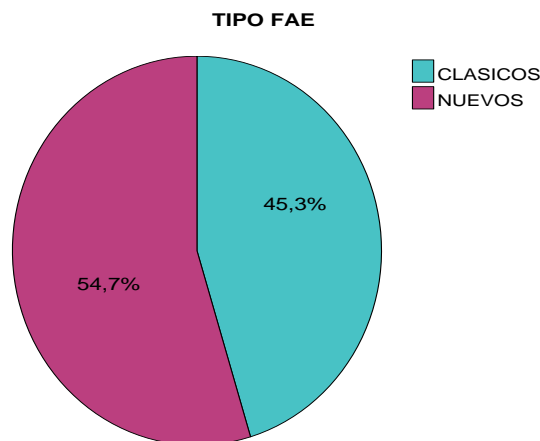
**Tabla 9.** Características referentes a la historia de epilepsia del grupo de estudio. Se incluye el tiempo de diagnóstico, tiempo de tratamiento, tipo de crisis, etiología y tipo de FAE.

	Características	Mediana		
		Percentil 25-Percentil 75		
<b>Historia de EPILEPSIA</b>	Tiempo de diagnóstico (años)	7 (3-16)		
	Tiempo de tratamiento (meses)	44 (24-82,5)		
	<b>Tipo de crisis</b>		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
	Crisis GTC	Sí	26	40,6
		No	38	59,4
	Focales	Sí	27	42,2
		No	37	57,8
	Bilaterales	Sí	17	26,6
		No	47	73,4
	<b>Etiología</b>		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
	Genética		14	21,9
	Estructural		35	54,7
	Desconocida		15	23,4
	<b>Tipo de FAE</b>		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
	Carbamazepina (CBZ)		7	10,9
	Fenitoína (PHE)		4	6,3
	Valproico (VPA)		18	28,1
Levetiracetam (LEV)		30	46,8	
Acetato de eslicarbazepina (ESL)		4	6,3	
Lacosamida (LCM)		1	1,6	



**Figura 23.** Distribución en porcentaje del tipo de FAE tomado por el grupo de estudio.

Teniendo en cuenta el tipo de FAE y clasificando estos como FAE clásicos (CBZ, PHT y VPA) o FAE de nueva generación (LEV, ESL, LCM), en la población de estudio hay 29 pacientes en tratamiento con FAE clásicos (45,3%) y 35 pacientes bajo tratamiento con FAE de nueva generación (54,7%) (Figura 24).



**Figura 24.** Distribución en porcentaje del tipo de FAE, clásicos o de nueva generación, tomado por el grupo de estudio.

Si se analiza el tiempo de diagnóstico de la epilepsia (cuantificado en años) y el tiempo que cada paciente lleva asociado un tratamiento antiepiléptico (expresado en meses) en función del tipo de FAE que estén tomando se encuentran diferencias



estadísticamente significativas en ambas variables. En la siguiente tabla (Tabla 10) se muestra el valor  $p$  asociado una vez realizado el test no paramétrico de la *U de Mann-Whitney*.

**Tabla 10.** Diferencias entre el tiempo de diagnóstico de epilepsia y tiempo de tratamiento en función del tipo de FAE (clásico o de nueva generación).

	Características	Mediana	Percentil 25-75	$p$
Tiempo de diagnóstico (años)	FAE clásicos	10	6-20,5	0,002
	FAE de nueva generación	5	3-8	
Tiempo de tratamiento (meses)	FAE clásicos	72	60-150	<0,001
	FAE de nueva generación	30	21-48	

A continuación se muestran los antecedentes personales del grupo de estudio, expresándose como frecuencias y porcentajes (%), entre ellos los antecedentes de osteoporosis, hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus (DM), consumo de tabaco y/o alcohol y presencia de enfermedades endocrinas (Tabla 11).

**Tabla 11.** Antecedentes personales del grupo de estudio, expresados como porcentaje (%).

			Frecuencia	Porcentaje (%)
Antecedentes personales	Antecedentes osteoporosis	Sí	12	18,8
		No	52	81,2
	HTA	Sí	6	9,4
		No	58	90,6
	DM	Sí	4	6,2
		No	60	93,8
	Consumo tabaco	Sí	18	28,1
		No	46	71,9
	Consumo alcohol	Sí	2	3,1
		No	62	96,8
	Enf. endocrinas	Sí	5	7,8
		No	59	92,2

Por último, se recogen en la siguiente tabla los datos referentes a los hábitos diarios y el tipo de piel, expresándose en todos los casos como porcentaje (Tabla 12).

**Tabla 12.** Características del grupo de estudio (tipo de piel, práctica de ejercicio físico y tratamiento concomitante asociado).

<b>Hábitos diarios</b>	<b>Tipo de piel</b>		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje (%)</b>	
	<b>Fototipo I</b>		-	-	
	<b>Fototipo II</b>		18	28,1	
	<b>Fototipo III</b>		35	54,7	
	<b>Fototipo IV</b>		9	14,1	
	<b>Fototipo V</b>		1	1,6	
	<b>Fototipo VI</b>		-	-	
	<b>Práctica de ejercicio físico</b>		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje (%)</b>	
	<b>Tipo I</b>		15	23,4	
	<b>Tipo II</b>		10	15,6	
	<b>Tipo III</b>		9	14,1	
	<b>Tipo IV</b>		15	23,4	
	<b>Tipo V</b>		15	23,4	
	<b>Tratamiento concomitante</b>		<b>Sí</b>	21	32,81
			<b>No</b>	43	67,18

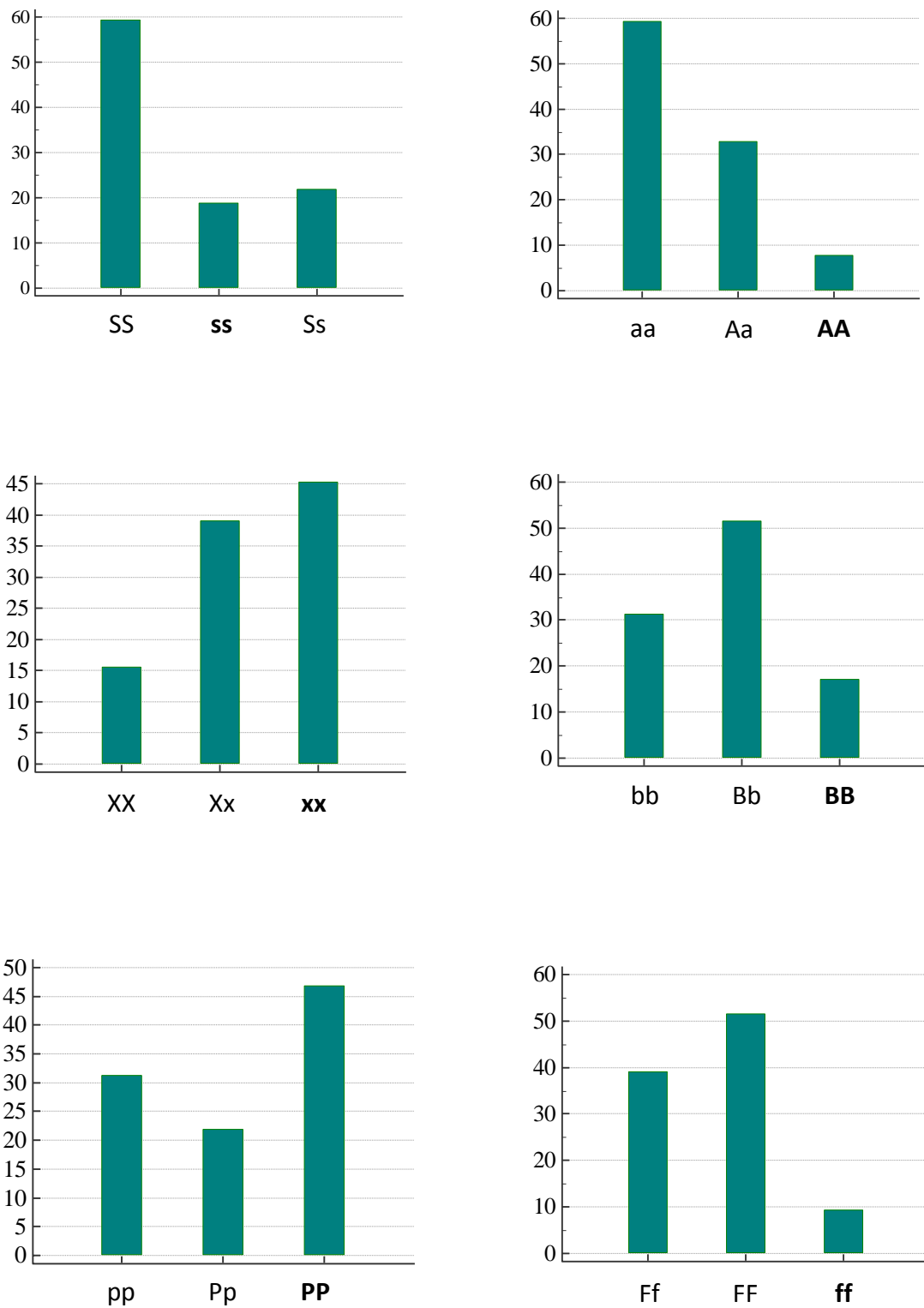
**4.2. OBJETIVO 2: Determinar la frecuencia genotípica de los polimorfismos de los genes VDR, ER, CTR y COL1A1 en pacientes epilépticos y compararlas con las frecuencias genotípicas encontradas en la población general y/o en pacientes con otras patologías.**

A continuación se detallan las frecuencias genotípicas de los polimorfismos de los genes analizados en la población de estudio (Tabla 13), quedando reflejado en la última columna de la tabla el valor de  $p$  obtenido mediante la realización del test  $\chi^2$  para comparar las frecuencias de los distintos genotipos.

**Tabla 13.** Frecuencias genotípicas de los polimorfismos genéticos estudiados (en “negrita” se muestran los genotipos asociados a menor DMO y/o mayor riesgo de fractura ósea).

Polimorfismo	Genotipo	Frecuencia	Porcentaje (%)	<i>p</i>
<b>VDR-BsmI</b>	<b>BB</b>	11	17,2	<b>0,003</b>
	bb	20	31,3	
	Bb	33	51,6	
<b>ESR1-PvuII</b>	<b>PP</b>	30	46,9	<b>0,046</b>
	pp	20	31,3	
	Pp	14	21,9	
<b>VDR-FokI</b>	FF	25	39,1	<b>&lt; 0,001</b>
	<b>ff</b>	6	9,4	
	Ff	33	51,6	
<b>CTR-AluI</b>	<b>AA</b>	5	7,8	<b>&lt; 0,001</b>
	aa	38	59,4	
	Aa	21	32,8	
<b>ESR1-XbaI</b>	XX	10	15,6	<b>0,009</b>
	<b>xx</b>	29	45,3	
	Xx	25	39,1	
<b>COL1A1-Sp1</b>	SS	38	59,4	<b>0,001</b>
	<b>ss</b>	14	21,9	
	Ss	8	12,5	
	SS/Ss	4	6,3	

Como se puede ver, tanto en la Tabla 13 como en las diferentes gráficas de la Figura 25, existen diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias genotípicas de los diferentes polimorfismos estudiados, encontrando mayor proporción de individuos con genotipo *SS*, genotipo *aa*, genotipo *xx*, genotipo *Bb*, genotipo *PP* y genotipo *FF*.



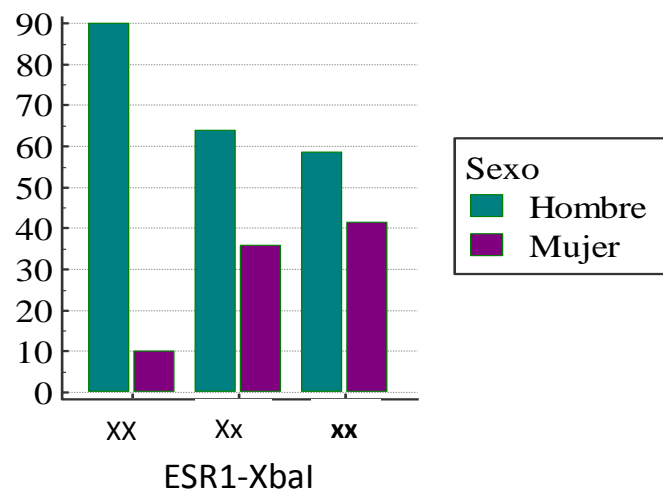
**Figura 25.** Representación gráfica de las frecuencias genotípicas de los diferentes polimorfismos estudiados, de izquierda a derecha y de arriba abajo: COL1A1-Sp1, CRT-ALUI, ESRI-XbaI, VDR-BsmI, ESRI-PvuII, VDR-FokI.

Se ha estudiado también la distribución de frecuencias genotípicas de los polimorfismos en función del sexo, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos (Tabla 14). En la última columna de la tabla se muestra el valor  $p$  asociado al resultado de la prueba de contraste de hipótesis realizada para comprobar la igualdad de distribuciones entre ambos sexos. Dado que al separar por sexos la muestra es pequeña y la frecuencia esperada en alguno de los casos es inferior a cinco se ha aplicado el estadístico exacto de Fisher, en vez de la prueba  $\chi^2$ .

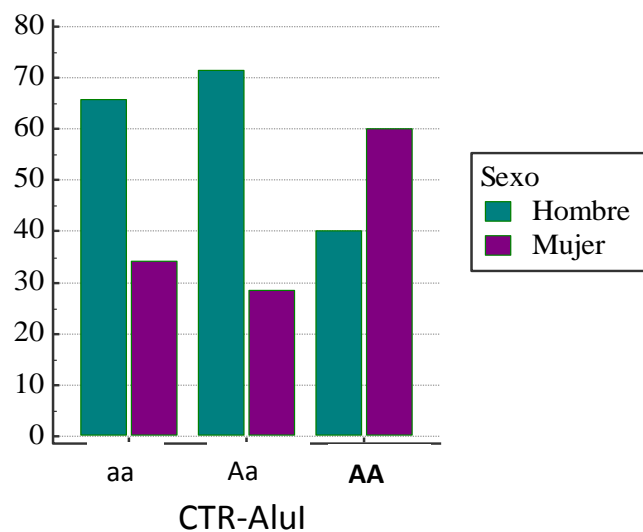
**Tabla 14.** Frecuencias genotípicas de los polimorfismos genéticos estudiados, en función del sexo.

Gen	Genotipo	Hombres (n=42)		Mujeres (n=22)		p
		Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	
VDR- BsmI	BB	8	19	3	13,6	0,382
	bb	15	35,7	5	22,7	
	Bb	19	45,2	14	63,6	
ESR1- PvuII	PP	21	50	9	40,9	0,491
	pp	11	26,2	9	40,9	
	Pp	10	23,8	4	18,2	
VDR- FokI	FF	20	47,6	5	22,7	0,121
	ff	3	7,1	3	13,6	
	Ff	19	45,2	14	63,6	
CTR-AluI	AA	2	4,8	3	13,6	0,425
	aa	25	59,5	13	59,1	
	Aa	15	35,7	6	27,3	
ESR1- XbaI	XX	9	21,4	1	4,5	0,192
	xx	17	40,5	12	54,5	
	Xx	16	38,1	9	40,9	
COL1A1- Sp1	SS	25	59,5	13	59,1	0,991
	ss	9	21,4	5	22,7	
	Ss	4	9,5	4	18,2	
	SS/Ss	4	9,5	-	-	

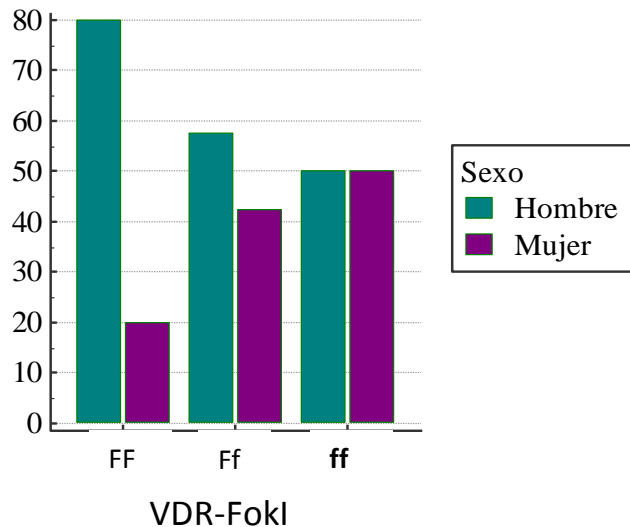
Sin embargo, a pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos, las distribuciones genotípicas de tres de los polimorfismos estudiados muestran características llamativas que se pueden ver en las siguientes gráficas. En cuanto al genotipo *XX* del polimorfismo *ESR1-XbaI* se muestra una clara mayoría de hombres que de mujeres (Figura 26); en el polimorfismo del receptor de la calcitonina los genotipos *Aa* y *aa* son más frecuentes en hombres que en mujeres mientras que el genotipo *AA* es al contrario, más frecuente en mujeres (Figura 27). Por último, en la distribución genotípica del polimorfismo *VDR-FokI* hay una clara mayoría de mujeres con genotipo *FF*, mientras que los genotipos *Ff* y *ff* se distribuyen equitativamente entre ambos sexos (Figura 28).



**Figura 26.** Distribuciones genotípicas del polimorfismo *ESR1-XbaI*, por sexo.



**Figura 27.** Distribuciones genotípicas del polimorfismo *CTR-AluI*, por sexo.



*Figura 28. Distribuciones genotípicas del polimorfismo VDR-FokI, por sexo.*

Una vez conocidas las frecuencias genotípicas de nuestra población de estudio se ha llevado a cabo la comparación de las mismas con las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas en población sana (Tabla 15) y otros grupos de riesgo (Tabla 16), como pueden ser pacientes diabéticos o pacientes sometidos a trasplante renal, que por distintos mecanismos también presentan una mayor predisposición hacia la pérdida de masa ósea.

Para realizar la comparación de prevalencias de los polimorfismos VDR-BsmI, VDR-FokI, ESR1-PvuII y ESR1-XbaI entre nuestros datos y los datos de población sana de referencia se ha seleccionado la población CEU del proyecto GENOMOS 1000, que incluye sujetos residentes en el estado de Utah con antepasados europeos. Este proyecto se llevó a cabo entre los años 2008 y 2015 y tenía como objetivo encontrar la mayoría de variantes genéticas de las poblaciones estudiadas que tuvieran una frecuencia mínima del 1%. De este modo se logró conseguir el mayor catálogo público a nivel mundial de genotipos humanos de libre acceso (175). Para el polimorfismo CTR-AluI, no incluido en el proyecto GENOMOS 1000, se han extraído los datos de un metaanálisis publicado en 2015 en el que se analizaban las frecuencias genotípicas y alélicas de dicho polimorfismo presentadas en 15 estudios y que recogía los datos de más de 3500 sujetos (176). Y por último, los datos de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo del colágeno COL1A1-Sp1 en población sana se han obtenido de un estudio multicéntrico publicado en 2006 en el que se incluían datos de más de 20.500

sujetos de diferentes países europeos. En este caso se han empleado los datos de una cohorte de Barcelona, con unos 1500 participantes (72).

**Tabla 15.** Frecuencias genéticas y alélicas de la población de estudio comparadas con la población control sana (población CEU, estudio GENOMOS y datos del metaanálisis realizado en 2015 por Xiong et al). (Se marcan con un \* las frecuencias genéticas de los polimorfismos obtenidos de poblaciones diferentes a la población CEU).

Gen	Genotipo	Frecuencia genética (%)			Frecuencias alélicas (%)		
		Población epilepsia	Población sana	p	Población epilepsia	Población sana	p
VDR-BsmI	BB	17,2	23,5	0,244	B: 42,96% b: 57,04%	B: 44,20% b: 53,50%	0,845 0,579
	bb	31,3	34,9	0,555			
	Bb	51,6	41,6	0,113			
ESR1-PvuII	PP	46,9	33,6	<b>0,028</b>	P: 57,8% p: 42,19%	P: 59,30% p: 40,70%	0,811 0,812
	pp	31,3	15	<b>&lt;0,001</b>			
	Pp	21,9	53,1	<b>&lt;0,001</b>			
VDR-FokI	FF	39,1	46,7	0,234	F: 64,85% f: 35,15%	F: 69,40% f: 30,60%	0,441 0,441
	ff	9,4	7,8	0,642			
	Ff	51,6	45,5	0,339			
CTR-AluI	AA	7,8	14,9*	0,113	A: 24,22% a: 75,78%	A: 35,80% a: 64,20%	<b>0,058</b> <b>0,058</b>
	aa	59,4	40,7*	<b>0,003</b>			
	Aa	32,8	44,2*	<b>0,071</b>			
ESR1-XbaI	XX	15,6	48,1	<b>&lt;0,001</b>	X: 35,15% x: 64,85%	X: 69,40% x: 30,60%	<b>&lt;0,001</b> <b>&lt;0,001</b>
	xx	45,3	9,3	<b>&lt;0,001</b>			
	Xx	39,1	42,6	0,580			
COL1A1-Sp1	SS	59,4	64,8*	0,713	S: 70,32% s: 29,68%	S: 80,15 % s: 19,85 %	<b>0,056</b> <b>0,056</b>
	ss	21,9	4,2*	<b>&lt;0,001</b>			
	Ss	12,5	30,9*	<b>0,001</b>			
	SS/Ss	6,3	-	-			



*Tabla 16. Comparación de las frecuencias genotípicas entre distintas poblaciones “enfermas”.*

Gen	Genotipo	Comparación de poblaciones				
		Epilepsia	Diabetes	<i>p</i>	Trasplante	<i>p</i>
VDR-BsmI	<b>BB</b>	17,2	19,5	0,690	20,2	0,615
	bb	31,3	32,2	0,895	32,69	0,844
	Bb	51,6	48,3	0,654	47,11	0,553
ESR1-PvuII	<b>PP</b>	46,9	25,0	<b>0,001</b>	44,24	0,724
	pp	31,3	20,5	<b>0,084</b>	25,96	0,430
	Pp	21,9	54,5	<b>&lt;0,001</b>	29,80	0,241
VDR-FokI	FF	39,1	51,1	0,103	60,58	<b>0,004</b>
	<b>ff</b>	9,4	7,8	0,693	6,73	0,505
	Ff	51,6	41,1	0,1518	32,69	<b>0,010</b>
CTR-AluI	<b>AA</b>	7,8	-	-	7,4	0,920
	aa	59,4	-	-	48,37	0,144
	Aa	32,8	-	-	44,23	0,124
ESR1-XbaI	XX	15,6	36,3	<b>0,002</b>	25,01	0,133
	<b>xx</b>	45,3	13,8	<b>&lt;0,001</b>	38,46	0,357
	Xx	39,1	50	0,1389	36,53	0,725
COL1A1-Sp1	SS	59,4	-	-	55,76	0,627
	<b>ss</b>	21,9	-	-	4,80	<b>&lt;0,001</b>
	Ss	12,5	-	-	35,57	<b>&lt;0,001</b>
	SS/Ss	6,3	-	-	4,07	0,489

**4.3. OBJETIVO 3: Determinar la posible influencia del tratamiento a largo plazo con FAE sobre el metabolismo fosfocálcico, metabolismo lipídico y la función renal de los pacientes del estudio en función del genotipo presentado.**

**4.3.1. Estudio del metabolismo fosfocálcico**

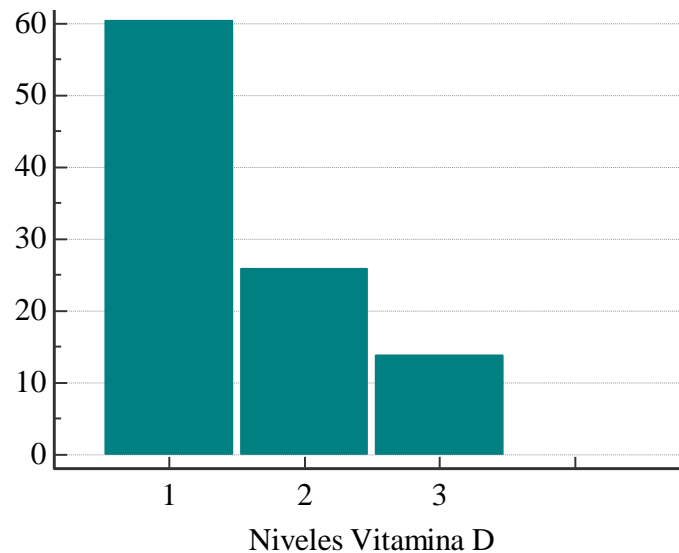
Para el estudio del metabolismo fosfocálcico se analizan las concentraciones de calcio y fósforo, tanto en suero como en orina, así como PTH y vitamina D. El primer paso es comprobar la distribución de las variables concluyendo que todas siguen una distribución Normal de manera que para el estudio de la evolución de la concentración de las distintas variables entre las dos visitas se realiza el test de la *T de Student* para variables apareadas.

En general no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables estudiadas, excepto para la vitamina D, en la que se encontraron concentraciones de vitamina D mayores en la segunda visita ( $p < 0,001$ ) y para el fósforo en orina, mayor en la determinación basal ( $p = 0,054$ ). Los resultados se muestran en la Tabla 17.

*Tabla 17. Concentraciones de los parámetros del metabolismo fosfocálcico en la 1ª y 2ª visita. Comparación entre ambas.*

Parámetro	Visita	Media	DE	Min	Max	<i>p</i>
Calcio (mg/dl)	1ª	9,69	0,34	8,80	10,70	0,122
	2ª	9,63	0,39	8,40	10,50	
Calcio O (mg/dl)	1ª	13,93	8,23	1,76	39,19	0,594
	2ª	13,41	7,11	1,83	34,30	
Fósforo (mg/dl)	1ª	3,53	0,52	2,30	4,61	0,319
	2ª	3,62	0,67	0,31	7,40	
Fósforo O (mg/dl)	1ª	72,81	35,36	24,19	153,78	<b>0,054</b>
	2ª	63,77	36,28	17,70	206,60	
Vitamina D (ng/ml)	1ª	18,69	8,72	6,70	61,1	<b>&lt;0,001</b>
	2ª	23,49	7,41	7,40	43,3	
PTH (pg/ml)	1ª	29,14	11,05	7,00	63,01	0,883
	2ª	28,91	14,77	5,00	70,03	

En el grupo de estudio tenemos que un 60% de los pacientes presentan niveles de vitamina D inferiores a 20 ng/ml, que es considerado por los especialistas como déficit de la vitamina, un 26% con niveles insuficientes de la misma (entre 21-29 ng/ml) y sólo un 14% de los pacientes con niveles suficientes de vitamina D (superiores a 30 ng/ml). (Figura 29).



**Figura 29.** Proporción de pacientes con déficit (1), insuficiencia (2) o suficiencia de Vitamina D (3).

Además de estudiar la evolución temporal de los parámetros bioquímicos del metabolismo fosfocálcico a lo largo del estudio en el total de los integrantes del grupo, se ha analizado si el efecto de los distintos tipos de FAE afecta de manera diferente a dichos parámetros, agrupando los fármacos como FAE clásicos y de nueva generación. En la siguiente tabla se pueden ver las concentraciones de los distintos parámetros tanto en la primera como en la segunda visita, diferenciando entre tipos de FAE, y la significación estadística  $p$  arrojada por el test *T de Student* aplicado. En este caso se encuentran diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de Calcio, detectándose concentraciones ligeramente superiores en los pacientes en tratamiento con FAE de nueva generación, siendo la  $p=0,034$  (Tabla 18).

**Tabla 18.** Parámetros del metabolismo fosfocálcico en la 1ª y 2ª visita, diferenciando entre FAE clásicos y de nueva generación.

Parámetro	Visita	FAE clásicos			FAE nuevos			p
		Media	DE	Min-Max	Media	DE	Min-Max	
Calcio (mg/dl)	1ª	9,62	0,41	8,80-10,7	9,74	0,26	9,40-10,40	<b>0,034</b>
	2ª	9,65	0,34	9,01-10,5	9,61	0,43	8,40-10,40	
Calcio O (mg/dl)	1ª	14,50	7,96	1,76-35,40	13,43	8,52	2,40-39,19	0,725
	2ª	13,92	6,52	4,73-33,52	13,01	7,60	1,83-34,30	
Fósforo (mg/dl)	1ª	3,53	0,52	2,70-4,50	3,47	0,51	2,31-4,60	0,196
	2ª	3,41	0,80	0,30-4,50	3,67	0,79	2,60-7,40	
Fósforo O (mg/dl)	1ª	80,31	33,07	29,0-153,7	67,53	35,19	24,19-146,5	0,156
	2ª	64,27	25,04	25,30-114,5	63,38	43,29	17,70-206,6	
Vitamina D (ng/ml)	1ª	19,10	8,25	6,70-34,80	19,66	9,48	7,50-61,10	0,733
	2ª	22,97	7,0	12,10-36,00	23,88	7,77	7,40-43,30	
PTH (pg/ml)	1ª	29,52	9,31	17,00-52,00	28,83	12,24	7,00-63,00	0,395
	2ª	30,96	13,20	12,00-59,00	27,36	15,88	5,00-70,01	

Adicionalmente, se ha estudiado la evolución del metabolismo fosfocálcico del grupo de pacientes agrupando los mismos en función del tipo de FAE que estuvieran tomando, ya fuera un FAE inductor enzimático o no lo fuera, ya que como se ha visto este tipo de FAE afectan de manera más notable a la salud ósea. Para ello se han hecho dos grupos de pacientes, los que siguen un tratamiento con PHT o CBZ (n= 11) y los que toman VPA, LEV, ESL o LCM (n=53).

Como se puede ver en la Tabla 19 existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de calcio ( $p=0,019$ ) y vitamina D ( $p=0,041$ ) entre aquellos pacientes que siguen un tratamiento con FAE inductores enzimáticos, con concentraciones más bajas de ambos parámetros, y los que toman FAE no inductores enzimáticos. Para dicho estudio estadístico se he aplicado un test *T de Student*.

**Tabla 19.** Parámetros del metabolismo fosfocálcico en la 1ª y 2ª visita, diferenciando entre FAE inductores enzimáticos y no inductores enzimáticos.

Parámetro	Visita	FAE inductores enzimáticos			FAE no inductores enzimáticos			p
		Media	DE	Min-Max	Media	DE	Min-Max	
Calcio (mg/dl)	1ª	9,40	0,38	8,80-10,00	9,76	0,27	9,20-10,70	<b>0,012</b>
	2ª	9,41	0,27	9,00-9,70	9,67	0,40	8,40-10,50	<b>0,019</b>
Calcio O (mg/dl)	1ª	16,74	7,50	5,59-29,09	13,35	7,65	1,76-39,19	0,221
	2ª	14,98	7,65	6,50-14,98	13,08	7,03	1,83-34,30	0,483
Fósforo (mg/dl)	1ª	3,60	0,42	2,90-4,30	3,47	0,53	2,30-4,60	0,391
	2ª	3,62	0,49	3,00-4,40	3,61	0,70	2,60-7,40	0,976
Fósforo O (mg/dl)	1ª	81,83	33,75	48,20-153,7	71,49	34,82	24,19-146,55	0,394
	2ª	78,45	28,68	36,40-114,5	60,71	37,20	17,70-206,60	0,112
Vitamina D (ng/ml)	1ª	15,50	7,46	6,70-30,80	20,21	9,00	7,50-61,10	<b>0,084</b>
	2ª	19,34	6,22	12,10-31,50	24,35	7,40	7,40-43,30	<b>0,041</b>
PTH (pg/ml)	1ª	32,73	9,95	20-52	28,64	11,03	7,00-63,01	0,242
	2ª	35,80	16,41	12-59	27,48	14,17	5,02-70,05	0,162

Paralelamente se ha estudiado el posible efecto del LEV sobre los niveles de vitamina D frente al efecto de otros FAE diferentes, no encontrando diferencias estadísticamente significativas tras la realización de una prueba *T de Student* ( $p=0,366$ ). No ha sido posible realizar el mismo tipo de estudio para el resto de FAE debido al bajo número de pacientes con cada uno de los FAE por separado.

Por último, se han estudiado los parámetros del metabolismo fosfocálcico en función de los posibles genotipos de los seis polimorfismos estudiados. Para ello se ha aplicado el método de análisis de la varianza (ANOVA) y los datos obtenidos se muestran en las Tablas 20 y 21. Como se puede observar, aquellos pacientes con genotipo *BB* para el polimorfismo VDR-BsmI presentan mayores concentraciones de calcio que el resto de pacientes ( $p=0,015$ ), aquellos con genotipo *PP* tienen una concentración de PTH mayor que el resto ( $p=0,016$ ) y aquellos con genotipo *pp* tienen mayores concentraciones de fósforo ( $p=0,041$ ). En cuanto al polimorfismo ESR1-XbaI, los pacientes con genotipo *XX* muestran mayor concentración de fósforo en orina que los pacientes con otros genotipos ( $p=0,044$ ). Se muestran también los resultados obtenidos al hacer el mismo estudio en función de la presencia/ausencia del alelo considerado patológico (Tablas 22 y 23).

**Tabla 20.** Parámetros del metabolismo fosfocálcico en función de los genotipos de los polimorfismos estudiados.

Parámetro	COL1A1-Sp1					CTR-AluI					VDR-BsmI				
	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>
Calcio (mg/dl)	<b>SS</b>	9,70	0,33	8,8-10,7	0,951	<b>AA</b>	9,50	0,36	9,1-10,0	0,351	<b>BB</b>	9,96	0,33	9,5-10,7	<b>0,015</b>
	<b>Ss</b>	9,73	0,33	9,1-10,4		<b>Aa</b>	9,74	0,31	9,1-10,4		<b>Bb</b>	9,63	0,35	8,8-10,4	
	<b>ss</b>	9,69	0,37	9,1-10,2		<b>aa</b>	9,71	0,34	8,8-10,7		<b>bb</b>	9,69	0,25	9,2-10,2	
Calcio O (mg/dl)	<b>SS</b>	14,57	8,75	4,00-39,19	0,721	<b>AA</b>	18,12	7,26	11,30-28	0,433	<b>BB</b>	16,24	10,82	2,40-35,40	0,487
	<b>Ss</b>	12,38	7,84	2,40-25,80		<b>Aa</b>	12,52	8,48	4,0-39,19		<b>Bb</b>	13,94	8,58	1,76-39,19	
	<b>ss</b>	13,38	7,46	1,76-28		<b>aa</b>	14,24	8,19	1,76-35,40		<b>bb</b>	12,42	5,46	4,80-21,90	
Fósforo (mg/dl)	<b>SS</b>	3,48	0,50	2,3-4,6	0,696	<b>AA</b>	3,51	0,46	3,0-3,9	0,967	<b>BB</b>	3,55	0,50	2,9-4,5	0,361
	<b>Ss</b>	3,44	0,52	2,7-4,5		<b>Aa</b>	3,47	0,40	2,9-4,2		<b>Bb</b>	3,41	0,49	2,3-4,5	
	<b>ss</b>	3,60	0,57	2,7-4,5		<b>aa</b>	3,51	0,58	2,3-4,6		<b>bb</b>	3,61	0,55	2,7-4,6	
Fósforo O (mg/dl)	<b>SS</b>	76,40	36,47	28,40-153,7	0,561	<b>AA</b>	76,026	22,27	48,00-100,40	0,712	<b>BB</b>	63,97	30,26	24,19-111,9	0,573
	<b>Ss</b>	63,46	35,98	24,19-146,5		<b>Aa</b>	68,07	36,30	24,19-146,45		<b>Bb</b>	73,61	35,96	30,10-153,78	
	<b>ss</b>	72,56	28,89	36,98-113,4		<b>aa</b>	75,85	35,09	28,40-153,78		<b>bb</b>	78,06	35,29	28,40-138,80	
Vitamina D (ng/ml)	<b>SS</b>	18,51	7,50	6,7-34,8	0,349	<b>AA</b>	21,52	5,50	17,3-30,8	0,832	<b>BB</b>	22,24	13,70	9,9-61,1	0,381
	<b>Ss</b>	22,76	13,17	10,9-61,1		<b>Aa</b>	18,81	7,73	7,5-33,8		<b>Bb</b>	18,07	7,12	7,7-30,4	
	<b>ss</b>	18,96	7,91	7,5-33,8		<b>aa</b>	19,46	9,89	6,7-61,1		<b>bb</b>	20,04	8,31	6,7-34,8	
PTH (pg/ml)	<b>SS</b>	30,16	10,81	16-63	0,759	<b>AA</b>	32,80	10,37	20-44	0,302	<b>BB</b>	25,27	15,14	7-58	0,324
	<b>Ss</b>	27,67	13,04	7-47		<b>Aa</b>	31,67	10,39	9-58		<b>Bb</b>	29,42	10,69	16-63	
	<b>ss</b>	28,57	9,61	17-52		<b>aa</b>	27,61	11,13	7-63		<b>bb</b>	31,45	8,02	16-44	

*Tabla 21. Parámetros del metabolismo fosfocálcico en función de los genotipos de los polimorfismos estudiados (continuación).*

Parámetro	VDR-FokI					ESR1-PvuII					ESR1-XbaI				
	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>
Calcio (mg/dl)	<b>FF</b>	9,64	0,39	8,8-10,7	0,503	<b>PP</b>	9,67	0,35	8,8-10,7	0,395	<b>XX</b>	9,63	0,39	8,8-10,1	0,640
	<b>Ff</b>	9,74	0,31	9,1-10,4		<b>Pp</b>	9,81	0,42	9,1-10,4		<b>Xx</b>	9,74	0,33	9,2-10,7	
	<b>ff</b>	9,73	0,23	9,6-10,2		<b>pp</b>	9,69	0,23	9,4-10,2		<b>xx</b>	9,69	0,32	9,1-10,4	
Calcio O (mg/dl)	<b>FF</b>	14,61	8,27	4,12-35,40	0,815	<b>PP</b>	14,74	7,94	2,40-45,40	0,500	<b>XX</b>	13,40	8,73	5,10-29,09	0,960
	<b>Ff</b>	13,67	8,52	1,76-39,19		<b>Pp</b>	11,62	7,86	1,76-28,30		<b>Xx</b>	13,71	8,25	1,76-35,40	
	<b>ff</b>	12,32	7,47	4,00-25,80		<b>pp</b>	14,35	9,01	4,00-39,19		<b>xx</b>	14,22	8,36	4,00-39,19	
Fósforo (mg/dl)	<b>FF</b>	3,34	0,48	2,3-4,2	0,163	<b>PP</b>	3,54	0,53	2,7-4,6	<b>0,041</b>	<b>XX</b>	3,23	0,38	2,7-3,9	0,167
	<b>Ff</b>	3,59	0,53	2,7-4,6		<b>Pp</b>	3,20	0,57	2,3-4,5		<b>Xx</b>	3,60	0,63	2,3-4,6	
	<b>ff</b>	3,60	0,43	3,1-4,3		<b>pp</b>	3,64	0,36	2,9-4,5		<b>xx</b>	3,50	0,42	2,8-4,5	
Fósforo O (mg/dl)	<b>FF</b>	78,16	38,25	28,40-153,7	0,901	<b>PP</b>	74,39	27,04	36,90-125,50	0,901	<b>XX</b>	90,32	21,78	62,50-115,67	<b>0,044</b>
	<b>Ff</b>	72,87	33,54	24,19-146,5		<b>Pp</b>	69,43	43,08	24,19-153,78		<b>Xx</b>	60,72	27,63	24,19-11,90	
	<b>ff</b>	54,92	18,86	30,10-86,9		<b>pp</b>	74,18	39,19	28,40-146,55		<b>xx</b>	79,42	39,82	28,40-153,78	
Vitamina D (ng/ml)	<b>FF</b>	17,75	7,13	7,5-30,8	0,298	<b>PP</b>	20,83	11,17	6,7-61,1	0,440	<b>XX</b>	19,74	8,69	8,6-30,8	0,573
	<b>Ff</b>	21,08	9,98	7,8-61,1		<b>Pp</b>	17,29	6,19	7,7-30,2		<b>Xx</b>	20,72	10,76	6,7-61,1	
	<b>ff</b>	17,08	8,56	6,7-30,2		<b>pp</b>	18,75	6,15	7,5-30,4		<b>xx</b>	18,15	7,12	7,5-34,8	
PTH (pg/ml)	<b>FF</b>	31,00	11,19	16-63	0,294	<b>PP</b>	32,02	11,42	7-58	<b>0,016</b>	<b>XX</b>	34,30	11,90	18-58	0,110
	<b>Ff</b>	27,36	9,89	7-52		<b>Pp</b>	22,21	7,12	9-38		<b>Xx</b>	26,20	11,16	7-52	
	<b>ff</b>	33,33	14,37	17-58		<b>pp</b>	30,30	10,45	16-63		<b>xx</b>	30,34	9,77	16-63	

*Tabla 22. Parámetros del metabolismo fosfocálcico en función de la presencia/ausencia del alelo patológico de los polimorfismos estudiados.*

Parámetro	COL1A1-Sp1				CTR-AluI				VDR-BsmI			
	Alelo	Media	DE	<i>p</i>	Alelo	Media	DE	<i>p</i>	Alelo	Media	DE	<i>p</i>
Calcio (mg/dl)	S	9,71	0,32	0,879	A	9,69	0,33	0,844	B	9,71	0,37	0,767
	s	9,71	0,35	0,919	a	9,72	0,33	0,250	b	9,65	0,31	<b>0,014</b>
Calcio O (mg/dl)	S	14,06	8,51	0,774	A	13,41	8,42	0,703	B	14,53	9,13	0,271
	s	12,94	7,48	0,437	a	13,61	8,27	0,308	b	13,39	7,58	0,423
Fósforo (mg/dl)	S	3,47	0,50	0,450	A	3,48	0,40	0,824	B	3,44	0,49	0,258
	s	3,52	0,54	0,723	a	3,49	0,52	0,941	b	3,48	0,52	0,701
Fósforo O (mg/dl)	S	73,37	36,92	0,932	A	69,35	34,19	0,473	B	71,14	34,50	0,488
	s	68,56	31,82	0,377	a	72,99	35,42	0,814	b	75,21	35,42	0,296
Vitamina D (ng/ml)	S	19,53	9,20	0,821	A	19,33	7,34	0,951	B	19,12	9,21	0,692
	s	20,71	10,61	0,365	a	19,23	9,12	0,434	b	18,82	7,57	0,438
PTH (pg/ml)	S	29,56	11,30	0,747	A	31,88	10,19	0,118	B	28,39	11,90	0,235
	s	28,15	11,09	0,477	a	29,05	10,96	0,476	b	30,19	9,76	0,322



*Tabla 23. Parámetros del metabolismo fosfocálcico en función de la presencia/ausencia del alelo patológico de los polimorfismos estudiados.*

Parámetro	VDR-FokI				ESR1-PvuII				ESR1-XbaI			
	Alelo	Media	DE	<i>p</i>	Alelo	Media	DE	<i>p</i>	Alelo	Media	DE	<i>p</i>
<b>Calcio (mg/dl)</b>	<b>F</b>	9,70	0,34	0,785	<b>P</b>	9,71	0,37	0,762	<b>X</b>	9,71	0,35	0,835
	<b>f</b>	9,74	0,29	0,271	<b>p</b>	9,74	0,32	0,385	<b>x</b>	9,72	0,32	0,509
<b>Calcio O (mg/dl)</b>	<b>F</b>	14,08	8,35	0,608	<b>P</b>	13,70	7,96	0,788	<b>X</b>	13,64	8,23	0,785
	<b>f</b>	13,45	8,27	0,596	<b>p</b>	13,30	8,52	0,468	<b>x</b>	13,98	8,23	0,863
<b>Fósforo (mg/dl)</b>	<b>F</b>	3,49	0,52	0,585	<b>P</b>	3,43	0,56	<b>0,081</b>	<b>X</b>	3,49	0,58	0,964
	<b>f</b>	3,59	0,51	<b>0,053</b>	<b>p</b>	3,46	0,50	0,560	<b>x</b>	3,54	0,52	<b>0,040</b>
<b>Fósforo O (mg/dl)</b>	<b>F</b>	75,18	35,43	<b>0,051</b>	<b>P</b>	72,74	32,79	0,890	<b>X</b>	67,90	29,02	0,210
	<b>f</b>	69,93	32,12	0,389	<b>p</b>	72,16	40,29	0,798	<b>x</b>	70,60	35,56	<b>0,049</b>
<b>Vitamina D (ng/ml)</b>	<b>F</b>	19,65	8,95	0,512	<b>P</b>	19,70	9,93	0,642	<b>X</b>	20,44	10,10	0,294
	<b>f</b>	20,46	9,78	0,206	<b>p</b>	18,15	6,11	0,249	<b>x</b>	19,34	8,99	0,898
<b>PTH (pg/ml)</b>	<b>F</b>	28,93	10,53	0,495	<b>P</b>	28,91	11,16	0,632	<b>X</b>	28,51	11,80	0,500
	<b>f</b>	28,28	10,69	0,340	<b>p</b>	26,97	9,96	<b>0,065</b>	<b>x</b>	28,43	10,55	0,171

### 4.3.2. Estudio del metabolismo lipídico

A continuación se ha estudiado la evolución de los parámetros del metabolismo lipídico a lo largo del estudio, incluyendo la concentración de colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL (cHDL), colesterol LDL (cLDL) y homocisteína. Para esto se ha aplicado una prueba *T de Student* para datos apareados, ya que todas las variables siguen una distribución Normal, hallándose diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de colesterol total ( $p=0,018$ ) y cLDL ( $p=0,014$ ), siendo en ambos casos las concentraciones mayores en la primera visita (Tabla 24).

**Tabla 24.** Concentración de los parámetros del metabolismo lipídico en la 1ª y 2ª visita.  
Comparación entre ambas.

Parámetro	Visita	Media	DE	Min	Max	<i>p</i>
Colesterol (mg/dl)	1ª	192,62	34,39	114	279	<b>0,018</b>
	2ª	186,40	38,84	105	275	
Triglicéridos (mg/dl)	1ª	97,95	53,98	32	311	0,311
	2ª	102,84	58,04	33	263	
cHDL (mg/dl)	1ª	60,48	20,28	25	133	0,093
	2ª	59,10	19,67	24	123	
cLDL (mg/dl)	1ª	110,33	29,68	47	186	<b>0,014</b>
	2ª	106,64	34,67	37	205	
Homocisteína (µmol/L)	1ª	11,01	2,87	2,5	19,5	0,828
	2ª	10,93	3,14	4,5	21,3	

Del mismo modo, se ha realizado una comparativa entre aquellos pacientes que reciben tratamiento con FAE clásicos y FAE de nueva generación. Se ha detectado una tendencia a la significación estadística en la concentración del triglicéridos, tanto en la visita basal como en la segunda visita, siendo mayor en aquellos pacientes en tratamiento con FAE clásicos (1ª visita: 112,59 mg/dl vs 85,84 mg/dl;  $p=0,061$ . 2ª visita: 119,68 mg/dl vs 90,09 mg/dl;  $p=0,054$ ). Sin embargo, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la evolución a lo largo del estudio de ninguno de los parámetros entre los dos grupos tras la realización del test *T de student* (Tabla 25).

**Tabla 25.** Parámetros del metabolismo lipídico en la 1ª y 2ª visita, diferenciando entre FAE clásicos y de nueva generación.

Parámetro	Visita	FAE clásicos			FAE nuevos			p
		Media	DE	Min-Max	Media	DE	Min-Max	
Colesterol (mg/dl)	1ª	196,45	32,55	127-260	185,49	34,57	114-279	0,344
	2ª	194,36	36,91	116-275	180,36	39,72	105-272	
Triglicéridos (mg/dl)	1ª	112,59	66,92	32-311	85,83	37,13	36-175	0,831
	2ª	119,68	65,54	33-263	90,09	48,88	34-261	
cHDL (mg/dl)	1ª	60,52	25,05	25-133	60,46	15,67	34-102	0,739
	2ª	58,08	23,45	24-133	59,88	16,59	36-110	
cLDL (mg/dl)	1ª	113,38	29,66	62-186	107,80	29,88	47-186	0,686
	2ª	112,20	34,65	58-205	102,42	34,62	37-184	
Homocisteína (µmol/L)	1ª	10,18	2,82	2,50-13,80	11,65	3,14	5,60-19,50	0,120
	2ª	10,90	2,99	6,40-21,30	10,95	3,29	4,50-18,60	

Adicionalmente, se han analizado los parámetros del metabolismo lipídico en función del tipo de FAE, agrupándolos en FAE inductores y no inductores enzimáticos, encontrando diferencias estadísticamente significativas en los niveles de cHDL, mayores en aquellos pacientes que siguen un tratamiento con FAE inductores enzimáticos (80,27 mg/dl frente a 56,38 mg/dl en la primera visita, y 73,20 mg/dl frente a 56,16 mg/dl en la segunda visita), con una significación estadística arrojada de la prueba *T de Student* realizada de 0,017 y 0,087 respectivamente.

En último lugar, se han analizado los parámetros del metabolismo lipídico en función del genotipo presentado respecto a los polimorfismos estudiados, encontrándose únicamente diferencias estadísticamente significativas en el polimorfismo del receptor de calcitonina (CTR-AluI). En este caso, los pacientes con genotipo homocigoto *wild type AA* presentan mayores concentraciones de cHDL ( $p < 0,001$ ) y menores de triglicéridos ( $p = 0,002$ ) que el resto de pacientes con otros genotipos. Los resultados se muestran en la siguiente tabla (Tabla 26).

**Tabla 26.** Parámetros del metabolismo lipídico en función de los genotipos del polimorfismo CTR-AluI.

Parámetro	CTR-AluI				
	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>
Colesterol (mg/dl)	AA	183,80	37,89	127-231	0,903
	Aa	191,10	24,88	154-233	
	aa	190,97	38,15	114-279	
Triglicéridos (mg/dl)	AA	58,40	24,23	35-93	<b>0,002</b>
	Aa	73,76	31,47	32-153	
	aa	116,53	58,87	44-311	
cHDL (mg/dl)	AA	91,20	34,56	46-133	<b>&lt;0,001</b>
	Aa	62,90	13,80	42-85	
	aa	55,11	17,55	25-102	
cLDL (mg/dl)	AA	80,80	19,53	62-111	<b>0,066</b>
	Aa	113,33	23,91	82-161	
	aa	112,55	31,96	47-186	
Homocisteína (μmol/L)	AA	9,68	2,66	6,1-12,6	0,311
	Aa	11,57	3,06	7,1-19,5	
	aa	10,64	2,75	2,5-17,3	

#### 4.3.3. Estudio de la función renal

Asimismo, se ha analizado la función renal de los pacientes del grupo de estudio, estudiando para ello la concentración de urea y creatinina en suero. Mediante la aplicación de una prueba *T de Student* para parámetros relacionados no existen diferencias significativas entre los datos de la primera y la segunda visita (Tabla 27), ni tampoco entre los pacientes que toman diferentes tipos de FAE, clásicos o nuevos (Tabla 28).

**Tabla 27.** Concentraciones de los parámetros de función renal en la 1ª y 2ª visita. Comparación entre ambas.

Parámetro	Visita	Media	DE	Min	Max	<i>p</i>
Urea (mg/dl)	1ª	33,86	9,32	18	61	0,448
	2ª	33,14	8,98	16	57	
Creatinina (mg/dl)	1ª	0,81	0,16	0,41	1,18	0,143
	2ª	0,83	0,17	0,36	1,36	

**Tabla 28.** Parámetros de función renal en la 1ª y 2ª visita, diferenciando entre FAE clásicos y de nueva generación.

Parámetro	Visita	FAE clásicos			FAE nuevos			p
		Media	DE	Min-Max	Media	DE	Min-Max	
Urea (mg/dl)	1ª	34,03	9,07	23-61	32,74	9,45	18-55	0,586
	2ª	34,60	8,59	18-51	32,03	9,24	16-57	
Creatinina (mg/dl)	1ª	0,78	0,16	0,41-1,10	0,84	0,17	0,56-1,18	0,796
	2ª	0,79	0,16	0,36-1,05	0,86	0,18	0,53-1,16	

Por último, se ha analizado la función renal de los pacientes en función de los posibles genotipos presentados en cada uno de los polimorfismos estudiados, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

**4.4. OBJETIVO 4:** Evaluar el estado de la masa ósea al inicio del estudio así como su evolución a lo largo del transcurso del mismo a través de la realización de una densitometría ósea mediante DEXA, calcular el riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX® y analizar la correlación de los datos obtenidos con los valores de los marcadores de remodelado óseo y con la presencia/ausencia de los polimorfismos estudiados.

**4.4.1. Evaluación del estado de la masa ósea al inicio del estudio y evolución de la misma durante el transcurso del mismo. Cálculo del riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX®.**

Para evaluar el estado de la masa ósea de cada participante en el estudio se ha realizado a cada uno de ellos una densitometría ósea mediante DEXA, tanto en la primera como en la segunda visita. El primer paso es describir la población de la que partimos y para ello analizamos los resultados de las densitometrías realizadas en la visita basal, en función del sexo y del tipo de FAE que el paciente estuviera tomando, englobando dentro del concepto FAE clásico a aquellos que toman PHE, VPA O CBZ, y como FAE nuevo a los que toman LEV, ESL o LCM. Los resultados obtenidos se resumen en la variable *T-Score*, que como ya se ha dicho previamente refleja el número de DE de la DMO con respecto al valor medio de la población de 29-30 años y del

mismo sexo, así como en la variable Z-Score, que compara la DMO del paciente frente a la DMO media de población sana de su misma edad, sexo y etnia. Para dicho análisis se realiza una prueba *T de Student* para muestras independientes. Los resultados se muestran en la Tabla 29 observando que existen diferencias estadísticamente significativas entre los hombres y las mujeres del estudio, tanto en el T como en el Z-Score, de manera que las mujeres presentan valores de DMO menores que los hombres tanto a nivel lumbar como femoral. En cuanto a la DMO de los pacientes en función del tipo de FAE que estuvieran tomando no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, aunque sí parece que aquellos que toman FAE de nueva generación presentan valores mayores de DMO tanto lumbar como femoral, siendo esta diferencia más acentuada a nivel femoral..

**Tabla 29.** Resultados de DMO expresados como T y Z-Score a nivel basal, diferenciando entre hombres y mujeres y pacientes que toman FAE clásicos (FAEc) y de nueva generación (FAEn).

	Hombres	Mujeres		FAEc	FAEn	
DMO	Media ± DE	Media ± DE	<i>p</i>	Media ± DE	Media ± DE	<i>p</i>
T-Score femoral basal	0,573 ± 1,62	-0,202 ± 1,30	<b>0,058</b>	0,197 ± 1,70	0,386 ± 1,43	0,635
T-Score lumbar basal	0,770 ± 1,79	-0,710 ± 1,19	<b>0,001</b>	0,090 ± 2,10	0,383 ± 1,42	0,532
Z-Score femoral basal	1,050 ± 1,25	0,193 ± 1,19	<b>0,015</b>	0,390 ± 1,24	0,983 ± ,122	<b>0,091</b>
Z-Score lumbar basal	1,011 ± 1,72	-0,145 ± 1,22	<b>0,012</b>	0,229 ± 1,92	0,647 ± 1,37	0,672

Teniendo en cuenta la clasificación propuesta por la OMS para estratificar el riesgo de fractura en base a los datos de DMO expresados como *T-Score* tenemos que dentro de la población de estudio hay un 81,3% de pacientes presenta una DMO normal a nivel femoral, un 15,6% presenta osteopenia y sólo un 3,1% presenta osteoporosis establecida. Si atendemos a la DMO a nivel lumbar estos porcentajes varían ligeramente, teniendo un 68,8% una DMO normal, presentando un 28,1% osteopenia y un 1,6% osteoporosis. Seleccionando únicamente a las mujeres vemos que el porcentaje de pacientes con osteopenia aumenta notablemente, alcanzando un 45,5% si tenemos en

cuenta el valor de T-Score a nivel lumbar (Tabla 30).

**Tabla 30.** Clasificación de la población de estudio según criterios de la OMS para el riesgo de fractura.

Clasificación OMS	Clasificación OMS		
	Normal (DE entre -1 y +1)	Osteopenia (DE entre -1 y -2.5)	Osteoporosis (DE < 2.5)
<b>T-Score Femoral</b>	81,3%	15,6%	3,1%
<b>T-Score Lumbar</b>	68,8%	28,1%	1,6%
<b>T-Score Lumbar mujeres</b>	50%	45,5%	4,5%

Para realizar el estudio de la evolución de la masa ósea a lo largo del estudio se ha realizado una prueba *T de Student* para muestras apareadas, quedando demostrado que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la DMO de los pacientes entre la primera densitometría y la segunda, realizada 6 meses después (Tabla 31), ni tampoco existen diferencias entre hombres y mujeres ni entre pacientes en función del tipo de FAE que tomen (FAE clásicos y nuevos) (Tabla 32).

**Tabla 31.** Valores de DMO expresados como T y Z-Score obtenidos mediante densitometría por DEXA en la 1ª y 2ª visita (DMO: densidad mineral ósea).

DMO	Media ± DE	<i>p</i>
T-Score femoral basal	0,215 ± 1,49	0,469
T-Score femoral 2ª visita	0,137 ± 1,30	
T-Score lumbar basal	0,089 ± 1,64	0,489
T-Score lumbar 2ª visita	0,138 ± 1,60	
Z-Score femoral basal	0,705 ± 1,22	0,999
Z-Score femoral 2ª visita	0,704 ± 1,11	
Z-Score lumbar basal	0,457 ± 1,58	0,446
Z-Score lumbar 2ª visita	0,396 ± 1,49	

**Tabla 32.** Diferencia de DMO entre la 1ª y la 2ª visita, expresada como T-Score femoral, diferenciando entre hombres y mujeres y por tipo de FAE.

	Media ± DS	Media ± DS		Media ± DS	Media ± DS	
DMO	Hombres	Mujeres	<i>p</i>	FAEc	FAEn	<i>p</i>
Diferencia T-Score femoral (1ª-2ª visita)	-0,208 ± 0,85	0,158 ± 0,48	<b>0,079</b>	0,006 ± 0,66	-0,135 ± 0,82	0,488
Diferencia T-Score lumbar (1ª-2ª visita)	0,072 ± 0,48	0,007 ± 0,62	0,650	0,052 ± 0,53	0,046 ± 0,54	0,969
Diferencia Z-Score femoral (1ª-2ª visita)	-0,125 ± 0,90	0,183 ± 0,56	0,193	0,072 ± 0,70	-0,059 ± 0,86	0,575
Diferencia Z-Score lumbar (1ª-2ª visita)	-0,140 ± 0,53	0,055 ± 0,54	0,229	-0,055 ± 0,47	0,065 ± 0,60	0,950

A continuación, una vez obtenidos todos los datos de la densitometría, se calcula para cada uno de los pacientes del estudio la probabilidad a diez años de sufrir una fractura de cadera (*Hip fracture*, HF) y la probabilidad de sufrir una fractura osteoporótica mayor (fractura de columna, de muñeca, húmero o cadera) mediante la herramienta informática FRAX<sup>®</sup>. Para ello se introducen todos los datos demográficos y factores de riesgo requeridos por la aplicación informática (edad, sexo, IMC, fractura previa, antecedentes de osteoporosis, fumador actual, tratamiento con glucocorticoides en los últimos tres meses) junto con los datos de DMO obtenidos. Al tratarse de una variable que no sigue una distribución Normal ha de describirse con los datos de mediana y percentiles 25 y 75, los cuales quedan recogidos en la Tabla 33.

Para comprobar si existe asociación entre el sexo o el tipo de FAE con el riesgo de fractura calculado mediante el FRAX<sup>®</sup> se utiliza la prueba *U de Mann Whitney*, exponiéndose los datos obtenidos en la siguiente tabla (Tabla 33). Se observa que el riesgo de sufrir una fractura osteoporótica mayor en mujeres es más elevado que en hombres ( $p = 0,014$ ). En cuanto al riesgo de fractura de cadera también es mayor en mujeres que en hombres, y aunque no existen diferencias sí parece haber cierta tendencia hacia la significación estadística ( $p = 0,083$ ).



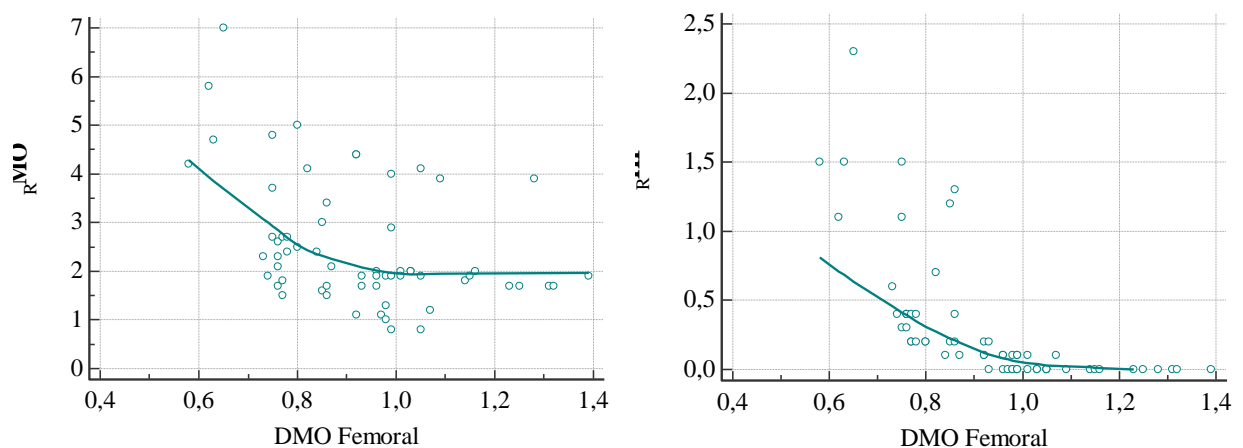
**Tabla 33.** Riesgo de fractura calculado mediante el algoritmo FRAX<sup>®</sup>, expresado en porcentaje (%), tanto de fractura de cadera (HF) como de fractura mayor osteoporótica (MO). Valores referentes al grupo en global, y diferenciando entre hombres y mujeres.

Riesgo de fracturas (%)	Mediana (Percentil 25-75)			p
	Grupo	Hombres	Mujeres	
FRAX <sup>®</sup> MO	2,0 (1,7 – 3,4)	1,9 (1,7 – 2,7)	2,45 (1,9 – 4,3)	<b>0,014</b>
FRAX <sup>®</sup> HF	0,1 (0,0 – 0,4)	0,1 (0,0 – 0,4)	0,2 (0,07-0,47)	<b>0,083</b>

Del mismo modo se ha realizado una prueba *U de Mann Whitney* para comprobar si existen diferencias entre el riesgo de fractura a diez años calculada mediante el FRAX<sup>®</sup> entre aquellos pacientes que toman FAE clásicos o de nueva generación, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Aplicando una Prueba de *Wilcoxon* se estudia si ha habido variación en cuanto al riesgo de fractura obtenido mediante el algoritmo FRAX<sup>®</sup> a lo largo de los meses del estudio, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas.

Mediante un estudio de correlaciones se estudia la asociación entre los datos de DMO obtenidos en las densitometrías y el riesgo de fractura ofrecido por el FRAX<sup>®</sup>. Los resultados se presentan en la Tabla 34 y se expresan mediante la significación estadística (*p*) y el Coeficiente de Correlación *rho* de Spearman (*r*).



**Figura 30.** Diagrama de correlación entre DMO femoral y la estimación de riesgo de fractura a diez años de fractura mayor (FRAX<sup>®</sup> MO y FRAX<sup>®</sup> HF)

**Tabla 34.** Correlación entre el riesgo de fractura calculado mediante el algoritmo FRAX<sup>®</sup>, expresado en porcentaje (%), tanto de fractura de cadera (HF) como de fractura mayor osteoporótica (MO) con las variables relacionadas con la DMO.

Parámetro	FRAX <sup>®</sup> MO	FRAX <sup>®</sup> HF
<b>DMO femoral (g/cm<sup>2</sup>)</b>	<b><i>p</i> &lt; 0,001</b> r: -0,442	<b><i>p</i> &lt; 0,001</b> r: -0,889
<b>T-Score femoral</b>	<b><i>p</i> : 0,002</b> r: -0,384	<b><i>p</i> &lt; 0,001</b> r: -0,898
<b>Z-Score femoral</b>	<b><i>p</i> : 0,006</b> r: -0,375	<b><i>p</i> &lt; 0,001</b> r: -0,694
<b>DMO lumbar (g/cm<sup>2</sup>)</b>	<i>p</i> : 0,082 r: -0,221	<b><i>p</i> : 0,001</b> r: -0,404
<b>T-Score lumbar</b>	<i>p</i> : 0,095 r: -0,212	<b><i>p</i> : 0,001</b> r: -0,402
<b>Z-Score lumbar</b>	<i>p</i> : 0,435 r: -0,112	<b><i>p</i> : 0,111</b> r: -0,226

Como puede observarse, existe una asociación significativa entre el resultado del FRAX<sup>®</sup> (riesgo de fractura tanto mayor (MO) como de cadera (HF)) y los valores de DMO a nivel femoral, siendo esta asociación negativa en todos los casos. Dicha asociación también se refleja en el T y Z-Score. En cuanto a los datos de DMO a nivel lumbar, existe una asociación, también negativa, entre los datos del FRAX<sup>®</sup> referentes a la fractura de cadera (HF) y las densitometrías, pero no con los datos del FRAX<sup>®</sup> MO.

Del mismo modo, se ha estudiado la posible correlación entre las variables clínicas consideradas factores de riesgo para la osteoporosis y los valores obtenidos mediante el la herramienta FRAX<sup>®</sup>. Los datos obtenidos se muestran en la siguiente Tabla (Tabla 35).

Atendiendo a los datos obtenidos encontramos una asociación negativa entre el valor del FRAX<sup>®</sup> para fractura osteoporótica mayor y el peso, la talla y el IMC, y cierta tendencia hacia la significación estadística entre la asociación del FRAX<sup>®</sup> y los años de diagnóstico de epilepsia. En cuanto al riesgo de fractura de cadera se aprecia una relación inversa entre el peso y la talla y el FRAX<sup>®</sup> HF y positiva entre éste y la edad del paciente.

**Tabla 35.** Correlación entre el riesgo de fractura de cadera (HF) y de fractura osteoporótica mayor (MO) calculado mediante el algoritmo FRAX®(%), con variables clínicas.

Parámetro	FRAX® MO	FRAX® HF
Edad (años)	<i>p</i> : 0,818 <i>r</i> : -0,30	<i>p</i> < <b>0,001</b> <i>r</i> : 0,527
Peso (kg)	<i>p</i> : <b>0,006</b> <i>r</i> : -0,343	<i>p</i> : <b>0,033</b> <i>r</i> : -0,269
Talla (metros)	<i>p</i> : <b>0,002</b> <i>r</i> : -0,375	<i>p</i> < <b>0,001</b> <i>r</i> : -0,462
IMC	<i>p</i> : <b>0,037</b> <i>r</i> : -0,264	<i>p</i> : 0,752 <i>r</i> : -0,041
Tiempo de diagnóstico (años)	<i>p</i> : <b>0,070</b> <i>r</i> : 0,230	<i>p</i> : 0,182 <i>r</i> : 0,170
Tiempo de tratamiento (meses)	<i>p</i> : 0,528 <i>r</i> : -0,81	<i>p</i> : 0,588 <i>r</i> : 0,069
Vitamina D (dieta)	<i>p</i> : 0,272 <i>r</i> : 0,144	<i>p</i> : 0,183 <i>r</i> : 0,174
Calcio (dieta)	<i>p</i> : 0,488 <i>r</i> : 0,091	<i>p</i> : 0,712 <i>r</i> : 0,049

#### 4.4.2. Correlación del estado de la masa ósea con los marcadores de remodelado óseo y la presencia/ausencia de los polimorfismos estudiados

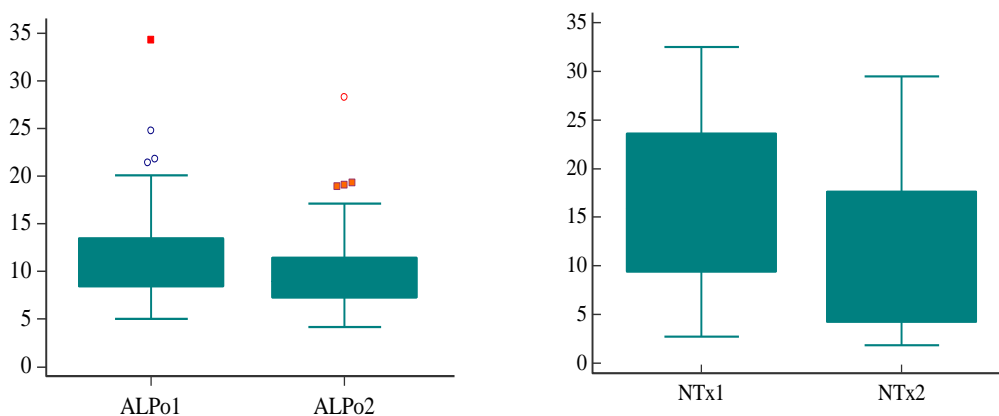
##### 4.4.2.1. Marcadores de remodelado óseo: evolución temporal y correlación con los datos de DMO obtenidos mediante densitometría.

Respecto a los marcadores bioquímicos de remodelado óseo se han estudiado como marcadores de formación la ALPo, OC y P1NP, y como marcadores de resorción ósea el  $\beta$ -Cross y NTX. Se ha analizado la diferencia de concentración de todos ellos entre la primera y la segunda visita, utilizándose para ello una prueba *T de student* para muestras apareadas. Los resultados se muestran en la Tabla 36.

**Tabla 36.** Concentraciones de los marcadores de remodelado óseo (de formación y resorción) en la 1ª y 2ª visita. Comparación entre ambas.

Parámetro	Visita	Media	DE	Min-Max	p
<b>ALPo</b> (µg/l)	<b>1ª</b>	11,63	5,08	5-34,30	<b>&lt;0,001</b>
	<b>2ª</b>	10,03	4,37	4,11-28,30	
<b>OC</b> (ng/ml)	<b>1ª</b>	21,40	8,24	8,80-45,20	0,327
	<b>2ª</b>	20,83	7,55	7,90-43,70	
<b>P1NP</b> (ng/ml)	<b>1ª</b>	51,99	22,40	5-121,50	<b>0,076</b>
	<b>2ª</b>	47,92	20,09	23,36-115,90	
<b>β-CTX</b> (ng/ml)	<b>1ª</b>	0,40	0,21	0,15-1,08	0,896
	<b>2ª</b>	0,40	0,20	0,12-0,96	
<b>NTX</b> (nM BCE)	<b>1ª</b>	16,36	7,51	2,76-32,47	<b>&lt;0,001</b>
	<b>2ª</b>	12,28	7,86	1,82-29,46	

Como puede observarse, tanto en la Tabla 36 como en la Figura 31, los valores de ALPo en la primera visita son significativamente mayores que en la segunda visita ( $p < 0,001$ ) y se observa cierta tendencia a disminuir en las concentraciones de P1NP a lo largo del estudio ( $p = 0,076$ ). En cuanto a los marcadores de resorción, encontramos también mayores concentraciones de NTX al inicio del estudio ( $p < 0,001$ ), siendo constantes las concentraciones de  $\beta$ -CTX.



**Figura 31.** Representación gráfica de los valores de ALPo y NTX en la primera y segunda visita (ALPo1 y ALPo2; NTX1 y NTX2).

A continuación, se realiza el análisis de los marcadores de remodelado óseo diferenciando entre aquellos pacientes que toman FAE clásicos o de nueva generación, mediante una prueba *T de Student*. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 37), observando que los valores iniciales de OC difieren estadísticamente entre ambos grupos, siendo menores en aquellos pacientes en tratamiento con FAE clásicos ( $p=0,036$ ). Por otro lado, los valores de P1NP obtenidos en la segunda visita son mayores en los pacientes tratados con FAE de nueva generación ( $p=0,042$ ). Asimismo, se observa cierta tendencia a la significación estadística en los valores iniciales de  $\beta$ -CTX, siendo mayores en pacientes que reciben FAE clásicos ( $p=0,082$ ).

**Tabla 37.** Parámetros de remodelado óseo, diferenciando entre FAE clásicos y de nueva generación.

Parámetro	Visita	FAE clásicos			FAE nuevos			<i>p</i>
		Media	DE	Min-Max	Media	DE	Min-Max	
ALPo ( $\mu\text{g/l}$ )	1 <sup>a</sup>	10,80	3,94	5-24,80	12,14	5,60	6,35-34,30	0,266
	2 <sup>a</sup>	9,24	3,09	4,57-17,10	10,63	5,10	4,11-28,30	0,206
OC (ng/ml)	1 <sup>a</sup>	19,12	7,13	8,80-40,38	23,38	8,51	10,57-45,20	<b>0,036</b>
	2 <sup>a</sup>	20,56	7,30	7,90-38,40	21,03	7,85	8,80-43,70	0,814
P1NP (ng/ml)	1 <sup>a</sup>	48,02	19,51	5,00-111,40	55,53	23,65	22,97-121,50	0,169
	2 <sup>a</sup>	42,26	11,28	23,42-67,51	52,21	24,08	23,36-115,90	<b>0,042</b>
$\beta$ -CTX (ng/ml)	1 <sup>a</sup>	0,35	0,14	0,15-0,73	0,44	0,24	0,17-1,08	<b>0,082</b>
	2 <sup>a</sup>	0,38	0,18	0,16-0,96	0,42	0,21	0,12-0,92	0,450
NTX (nM BCE)	1 <sup>a</sup>	15,76	7,51	3,14-29,60	16,86	7,58	2,76-32,47	0,565
	2 <sup>a</sup>	12,66	8,48	1,82-28,34	12,00	7,47	2,34-29,46	0,759

Adicionalmente, mediante una *T de Student* se ha analizado el efecto de los diferentes FAE sobre las concentraciones de biomarcadores de remodelado óseo en función de su mecanismo de acción, agrupando los pacientes en tratamiento con FAE inductores enzimáticos (CBZ, PHT, ESL), pacientes con VPA (inhibidor enzimático) y pacientes con FAE neutros (LEV y LCM) (Tabla 38).

*Tabla 38. Parámetros de remodelado óseo diferenciando entre FAE por su mecanismo de acción.*

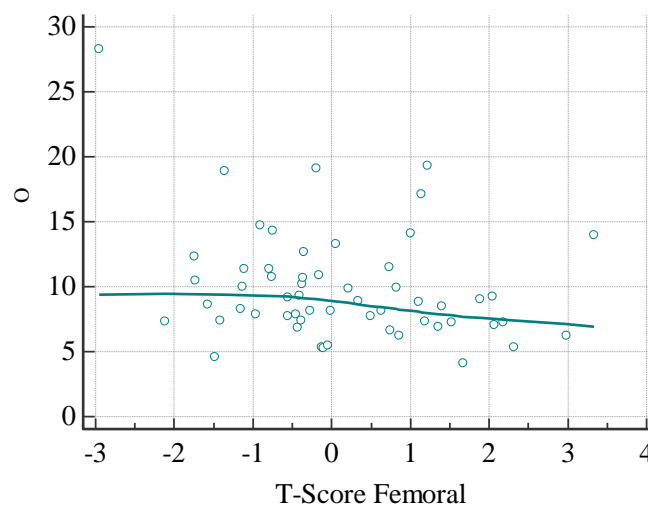
Parámetro	Visita	FAE inductores enzimáticos			LEV + LCM			VALPROICO		
		Media	DE	p	Media	DE	p	Media	DE	p
ALPo (µg/l)	1 <sup>a</sup>	12,73	4,46	<b>0,002</b>	12,26	5,92	<b>0,001</b>	9,40	3,03	<b>0,041</b>
	2 <sup>a</sup>	10,29	3,34		10,74	5,32		8,40	2,59	
OC (ng/ml)	1 <sup>a</sup>	20,62	6,67	0,383	23,21	8,81	<b>0,004</b>	18,64	8,04	0,162
	2 <sup>a</sup>	21,69	7,60		20,79	8,17		20,19	6,64	
P1NP (ng/ml)	1 <sup>a</sup>	56,73	23,19	<b>0,015</b>	55,15	23,94	0,549	41,45	15,32	0,993
	2 <sup>a</sup>	44,27	17,17		53,01	24,10		41,47	9,85	
β-CTX (ng/ml)	1 <sup>a</sup>	0,39	0,14	0,423	0,44	0,26	0,370	0,33	0,14	0,702
	2 <sup>a</sup>	0,43	0,22		0,42	0,22		0,34	0,12	
NTX (nM BCE)	1 <sup>a</sup>	15,89	8,00	0,337	16,19	7,89	<b>&lt;0,001</b>	17,33	7,91	<b>0,064</b>
	2 <sup>a</sup>	14,62	8,04		11,13	7,33		12,32	8,71	

*Tabla 39. Estudio de correlaciones entre los distintos marcadores bioquímicos de remodelado óseo.*

	ALPo	OC	P1NP	β-CTX	NTX
ALPo		r = <b>0,428</b> p = <b>0,001</b>	r = <b>0,536</b> p < <b>0,001</b>	r = <b>0,455</b> p < <b>0,001</b>	r = 0,183 p = 0,169
OC	r = <b>0,428</b> p = <b>0,001</b>		r = <b>0,667</b> p < <b>0,001</b>	r = <b>0,774</b> p < <b>0,001</b>	r = 0,224 p = 0,091
P1NP	r = <b>0,536</b> p = <b>0,001</b>	r = <b>0,667</b> p < <b>0,001</b>		r = <b>0,774</b> p < <b>0,001</b>	r = 0,052 p = 0,696
β-CTX	r = <b>0,455</b> p < <b>0,001</b>	r = <b>0,774</b> p < <b>0,001</b>	r = <b>0,774</b> p < <b>0,001</b>		r = 0,167 p = 0,211
NTX	r = 0,183 p = 0,169	r = 0,224 p = 0,091	r = 0,052 p = 0,696	r = 0,167 p = 0,211	

Como puede observarse en la Tabla 38 todos los pacientes en tratamiento con FAE, independientemente del tipo de FAE que estuvieran tomando, presentan valores significativamente más bajos de ALPo en la segunda visita. Aquellos pacientes en tratamiento con FAE inductores enzimáticos muestran además una reducción significativa de la concentración de PINP. Los pacientes en tratamiento con LEV o LCM son los que mayores diferencias presentan entre la primera y la segunda visita mostrando valores menores tanto de ALPo, como de OC y NTX. Al comparar el efecto de los distintos FAE entre sí mediante un ANOVA se ha comprobado que no existen diferencias significativas en la concentración de ninguno de los biomarcadores estudiados, por lo que el efecto que unos FAE ejercen sobre el metabolismo óseo respecto a otros es similar.

Por otro lado, se ha realizado un estudio de correlaciones entre los distintos marcadores bioquímicos de remodelado óseo entre sí y respecto a las variables de DMO obtenidas en las densitometrías. Se ha encontrado correlación positiva entre prácticamente todos los biomarcadores de remodelado óseo (Tabla 39), pero contrariamente, no se ha encontrado asociación entre los marcadores bioquímicos de remodelado óseo y los resultados densitométricos (DMO, T-Score y Z-Score), excepto entre la ALPo y el T-Score femoral ( $r = -0,270$ ;  $p = 0,042$ ) (Figura 32).

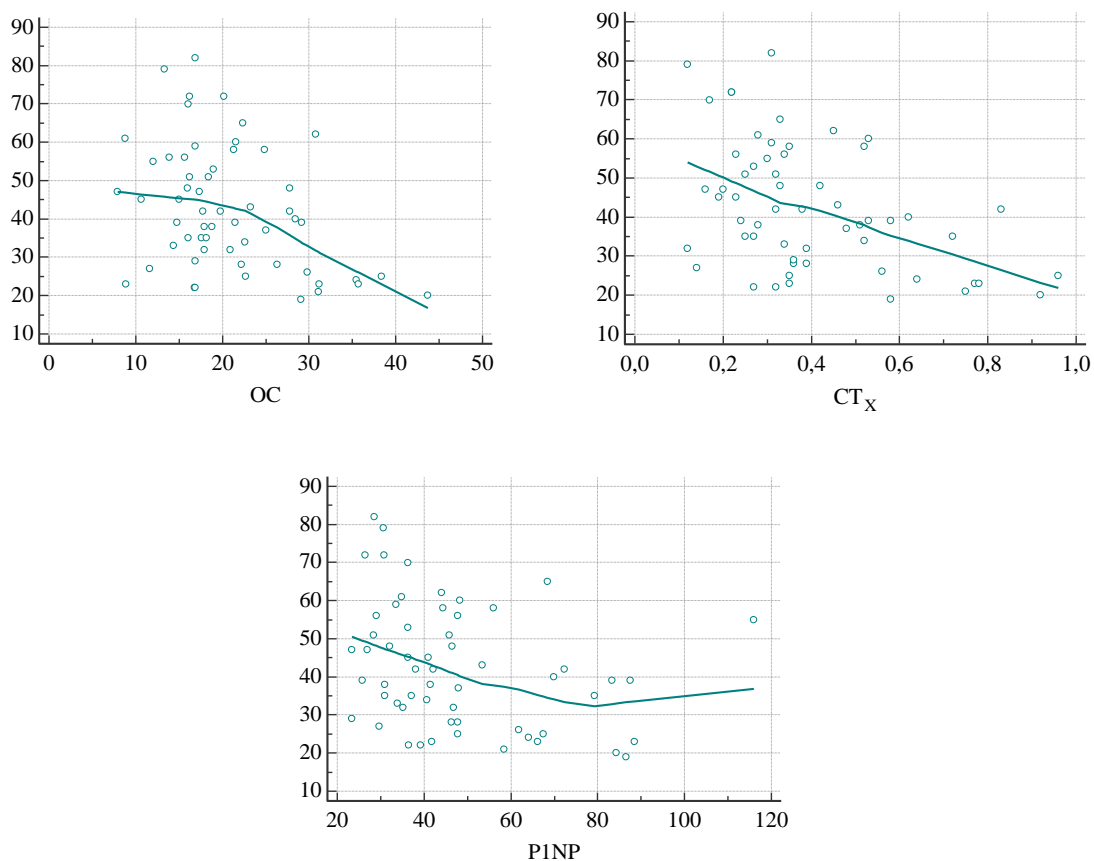


**Figura 32.** Representación gráfica de la asociación entre las concentraciones de ALPo y el T-Score femoral.

Para evaluar la asociación entre los distintos biomarcadores de remodelado óseo, tanto de formación como de resorción, y las distintas variables demográficas (edad, peso, talla, IMC) y clínicas relacionadas con la epilepsia (años de diagnóstico, años de tratamiento con FAE) de cada paciente se ha realizado un estudio de correlaciones mediante una Correlación de *Pearson*. De los resultados obtenidos únicamente destaca la asociación inversa significativa de la edad con tres de los biomarcadores estudiados (OC, P1NP y  $\beta$ -CTX) (Tabla 40 y Figura 33).

	ALPo ( $\mu\text{g/l}$ )	OC (ng/ml)	P1NP (ng/ml)	$\beta$ -CTX (ng/ml)	NTX (nM BCE)
<b>Edad (años)</b>	$r = -0,098$ $p = 0,466$	<b><math>r = -0,390</math></b> <b><math>p = 0,003</math></b>	<b><math>r = -0,300</math></b> <b><math>p = 0,022</math></b>	<b><math>r = -0,460</math></b> <b><math>p &lt; 0,001</math></b>	$r = -0,164$ $p = 0,218$

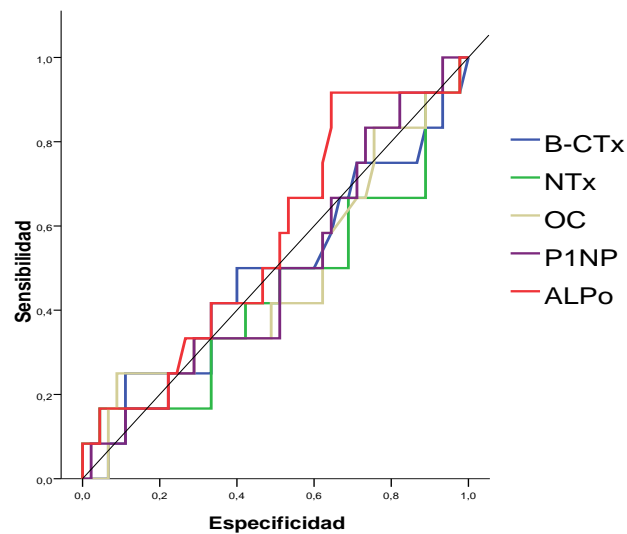
**Tabla 40.** Estudio de correlaciones entre los distintos marcadores bioquímicos de remodelado óseo.



**Figura 33.** Representación gráfica de la asociación entre la edad y diferentes marcadores bioquímicos de remodelado óseo (OC,  $\beta$ -CTX y P1NP).



A pesar de no encontrarse asociación ninguna entre los datos de DMO y las concentraciones de los biomarcadores de remodelado óseo, con el objetivo de evaluar la utilidad clínica de éstos como predictores del desarrollo de patología ósea, ya sea osteopenia u osteoporosis, frente al *gold standard* que es la densitometría ósea se han empleado curvas ROC, estudiando el área bajo la curva (AUC) y la sensibilidad y especificidad diagnósticas en aquellas variables en las que la AUC es significativa. Los resultados de muestran en la Figura 34 y la Tabla 41.



**Figura 34.** Curva ROC de los marcadores de remodelado óseo ( $\beta$ -CTX, NTx, OC, PINP y APLo) en el diagnóstico de osteopenia/osteoporosis frente a las densitometrías óseas.

**Tabla 41.** Capacidad de los marcadores de remodelado óseo para el diagnóstico de patología ósea. Valores del área bajo la curva (AUC), valor de *p* e intervalos de confianza (IC)

	AUC	Intervalo de Confianza (IC)		<i>p</i>
		Límite inferior	Límite superior	
ALPo ( $\mu\text{g/l}$ )	0,563	0,385	0,741	0,506
OC (ng/ml)	0,476	0,282	0,670	0,799
P1NP (ng/ml)	0,489	0,307	0,671	0,907
$\beta$ -CTX (ng/ml)	0,489	0,292	0,685	0,907
NTX (nMBCE)	0,444	0,247	0,642	0,557

Como puede verse, ninguno de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo parece un buen predictor de patología ósea pues todos presentan un AUC próximo a 0,5.

#### 4.4.2.2. Polimorfismos genéticos y su correlación con la DMO

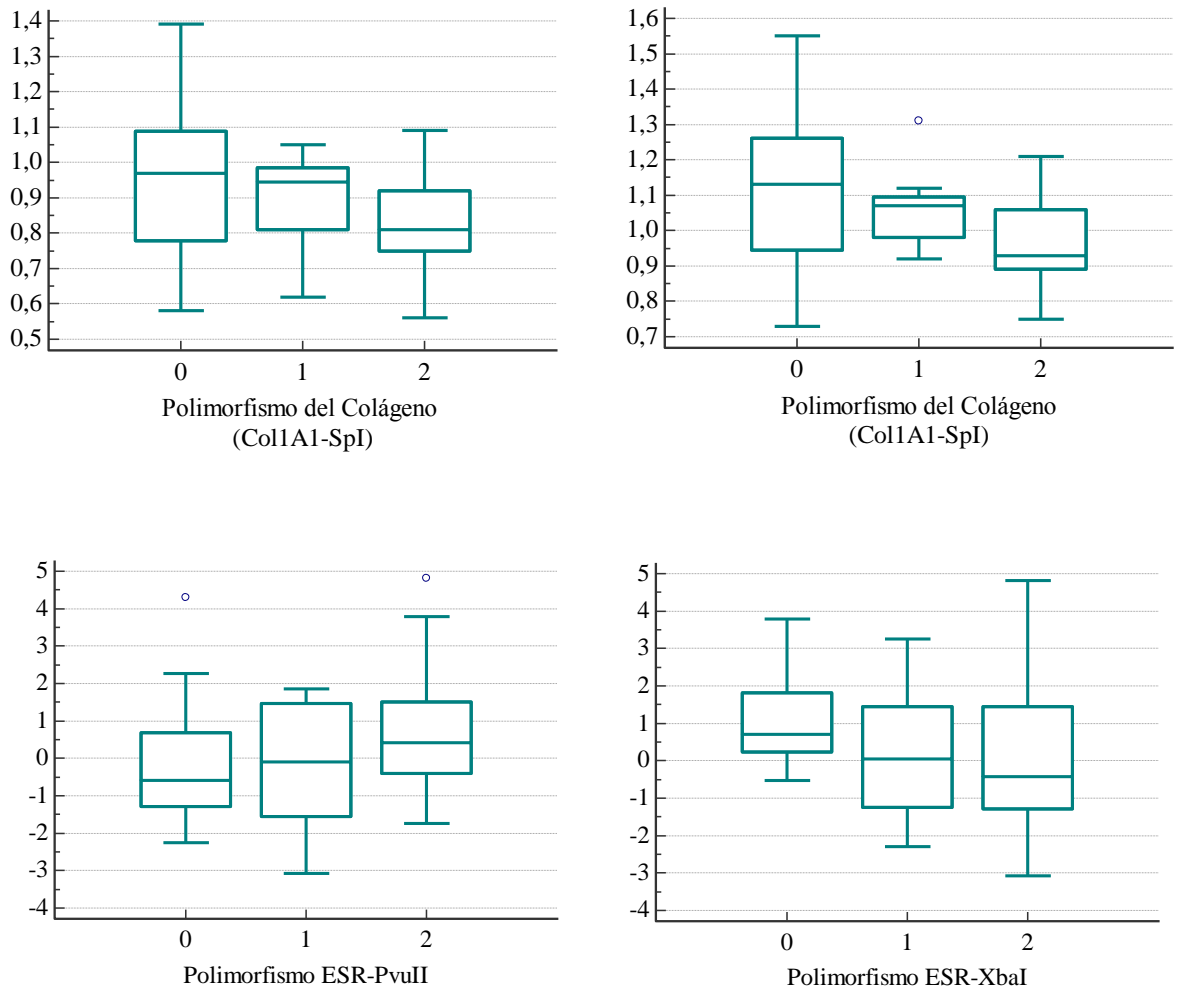
Para estudiar la influencia de los factores genéticos sobre la salud ósea de los pacientes del estudio se ha realizado un ANOVA entre distintas variables que reflejan el estado de la masa ósea obtenidas en la densitometría (DMO, Z-Score y T-Score) y los posibles genotipos posibles de cada uno de los polimorfismos estudiados.

Como se puede observar en la Tabla 42 existen diferencias significativas entre la DMO entre pacientes con distintos genotipos respecto al polimorfismo del colágeno COL1A1-Sp1 de manera que aquellos con genotipo *ss* presentan valores de DMO significativamente menores que aquellos con otros genotipos (*SS* o *Ss*), tanto a nivel lumbar como femoral (Figura 35). Además, se observa cierta tendencia hacia la significación estadística en la DMO de los pacientes con genotipo *PP* del polimorfismo ESR1-PvuII (Tabla 43), reflejando valores de DMO mayor en las densitometrías respecto al resto de pacientes (Figura 35). En cuanto al resto de polimorfismos no se observan diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con distintos genotipos, a pesar de observar pequeñas variaciones en los resultados de las densitometrías (Tablas 42 y 43).

Adicionalmente se han analizado los valores referentes a la masa ósea de cada individuo en función de la presencia/ausencia de los diferentes alelos considerados patológicos en la bibliografía y de la presencia/ausencia del polimorfismo que ha sido asociado a osteopenia/osteoporosis por diferentes autores. Coincidiendo con el análisis de los genotipos, se han encontrado valores significativamente más bajos de todas las variables densitométricas estudiadas en aquellos pacientes que presentan al menos una copia del alelo *s*: DMO lumbar 1,01 vs 1,12 ( $p= 0,021$ ); Z-Score lumbar -0,02 vs 0,93 ( $p= 0,024$ ); T-Score lumbar -0,34 vs 0,67 ( $p= 0,023$ ). También se han detectado cambios similares a nivel femoral: DMO femoral 0,85 vs 0,96 ( $p= 0,020$ ); Z-Score femoral 0,20 vs 1,04 ( $p=0,017$ ) y T-Score femoral -0,28 vs 0,71 ( $p=0,010$ ). En cuanto a la presencia/ausencia del alelo *x* del polimorfismo ESR1-XbaI se observa una tendencia a la disminución de la masa ósea a nivel lumbar en aquellos pacientes en los que hay al menos una copia de dicho alelo. Así, la DMO en estos pacientes es 1,01 frente a 1,18 de

los pacientes que carecen de él.

Por último, se ha analizado la tasa de pérdida de masa ósea durante los meses del estudio, comparando los resultados de las dos densitometrías, en función del genotipo mediante un test de ANOVA, observando que todos los pacientes tienen una tasa de pérdida de hueso similar, independientemente del genotipo que posean.



**Figura 35.** Representación gráfica de los valores de DMO ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) en función de los genotipos de algunos de los polimorfismos estudiados: COL1A1-Sp1 (0: SS; 1: Ss; 2: ss); ESR1-PvuII (0: pp; 1: Pp; 2: PP) y ESR1-XbaI (0: bb; 1: Bb; 2: BB)

**Tabla 42.** Parámetros obtenidos mediante densitometrías (DMO (g/cm<sup>2</sup>), T-Score y Z-Score) a nivel lumbar y femoral, en función del genotipo de cada uno de los polimorfismos estudiados.

Parámetro	COL1A1-Sp1					CTR-AluI					VDR-BsmI				
	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>
<b>DMO lumbar</b>	<b>SS</b>	1,12	0,22	0,73-1,55	<b>0,032</b>	<b>AA</b>	0,98	0,11	0,87-1,10	0,558	<b>BB</b>	1,03	0,15	0,77-1,26	0,719
	<b>Ss</b>	1,06	0,10	0,92-1,31		<b>Aa</b>	1,08	0,24	0,73-1,49		<b>Bb</b>	1,08	0,19	0,73-1,49	
	<b>ss</b>	0,96	0,13	0,75-1,21		<b>aa</b>	1,08	0,17	0,77-1,55		<b>bb</b>	1,09	0,21	0,87-1,55	
<b>Z-Score lumbar</b>	<b>SS</b>	0,93	1,81	-2,20-4,57	<b>0,096</b>	<b>AA</b>	-0,66	0,95	-1,53-0,49	0,294	<b>BB</b>	0,36	1,52	-2,20-2,66	0,789
	<b>Ss</b>	0,23	0,82	-,93-1,86		<b>Aa</b>	0,57	1,88	-2,20-3,66		<b>Bb</b>	0,50	1,59	-2,24-3,66	
	<b>ss</b>	-0,27	1,33	-2,24-1,72		<b>aa</b>	0,70	1,52	-2,24-4,57		<b>bb</b>	0,81	1,87	-1,35-4,57	
<b>T-Score lumbar</b>	<b>SS</b>	0,67	1,97	-3,08-4,81	<b>0,038</b>	<b>AA</b>	-0,59	1,10	-1,74-0,50	0,538	<b>BB</b>	-0,11	1,36	-2,26-1,86	0,717
	<b>Ss</b>	0,08	0,97	-1,30-2,26		<b>Aa</b>	0,34	2,13	-3,08-3,70		<b>Bb</b>	0,26	1,87	-3,08-3,78	
	<b>ss</b>	-0,70	1,21	-2,40-1,45		<b>aa</b>	0,31	1,57	-2,29-4,81		<b>bb</b>	0,42	1,78	-1,74-4,81	
<b>DMO femoral</b>	<b>SS</b>	0,96	0,20	0,58-1,39	<b>0,045</b>	<b>AA</b>	0,86	0,10	0,77-0,99	0,749	<b>BB</b>	0,85	0,12	0,62-1,03	0,296
	<b>Ss</b>	0,89	0,13	0,62-1,05		<b>Aa</b>	0,92	0,21	0,56-1,39		<b>Bb</b>	0,91	0,19	0,58-1,39	
	<b>ss</b>	0,82	0,14	0,56-1,09		<b>aa</b>	0,92	0,17	0,58-1,31		<b>bb</b>	0,96	0,19	0,56-1,31	
<b>Z-Score femoral</b>	<b>SS</b>	1,04	1,34	-1,38-3,73	<b>0,052</b>	<b>AA</b>	0,01	0,65	-0,39-0,98	0,461	<b>BB</b>	0,27	0,93	-1,34-1,43	0,498
	<b>Ss</b>	0,33	0,99	-1,34-1,67		<b>Aa</b>	0,66	1,32	-0,86-3,64		<b>Bb</b>	0,78	1,30	-1,38-3,64	
	<b>ss</b>	0,06	0,81	-0,98-1,62		<b>aa</b>	0,84	1,27	-1,38-3,73		<b>bb</b>	0,88	1,34	-0,83-3,73	
<b>T-Score femoral</b>	<b>SS</b>	0,71	1,67	-2,41-4,34	<b>0,032</b>	<b>AA</b>	-0,14	0,52	-0,61-0,54	0,683	<b>BB</b>	-0,40	1,01	-1,98-1,30	0,120
	<b>Ss</b>	-0,09	0,92	-1,98-1,30		<b>Aa</b>	0,18	1,79	-3,01-3,74		<b>Bb</b>	0,24	1,48	-2,41-3,74	
	<b>ss</b>	-0,45	1,32	-3,01-2,27		<b>aa</b>	0,42	1,50	-2,41-4,34		<b>bb</b>	0,78	1,78	-3,01-4,34	

**Tabla 43.** Parámetros obtenidos mediante densitometrías (DMO (g/cm<sup>2</sup>), T-Score y Z-Score) a nivel lumbar y femoral, en función del genotipo de cada uno de los polimorfismos estudiados (continuación).

Parámetro	VDR-FokI					ESR1-PvuII					ESR1-XbaI				
	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>
<b>DMO lumbar</b>	<b>FF</b>	1,17	0,21	0,75-1,55	0,458	<b>PP</b>	1,13	0,19	0,87-1,55	0,104	<b>XX</b>	1,18	0,17	0,98-1,49	0,175
	<b>Ff</b>	1,05	0,19	0,73-1,55		<b>Pp</b>	1,02	0,19	0,73-1,26		<b>Xx</b>	1,05	0,15	0,77-1,43	
	<b>ff</b>	1,03	0,15	0,81-1,21		<b>pp</b>	1,03	0,18	0,77-1,55		<b>xx</b>	1,05	0,22	0,73-1,55	
<b>Z-Score lumbar</b>	<b>FF</b>	0,89	1,72	-2,20-4,00	0,463	<b>PP</b>	1,14	1,63	-1,53-4,57	<b>0,062</b>	<b>XX</b>	1,44	1,32	0,15-3,66	0,249
	<b>Ff</b>	0,28	1,55	-2,24-4,57		<b>Pp</b>	0,01	1,43	-2,24-2,43		<b>Xx</b>	0,35	1,44	-2,24-3,09	
	<b>ff</b>	0,53	1,71	-2,00-2,66		<b>pp</b>	0,11	1,58	-2,20-4,00		<b>xx</b>	0,41	1,80	-2,20-4,57	
<b>T-Score lumbar</b>	<b>FF</b>	0,61	1,82	-2,40-4,31	0,426	<b>PP</b>	0,75	1,73	-1,74-4,81	<b>0,098</b>	<b>XX</b>	1,22	1,46	-0,52-3,78	0,162
	<b>Ff</b>	0,05	1,74	-3,09-4,81		<b>Pp</b>	-0,24	1,74	-3,08-1,86		<b>Xx</b>	0,77	1,41	-2,29-3,26	
	<b>ff</b>	-0,12	1,47	-2,26-1,45		<b>pp</b>	-0,16	1,65	-2,26-4,31		<b>xx</b>	0,06	2,01	-3,08-4,81	
<b>DMO femoral</b>	<b>FF</b>	0,93	0,19	0,56-1,32	0,660	<b>PP</b>	0,95	0,20	0,58-1,39	0,363	<b>XX</b>	0,96	0,21	0,58-1,39	0,649
	<b>Ff</b>	0,92	0,17	0,62-1,39		<b>Pp</b>	0,87	0,18	0,62-1,28		<b>Xx</b>	0,92	0,20	0,62-1,32	
	<b>ff</b>	0,85	0,22	0,75-1,31		<b>pp</b>	0,89	0,15	0,56-1,16		<b>xx</b>	0,90	0,16	0,56-1,23	
<b>Z-Score femoral</b>	<b>FF</b>	0,97	1,28	-1,38-3,64	0,348	<b>PP</b>	0,89	1,33	-1,38-3,73	0,611	<b>XX</b>	0,80	1,06	-1,38-2,05	0,979
	<b>Ff</b>	0,63	1,30	-1,34-3,73		<b>Pp</b>	0,44	1,46	-1,34-3,23		<b>Xx</b>	0,70	1,53	-1,34-3,64	
	<b>ff</b>	0,10	0,65	-0,66-0,89		<b>pp</b>	0,68	1,00	-0,86-2,24		<b>xx</b>	0,70	1,11	-0,86-3,73	
<b>T-Score femoral</b>	<b>FF</b>	0,32	1,52	-3,01-3,21	0,934	<b>PP</b>	0,58	1,68	-2,41-4,34	0,231	<b>XX</b>	0,49	1,56	-2,41-3,74	0,916
	<b>Ff</b>	0,32	1,50	-1,98-3,74		<b>Pp</b>	-0,30	1,42	-1,98-2,89		<b>Xx</b>	0,28	1,73	-1,98-4,34	
	<b>ff</b>	0,07	2,13	-1,45-4,34		<b>pp</b>	0,27	1,36	-3,01-2,92		<b>xx</b>	0,25	1,42	-3,01-3,56	

#### 4.4.2.3. Polimorfismos genéticos y su correlación con los marcadores de remodelado óseo

Mediante un test de ANOVA se ha analizado el posible efecto de los polimorfismos genéticos estudiados y la concentración de biomarcadores de remodelado óseo en los pacientes del estudio. De todos los datos obtenidos únicamente se muestran los estadísticamente significativos: mayor concentración de ALPo en pacientes con genotipo AA del polimorfismo CTR-AluI ( $p= 0,040$ ), mayor concentración de NTX en pacientes con genotipo PP del polimorfismo ESR1-PvuII ( $p< 0,001$ ) y menor concentración de NTX en pacientes con genotipo heterocigoto Bb para el polimorfismo VDR-BsmI ( $p< 0,001$ ) (Tabla 44).

**Tabla 44.** Concentraciones de marcadores de remodelado óseo (ALPo y NTX) en función de determinados polimorfismos (CTR-AluI, ESR1-PvuII y VDR-BsmI).

Parámetro	CTR-AluI				
	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>
ALPo (µg/l)	AA	15,28	6,75	10,20-24,80	<b>0,040</b>
	Aa	12,75	6,25	5,00-34,30	
	aa	10,36	3,34	6,13-21,40	

Parámetro	ESR1-PvuII				
	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>
NTX (nM BCE)	PP	19,81	6,39	3,33-29,60	<b>&lt;0,001</b>
	Pp	8,37	4,36	2,76-15,20	
	pp	16,80	6,77	6,58-32,47	

Parámetro	VDR-BsmI				
	SNP	Media	DE	Min-Max	<i>p</i>
NTX (nM BCE)	BB	15,82	7,86	3,69-29,60	<b>&lt;0,001</b>
	Bb	13,27	6,85	2,76-25,32	
	bb	21,76	5,32	13,24-32,47	

El resto de biomarcadores estudiados presentan variaciones discretas en función del genotipo, cuyos resultados no se presentan por no tener la suficiente evidencia estadística para tenerlos en cuenta.

---

#### **4.5. OBJETIVO 5: Establecer la combinación más adecuada de marcadores de remodelado óseo y SNPs con las variables clínicas para el diagnóstico y seguimiento de la patología ósea en pacientes epilépticos.**

Con el objetivo de elaborar un modelo que predijese la probabilidad o riesgo de desarrollar osteopenia/osteoporosis en nuestro grupo de pacientes se ha realizado un análisis de regresión logística, tomando como referencia la Odds Ratio ajustada, con un intervalo de confianza del 95%.

Para ello se consideró como variable dependiente, y objeto de estudio, la presencia de osteopenia/osteoporosis en la primera visita según los datos de DMO obtenidos en las densitometrías (T-Score), teniendo en cuenta los criterios diagnósticos de la OMS. Como variables independientes o covariables se han considerado una serie de variables demográficas y clínicas recogidas en la primera visita, así como los parámetros bioquímicos de remodelado óseo y los polimorfismos estudiados. Haciéndose combinaciones de los mismos se han elaborado diferentes modelos que finalmente se comparan para obtener el más eficiente de todos a la hora de predecir el desarrollo de la patología ósea.

Para la realización de un primer modelo de regresión logística se han incluido las variables clínicas que se consideran factores de riesgo para el desarrollo de osteoporosis: sexo, edad, Índice de masa corporal (IMC), Hipertensión arterial (HTA), Diabetes Mellitus (DM), dislipemia, consumo de tabaco, enfermedades endocrinas, antecedentes de osteoporosis y consumo de calcio (mg/día) y vitamina D (UI/día) en la dieta. Y como variables relacionadas con la epilepsia: tiempo de diagnóstico de la enfermedad en años, tiempo de tratamiento en meses y tratamiento con FAE clásicos o nuevos.

Inicialmente se ha realizado un análisis univariado incluyendo las variables anteriormente citadas y relacionándolas con la DMO a nivel femoral (Tabla 45); todas aquellas con una significación  $p > 0,15$  se descartaron al comprobar con dicho análisis que no mejoraban el rendimiento diagnóstico. Con aquellas variables con una  $p < 0,15$  se realiza un análisis multivariado de regresión logística incluyendo por tanto únicamente las variables HTA, DM, consumo de tabaco, tiempo de diagnóstico de la epilepsia y consumo de calcio y vitamina D en la dieta confirmándose que únicamente la hipertensión arterial es un factor predictor del desarrollo de osteoporosis de forma

independiente ( $p < 0,05$ ).

*Tabla 45. MODELO I: Modelo de regresión logística para el diagnóstico de osteopenia/osteoporosis, incluyendo variables clínicas y relacionadas con la epilepsia. Las variables Sexo, HTA, DM, Dislipemia, consumo de tabaco y alcohol, enfermedades endocrinas, antecedentes de osteoporosis y el tipo de FAE son variables dicotómicas (si/no).*

VARIABLE	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)	<i>p</i>
Sexo	0,90 (0,23-3,48)	0,879		
Edad (años)	1,02 (0,98-1,06)	0,236		
IMC	1,03 (0,88-1,13)	0,958		
HTA	0,16 (0,02-0,93)	<b>0,042</b>	0,05 (0,05-0,65)	<b>0,021</b>
DM	0,17 (0,22-1,41)	<b>0,103</b>	0,66 (0,05-8,20)	0,748
Dislipemia	0,54 (0,12-2,46)	0,431		
Tabaco	4,72 (0,55-39,93)	<b>0,154</b>	4,85 (0,37-62,34)	0,225
Enf. endocrinas	0,81 (0,08-8,09)	0,860		
Antecedentes osteoporosis	2,61 (0,30-22,71)	0,382		
Calcio dieta (mg)	1,00 (1,00-1,04)	<b>0,103</b>	1,00 (0,99-1,00)	0,129
Vitamina D dieta (UI)	1,00 (0,99-1,00)	<b>0,151</b>	1,00 (0,99-1,00)	0,512
Tiempo de diagnóstico (años)	1,06 (0,99-1,13)	<b>0,077</b>	1,05 (0,95-1,15)	0,315
Tiempo de tratamiento (meses)	1,00 (0,99-1,01)	0,326		
FAE clásico/nuevo	2,46 (0,64-9,46)	0,188		

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión logística se calcula la siguiente ecuación para el Modelo I:

$$\text{Logit}(p) = -3,329 - 2,825 \times \text{HTA} - 0,412 \times \text{DM} + 1,580 \times \text{Tabaco} + 0,002 \times \text{Calcio Dieta} - 0,002 \times \text{Vitamina D dieta} + 0,050 \times \text{Tiempo diagnóstico}$$

Siendo  $\text{Logit}(p) = \ln [p/(1-p)]$ , y donde  $p$  es la probabilidad de que un individuo presente la característica evaluada, es decir, la probabilidad de que un paciente presente osteopenia/osteoporosis.



Según el coeficiente de determinación de Nagelkerke obtenido ( $R^2=0,328$ ) esta ecuación predice la aparición de osteoporosis en un 32% ( $p=0,041$ ).

Asimismo, se ha estudiado el papel de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo como predictores de osteoporosis mediante la realización de un análisis univariado. Como puede verse en la Tabla 46 únicamente la ALPo se incluye en el análisis multivariado al considerarse que su inclusión puede mejorar el rendimiento diagnóstico del modelo. Finalmente vemos que tanto la HTA como la determinación de la concentración del ALPo pueden considerarse factores predictores del desarrollo de osteoporosis de forma independiente ( $p<0,05$ ) (Tabla 46).

*Tabla 46. MODELO II: Modelo de regresión logística para el diagnóstico de osteopenia/osteoporosis, incluyendo variables clínicas y marcadores bioquímicos de remodelado óseo.*

VARIABLE	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<b>HTA</b>	0,16 (0,02-0,93)	<b>0,042</b>	0,05 (0,004-0,602)	<b>0,018</b>
<b>DM</b>	0,17 (0,22-1,41)	<b>0,103</b>	0,33 (0,02-4,94)	0,425
<b>Tabaco</b>	4,72 (0,55-39,93)	<b>0,154</b>	4,82 (0,38-60,70)	0,224
<b>Calcio dieta (mg)</b>	1,00 (1,00-1,04)	<b>0,103</b>	1,00 (0,99-1,00)	0,112
<b>Vitamina D dieta (UI)</b>	1,00 (0,99-1,00)	<b>0,151</b>	1,00 (0,99-1,00)	0,895
<b>Tiempo de diagnóstico (meses)</b>	1,06 (0,99-1,13)	<b>0,077</b>	1,05 (0,94-1,16)	0,338
<b>ALPo (µg/l)</b>	1,09 (0,97-1,23)	<b>0,112</b>	1,15 (1,00-1,33)	<b>0,051</b>
<b>OC (ng/ml)</b>	1,02 (0,95-1,10)	0,493		
<b>P1NP (ng/ml)</b>	1,00 (0,97-1,03)	0,606		
<b>β-CTX (ng/ml)</b>	3,61 (0,21-61,85)	0,375		
<b>NTX (nM BCE)</b>	0,95 (0,87-1,04)	0,289		

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en este modelo de regresión logística se calcula la siguiente ecuación para el Modelo II:

$$\text{Logit}(p) = -4,261 - 3,003 \times \text{HTA} - 1,099 \times \text{DM} + 1,573 \times \text{Tabaco} + 0,003 \times \text{Calcio Dieta} + 0,001 \times \text{Vitamina D dieta} + 0,051 \times \text{Tiempo diagnóstico} + 0,145 \times \text{ALPo}$$

Según la  $R^2$  obtenida en el modelo dicha ecuación predice la aparición de osteoporosis en un 41,2% ( $p=0.017$ )

Por último se ha estudiado la capacidad de los polimorfismos relacionados con el metabolismo óseo estudiados como predictores del desarrollo de patología ósea. Para ello se realiza un análisis univariado estudiando los datos de DMO femoral obtenidos en las densitometrías y expresados como T-Score y los resultados de los polimorfismos y en función de los resultados de éste un análisis multivariado. Los resultados de ambos se muestran en la Tabla 47.

*Tabla 47. MODELO III: Modelo de regresión logística para el diagnóstico de osteopenia/osteoporosis, incluyendo variables clínicas, marcadores bioquímicos de remodelado óseo y polimorfismos óseos.*

VARIABLE	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<b>HTA</b>	0,16 (0,02-0,93)	<b>0,042</b>	0,04 (0,003-0,60)	<b>0,019</b>
<b>DM</b>	0,17 (0,22-1,41)	<b>0,103</b>	0,84 (0,048-14,92)	0,907
<b>Tabaco</b>	4,72 (0,55-39,93)	<b>0,154</b>	8,51 (0,45-158,29)	0,151
<b>Calcio dieta</b>	1,00 (1,00-1,04)	<b>0,103</b>	1,00 (0,99-1,00)	0,122
<b>Vitamina D dieta (UI)</b>	1,00 (0,99-1,00)	<b>0,151</b>	1,00 (0,99-1,00)	0,730
<b>Tiempo de diagnóstico</b>	1,06 (0,99-1,13)	<b>0,077</b>	1,05 (0,96-1,16)	0,359
<b>ALPo (µg/l)</b>	1,09 (0,97-1,23)	<b>0,112</b>	1,14 (0,97-1,33)	0,099
<b>Alelo s COL1A1-Sp1</b>	0,31 (0,08-1,23)	<b>0,098</b>	0,21 (0,030-1,60)	0,135
<b>Alelo A CTR-AluI</b>	0,78 (0,21-2,91)	0,720		
<b>Alelo P ESR1-PvuII</b>	1,68 (0,44-6,44)	0,446		
<b>Alelo x ESR1-XbaI</b>	0,48 (0,05-4,31)	0,519		
<b>Alelo B VDR-BsmI</b>	0,97 (0,18-3,37)	0,755		
<b>Alelo f VDR-FokI</b>	0,87 (0,22-3,34)	0,840		

Como puede verse en dicha tabla el estudio del polimorfismo del gen del colágeno COL1A1-Sp1 es el único que, tras realizar el análisis univariado, parece tener fuerza como factor predictor del desarrollo de osteoporosis ( $p=0,098$ ). Sin embargo, no puede considerarse buen factor pronóstico si lo consideramos de forma independiente

( $p=0,135$ ). De todas las variables estudiadas, la única que ha resultado mostrar utilidad como herramienta en la predicción de patología ósea de manera independiente es la HTA ( $p=0,019$ ).

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo III de regresión logística se calcula la siguiente ecuación:

$$\text{Logit}(p) = -4,494 - 3,146 \times \text{HTA} - 0,172 \times \text{DM} + 2,141 \times \text{Tabaco} + 0,003 \times \text{Calcio Dieta} + 0,001 \times \text{Vitamina D dieta} + 0,049 \times \text{Tiempo diagnóstico} + 0,132 \times \text{ALPo} - 1,520 \times \text{Presencia del Alelo } s \text{ COL1A1-Sp1}$$

Con dicha ecuación, y según el coeficiente de determinación obtenido ( $R^2=0,462$ ), el modelo diagnóstico elaborado podría predecir un 46% de los casos de osteopenia/osteoporosis.

Del mismo modo, se ha realizado el estudio estadístico teniendo en cuenta los datos obtenidos en las densitometrías pero a nivel lumbar. En la Tabla 48 se muestran los resultados obtenidos al realizar un análisis multivariado en el que se incluyen las variables con una  $p < 0,15$  en el análisis univariado. En este primer modelo se analiza el efecto de las variables clínicas y las relacionadas con la epilepsia sobre la probabilidad de desarrollar osteopenia/osteoporosis, confirmándose en el modelo final que tanto el sexo como el tipo de FAE (clásico/de nueva generación) que estuviesen tomando los pacientes resultaron predictores de patología ósea ( $p < 0,05$ ) y, aunque el IMC no es significativo estadísticamente, parece tener cierta fuerza predictora ( $p=0,067$ ).

**Tabla 48. MODELO IV: Modelo de regresión logística para el diagnóstico de osteopenia/osteoporosis, incluyendo variables clínicas y relacionadas con la epilepsia, teniendo en cuenta los resultados de las densitometrías a nivel lumbar.**

VARIABLE	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p
Sexo	0,23 (0,07-0,73)	<b>0,013</b>	0,21 (0,04-0,91)	<b>0,037</b>
Edad (años)	1,00 (0,97-1,04)	0,594		
IMC	0,87 (0,76-0,99)	<b>0,048</b>	0,86 (0,74-1,01)	<b>0,067</b>
HTA	0,82 (0,13-4,96)	0,837		
DM	0,39 (0,051-3,03)	0,372		
Dislipemia	0,81 (0,21-3,10)	0,759		
Tabaco	1,69 (0,47-6,03)	0,416		
Enf. endocrinas	1,75 (0,18-16,83)	0,625		
Antecedentes osteoporosis	0,81 (0,21-3,10)	0,759		
Calcio dieta (mg)	1,00 (0,99-1,00)	0,322		
Vitamina D dieta (UI)	1,03 (0,99-1,00)	0,160		
Tiempo de diagnóstico (años)	1,09 (1,02-1,16)	<b>0,009</b>	1,04 (0,97-1,12)	0,218
Tiempo de tratamiento (meses)	1,00 (0,99-1,01)	<b>0,069</b>	0,99 (0,98-1,00)	0,766
FAE clásico/nuevo	0,25 (0,08-0,79)	<b>0,019</b>	7,79 (1,44-41,91)	<b>0,017</b>

Con los coeficientes no estandarizados obtenidos en este modelo de regresión logística se ha calculado la siguiente ecuación para el Modelo IV:

$$\text{Logit}(p) = 2,345 - 1,55 \times \text{Sexo} - 0,143 \times \text{IMC} + 0,046 \times \text{Tiempo de diagnóstico} - 0,002 \times \text{Tiempo de tratamiento} + 2,053 \times \text{FAE clásico/Nueva generación}$$

Según el coeficiente de determinación de Nagelkerke obtenido ( $R^2=0,399$ ) esta ecuación predice la aparición de osteoporosis en un 39% ( $p=0,001$ ).

Asimismo, se estudia la capacidad predictora de patología ósea tanto de los marcadores bioquímicos (Tabla 49) como de los polimorfismos óseos (Tabla 50), pero en este caso estudiamos la presencia/ausencia del polimorfismo.

**Tabla 49.** Estudio de regresión logística para el diagnóstico de osteopenia/osteoporosis a nivel lumbar, incluyendo marcadores bioquímicos de remodelado óseo.

VARIABLE	UNIVARIADO	
	OR (IC 95%)	<i>p</i>
ALPo (µg/l)	1,00 (0,89-1,11)	0,976
OC (ng/ml)	0,98 (0,92-1,05)	0,713
PINP (ng/ml)	0,995 (0,97-1,02)	0,677
β-CTX (ng/ml)	0,53 (0,037-7,77)	0,645
NTX (nM BCE)	0,960 (0,89-1,03)	0,279

**Tabla 50.** Estudio de regresión logística para el diagnóstico de osteopenia/osteoporosis a nivel lumbar, incluyendo el genotipado de los polimorfismos óseos.

VARIABLE	UNIVARIADO	
	OR (IC 95%)	<i>p</i>
COL1A1-Sp1	0,31 (0,09-1,08)	<b>0,067</b>
CTR-AluI	1,64 (0,25-10,74)	0,602
ESR1-PvuII	0,40 (0,13-1,25)	<b>0,116</b>
ESR1-XbaI	0,48 (0,16-1,44)	0,192
VDR-BsmI	0,57 (0,14-2,33)	0,441
VDR-FokI	0,82 (0,13-4,96)	0,837

Como se puede observar en la Tabla 49, si tenemos en cuenta la masa ósea a nivel lumbar, ninguno de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo se puede considerar un buen predictor de patología ósea por sí sólo ni como componente dentro de un modelo al no mejorar el rendimiento diagnóstico del mismo. De los polimorfismos estudiados, tanto el polimorfismo del receptor de estrógenos ESR1-PvuII como el del colágeno COL1A1-Sp1 presentan una  $p < 0,15$  en el análisis univariado (Tabla 50) por lo que se incluyen como factores en el análisis multivariado junto con las variables clínicas sexo, IMC, tiempo de diagnóstico de epilepsia y tiempo de tratamiento y tipo de FAE. Los resultados de este se muestran a continuación (Tabla 51), viendo que tanto el sexo como el tipo de FAE y los polimorfismos COL1A1-Sp1 y ESR1-XbaI podrían considerarse herramientas útiles para predecir el desarrollo de

osteopenia/osteoporosis de una forma independiente.

**Tabla 51. MODELO V: Modelo de regresión logística para el diagnóstico de osteopenia/osteoporosis, incluyendo variables clínicas y relacionadas con la epilepsia y polimorfismos, teniendo en cuenta los resultados de las densitometrías a nivel lumbar.**

VARIABLE	UNIVARIADO		MULTIVARIADO	
	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p
Sexo	0,23 (0,07-0,73)	<b>0,013</b>	0,18 (0,03-0,93)	<b>0,041</b>
IMC	0,87 (0,76-0,99)	<b>0,048</b>	0,85 (0,71-1,02)	0,096
Tiempo de diagnóstico (años)	1,09 (1,02-1,16)	<b>0,009</b>	1,05 (0,96-1,13)	0,233
Tiempo de tratamiento (meses)	1,00 (0,99-1,01)	<b>0,069</b>	1,00 (0,99-1,01)	0,748
FAE clásico/nuevo	0,25 (0,08-0,79)	<b>0,019</b>	9,43 (1,55-57,48)	<b>0,015</b>
COL1A1-Sp1	0,31 (0,09-1,08)	<b>0,067</b>	0,17 (0,02-1,04)	<b>0,055</b>
ESR1-XbaI	2,47 (0,79-7,67)	<b>0,116</b>	11,54 (1,80-73,74)	<b>0,010</b>

A continuación se calcula la ecuación para el modelo V a partir de los coeficientes no estandarizados obtenidos en el modelo de regresión:

$$\text{Logit}(p) = 1,676 - 1,71 \times \text{Sexo} - 0,146 \times \text{IMC} + 0,069 \times \text{Tiempo de diagnóstico} - 0,001 \times \text{Tiempo de tratamiento} + 2,245 \times \text{FAE clásico/Nueva generación} - 1,763 \times \text{Presencia del polomorfismo COL1A1-Sp1} + 2,446 \times \text{Presencia del polomorfismo ESR1-XbaI}$$

Según el coeficiente de determinación de Nagelkerke obtenido ( $R^2=0,563$ ) esta ecuación predice la aparición de osteoporosis en un 56% ( $p<0,001$ ), siendo el mejor de todos los modelos elaborados.

Una vez elaborados los tres modelos para el estudio de patología ósea a nivel femoral (I, II y III), para estudiar su validez se analiza cómo se ajustan a los datos para lo cual se evalúa el grado de calibración y de discriminación de cada uno de ellos. Se realiza el test de Hosmer-Lemeshow, un test de bondad de ajuste que comprueba si el modelo

propuesto explica los resultados observados en la variable de estudio (osteopenia/osteoporosis). En nuestro caso, los tres modelos obtenidos se ajustan correctamente ( $p > 0,05$ ) (Tabla 52). Asimismo, se ha evaluado la capacidad discriminadora de los modelos mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC), obteniéndose el estadístico  $c$  (Tabla 52). Según los resultados obtenidos los tres modelos presentan capacidad discriminadora ( $p < 0,05$ ), es decir, son capaces de distinguir entre individuos en los que ocurre el evento estudiado y los que no

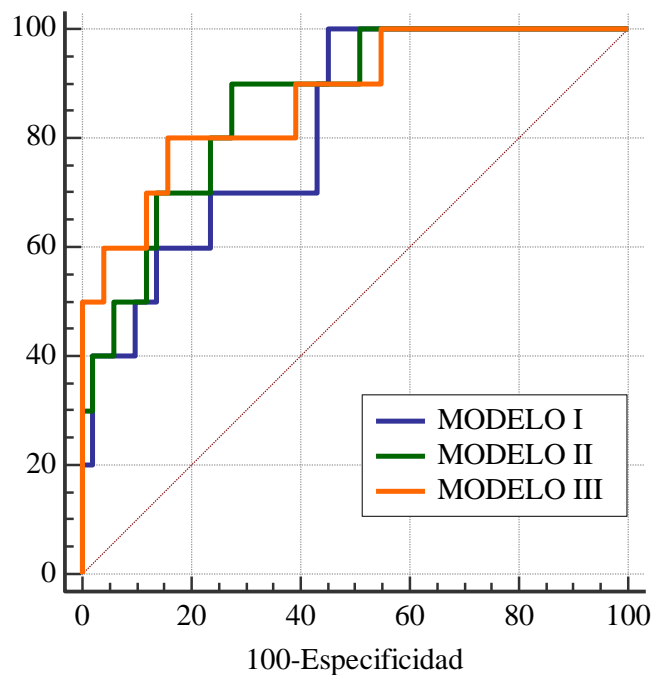
Además, se ha comparado la utilidad de los tres modelos mediante el cálculo del IDI (*Integrated Discrimination Improvement*) y la diferencia de áreas (Tabla 53). De acuerdo a los resultados obtenidos no existen diferencias significativas entre el modelo con variables clínicas, el modelo con variables clínicas y ALPo y el modelo con variables clínicas, ALPo y el polimorfismo del COL1A1-Sp1 respectivamente.

**Tabla 52.** Test de Hosmer-Lemeshow (H-L) y estadístico  $c$  de los tres modelos de regresión logística obtenidos.

Modelo	H-L	Estadístico $c$	
		AUC (IC95%)	$p$
Modelo con variables clínicas	0,619	0,818 (0,698-0,905)	<0,001
Modelo con variables clínicas y ALPo	0,764	0,865 (0,753-0,939)	<0,001
Modelo con variables clínicas, ALPo y polimorfismo COL1A1-Sp1	0,532	0,875 (0,765-0,945)	<0,001

**Tabla 53.** Diferencias de áreas e IDI al comparar los tres modelos de regresión logística.

Modelo	Diferencia de áreas		IDI	
	AUC (IC95%)	<i>p</i>	Valor (IC95%)	<i>p</i>
Modelo con variables clínicas (I) Vs Modelo con variables clínicas y ALPo (II)	0,047 (-0,050-0,145)	0,344	0,063 (-0,066-0,219)	0,258
Modelo con variables clínicas (I) Vs Modelo con variables clínicas, APLo y polimorfismo COL1A1-Sp1 (III)	0,056 (-0,045-0,160)	0,279	0,076 (-0,034-0,309)	0,104
Modelo con variables clínicas y APLo (II) Vs Modelo con variables clínicas, APLo y polimorfismo COL1A1-Sp1 (III)	0,009 (-0,040-0,060)	0,717	0,031 (-0,129-0,007)	<b>0,075</b>

**Figura 36.** Curvas ROC de los tres modelos de regresión logística obtenidos a nivel femoral.



Asimismo se ha analizado la capacidad predictora de osteopenia/osteoporosis a nivel lumbar de los modelos IV y V mediante el test de Hosmer-Lemeshow y como se puede ver en la Tabla 54 éste nos indica que ambos modelos se ajustan correctamente, es decir, explican los resultados observados en la variable de estudio (osteopenia/osteoporosis). Además, se ha calculado el AUC de los mismos comprobando que tienen una adecuada capacidad discriminadora (AUC = 0,847 y 0,901). (Figura 37)

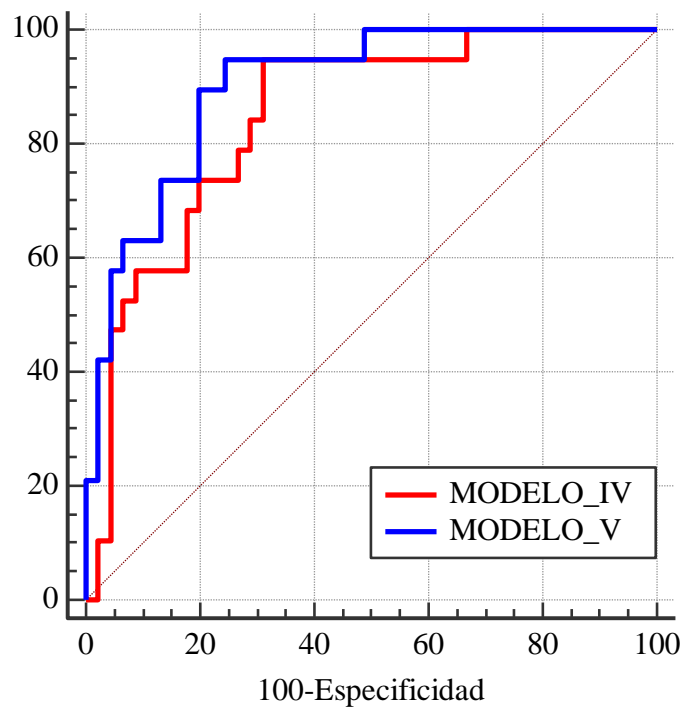
**Tabla 54.** Test de Hosmer-Lemeshow (H-L) y estadístico c del modelo V.

Modelo	H-L	Estadístico c	
		AUC (IC95%)	P
Modelo IV: Modelo con variables clínicas	0,699	0,847	<i>p</i> <0,001
Modelo V: Modelo con variables clínicas y polimorfismos (a nivel lumbar)	0,861	0,901 0,825-0,976)	<0,001

Por último, se han comparado los dos modelos obtenidos con los resultados de las densitometrías a nivel lumbar (Modelos IV y V), comparando el AUC de ambos modelos y calculando el IDI (*Integrated Discrimination Improvement*). Tal y como puede verse en la Tabla 55, no existen diferencias significativas entre los dos modelos, teniendo ambos un adecuado AUC. En la figura 37 se muestran las curvas ROC de cada uno de los modelos.

**Tabla 55.** Diferencias de áreas e IDI al comparar los dos modelos de regresión logística obtenidos a nivel lumbar.

Modelo	Diferencia de áreas		IDI	
	AUC (IC95%)	<i>p</i>	Valor (IC95%)	<i>p</i>
Modelo con variables clínicas (IV) Vs Modelo con variables clínicas y polimorfismos (V)	0,05 (-0,01-0,11)	0,10	0,045 (-0,23-(-0,056)	<b>0,002</b>



**Figura 37.** Curvas ROC de los modelos de regresión logística IV y V

## V. DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más frecuentes, presente en todas las sociedades y grupos de edad, estimando la OMS que alrededor de 50 millones de personas en todo el mundo padecen o han padecido epilepsia en algún momento de su vida. Se trata de una patología crónica con un alto impacto social y, lo que es peor, con un gran impacto sobre la calidad de vida tanto de las personas que la sufren como de sus familiares (OMS, Febrero 2017). Además, la epilepsia es uno de los trastornos neurológicos que con más frecuencia requieren atención urgente y una de los principales motivos de ingreso hospitalario, suponiendo esto un gran impacto para el sistema sanitario y económico de un país. Hay que tener en cuenta que el ingreso y/o morbilidad de los pacientes epilépticos no sólo se debe a la presencia de crisis epilépticas sino también a los accidentes derivados de ellas.

Gracias al conocimiento y grandes avances realizados en farmacología durante las últimas décadas, actualmente se dispone de una gran variedad de fármacos antiepilépticos que permiten que la mayor parte de enfermos epilépticos (70-75%) estén bien controlados, disminuyendo así la probabilidad de sufrir crisis epilépticas. Sin embargo, sigue habiendo un porcentaje no desdeñable de pacientes en los que las crisis epilépticas no cesan a pesar de seguir un tratamiento farmacológico adecuado; es lo que se conoce como epilepsia farmacorresistente, y que la ILAE ha definido en el año 2010 como aquella en la que fallan dos regímenes terapéuticos (adecuados y bien tolerados), ya sea en monoterapia o en combinación para lograr una libertad de crisis sostenida (177).

Una vez que un paciente es diagnosticado de epilepsia se debe seleccionar cuidadosamente el tipo de FAE que se le ha de administrar atendiendo al tipo de epilepsia y las características del paciente (edad, sexo, peso, comorbilidad, etc...). Esta elección resulta fundamental puesto que el tratamiento antiepiléptico deberá ser administrado durante años. El tratamiento en monoterapia parece ser más efectivo, puesto que por una parte facilita el cumplimiento del tratamiento y por otra disminuye la posibilidad de aparición de efectos adversos.

Uno de los efectos adversos más conocidos asociados a la toma de FAE son aquellos asociados a la salud ósea. La asociación entre la toma de FAE, el déficit de vitamina D y las alteraciones en la salud ósea se conocen desde 1968 e incluyen cambios en la tasa

de recambio óseo, osteoporosis, alteraciones en la calidad del hueso y, lo más importante, mayor riesgo de presentar una fractura ósea (178). Dichas alteraciones son especialmente relevantes durante la niñez puesto que esta es la etapa del desarrollo en la que se presenta mayor tasa de mineralización ósea e incrementan de dos a tres veces el riesgo de fractura. Sin embargo, la patología ósea asociada a la toma de FAE no solo se explica por el déficit de vitamina D; existen otras rutas metabólicas implicadas en la pérdida de masa ósea asociadas a los diferentes mecanismos de acción de los FAE que dan lugar a alteraciones del metabolismo óseo y que acaban dando lugar a fracturas osteoporóticas.

Los mecanismos involucrados en la alteración del metabolismo óseo en estos pacientes está relacionado no sólo con factores exógenos o de riesgo como el tratamiento antiepiléptico, el estado nutricional, la actividad física o el estado puberal, entre otros, sino también con factores endógenos como la susceptibilidad de cada individuo a padecer fracturas, o lo que es lo mismo, la susceptibilidad genética. La osteoporosis y el incremento de la mortalidad asociado a sus principales fracturas tienen tal impacto que no debería ser ignorado. El conocimiento de los factores genéticos heredables y su interacción con los agentes medio ambientales y farmacológicos pueden ser la clave de una mejor prevención y/o de la instauración de una terapia adecuada que evite el efecto final de la misma, que son las fracturas.

Por tanto, siguiendo esta línea, sería de gran utilidad para el clínico disponer de información y herramientas que le permitiesen realizar un mejor diagnóstico no sólo de la epilepsia, como patología base, sino del riesgo de pérdida de masa ósea y en su estadio final riesgo de desarrollar osteoporosis como patología asociada, pudiendo poner a su alcance la posibilidad de establecer tratamientos preventivos en aquellas personas clasificadas como de alto riesgo y disminuir, por tanto, el riesgo de fracturas osteoporóticas.

### **5.1. Análisis descriptivo de las características demográficas y clínicas de una población de pacientes epilépticos de la Región de Murcia.**

La cohorte de estudio incluida en esta Tesis Doctoral ha sido reclutada en la Unidad de Epilepsia del Servicio de Neurología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la

---

Arrixaca de Murcia, a la cual dichos pacientes acuden de manera rutinaria para el seguimiento de su patología.

El grupo de estudio, compuesto por 64 pacientes, estaba formado por 42 hombres y 22 mujeres y la media de edad global fue de 41,55 años, con un rango de edades comprendido entre los 19 y los 82 años. Lo descrito en la bibliografía en cuanto a la proporción de la epilepsia por género, tanto en España como a nivel mundial, es que no existen diferencias significativas de prevalencia de la enfermedad entre hombres y mujeres; sin embargo en nuestro grupo de estudio sí observamos un mayor predominio de hombres (65,6%) que de mujeres (34,4%), hecho que coincide con los datos publicados en 2011 por *Pato et al.* en su estudio sobre los costes de la epilepsia en España (179) así como con otros artículos de prevalencia publicados en Europa (180). Respecto a la edad, la mayor proporción de participantes tenían entre 20 y 40 años, encontrándose además un discreto aumento del número de pacientes alrededor de los 50-60 años. Nuestros datos no parecen ajustarse a la distribución bimodal descrita y aceptada por la comunidad científica, que hace referencia a dos picos de mayor frecuencia de la enfermedad, el primero en la infancia y adolescencia y el segundo alrededor de la sexta década de la vida, con un descenso durante la edad media. Este segundo pico de prevalencia de la enfermedad sólo se refleja en los países desarrollados, debido principalmente a la mayor esperanza de vida de la población respecto a los países en vías de desarrollo (181). El planteamiento de nuestro estudio presenta dos características que hacen que la distribución por edades no pueda ajustarse a una distribución bimodal; por un lado, todos los pacientes incluidos en nuestro estudio debían haber cumplido la mayoría de edad por lo que el pico presente en la infancia no puede quedar reflejado aunque sí se observa un aumento del número de pacientes próximos a la adolescencia; y por otro, a partir de los 60 años la proporción de pacientes en nuestro estudio cae bruscamente, lo cual puede ser debido a la limitación de movilidad que suelen presentar las personas de edad avanzada que les dificulta los desplazamientos y con ello la posibilidad de acudir a las visitas establecidas en nuestro estudio, tanto médicas como para la realización de densitometrías.

Todos los participantes del estudio habían sido diagnosticados de epilepsia siguiendo criterios clínicos y apoyándose en datos encefalográficos y radiológicos, clasificándose ésta en genética (21,9%), estructural (54,7%) o desconocida (23,4%) según la última clasificación de la ILAE. Esta distribución es lógica y en concordancia con lo

encontrado en la literatura si tenemos en cuenta que la causa estructural es, por el momento, la más fácil de diagnosticar mediante la realización de pruebas de imagen (182). Hasta hace pocos años en ocasiones era complicado encontrar el origen de las crisis epilépticas cuando no se hallaba una causa estructural, por lo que el número de epilepsias de causa desconocida era alto; sin embargo, el avance en el conocimiento y en las técnicas de diagnóstico genético ha ido aumentando paulatinamente el número de casos clasificados como epilepsias de origen genético, debido a la identificación del gen responsable.

Una vez diagnosticados de epilepsia, la elección del abordaje terapéutico depende del tipo de epilepsia y tipos de crisis epilépticas que se presenten, de las características individuales de cada paciente (edad, género y comorbilidades, entre otros), el mecanismo de acción de los FAE, su farmacocinética, posibles interacciones y reacciones adversas asociadas. Todos los participantes del estudio llevaban un tratamiento antiepiléptico crónico que debían estar tomando durante, como mínimo, 12 meses antes del comienzo del estudio. De los diferentes fármacos disponibles en el mercado hasta la fecha, el más ampliamente empleado por nuestros pacientes fue el Levetiracetam (46,8%), uno fármaco comercializado en nuestro país alrededor del año 2000 y clasificado como de nueva generación. Según los datos de consumo publicados por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios en Septiembre de 2017, el uso de este fármaco en nuestro país ha mostrado un aumento progresivo desde 2006 hasta finales de 2016 (26), lo cual parece responder a su buen perfil farmacocinético y pocos efectos adversos asociados (183). El levetiracetam es un FAE de amplio espectro, eficaz para el control de las crisis tanto en adultos como en niños que permite mejorar sustancialmente la calidad de vida del paciente (184). Del resto de FAE de nueva generación únicamente estaban representados en nuestro grupo de estudio el Acetato de eslicarbazepina y la Lacosamida, que en conjunto suponían un 7,9% de todos los FAE. Ambos son fármacos de reciente comercialización que solamente llevan en el mercado unos 6-7 años, periodo muy corto para que aún se haya extendido su uso entre la población. Dentro del grupo de los FAE clásicos, que en total suponen un 45,3%, el más empleado es el Ácido valproico (28,1%) y a pesar de ser menos utilizado que el Levetiracetam, sigue siendo uno de los FAE más empleados en la actualidad. Fenitoína y Carbamazepina, que en conjunto suponen el 17,2%, son FAE clásicos cada vez menos utilizados ya que a pesar de ser eficaces en su efecto



antiepiléptico van siendo sustituidos por FAE de nueva generación que, a priori, son más eficaces y llevan menos efectos adversos asociados. En esta misma línea se muestran los datos recogidos en el Área Oeste de Málaga en el año 2015 (185). A día de hoy no se puede decir que, según los estudios realizados y los datos publicados por diferentes grupos en diferentes partes del mundo, se haya logrado una mejora sustancial en el pronóstico a largo plazo de la epilepsia con los nuevos FAE, y son pocos los pacientes con crisis epilépticas que han quedado asintomáticos. Lo que sí parece haberse logrado con la aparición de los nuevos FAE es una disminución en la frecuencia de los ataques, conseguir una mayor tolerancia y seguridad y una mejora en los aspectos farmacológicos. Además parece haberse demostrado que cualquiera de los nuevos FAE, aún presentando la misma tasa de eficacia, es efectivo en segmentos diferentes de la población epiléptica (186).

Como era de esperar, tanto el tiempo de diagnóstico de la epilepsia como el tiempo de tratamiento con FAE es mayor en aquellos pacientes que están bajo tratamiento antiepiléptico con FAE clásicos que aquellos que toman FAE de nueva generación. Como se ha dicho anteriormente, los nuevos FAE han ido surgiendo durante los últimos años en un intento de evolucionar en el campo del tratamiento antiepiléptico; así, en las últimas dos décadas se han comercializado en nuestro país alrededor de quince nuevos FAE que han incrementado notablemente las opciones del tratamiento de la epilepsia gracias al conocimiento de nuevos mecanismos de acción con capacidad antiepiléptica como la inhibición de canales de sodio dependientes de voltaje (Lamotrigina, Zonisamida o Topiramato), acciones a nivel del neurotransmisor GABA (Topiramato o Vigabatrina), inhibición de canales de calcio o potasio (Levetiracetam), etc... o a la aparición de nuevos FAE diseñados como análogos o derivados de otros FAE ya existentes (187). Está comprobado que dichos FAE presentan un espectro de acción más amplio y una mejor tolerabilidad con la aparición de menos efectos secundarios graves, siendo su metabolismo, independiente de la inducción de los sistemas enzimáticos hepáticos, su mayor ventaja frente a los FAE clásicos (188). Sin embargo, hasta el momento, todos los FAE adolecen del mismo problema y es que continúan siendo fármacos que tratan la consecuencia de la epilepsia, es decir, son fármacos anti-crisis, sin que se haya demostrado impacto ninguno por el momento frente al proceso causal de las mismas, la epileptogénesis.

Uno de los efectos secundarios del tratamiento a largo plazo con FAE es la variación

del peso corporal. Varios estudios defienden la idea de que el tratamiento crónico con Ácido valproico conlleva un aumento del peso corporal debido a que produce efectos desfavorables sobre el perfil lipídico, entre ellos la disminución del colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL) y el aumento de los niveles de triglicéridos (189,190). Por el contrario, otros FAE de nueva generación como el Topiramato se asocian a una pérdidas de peso, tanto en la infancia como en pacientes adultos (191). En cuanto a otros FAE como Carbamazepina o Fenitoína hay poca información publicada y en caso de haberla es contradictoria (192) mientras que Levetiracetam o la Lamotrigina, dos de los FAE de nueva generación más extendidos, parecen tener un efecto neutro sobre el perfil lipídico y el peso corporal (193). En nuestro grupo de estudio el IMC medio (27,05) sobrepasa los límites establecidos para el normopeso (18,5-24,9), es decir, los pacientes incluidos en el estudio presentan sobrepeso aunque no llegan a alcanzar la obesidad. Sin embargo, no se puede decir que el tratamiento antiepiléptico sea responsable por sí mismo de dicho sobrepeso ya que en España un 35,7% de la población presenta sobrepeso según datos publicados en la Encuesta Europea de Salud en España en el año 2016 (194), hecho que se relaciona en primera instancia con el sedentarismo y los malos hábitos alimentarios. En la cohorte estudiada un 46,8% de los pacientes no realiza ejercicio físico o lo hace esporádicamente (Tabla 12) lo cual puede explicar el mayor IMC encontrado. Este dato es similar a la tasa de sedentarismo a nivel nacional (44,44%) según datos del año 2014, y también se ajusta a los datos publicados en 2016 referentes a la Región de Murcia (44,47%), una de las comunidades junto con Castilla La Mancha que mayor tasa de sedentarismo presenta (195). Además, se ha analizado también el comportamiento del peso corporal frente al tratamiento con diferentes FAE, y a pesar de que el IMC de aquellos en tratamiento crónico con Ácido valproico es mayor (27,68) que los que reciben FAE diferentes a éste (26,81), la diferencia encontrada no es estadísticamente significativa por lo que dicha diferencia no puede explicarse simplemente por el efecto de dicho fármaco sobre la salud, sino que debe haber otros factores que intervengan. Es posible que aunque se observe cierta diferencia de IMC el pequeño tamaño muestral haya hecho que la diferencia no sea mayor aunque sí que deje ver una mayor tendencia hacía el sobrepeso en aquellos pacientes tratados con Ácido valproico.

En cuanto a los hábitos tóxicos de los pacientes que forman el grupo de estudio, un 28,1% consumen tabaco, mientras que sólo un 3,1% consume alcohol de manera

habitual. En lo que se refiere al consumo de tabaco los datos obtenidos en nuestro grupo de estudio son ligeramente superiores a los datos oficiales publicados por el Instituto Nacional de Estadística en 2016, que cifra en un 23% el número de sujetos fumadores en toda España en el año 2014 y en un 23,95% en 2017, siendo dicha tasa mayor en hombres (27,6%) que en mujeres (18,6%) (194). Sin embargo, la Región de Murcia, junto con Extremadura, es una de las Comunidades Autónomas con una mayor tasa de fumadores (195) por lo que el porcentaje de fumadores se eleva ligeramente respecto a la media nacional, ascendiendo hasta un 25,56% en el año 2014. Estos datos, junto con el hecho de que el 65,6% de los participantes de nuestro grupo de estudio fueran hombres y por tanto, mayores consumidores de tabaco, hacen que el porcentaje de fumadores de nuestro grupo concuerde con los datos publicados y por tanto, representen adecuadamente el conjunto de la población. Respecto al consumo de alcohol, un 3,1% de los participantes admitieron consumir alcohol a dosis perjudiciales (más de 3 unidades al día o más de 21 unidades a la semana, conteniendo cada unidad unos 8 gramos de alcohol aproximadamente) porcentaje que supera la media nacional situada en un 1,6%, según datos del año 2014 (194,195). Al igual que el consumo de tabaco, el consumo de alcohol es mayor entre los hombres (2,0%) que entre las mujeres (1,2%), y a pesar de que a nivel nacional el porcentaje de riesgo de consumo de alcohol ha disminuido en España en los últimos años, los datos recogido hasta el año 2014 muestran un aumento de dicha tasa tanto en Murcia como en Extremadura (195,196). Es bien conocido que la ingesta excesiva de alcohol puede provocar la aparición de crisis epilépticas y está demostrado que el riesgo de provocar una crisis aumenta con ingestas que superan los 50 gramos de alcohol al día, siendo este efecto dosis-dependiente (197).

Diferentes autores han estudiado la relación entre la epilepsia y diferentes enfermedades autoinmunes como el Lupus eritomatoso sistémico (LES) o la Diabetes Mellitus (DM) entre otros. *Mei-Sing Ong et al* analizaron dicha asociación en más de dos millones y medio de pacientes de Estados Unidos concluyendo que aquellos pacientes con DM tipo 1 presentaban un riesgo cinco veces mayor de desarrollar epilepsia frente a la población general y que este riesgo es especialmente pronunciado en niños (198). No está claro aún el mecanismo que relaciona ambas situaciones clínicas; actualmente, las principales hipótesis que expuestas en la bibliografía encontrada plantean la posibilidad de que la aparición de la epilepsia en pacientes con enfermedades autoinmunes pueda ser debida a múltiples factores fisiológicos, entre

ellos anomalías inmunitarias, factores metabólicos, mutaciones genéticas o incluso que dicha asociación sea atribuible al componente inflamatorio de dichas enfermedades. Sin embargo, también es posible que la epilepsia, entendida como la aparición de más de dos crisis epilépticas, sea consecuencia de complicaciones vasculares a nivel central (lesiones microvasculares en el cerebro, daño cerebral focal...), comúnmente asociadas a muchas enfermedades autoinmunes, entre ellas las DM tipo 1 (199). En la cohorte estudiada en esta Tesis Doctoral, el 6,2% de los pacientes incluidos presenta DM, dato acorde con la media a nivel nacional (6,8%) publicada en distintas encuestas poblacionales (194,195). Por tanto, a pesar de lo anteriormente expuesto, en nuestra población, representativa de la población de la Región de Murcia, no parece haber relación ninguna entre la epilepsia y la DM, por lo que coincidiendo con la mayoría de autores, creemos necesario la realización de más estudios que ayuden a dilucidar la relación entre ambas condiciones.

Respecto a la tensión arterial, tan solo un 9,4% de los pacientes incluidos en nuestro estudio se consideran hipertensos, siendo este porcentaje bastante inferior a la media poblacional en España que se estima en un 42,6% según un estudio publicado en el año 2016 (200). El bajo porcentaje de pacientes hipertensos puede deberse a la media de edad del grupo (42,04 años), bastante por debajo de la edad a la que la situación de hipertensión es más frecuente. Según los datos publicados en dicho trabajo el porcentaje de pacientes con hipertensión aumenta radicalmente a partir de los 45 años, siendo hasta entonces de un 17,2%. La prevalencia es mayor en hombres que en mujeres a todas las edades hasta que se rebasan los 70 años, momento en el cual la prevalencia es mayor en mujeres que en hombres. En el trabajo previamente mencionado, que incluye más de 10.000 adultos, tan solo un 3,3% de las mujeres de entre 18 y 30 años es hipertensa, aumentando dicho porcentaje hasta un 10,0% al incluir mujeres de hasta 45 años. En los hombres dichos porcentajes aumentan, pasando de 16,7% a 27,4% en menores de 45 años (200).

---

**5.2. Determinar la frecuencia genotípica de los polimorfismos de los genes VDR, ER, CTR y COL1A1 en pacientes epilépticos y compararlas con las frecuencias genotípicas encontradas en la población general y/o en pacientes con otras patologías.**

Como ya se ha mencionado en varias ocasiones a lo largo de esta Tesis Doctoral, la osteoporosis es una patología de origen multifactorial y multigénico. Son muchos los factores de riesgo que intervienen en el desarrollo de la enfermedad y es la combinación de ellos lo que determina la severidad de la misma y la respuesta al tratamiento. Dentro de estos factores de riesgo se incluyen variantes alélicas de genes candidatos asociados a la DMO baja y otros fenotipos implicados en la patogénesis de la enfermedad. Dichos factores de riesgo genético serán transmitidos de una generación a la siguiente pero su expresión fenotípica dependerá de la interacción con otras variantes génicas y con factores ambientales. Más de mil publicaciones acerca de la genética asociada a la osteoporosis durante las últimas dos décadas avalan la importancia del tema.

Uno de los posibles factores de riesgo que puede intervenir en el desarrollo de la osteoporosis es la presencia de ciertas enfermedades asociadas, centrandose la atención en este caso en la epilepsia y el tratamiento crónico asociado a la misma. Se han considerado los siguientes genes potencialmente candidatos que podrían estar asociados a la osteoporosis en el grupo de estudio: dado que la vitamina D y las hormonas sexuales son importantes reguladores de la función de las células óseas y que su acción está mediada por receptores que actúan como mediadores transcripcionales, los genes que codifican para tales receptores han sido considerados importantes candidatos para la determinación del riesgo de osteoporosis. Los genes COL1A1 y COL1A2 (principalmente el primero) que codifican para el colágeno, principal proteína estructural del hueso, también presentan polimorfismos que en algunos fenotipos están asociados a la masa ósea. Así mismo, la calcitonina es una de las proteínas con importante función en la regulación de la función osteoclástica y, por tanto, en la resorción ósea. Por tanto, su receptor, presente de forma abundante en los osteoclastos es otro de los genes candidatos como determinantes de la masa ósea.

A continuación se hablará una a una sobre las frecuencias genotípicas de los polimorfismos estudiados en nuestra población, y se compararán los resultados obtenidos con los resultados publicados en población sana. Para comparar ambas

poblaciones se han usado en los polimorfismos VDR-BsmI, VDR-FokI, ESR1-PvuII y ESR1-XbaI los datos de la población CEU del proyecto GENOMOS 1000 que incluye sujetos residentes en el estado de Utah con antepasados europeos. Para los polimorfismos no incluidos en dicho proyecto se han usado: en el análisis del polimorfismo CTR-AluI los datos de la población europea de un metaanálisis publicado en 2015 (176) y para el polimorfismo del colágeno COL1A1-Sp1 los datos de una cohorte de Barcelona incluidos en un estudio multicéntrico (estudio GENOMOS) publicado en 2006 (72).

### **5.2.1. Polimorfismos del receptor de la vitamina D**

La vitamina D está implicada en múltiples aspectos de la fisiología humana y los polimorfismos del receptor de vitamina D (VDR) están asociados a una variedad de trastornos neuropsiquiátricos. Aunque la deficiencia de vitamina D es altamente prevalente en pacientes con epilepsia y la evidencia convergente indica un papel para ésta en el desarrollo de la epilepsia, no hay datos disponibles sobre la posible relación entre la epilepsia y las variaciones genéticas de VDR.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral revelan que las frecuencias genotípicas para el polimorfismo VDR-BsmI obtenidas en población epiléptica coinciden con las frecuencias genotípicas de la población sana, siendo el genotipo predominante el heterocigoto Bb (51,6%), seguido del genotipo homocigoto bb (31,3%) y por último, el genotipo homocigoto salvaje BB (17,2%), y aunque los porcentajes varíen ligeramente la proporción se mantiene en ambas poblaciones. Esto quiere decir que en nuestra población no se ha encontrado asociación entre el polimorfismo VDR-BsmI y la epilepsia.

Del mismo modo, estas frecuencias genotípicas concuerdan con las frecuencias genotípicas obtenidas en diferentes poblaciones de la región de Murcia que padecen determinadas patologías, tanto en una cohorte de pacientes diabéticos como en un grupo de pacientes sometidos a trasplante renal.

Teniendo en cuenta que poblaciones geográficamente distantes así como las diferentes etnias presentan variaciones considerables en cuanto a las distribuciones genotípicas de los distintos polimorfismos, se han comparado los resultados de nuestra

población con resultados de poblaciones epilépticas de otros países y/o continentes. Así pues, nuestros datos coinciden con los de otros estudios publicados en los que se llega a la conclusión de que no existe relación entre el polimorfismo VDR-BsmI y la epilepsia; sin embargo, las frecuencias genotípicas varían con respecto a los datos de otras poblaciones. En el caso de un estudio realizado en Malasia en un grupo de 87 niños de entre 4 y 18 años el genotipo predominante es el bb (66,66%) seguido del Bb (27,58%) y del BB (5,74%) (201), mientras que los resultados publicados por *Jiang et al* de su grupo de pacientes de origen chino muestran frecuencias genotípicas diferentes respecto a las recientemente citadas y respecto a las de nuestro grupo de estudio (BB: 87,8%; Bb 8,5%, bb: 3,7%) (202), pero en ningún caso encuentran asociación entre el polimorfismo y la epilepsia. Esta diferencia de frecuencias genotípicas puede deberse, como hemos dicho, a la diferencia entre las distintas etnias y zonas geográficas del mundo estudiadas.

En cuanto al polimorfismo VDR-FokI, por el momento menos estudiado que el BsmI, tampoco se ha encontrado asociación con la epilepsia siendo las frecuencias genotípicas similares a las de la población control (población CEU). En este caso el genotipo menos frecuente es el homocigoto para el polimorfismo FokI (ff: 9,4% vs 7,8%), y el más frecuente el heterocigoto (Ff: 51,6% vs 45,5%). Dicha distribución coincide también con los datos publicados en el estudio de casos/controles en población caucásica (203) y en población francesa (204). Sin embargo, en un estudio realizado en población asiática con epilepsia en el lóbulo temporal, la epilepsia focal más frecuente, sí establecen relación entre dicho polimorfismo y la enfermedad al encontrar una mayor proporción de individuos con genotipo heterocigoto Ff (57,3%) en el grupo control que en el grupo de pacientes epilépticos (41, 5%), concluyendo que dicho genotipo podría asociarse con cierta condición de neuroprotección (202). Sin embargo, al ser pocos los estudios realizados en este tipo de patología, y ser las poblaciones muy diferentes entre sí, podría ser aventurado aceptar dicha afirmación por lo que sería necesario seguir investigando en esta línea.

Al comparar los resultados de nuestra población epiléptica con resultados de población de la misma zona geográfica pero con distintas patologías encontramos diferencias notables con el grupo de pacientes trasplantados renales en los que la frecuencia del genotipo FF (60,58%) es mayor que la de genotipo heterocigoto Ff (32,69%) y que la del homocigoto para el polimorfismo ff (6,73%) (205). Esta

diferencia, no atribuible a la diferencia de procedencia del grupo de pacientes, podría suponer una diferente predisposición de los mismos frente a alguna situación relacionada con su enfermedad, ya que la vitamina D juega un papel fundamental en dichos pacientes en relación al hiperparatiroidismo secundario resultante de su disfunción renal.

En cuanto al grupo de pacientes de la Región de Murcia con DM, no se encuentran diferencias en la distribución genotípica del VDR-FokI (206).

En ninguno de los dos polimorfismos estudiados existen diferencias significativas entre sexos, siendo las frecuencias genotípicas de hombre y mujeres similares. Sin embargo, sí observamos un mayor número de hombres con genotipo homocigoto FF (47,6%) que de mujeres (22,7%).

### **5.2.2. Polimorfismos del receptor de estrógenos**

La relación entre las hormonas sexuales, la epilepsia y los fármacos anticonvulsivos es muy compleja y afecta tanto a hombres como a mujeres. A día de hoy está demostrado que las personas epilépticas presentan más frecuentemente disfunción sexual, disminución de la fertilidad, menopausia prematura y síndrome de ovario poliquístico que las personas sanas (207). Así mismo, también está descrito en la bibliografía que las hormonas sexuales femeninas y masculinas influyen en la excitabilidad neuronal de modo que pueden influir en la severidad y frecuencia de aparición de las crisis epilépticas (208). Las hormonas sexuales femeninas, progesterona y sus metabolitos, tienen mayor efecto anticonvulsivante mientras que los estrógenos son mayormente proconvulsivos. Las fluctuaciones mensuales en los niveles hormonales de estrógenos y progesterona son la base de la epilepsia catamenial, que se define como el cambio de frecuencia de crisis epilépticas que acompañan al ciclo menstrual (209).

Los mecanismos por los cuales las hormonas sexuales interfieren en la excitabilidad neuronal pueden ser mecanismos intracelulares o mecanismos mediados a través de receptores de membrana, siendo estos últimos los más relevantes en la epilepsia. Los receptores de estrógenos pueden ser de tipo  $\alpha$  o  $\beta$  (ER- $\alpha$  o ER- $\beta$ ). Se postula además que los FAE inductores enzimáticos modulan las vías de señalización de andrógenos y



estrógenos en el hipocampo dando lugar a trastornos mentales y reproductivos, hecho contrastado en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (210).

Sobre el receptor de estrógenos se han analizado dos polimorfismos ESR1-PvuII y ESR1-XbaI. En el primero de ellos (ESR1-PvuII) se han encontrado diferencias notorias en cuanto a la distribución de frecuencias genotípicas en comparación con la población sana de modo que en pacientes epilépticos el genotipo más frecuente es el homocigoto silvestre PP, presentándolo un 46,9% de la población frente a un 33,6% de los pacientes sanos de la población CEU. Por el contrario, el genotipo heterocigoto Pp es el más frecuente en la población sana (53,1%) mientras que tan solo supone un 21,9% de los pacientes epilépticos, siendo el porcentaje restante pacientes con genotipo homocigoto para el polimorfismo (31,3% en pacientes epilépticos frente al 15% en pacientes sanos).

Asimismo, se han encontrado diferencias en cuanto a las frecuencias genotípicas del polimorfismo ESR1-XbaI entre población epiléptica y población sana de manera que para esta última el genotipo más abundante es el genotipo XX suponiendo un 48,1% frente al 15,6% de la población epiléptica, invirtiéndose las proporciones en las frecuencias del genotipo homocigoto para el polimorfismo ESR1-XbaI (*xx*), presentándolo un 45,3% de los pacientes epilépticos frente a un 9,3% de los pacientes de la población CEU. El porcentaje de pacientes epilépticos con genotipo heterocigoto es similar en ambas poblaciones (39,1% de pacientes epilépticos vs 42,6% de pacientes sanos).

Todo esto nos lleva a pensar que puede existir una asociación entre dichos polimorfismos y el desarrollo de la epilepsia. Atendiendo a la bibliografía consultada es posible que estas diferencias en la distribución de frecuencias genotípicas entre ambas poblaciones tenga una explicación fisiológica. *Sundermann et al* analizaban en su metaanálisis publicado en 2010 la relación entre los polimorfismos del receptor de estrógenos y las alteraciones en cuanto a salud mental. Dichos autores analizaron los resultados de veinticinco artículos publicados entre 1995 y 2009 llegando a la conclusión de que la presencia de los alelos *p* y *x* de los polimorfismos ESR1-PvuII y ESR1-XbaI respectivamente confiere riesgo de deterioro cognitivo (211), si bien es cierto que encontraban ciertas incongruencias que los mismos autores achacaban a la diferencia de etnias analizadas en su metaanálisis. A pesar de que dicho estudio se centra en el deterioro cognitivo y no en la epilepsia, esta última es un tipo de desorden

neurrológico de modo que siguiendo la misma idea se podría explicar, en el caso del polimorfismo ESR1-XbaI, la mayor proporción del genotipo *xx* en pacientes epilépticos que le conferiría mayor riesgo de sufrir crisis epilépticas frente a la población sana. Sin embargo, no se podría explicar en base a esto la prevalencia del genotipo *PP* en sujetos epilépticos.

Cuando comparamos las frecuencias genotípicas de nuestra población con las frecuencias obtenidas en otras poblaciones próximas geográficamente observamos que dichas proporciones se mantienen en el caso de pacientes con fallo renal sometidos a trasplante (205), mientras que varían significativamente de las de la población de pacientes afectados de DM, población en la que los genotipos más frecuentes son el heterocigoto *Pp* para el polimorfismo ESR1-PvuII (54,5%) y el heterocigoto *Xx* para el polimorfismo ESR1-XbaI (50%) (206).

### 5.2.3. Polimorfismo del receptor de calcitonina

Pocos son los estudios que relacionan los efectos de la calcitonina y su receptor con la epilepsia. La calcitonina es una hormona producida por las células C del tiroides involucrada en los mecanismos de regulación de los niveles de calcio en el organismo. Distintos autores han postulado que dichos mecanismos podrían estar involucrados en la aparición crisis epilépticas con el desarrollo de convulsiones mioclónicas y que quizá, los suplementos nutricionales de calcio y vitamina D podrían ayudar a prevenirlas (212). Además, en un estudio realizado en ratas por Aksoy *et al* afirmaban que dicha hormona parece tener efecto positivo sobre el control del dolor neuropático y crónico de manera similar a cómo determinados FAE como la PGB, GBP o CBZ ejercen su efecto anticonvulsivo, de modo que podría tener un efecto positivo sobre las convulsiones (213).

En nuestro estudio, la frecuencia del genotipo *wild type* (*AA*) es la menos frecuente (7,8%), siendo el más extendido el genotipo homocigoto para el polimorfismo (*aa*: 59,4%), haciéndonos pensar que dicho polimorfismo pueda suponer alguna desventaja en pacientes epilépticos frente al genotipo silvestre a la hora de promover la aparición de convulsiones. La información frente a la que se comparan los datos de nuestra población se han obtenido de un metaanálisis realizado en el año 2015 en el que se

analizaban las frecuencias genotípicas de dicho polimorfismo en diferentes poblaciones (176). En dicho caso, la distribución de frecuencias genotípicas es similar a la obtenida en nuestro grupo de pacientes epilépticos, aunque la proporción de pacientes con el genotipo homocigoto para el polimorfismo es menor (*aa*: 40,78%), lo cual podría ser ventajoso también a la hora de controlar más adecuadamente los niveles de calcio en el organismo. El genotipo menos frecuente en ambas poblaciones es el homocigoto silvestre *AA*, suponiendo un 7,8% en la población epiléptica frente a un 14,97% en la población de referencia.

Al comparar las frecuencias genotípicas de nuestro grupo de estudio con las frecuencias del grupo de pacientes sometidos a trasplante renal de la Región de Murcia, encontramos una distribución similar aunque, coincidiendo con los datos consultados de la población de referencia, la frecuencia del genotipo homocigoto para el polimorfismo CTR-AluI (*aa*) es menor en pacientes trasplantados que en pacientes epilépticos (48,37% vs 59,4%) (205). Si tenemos en cuenta que la calcitonina es una hormona con un papel importante en la regulación de los niveles de calcio y que dicha hormona actúa a través de su receptor propio CTR es posible pensar que la presencia del polimorfismo de lugar a una regulación anormal de la concentración extracelular de dicho ión y como consecuencia se produzca una alteración en la despolarización de las membranas neuronales acabando todo esto en una despolarización excesiva de las mismas.

#### **5.2.4. Polimorfismo del gen del colágeno**

La distribución de frecuencias genotípicas del polimorfismo del colágeno COL1A1-Sp1 de la población epiléptica del estudio difiere de la distribución genotípica tanto de la población de referencia (Cohorte de Barcelona del Estudio GENOMOS) como del grupo de pacientes con enfermedad renal de la Región de Murcia sometidos a trasplante. En los tres casos el genotipo homocigoto salvaje (*SS*) es el mayoritario, siendo un 64,85% en la población de referencia de Barcelona frente a un 55,76% de la población de enfermos renales y un 59,4% de pacientes epilépticos. Sin embargo, en los dos últimos casos la proporción del genotipo *SS* se acerca más, probablemente debido a la proximidad geográfica de los pacientes incluidos en cada estudio, en ambos casos pacientes de la Región de Murcia. Por el contrario, sí se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la distribución de los genotipos heterocigoto (*Ss*) y

homocigoto para el polimorfismo (*ss*); en el caso de nuestra población de estudio el segundo genotipo más frecuente es el homocigoto “mutante” (*ss*) con un 21,9% de la población, mientras que en la población sana supone tan sólo un 4,2% y en los pacientes enfermos renales un 4,8%. Quizá esta variación polimórfica suponga alguna ventaja o desventaja para los pacientes epilépticos aunque a día de hoy aún no ha sido publicado nada al respecto y serían necesarios más estudios para poder afirmar con rotundidad que dicho polimorfismo está asociado a la enfermedad. Respecto al genotipo heterocigoto *Ss* también se encuentran diferencias notables entre las distintas poblaciones, siendo menos frecuente en los pacientes epilépticos que en los integrantes de las otras dos poblaciones.

No se encuentran diferencias significativas en cuanto al polimorfismo del colágeno COL1A1-Sp1 entre los hombres y mujeres de nuestra población de estudio.

### **5.3. Determinar la posible influencia del tratamiento a largo plazo con FAE sobre el metabolismo fosfocálcico, metabolismo lipídico y la función renal de los pacientes del estudio en función del genotipo presentado.**

Los efectos adversos de los FAE sobre la salud ósea se reportaron por primera vez en la literatura hace aproximadamente cuatro décadas y, desde entonces, un creciente número de artículos publicados relaciona la toma de dichos fármacos con un mayor riesgo de pérdida de masa ósea y enfermedad ósea metabólica, acabando en el peor de los casos en fractura ósea.

Uno de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad ósea inducida por FAE más estudiados es el déficit de vitamina D que, de hecho, se considera una de las principales causas de la pérdida de masa ósea en pacientes en tratamiento con dichos fármacos. Como ya hemos visto, varios son los mecanismos por los cuales se puede producir el déficit vitamínico asociado al tratamiento farmacológico, entre ellos el efecto inductor del CYP450 de algunos FAE ampliamente utilizados como la PHT o la CBZ que conduce a un rápido catabolismo de la vitamina D y el bloqueo de la primera hidroxilación de ésta a nivel hepático, evitando la formación de 25OH-D<sub>3</sub>. Además, los FAE inducen la expresión de la enzima 24-hidroxilasa (CYP24A1) que convierte la 1,25OH-D<sub>3</sub> en la forma inactiva soluble 1,24,25OH-D<sub>3</sub>, disminuyendo así los niveles de vitamina D biológicamente activos (149). Esta disminución de la vitamina

D activa conlleva una serie de anomalías bioquímicas del metabolismo óseo, entre ellas la hipocalcemia e hipofosfatemia y el aumento de la concentración de PTH (214–216).

Varios son los autores que reflejan el déficit vitamínico D en sus publicaciones. *Kim et al* en un estudio longitudinal realizado sobre pacientes en tratamiento con distintos FAE demostraron que el tratamiento en monoterapia con CBZ se asociaba a la disminución de la DMO acompañada de la disminución de los niveles de vitamina D, mientras que pacientes en tratamiento con otros FAE como VPA o LTG no reflejaban dicho efecto negativo sobre la salud ósea ni sobre los niveles de vitamina D (217). Asimismo, *Pack et al* encontraron efectos adversos asociados al tratamiento con PHT en un grupo de mujeres jóvenes de entre 18 y 40 años en tratamiento en monoterapia durante un año; en dichas mujeres fue detectada una disminución de la DMO junto con concentraciones más bajas de vitamina D y más altas de PTH, patrón asociado a un estado de hiperparatiroidismos secundario (218). Sin embargo, en aquellas pacientes del estudio en tratamiento con otros FAE como CBZ, LTG o VPA no se objetivaron pérdidas de masa ósea ni cambios en los patrones bioquímicos.

En nuestro estudio, no se ha podido demostrar una disminución de los niveles de vitamina D a lo largo del estudio, hecho que coincide con lo publicado por otros muchos autores, como *Fong et al.* que afirman en su último estudio publicado recientemente que el tratamiento con FAE no se asocia a disminución de las concentraciones de vitamina D y que los niveles de la misma no conllevan una mayor pérdida de masa ósea (201). Del mismo modo, otros autores no encuentran asociación entre el tratamiento a largo plazo con FAE y los niveles de vitamina D (219), encontrándose por tanto diferencias importantes en la bibliografía en lo que se refiere a este tema. Una posibilidad es que estas diferencias pudieran ser debidas no solo al efecto de los FAE sino también a las diferencias socio-demográficas de los pacientes incluidos en cada estudio; se sabe que la hipovitaminosis D puede correlacionarse con las diferentes poblaciones donde la exposición a rayos ultravioleta reducida es uno de los principales factores de riesgo. Entre dichas correlaciones destacan la estación del año y los factores culturales sobre la exposición al sol. Como ejemplo de esto es la alta prevalencia de déficit vitamínicos D en poblaciones con hábitos culturales del uso de ropas que cubren el cuerpo. En países donde la exposición al sol se considera normal o suficiente, el factor desencadenante de esta hipovitaminosis puede estar relacionado con una disminución de su consumo en la dieta; así, en países con alto grado de obesidad se

---

produce una disminución de la biodisponibilidad de la vitamina D, lo que también conlleva a la hipovitaminosis. Del mismo modo, cuanto mayor sea la pigmentación de la piel, mayor será la concentración de melanina, que actúa como barrera para la radiación ultravioleta, de donde proviene gran parte de la vitamina D (220).

En nuestro estudio vamos un paso más allá, y es que no sólo no encontramos disminución de la concentración de la vitamina D a lo largo del estudio, si no que se detecta un aumento de la misma entre la visita basal y la segunda visita. Es posible que este aumento pueda deberse a la época del año en la que fue recogida la muestra. La mayoría de pacientes del estudio fueron reclutados durante los meses de Diciembre a Marzo por lo que la primera determinación de los parámetros bioquímicos fue realizada en una época del año en la que la exposición al sol es más reducida y por tanto, la síntesis de vitamina D podría estar más limitada. Como ya se ha dicho previamente, el 90% de la producción endógena de vitamina D<sub>3</sub> se obtiene a partir de la conversión de 7-dehidrocolesterol a previtamina D<sub>3</sub> la cual, por exposición a los rayos ultravioleta del sol, sufre un proceso de isomerización no enzimática formando la vitamina D<sub>3</sub>. La segunda visita de la gran mayoría de los pacientes se realizó entre los meses de Julio y Octubre, pasados entre seis y ocho meses del inicio, periodo que abarca los meses de verano en los que debido a las altas temperaturas hay una mayor exposición al sol, tanto en tiempo como en zonas corporales expuestas, hecho que intensifica la síntesis de vitamina D<sub>3</sub> y que podría ser responsable del ligero aumento de los niveles de la vitamina hallados en los pacientes del estudio.

Pese a detectarse mayores niveles de vitamina D en la segunda visita, ni la concentración del calcio o fósforo ni la de PTH variaron respecto a la determinación basal cuando estudiamos al grupo en conjunto, manteniéndose ambas dentro de los rangos de normalidad. La concentración de fósforo urinario disminuyó a lo largo de los meses de estudio, quizá como un mecanismo de regulación para mantener las concentraciones de fósforo sérico dentro de la normalidad. Tanto la PTH como la vitamina D desempeñan papeles importantes en el desarrollo y mantenimiento de la masa ósea al participar en la homeostasis de calcio y fosfato y modular la actividad de osteoblastos y osteoclastos. Si los niveles de calcio y fósforo se encuentran dentro de niveles normales para el organismo es lógico pensar que la concentración de quien se encarga de regular su homeostasis se encuentre también dentro de rangos de normalidad, por lo que observamos que los niveles de PTH no sufrieron modificaciones

a lo largo del estudio. Nuestros datos coinciden con lo publicado por otros autores que tampoco detectaron disminución significativa de los niveles séricos de calcio y fosfato en pacientes epilépticos, incluso en aquellos en tratamiento con FAE inductores enzimáticos (221,222).

Sin embargo, al analizar los parámetros del metabolismo fosfocálcico en función de si el FAE tuviese o no efecto inductor enzimático sí encontramos diferencias notables en los niveles tanto de calcio como de vitamina D, siendo ambos más bajos en aquellos pacientes tratados con PHT o CBZ. A pesar de que el número de pacientes incluidos en este grupo es reducido y que esto pudiera limitar las conclusiones extraídas, nuestros datos coinciden con lo encontrado en la bibliografía que acepta el efecto adverso de este tipo de fármacos sobre la salud ósea asociado por un lado a su efecto inductor sobre el CYP450, que conduce a una mayor obtención de metabolitos inactivos de la vitamina D (223), y por otro a la activación del receptor X de pregnano (PRX) por algunos FAE como la PHT que promueve la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la vitamina D, entre ellos el gen de la CYP24AI (24-hidroxilasa) (224). Tan aceptado está este hecho que ya en 2011 la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) hizo una advertencia al respecto publicando en uno de sus boletines mensuales que “el uso prolongado de CBZ, PHT, PB, LMT, OXC, PRM o VPA se asocia con riesgo de disminución de la DMO que puede conducir a osteopenia y a fracturas óseas” (225).

Por último, se ha comparado la evolución de los parámetros del metabolismo fosfocálcico a lo largo del estudio agrupando los pacientes en función del tratamiento que estuvieran siguiendo, con FAE clásicos o de nueva generación, siendo el único parámetro que difiere entre ellos la concentración sérica de calcio. Aunque en ambos casos los niveles de calcio están dentro de la normalidad al inicio del estudio (9,62 mg/dl en pacientes con FAE clásicos y 9,74 mg/dl en pacientes tratados con FAE de nueva generación) la disminución a lo largo del mismo en aquellos pacientes en tratamiento con FAE de nueva generación es mayor, pasando de 9,74 mg/dl a 9,61 mg/dl en la segunda visita. Aunque estas cifras están lejos de acercarse a rangos de hipocalcemia podrían estar revelando un efecto secundario de este tipo de fármacos sobre el metabolismo fosfocálcico que podría agudizarse con el tiempo, ya que hay que tener en cuenta que el periodo de estudio en nuestro caso ha sido relativamente corto (seis meses). Sin embargo, la mayoría de artículos publicados respecto a los nuevos

---

FAE no relacionan el tratamiento con fármacos de este grupo, como LEV o LCM, con hipocalcemia o disminución de la calcemia a lo largo del tratamiento (167,226).

Para el estudio de la función renal de los pacientes del estudio se han determinado los niveles séricos de Urea y Creatinina, estando ambos parámetros dentro de los rangos de normalidad tanto el comienzo del estudio como en la segunda visita (Tabla 26), dato que nos hace pensar que el tratamiento farmacológico no causa ningún tipo de efectos secundarios sobre la función renal. A pesar de que distintas guías sobre la práctica clínica en epilepsia contemplan la aparición de ciertos efectos adversos a este nivel, tales como el desarrollo de litiasis renal (18), y que algunos autores asocian el uso de FAE a alteraciones estructurales y funcionales de los riñones (227) ninguno de los pacientes incluidos en nuestro estudio ha presentado afectación a nivel renal a lo largo del estudio. Del mismo modo, el estudio comparativo entre pacientes en función del FAE que estuvieran tomando no ha reflejado diferencia alguna entre el efecto de estos sobre la función renal (Tabla 27), mostrando que tanto FAE clásicos como de nueva generación son seguros a este nivel. Los pocos artículos publicados sobre este tema hacen referencia principalmente al tratamiento con TPM, relacionándolo con un mayor riesgo de desarrollar urolitiasis (228,229); sin embargo, ninguno de los pacientes incluidos en nuestro estudio reciben dicho tratamiento por lo que no nos ha sido posible realizar ningún tipo de afirmación al respecto. En la enfermedad renal las alteraciones óseo-metabólicas son secundarias a la pérdida progresiva de masa renal y función renal, que conlleva una retención de fósforo y descenso de los niveles de 1,25OH-D<sub>3</sub>, responsables de la resistencia esquelética a la acción de la PTH.

La terapia a largo plazo con FAE se asocia a una amplia gama de efectos adversos crónicos poco conocidos, que incluyen alteraciones metabólicas y endocrinas, entre ellas el aumento del riesgo de aterosclerosis. Algunos autores afirman que FAE inductores enzimáticos como CBZ o PHT ejercen potentes efectos sobre el CYP450, en concreto, sobre una de las proteínas de esta superfamilia denominada CYP51A1 involucrada en la biosíntesis del colesterol humano. Además, la CBZ estimula la síntesis hepática de colesterol e incrementa la formación de los ácidos biliares, que a su vez elevan la absorción del colesterol facilitando la formación de micelas (230). Asimismo está descrito que los niveles de homocisteína, un intermediario clave en el metabolismo de la metionina, aumentan en aquellos pacientes en tratamiento crónico con determinados FAE al disminuir la concentración de ácido fólico. Los mecanismos



propuestos para explicar dicho agotamiento de ácido fólico incluyen la interferencia de la absorción intestinal del mismo al aumentar los niveles de pH así como en su transporte a los tejidos y la inducción microsomal hepática que conlleva un aumento de su catabolismo (152,231). Todo esto conlleva ciertas alteraciones sobre parámetros del metabolismo lipídico como el aumento de colesterol total, cLDL y triglicéridos o los niveles séricos de homocisteína (193,232), aumentando sustancialmente con ello el riesgo aterogénico de los pacientes en tratamiento con FAE. *Belcastro et al* demostraron además que otros FAE de nueva generación como OXC o TPM conducen también a un aumento de los niveles de homocisteína en sangre y que, por tanto, el tratamiento a largo plazo con dichos FAE se asocia a un mayor riesgo cardiovascular (233). Sin embargo no se ha podido demostrar que el efecto del VPA u otros FAE de nueva generación como LEV o LTG se asocie igualmente a una alteración del perfil lipídico (234,235).

Pese a los datos encontrados en la literatura, en nuestro grupo de estudio ha quedado demostrada una disminución significativa de los niveles tanto de colesterol total (que pasó de 192,62 mg/dl a 186,40 mg/dl) como de cLDL (de 110,33 mg/dl a 106,64 mg/dl) a lo largo de los meses del estudio (Tabla 24), contrario a lo que cabría esperar. Como ya hemos visto, el efecto sobre el metabolismo lipídico en pacientes en tratamiento antiepiléptico está bien descrito y con una clara asociación en aquellos pacientes en tratamiento con PHE, CBZ y OXC (236); sin embargo, hay pocos estudios referentes a otros FAE y los que hay demuestran que dichos FAE no afectan a los niveles de Colesterol total, cHDL, cLDL o triglicéridos, coincidiendo con los datos obtenidos en nuestro grupo de estudio (237,238). En nuestro caso solo una minoría de pacientes está en tratamiento con FAE como PHE o CBZ, estando la mayoría tratados con LEV o VPA, por lo que es posible que debido a esto nuestros datos no reflejen ninguna alteración patológica del perfil lipídico. Por otra parte, estudiando los parámetros del perfil lipídico en aquellos pacientes en tratamiento con FAE inductores enzimáticos hemos observado un aumento de cHDL en comparación con los pacientes tratados con FAE no inductores. Debido al bajo número de pacientes en tratamiento con dichos FAE y a que contradice todo lo encontrado en la bibliografía al respecto, podríamos considerar este hallazgo como casual, sin tener ninguna relación con los efectos del tratamiento antiepiléptico.

Dada la importancia de los factores genéticos sobre el desarrollo de una adecuada masa ósea durante la infancia y la juventud y el mantenimiento de la misma a lo largo de la vida se ha analizado la posible influencia de distintos polimorfismos sobre el metabolismo fosfocálcico, ya sea sobre la regulación de los niveles de calcio y fósforo así como de los componentes moduladores de este, vitamina D y PTH. De entre los polimorfismos estudiados cabe destacar el polimorfismo del receptor de la vitamina D, VDR-BsmI; aquellos pacientes con genotipo *wild type BB* presentan mayores concentraciones de calcio sérico que los pacientes que presentan genotipo heterocigoto u homocigoto mutante, dato que se correlaciona con los mayores niveles de vitamina D en dichos pacientes (aunque la diferencia en los niveles de vitamina D entre genotipos no llega a ser estadísticamente significativa). Nuestros resultados no concuerdan con lo publicado sobre el polimorfismo del fragmento de restricción BsmI del VDR en pacientes epilépticos en los que se asocia la presencia de al menos un alelo *B* con niveles séricos más bajos de vitamina D en comparación con aquellos pacientes con genotipo *bb*, a la vez que presentan cierta tendencia al hiperparatiroidismo (173). El VDR es un factor de transcripción que regula la expresión de los genes responsables de su actividad biológica y que, por tanto, desempeña un papel importante en la regulación de la homeostasis del calcio a través de la unión y la translocación nuclear de  $1,25\text{OH}_2\text{D}_3$ , que afecta la resorción ósea y aumenta la absorción intestinal de calcio. En esta misma línea, los pacientes con genotipo *BB* son los que presentan concentraciones menores de PTH, reflejando una homeostasis adecuada del metabolismo fosfocálcico en dichos pacientes lo cual podría suponer cierta ventaja evolutiva frente a pacientes epilépticos con otros genotipos, en un intento de mantener concentraciones adecuadas de calcio y fósforo que posibiliten una adecuada mineralización ósea. Este hallazgo difiere a lo encontrado por *Howard et al.* que describieron niveles más elevados de PTH en mujeres premenopáusicas caucásicas con genotipo *BB* (239) o a lo publicado por *Garnero et al* que también encontraron valores ligeramente superiores de PTH en su cohorte de estudio, que incluía más de 650 mujeres postmenopáusicas (204). Nuestros resultados podrían seguir la idea de *Morrison et al.* que afirman en su publicación que el alelo *b* se asocia con niveles más bajos de ARNm del VDR por disminución de la transcripción y la estabilidad del mensajero. Así, niveles menores de VDR en la paratiroides de los individuos *bb* contribuyen a una peor respuesta a la  $1,25\text{OH-D}_3$  o calcitriol y por lo tanto favorecen la hiperplasia de la glándula y los niveles séricos más elevados de PTH (51).

Del resto de polimorfismos estudiados hemos encontrado diferencias significativas entre pacientes con distintos genotipos en el polimorfismo PvuII del receptor de estrógenos de manera que aquellos con genotipo *PP* tienen una mayor concentración de PTH que el resto de pacientes, así como niveles ligeramente menores de calcio y mayores de vitamina D (Tabla 25). El proceso de remodelado óseo está marcadamente regulado por los estrógenos ováricos, que inhiben la resorción ósea directamente a través de los receptores ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  en el hueso, o mediante la inhibición de las citocinas osteoresortivas como la Il-1 o el TNF $\alpha$ . Podemos pensar entonces que aquellos pacientes con genotipo *PP* tienen cierta tendencia hacia un estado de hiperparatiroidismo respecto al resto de pacientes. En nuestro caso es posible que el aumento de los niveles de PTH y vitamina D, hormonas reguladoras del metabolismo fosfocálcico, sea un paso previo al estado de hipercalcemia característico del hiperparatiroidismo y que acabe conduciendo a una alteración del metabolismo óseo y finalmente al desarrollo de osteoporosis (240). Algunos autores han descrito la asociación entre el genotipo *PP* y la mayor pérdida de masa ósea en mujeres sanas postmenopáusicas (241) aunque son varias las publicaciones que reflejan la ausencia de relación entre la DMO y el metabolismo fosfocálcico y el genotipo ESR1-PvuII (58,242). Estas discrepancias pueden deberse a los diferentes diseños de cada uno de los estudios, el tamaño muestral insuficiente y la inclusión de poblaciones heterogéneas en cada cohorte estudiada. Por el momento, no se ha descrito asociación ninguna entre el polimorfismo ESR1-PvuII y el metabolismo fosfocálcico en pacientes epilépticos.

Los factores que afectan el metabolismo lipídico generalmente se clasifican como exógenos o endógenos. Los factores exógenos incluyen la dieta, el ejercicio y factores iatrogénicos y los factores endógenos incluyen factores genéticos y alteraciones enzimáticas u hormonales. Algunos autores afirman que tanto PTH como calcitonina pueden participar en el metabolismo de los lípidos. Parece ser que la PTH estimula la lipólisis (243) y eleva el nivel de colesterol en animales de experimentación, comprobándose por otro lado que la paratiroidectomía disminuye el nivel de colesterol en pacientes con enfermedad renal crónica (244,245). La calcitonina, además de participar en la regulación del metabolismo fosfocálcico, inhibe la lipólisis inducida por la PTH en los tejidos adiposos de animales de experimentación (246). Además, estudios tanto in vitro como in vivo demostraron que la calcitonina disminuía los niveles de colesterol sérico y triglicéridos (247). Nuestros resultados se pueden englobar en esta

---

línea, asumiendo que el genotipo *wild type* AA del receptor de calcitonina promueve un efecto beneficioso de la calcitonina sobre el metabolismo lipídico que acaba dando lugar a la disminución significativa del nivel de triglicéridos y al aumento del cHDL en pacientes con dicho genotipo, siendo ambos hallazgos beneficiosos desde el punto de vista de desarrollo de riesgo cardiovascular. Sin embargo, es poco lo publicado en la bibliografía acerca de este concepto, por lo que serían necesarios más estudios que permitieran establecer dicha asociación.

**5.4. Evaluar el estado de la masa ósea al inicio del estudio así como su evolución a lo largo del transcurso del mismo a través de la realización de una densitometría ósea mediante DEXA, calcular el riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX® y analizar la correlación de los datos obtenidos con los valores de los marcadores de remodelado óseo y con la presencia/ausencia de los polimorfismos estudiados.**

Los efectos adversos del tratamiento crónico con FAE tienen un gran impacto sobre la calidad de vida del paciente y contribuyen de manera considerable al fracaso del tratamiento. Uno de los principales efectos indeseables del uso de FAE a largo plazo es la aparición de efectos metabólicos significativos en el hueso. Es muy importante tener conocimiento de este posible efecto adverso ya que en la mayoría de los casos comienza a desarrollarse de manera subclínica durante un tiempo prolongado y puede tardar años en manifestarse clínicamente hasta el momento en el que aparece la fractura osteoporótica.

**5.4.1. Evaluación de la DMO mediante densitometrías**

Diversos estudios publicados a lo largo de los últimos años han estudiado el metabolismo óseo y el riesgo de fracturas asociado al tratamiento crónico con FAE. Muchos de ellos sugieren que aquellas personas en tratamiento con FAE pueden presentar un mayor riesgo de enfermedad ósea, incluidos cambios en el turnover o recambio óseo, osteoporosis, alteraciones en la calidad ósea y, lo más importante, fractura ósea. Sin embargo, a pesar de esta creciente evidencia que asocia la epilepsia y el uso de FAE con la enfermedad ósea, se siguen publicando artículos con resultados

controvertidos y por el momento no hay consenso sobre quién y cuándo evaluar, así como a quién y cómo tratarlo.

La densitometría ósea es, a día de hoy, la técnica por imagen de elección en el estudio de la masa ósea y el diagnóstico de la osteoporosis. Así pues, a través de la realización de una densitometría mediante DEXA se ha evaluado la masa ósea de todos los pacientes incluidos en nuestro estudio. A continuación, y atendiendo a las recomendaciones de la OMS para estratificar el riesgo de fractura en función del T-Score obtenido, se ha incluido a los pacientes dentro de un grupo u otro de riesgo. En función de los datos de T-Score femoral, un 15,6% de los pacientes presentaban osteopenia al inicio del estudio y un 3,1% osteoporosis y si atendemos al T-Score obtenido a nivel lumbar los porcentajes varían discretamente de manera que un 28,1% de los pacientes se considera que presentan osteopenia y un 1,6% presentan osteoporosis (Tabla 29). Esta diferencia de porcentajes, obtenida también en otros grupos de estudio (248), puede explicarse por la distinta composición de cada hueso; a nivel lumbar hay una mayor proporción de hueso trabecular que, desde el punto de vista metabólico, presenta mayor vascularización, porosidad y superficie de contacto con la médula ósea, lo que hace que sea un tejido diez veces más activo que el hueso cortical. De ahí que las alteraciones en la DMO se observen antes en este tipo de hueso que en el hueso cortical, presente en el cuello femoral y cuya función es fundamentalmente mecánica y protectora. Sin embargo, existen en la literatura otras publicaciones en las que no se encuentran diferencias entre la DMO a nivel lumbar y a nivel femoral (249,250).

A pesar de que la osteoporosis se ha considerado tradicionalmente como una enfermedad que afecta fundamentalmente a mujeres, los cambios en la salud ósea asociados al uso de FAE no son específicos ni de género ni de edad, viéndose afectados tanto hombres como mujeres de todas las edades (145).

En cuanto a la prevalencia de la patología ósea existen grandes discrepancias entre los distintos artículos publicados. *Beerhorst et al.* realizaron un estudio transversal en el que incluyeron 195 adultos hospitalizados en una unidad de epilepsia europea a los cuales se les realizó una densitometría mediante DEXA. De todos ellos el 80% presentaba una baja DMO, teniendo un 48,2% osteopenia y un 31,8% osteoporosis; más del 50% de dichos pacientes tenían una edad comprendida entre 18 y 50 años (251). Por

su parte, *Lado et al.* midieron la DMO de 130 pacientes estadounidenses en tratamiento con FAE durante más de tres años e hicieron un seguimiento de estos durante un período de 6 meses. Estos autores encontraron una prevalencia de DMO disminuida más alta de lo esperado, presentando un 39% de los pacientes osteopenia y un 16% osteoporosis (252). Esta prevalencia es similar a la encontrada por *Pack et al.* en un grupo de pacientes de mediana edad (entre 19 y 50 años), también de Estados Unidos, diagnosticados de epilepsia refractaria de los cuales un 40% presentaba osteopenia y un 10% osteoporosis (253). Sin embargo, otro estudio publicado recientemente por *Osman et al* estudiaba un grupo de 60 pacientes pediátricos de entre 5 y 12 años en tratamiento con FAE durante al menos un año, el 68% de ellos en monoterapia y el 32% en politerapia. Este estudio reveló que el 28% de los pacientes presentaba una DMO clasificada como de osteopenia mientras que el 72% restante presentaba una DMO normal acorde con su edad (254). Nuestro estudio revela una prevalencia de pacientes con osteopenia a nivel lumbar similar a la encontrada por *Phabphal et al* en su grupo de estudio (248). Dicho autor evaluó la DMO de un grupo de 130 pacientes asiáticos, 79 recibiendo FAE en monoterapia y 51 en politerapia, con una media de edad de 32 años, de los cuales la mitad eran hombres y la mitad mujeres. El 26% de los pacientes de dicho estudio presentaban osteopenia, porcentaje muy similar al encontrado en nuestro grupo de estudio y en otros estudios (201). Muchos son los estudios publicados sobre este tema y, como puede observarse, la prevalencia de osteopenia/osteoporosis varía significativamente entre ellos. Uno de las razones más importantes para poder explicar esta diferencia es la gran heterogeneidad entre los pacientes de los distintos grupos de estudio; algunos de ellos incluyen pacientes pediátricos mientras que otros incluyen pacientes de todas las edades, unos incluyen únicamente pacientes en monoterapia estable con FAE mientras que otros recogen los datos de pacientes tanto en monoterapia como en politerapia, unos analizan el efecto de FAE inductores enzimáticos mientras que otros engloban los FAE en función de si son clásicos o de nueva generación, la diferencia de etnias recogidas en cada artículo, etc... Todo esto hace que los resultados obtenidos sean muy dispares y que sea difícil sacar conclusiones respecto a la prevalencia de la patología ósea en dichos pacientes.

Si estudiamos la DMO de los participantes del grupo de estudio en función del sexo vemos que el T-Score de las pacientes es menor que el de los hombres (T-Score femoral: -0,202 vs 0,573; T-Score lumbar: -0,710 vs 0,770) (Tabla 28), lo cual refleja la

mayor susceptibilidad de las mujeres a la pérdida de masa ósea debida probablemente al efecto hormonal sobre el metabolismo óseo. Los estrógenos son esenciales para la maduración esquelética, en hombres y mujeres, tanto durante la infancia y la juventud como en el mantenimiento del equilibrio del recambio óseo del esqueleto durante la edad adulta. El déficit estrogénico de la mujer en la menopausia conlleva un aumento del reclutamiento, actividad y vida media de los osteoclastos que da lugar a un aumento en el número y actividad de las unidades de remodelado óseo. También se describe un aumento de la apoptosis de los osteoblastos hecho que, unido al incremento en el número de unidades de remodelado, implicaría un balance negativo en cada una de estas unidades de remodelado dando lugar no sólo a trabéculas más finas sino en ocasiones a lagunas de resorción más profundas y pérdida de la conectividad del hueso, fundamentalmente a nivel del hueso trabecular (255). Sin embargo, estos resultados difieren de lo publicado por otros autores, que muestran valores de DMO similares en hombres y mujeres, tanto a nivel lumbar como femoral (201,248) o incluso menores valores de DMO en hombres que en mujeres (256). Dichos resultados pueden deberse a la mayor o menor proporción de mujeres menopáusicas incluidas en cada uno de los estudios, y a si la condición hormonal se considera o no como factor de riesgo en cada uno de ellos. En nuestro grupo de estudio el 45% de las mujeres son menopáusicas, por lo que la DMO media en el grupo de mujeres en general estará significativamente disminuida respecto a la de los hombres. Además, hay un mayor porcentaje de mujeres que presenta patologías asociadas como DM (13,6% vs 2,4%), HTA (18% vs 4,8%) u otras enfermedades endocrinas (9,1% vs 7,1%), consideradas todas ellas factores de riesgo para la pérdida de masa ósea.

Sin embargo, al estudiar la evolución de la DMO a lo largo de los meses del estudio en función del sexo, parece que los hombres pierden más masa ósea que las mujeres (diferencia de T-Score: -0,208 en hombres vs 0,158 en mujeres) (Tabla 31), demostrando cierta tendencia hacia la significación estadística en dicho resultado. Estudiando el grupo en su conjunto, sin diferenciar por sexo ni en función del FAE, vemos que no se aprecian diferencias significativas entre la primera y la segunda visita, aunque sí parece que a nivel femoral el T-Score disminuye a lo largo de los meses (0,215 vs 0,137), diferencia no apreciable a nivel lumbar.

Parece ser que algunos FAE, particularmente los medicamentos más antiguos englobados bajo el término de FAE clásicos y aquellos con efecto inductor enzimático

como la PHT o la CBZ, presentan un efecto perjudicial mayor sobre la masa ósea que otros de comercialización más reciente (219,257,258), aunque la evidencia de esta afirmación es por el momento inconsistente encontrándose en la literatura publicaciones en las que se describe dicha asociación y otras en las que no se puede demostrar el efecto negativo de dichos FAE sobre la salud ósea. En nuestro estudio no se aprecian diferencias significativas en cuanto a la calidad ósea medida por densitometría al estudiar los pacientes en función del tipo de FAE que estuvieran tomando (FAE clásicos o de nueva generación) aunque sí parece que aquellos pacientes tratados con FAE de nueva generación como LEV, ESL o LCM presentan un T-Score, tanto a nivel femoral como a nivel lumbar, mayor que aquellos pacientes tratados con FAE clásicos. Tampoco ha sido posible objetivar ninguna diferencia entre el efecto a largo plazo de los distintos tipos de FAE, no encontrándose diferencias entre el T-Score a nivel lumbar o femoral entre las dos visitas realizadas. Acorde con nuestros resultados están los publicados por *Phabphal et al*, que no encuentran diferencias significativas en cuanto a DMO entre los diferentes grupos de estudio de su población (130 pacientes de los cuales 71 estaban en tratamiento en monoterapia con algún FAE con efecto inductor enzimático, 28 estaban en tratamiento en monoterapia con FAE no inductores enzimáticos y 31 en politerapia) (248), y los resultados de *Fong et al* recientemente publicados en los que queda plasmada la ausencia de diferencias notables en la DMO de los pacientes del estudio en base al tipo de FAE que estuvieran tomando, siempre y cuando fuera en monoterapia (201). Este último artículo sí recoge diferencias en la DMO de pacientes en tratamiento en politerapia respecto a aquellos que reciben un solo FAE, quedando plasmado así el efecto perjudicial del tratamiento con dos o más FAE previamente descrito en la bibliografía (259,260).

A pesar del creciente número de artículos publicados en los últimos años referentes a la salud ósea en pacientes en tratamiento crónico con FAE existe hoy en día cierta confusión al respecto sin llegar a aclararse si el efecto de unos u otros tipos de FAE, o incluso todos los tipos de FAE, se asocia a efectos adversos en la salud ósea o no. Esta controversia entre los distintos tipos de estudios radica en el distinto planteamiento entre todos ellos. Algunos realizan el estudio comparando los resultados de un grupo de sujetos sanos con un grupo de pacientes en tratamiento crónico con FAE. Dentro de los pacientes epilépticos encontramos pacientes que llevan tratamiento antiépiléptico asociado durante tan solo unos meses, y otros que llevan años. Por otro lado,



encontramos estudios que evalúan el efecto de FAE clásicos frente a FAE de nueva generación, sin tener en cuenta los resultados en pacientes sanos (como es nuestro caso). Encontramos también poblaciones en las cuales se incluyen pacientes en tratamiento con distintos tipos de FAE, sin tener en cuenta el efector inductor enzimático de algunos de ellos y, por tanto, el diferente efecto a nivel del metabolismo óseo que puedan generar y otros en los que solamente se estudia la diferencia entre el efecto de un determinado tipo de FAE con otro. A esto se suma la variabilidad de etnias sobre las que se realiza cada investigación, así como los diferentes grupos de edad incluidos en cada uno. Y por último, la limitación en el número de pacientes incluidos en cada estudio ya que la epilepsia es una enfermedad limitante y no es fácil encontrar pacientes dispuestos a someterse a estudios que aumenten el número de visitas y exámenes médicos. Todo esto hace que los resultados obtenidos en cada estudio sean tan variados y que las conclusiones extraídas de cada uno sean limitadas, requiriéndose un mayor número de estudios mejor definidos.

#### **5.4.2. Estudio del riesgo de fractura mediante el algoritmo FRAX®**

Las fracturas osteoporóticas constituyen una problemática de creciente trascendencia en salud pública, por lo que la utilización de herramientas que permitan una valoración precoz y adecuada del riesgo de fractura y el establecimiento de políticas preventivas deberían ser prioritarios.

El FRAX es una herramienta de valoración del riesgo de fractura para hombres y mujeres entre 40 y 90 años desarrollada por un centro colaborador de la OMS. Mediante un programa informático, los algoritmos del modelo permiten calcular la probabilidad de fractura por fragilidad a 10 años, y específicamente de cadera también a 10 años. Están disponibles 14 versiones del modelo para diferentes países, incluido España, con modelos específicos por origen étnico caucásico, afroamericano, latino y asiático.

En nuestro grupo de estudio, tanto el riesgo de fractura osteoporótica mayor (FRAX® MO: 2,0) como el riesgo de fractura de cadera a 10 años (FRAX® HF: 0,1) fueron considerados de bajo riesgo, atendiendo a las recomendaciones de la NOF (108). Sin embargo, hay que tener en cuenta que el FRAX® determina el riesgo de fractura en función de diferentes factores de riesgo: edad y sexo, peso y altura, fractura por fragilidad previa, antecedentes de fractura de cadera en alguno de los padres,

tratamiento con corticoides durante al menos tres meses, osteoporosis secundarias a DM1, osteogénesis imperfecta, hipertiroidismo crónico no tratado, hipogonadismo, menopausia precoz, malnutrición crónica, malabsorción y hepatopatía crónica, tabaquismo y consumo de alcohol. Sin embargo, no contempla como factor de riesgo la epilepsia ni el tratamiento crónico con FAE por lo que los resultados de riesgo de fractura obtenidos en nuestro grupo de estudio deben interpretarse con cierta precaución. En el caso que nos ocupa, sería conveniente evaluar el riesgo de fractura mediante otras herramientas informáticas disponibles como el QFractureScore que, como ya hemos visto, sí considera el tratamiento crónico con FAE como un factor de riesgo. Lamentablemente, a día de hoy no es posible realizar dicha evaluación debido a la falta de información disponible acerca de la interpretación de los resultados obtenidos y su aplicación a la hora de realizar recomendaciones en nuestro país.

En nuestra población, la estimación del riesgo de fractura osteoporótica mayor a diez años mediante el FRAX<sup>®</sup> (FRAX<sup>®</sup> MO) se asocia negativamente con el peso, la talla y el IMC, de manera que según este cálculo y a pesar de que el aumento del IMC se considera un factor de riesgo para la osteoporosis (131), a mayor IMC menor riesgo de fractura. La estimación del riesgo de fractura de cadera a diez años mediante el FRAX<sup>®</sup> (FRAX<sup>®</sup> HF) se asocia igualmente de forma negativa con el peso y la talla de los pacientes y positivamente con la edad, considerando esta última como uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de osteoporosis tanto en pacientes epilépticos como en la población en general. Sin embargo, no se ha encontrado asociación ninguna con el tiempo de diagnóstico de epilepsia ni el tiempo de tratamiento, de manera que podemos decir que en pacientes epilépticos el riesgo de fractura osteoporótica mayor o fractura de cadera es independiente de ambos parámetros, siempre y cuando sea utilizada la herramienta FRAX<sup>®</sup> para dicho cálculo.

En nuestro grupo de pacientes, los resultados obtenidos mediante densitometría (DMO y T y Z-Score) se asocian de forma inversa con el riesgo de fractura (FRAX<sup>®</sup> MO y FRAX<sup>®</sup> HF), fundamentalmente a nivel femoral, de manera que a menores valores de DMO mayor valor del FRAX<sup>®</sup>, hecho que se ajusta a lo obtenido en otros grupos de estudio (261).

### 5.4.3. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo y su relación con la DMO

En la actualidad, la realización de la densitometría ósea mediante DEXA es el método más idóneo para la evaluar al paciente con osteoporosis debido a su capacidad para predecir fracturas por fragilidad, a su gran versatilidad que permite realizar determinaciones precisas de la DMO en los lugares de mayor relevancia clínica y todo esto con una exposición mínima a radiación. Por todo esto, la densitometría es considerada el *gold standard* para el diagnóstico de la osteoporosis (262).

Sin embargo, la densitometría también tiene ciertos inconvenientes y es que es una técnica que supone un elevado coste y que además únicamente aporta información cuantitativa (DMO) en un momento determinado; por tanto, al tratarse de un parámetro estático no aporta información del ritmo de recambio óseo que es uno de los parámetros más importantes del estudio del metabolismo óseo.

Es ahí donde los marcadores bioquímicos de remodelado óseo juegan un papel importante ya que por una parte suponen pruebas no invasivas para el paciente y son relativamente económicos, y por otro, aportan una información dinámica y global de la tasa de remodelado óseo del esqueleto en su conjunto. Actualmente, la aplicación clínica más relevante de la determinación de estos biomarcadores es la evaluación de la respuesta terapéutica. También podrían ser útiles en la evaluación del riesgo de fractura y la tasa de pérdida de masa ósea, así como su correlación con la DMO, aunque debido a la variabilidad analítica y biológica los resultados obtenidos en los diferentes trabajos han sido dispares, limitando por el momento su aplicabilidad en la clínica y obligando al clínico a realizar una interpretación de los resultados con cautela.

En nuestro estudio se han cuantificado los niveles de ALPo, OC y P1NP como marcadores que reflejan la formación ósea, y de NTX y  $\beta$ -CTX como marcadores de resorción. El estudio de estos biomarcadores a lo largo de los meses ha puesto de manifiesto una disminución significativa de la concentración de ALPo así como de NTX, mientras que se detecta una ligera disminución de la concentración de P1NP entre la primera y la segunda visita. Esta variación en las concentraciones de los biomarcadores parecen correlacionarse en cierta medida con la discreta disminución de la DMO a nivel femoral obtenida mediante densitometría, reflejando una menor tasa de recambio óseo al disminuir las concentraciones de marcadores tanto de formación (ALPo y P1NP) como de resorción (NTX). Estos cambios, aunque discretos, se

correlacionan también con el aumento de las concentraciones de vitamina D que se detectan entre las dos visitas como mecanismo de respuesta compensatoria ante la falta síntesis de hueso nuevo y que, en caso de no solucionarse, acabaría conduciendo a una pérdida de masa ósea más pronunciada. Como hemos visto, un 60% de los pacientes de nuestro estudio presentan concentraciones deficientes de vitamina D al inicio del estudio y, a pesar del aumento de la misma a lo largo de los meses, los niveles de la vitamina siguen siendo insuficientes para garantizar una adecuada mineralización del hueso, por lo que dichos resultados podrían explicar también la disminución de la DMO encontrada. Sin embargo, los datos encontrados en la bibliografía sugieren que la patología ósea en pacientes epilépticos no es tanto un problema en el proceso de mineralización sino más bien un aumento en la tasa de remodelado óseo. Esta afirmación surge de un estudio realizado sobre 120 pacientes en tratamiento crónico con FAE en los que se encontraron concentraciones de calcio significativamente disminuidas y un aumento de la concentración de PTH en comparación con sujetos control sanos, sin encontrar diferencias entre los niveles de vitamina D entre los dos grupos. Los resultados de las biopsias óseas realizadas a estos mismos pacientes indicaron una mayor superficie y volumen de osteoide (hueso nuevo no mineralizado), una velocidad de mineralización acelerada y un menor tiempo de retardo en la misma, concluyendo que la enfermedad ósea en dichos pacientes se debía principalmente a una mayor tasa de remodelado óseo más que a un defecto en el proceso de mineralización (263). Dicho estudio cobra fuerza al haber analizado los resultados obtenidos en las biopsias óseas, técnica que aporta resultados muy fieles a la situación del hueso en cuanto volumen, mineralización y recambio óseo.

La deficiencia o insuficiencia de vitamina D puede estar asociada con concentraciones más bajas de calcio sérico, hiperparatiroidismo secundario y aumento de los marcadores de resorción y recambio óseo. Los primeros estudios realizados sobre este tema en pacientes epilépticos coincidían con este concepto, sin embargo, la mayoría de los sujetos incluidos en estas investigaciones eran pacientes institucionalizados o presentaban déficit nutricionales, exposición inadecuada a la luz solar y ejercicio limitado, o vivían en países del norte, factores considerados de riesgo para el déficit de vitamina D e hiperparatiroidismo secundario. Curiosamente, muchos de los estudios publicados posteriormente no encuentran niveles de vitamina D en suero significativamente reducidos y los hallazgos con respecto a los niveles séricos de calcio

y PTH tampoco son consistentes. En nuestro caso, los cambios en los niveles de biomarcadores y vitamina D no se acompañan de cambios en las concentraciones de calcio o PTH, implicados también en la regulación del metabolismo fosfocálcico, situación que podría ser interpretada como un paso previo y temprano de la activación de la respuesta compensatoria que se pondría de manifiesto posteriormente.

El estudio del efecto de los FAE sobre la salud ósea diferenciando entre FAE clásicos o de nueva generación ha revelado diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de OC y P1NP, siendo mayores en ambos casos en aquellos pacientes en tratamiento crónico con FAE considerados de nueva generación, y discretos aumentos de  $\beta$ -CTX en el mismo grupo. *A priori*, esta diferencia podría estar reflejando una mayor tasa de remodelado óseo en dichos pacientes, o lo que es lo mismo, que aquellos pacientes en tratamiento con FAE clásicos presentan una disminución del metabolismo óseo con menores tasas de formación ósea que podría conducir a un envejecimiento acelerado del hueso que acabaría produciendo osteopenia u osteoporosis y finalmente a la aparición de una fractura ósea. Este hallazgo parece estar en consonancia con los datos de DMO obtenidos en las densitometrías que, aunque no muestran diferencias significativas entre los dos grupos de FAE, si difieren discretamente presentando un T y Z-Score mayor aquellos pacientes tratados con FAE de nueva generación, tanto a nivel lumbar como femoral. El efecto adverso de los FAE clásicos sobre la salud ósea es aceptado a nivel internacional debido a la gran cantidad de estudios publicados durante los últimos años que avalan dicha afirmación, ya sea estudiando todos los FAE en conjunto (264,265) o cada uno de ellos en particular (CBZ (218,266–268), PHT ((218,257) o VPA ((269,270).

La mayoría de los estudios realizados sobre este tema son estudios caso/control en los que se analiza el efecto de dichos FAE sobre la salud ósea y se compara con controles sanos que no toman el tratamiento antiepiléptico. Además, gran parte de ellos evalúa la salud ósea y el riesgo de fractura de los pacientes a través de los datos de DMO obtenidos mediante densitometrías, pero son pocos los estudios encontrados en los que se cuantifican los marcadores de remodelado óseo en pacientes epilépticos comparando el efecto de distintos FAE entre sí.

Atendiendo a los datos de los biomarcadores de remodelado óseo hemos encontrado discrepancias en la bibliografía respecto a nuestros resultados. Así, contrariamente a

nuestros hallazgos encontramos los publicados por *Verrotti et al* que afirman que las concentraciones de marcadores de formación (ALPo, OCy P1NP) y de resorción (NTX) son mayores en los quince pacientes epilépticos de su estudio tratados con CBZ al compararlos con sujetos sanos que actuaban como controles, reflejando esto un mayor recambio óseo (271). Sin embargo, el bajo número de pacientes incluidos en dicho estudio limita la fiabilidad de los resultados obtenidos. Por otra parte, un grupo de investigadores de Estados Unidos estudió los efectos del LEV frente al efecto de otros FAE clásicos como CBZ y VPA en un grupo de setenta pacientes demostrando que el  $\beta$ -CTX disminuía en ambos grupos de pacientes mientras que el P1NP únicamente disminuía en aquellos pacientes tratados con FAE clásicos. Los autores de este estudio acaban concluyendo que tanto el uso de FAE clásicos como el de LEV se asocia con una reducción del recambio óseo y una pérdida de masa ósea (171). *Kulak et al* en su estudio de casos/controles demostró que aquellos pacientes tratados con PB mostraban disminución de su masa ósea a lo largo del estudio, correlacionando dicha pérdida con el aumento de  $\beta$ -CTX en dichos pacientes frente a los controles sanos (272). A pesar de las discrepancias en los resultados de los biomarcadores la mayor parte de autores, al igual que en nuestro caso, llegan a la conclusión de que el tratamiento con determinados FAE surgidos al principio de la era de los antiepilépticos se asocia a una pérdida acelerada de masa ósea, y por tanto, a un mayor riesgo de fractura ósea. Con el tiempo dichos efectos han sido detalladamente explicados en base a su mecanismo de acción; como ya se ha comentado previamente, PHT o CBZ son FAE con efecto inductor enzimático lo cual conduce a la obtención de metabolitos inactivos de la vitamina D que no son capaces de ejercer su acción sobre el metabolismo fosfocálcico y acaban conduciendo a una situación de hipocalcemia y finalmente a defectos en la mineralización ósea (273,274). Por otra parte el VPA, que no presenta efecto inductor enzimático, se asocia a efectos óseos adversos que parecen explicarse por la acción que ejerce sobre las células óseas; por un lado, modula la expresión de genes relacionados con la diferenciación y maduración de osteoblastos, controlando por tanto su actividad, y por otro potencia la actividad de los osteoclastos (275). En la cohorte estudiada en esta Tesis Doctoral parece que todos los pacientes incluidos muestran una reducción de la tasa de recambio óseo, aunque son los pacientes en tratamiento con LEV en los que se detecta un efecto más significativo; en dichos pacientes se encuentra una disminución notable tanto de ALPo como de OC y NTX y discreta disminución de P1NP, situación que también se repite en el estudio publicado por *Beniczky et al* (276). En los pacientes

en tratamiento con FAE clásicos y VPA hay una disminución significativa de ALPo acompañada de pequeñas variaciones en la concentración de PINP, en el caso de los primeros, y de NTX en los segundos, si bien es cierto que el número de pacientes en tratamiento con FAE clásicos incluidos en nuestro estudio es limitado, hecho que puede condicionar los resultados obtenidos. Sin embargo, a pesar de las limitaciones nuestros resultados siguen la línea de los publicados por *Hakami et al* asumiendo que el tratamiento con FAE, independientemente del mecanismo de acción, conlleva una disminución del *turnover* óseo (171) y según nuestros datos, parece que dicha disminución es más marcada en pacientes en tratamiento con FAE clásicos. Sin embargo, y haciendo hincapié en lo dicho hasta el momento, son necesarios más estudios para aclarar esta afirmación, ya que sigue habiendo discrepancias en los resultados.

A pesar de que los resultados de los biomarcadores a lo largo del estudio reflejan una disminución de la tasa de remodelado óseo que parece acompañarse de una discreta pérdida de masa ósea a lo largo del estudio no se ha encontrado una asociación significativa entre ambas, demostrando con esto que la determinación de los niveles de los biomarcadores no refleja el estado de la masa ósea y que, por tanto, no puede considerarse una herramienta útil a la hora de evaluar la salud ósea y el riesgo de fractura en un momento puntual. Sin embargo, ya hemos dicho que el principal uso de los biomarcadores a día de hoy no es el diagnóstico de osteoporosis sino más bien el seguimiento de su evolución, ya sea en respuesta a un tratamiento antirresortivo en el caso que lo haya, o en respuesta a factores perjudiciales externos como es el tratamiento con FAE en el caso que nos ocupa. Debido a que un ciclo de remodelado óseo tarda aproximadamente tres meses en completarse podemos pensar que tras ese periodo de tiempo la concentración de los biomarcadores se modificará reflejando los cambios producidos a nivel del hueso (277). Esto nos permitiría evaluar al paciente en un periodo de tiempo breve sin tener que esperar un mínimo de seis u ocho meses a que dichos cambios fuesen detectados en las densitometrías por lo que estaríamos detectando con antelación la evolución favorable o desfavorable de la tasa de remodelado y podríamos anticiparnos a situaciones indeseables como son el desarrollo de osteoporosis y su consecuencia última que es la fractura ósea.

#### 5.4.4. Polimorfismos genéticos y su relación con la DMO

A día de hoy se puede decir que cualquier enfermedad es el resultado de la interacción entre el componente genético y la multitud de factores ambientales a los que está sometido, si bien para la osteoporosis en particular aún nos hallamos en el camino que nos aclare o cuantifique la trascendencia del primer componente. Diversos estudios afirman que probablemente hasta el 80% de la cantidad de hueso que adquiere un individuo esté determinada genéticamente. Desde esta perspectiva, la osteoporosis se considera una enfermedad compleja, con una predisposición adquirida y sujeta a fuertes influencias ambientales perfectamente descritas en los estudios epidemiológicos.

La importancia de la genética en la osteoporosis queda reflejada en las más de mil publicaciones surgidas desde que se descifró el código genético humano. La identificación del gen o los genes implicados en su desarrollo se ve dificultada, sin embargo, por el carácter multifactorial de la propia enfermedad, así como por la heterogeneidad de las distintas poblaciones.

##### 5.4.4.1. Gen del colágeno tipo I (COL1A1)

La carrera por descubrir una alteración genética que influyera en el desarrollo de la osteoporosis se inició con el estudio del gen COL1A1, la principal proteína de la matriz ósea y cuya mutación determina la aparición de la osteogénesis imperfecta, siendo en la actualidad uno de los genes candidatos más ampliamente estudiados. A día de hoy son varios los estudios que avalan la idea de que la presencia del polimorfismo COL1A1-Sp1 que afecta a una región reguladora clave de la expresión del gen se asocia a una mayor susceptibilidad de sufrir una fractura osteoporótica (278).

Actualmente uno de los mayores estudios realizados sobre este polimorfismo es el publicado por *Ralston et al*, un metaanálisis en el que se analizaron los datos de más de 26.000 pacientes de varios centros europeos, todos dentro del marco del consorcio para el estudio de marcadores genéticos para la osteoporosis, proyecto GENOMOS. Dicho estudio demuestra la existencia de una asociación entre la presencia del polimorfismo COL1A1-Sp1 y la disminución de la DMO tanto a nivel de la columna lumbar como del cuello femoral, de manera que aquellos pacientes con genotipo homocigoto para el polimorfismo *ss* presentaban valores de DMO inferiores al resto de pacientes con otros



genotipos, tanto *SS* como *Ss*, y en consecuencia un mayor riesgo de sufrir fracturas osteoporóticas (72). Siguiendo esta idea se encuentran en la bibliografía multitud de estudios que examinan la relación entre la presencia del polimorfismo y la salud ósea, estando la gran mayoría de acuerdo con dicha teoría (279–282). A pesar de que este tipo de estudios de asociación son muy abundantes no hemos encontrado en la bibliografía ninguna publicación referente a pacientes epilépticos; sin embargo, nuestros resultados son acordes con lo previamente expuesto encontrando que aquellos pacientes con genotipo *ss* presentan una DMO menor que los pacientes con genotipos homocigoto silvestre *SS* y heterocigoto *Ss*, hecho que se refleja tanto a nivel lumbar como femoral.

Algunos autores, por el contrario, describen una asociación entre el riesgo de sufrir fracturas osteoporóticas y la presencia del polimorfismo del colágeno COL1A1-Sp1 de modo que aquellos individuos con genotipo *SS* presentan menor riesgo de sufrir fracturas, ya sea vertebrales como de cadera, que los portadores de un alelo *s*, siendo dicho efecto independiente de la DMO (279). Y otros admiten que la presencia del polimorfismo se asocia con un mayor riesgo de fractura acompañado de una modesta disminución de la DMO (282).

Estudios realizados sobre líneas celulares derivadas de osteoblastos con genotipo *Ss* mostraron una producción alterada de la cadena  $\alpha 1$  de la proteína de colágeno respecto a la  $\alpha 2$  (relación 2,3 en heterocigotos *Ss* en comparación con el valor esperado de 2 a 1 que se observó en homocigotos *SS*). Esta proporción alterada de las cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del colágeno puede ser relevante en la patogenia de la osteoporosis asociándose a una resistencia deteriorada del hueso que puede dar lugar a una alteración tanto de la cantidad como de calidad óseas (70).

La gran mayoría de publicaciones encontradas en la bibliografía acerca del polimorfismo del colágeno COL1A1-Sp1 hacen referencia a grupos de mujeres, tanto pre como postmenopáusicas, ya que este colectivo es uno de los más susceptibles de sufrir osteoporosis (283). Sin embargo, también se ha encontrado asociación entre la presencia de éste y el riesgo de sufrir osteoporosis en hombres. *Peris et al* estudiaron un grupo de hombres de Barcelona diagnosticados de osteoporosis idiopática encontrando en dicho grupo una mayor prevalencia del alelo *s* y del genotipo *Ss* no relacionado con otros parámetros del metabolismo óseo (280).

Respecto al resto de polimorfismos estudiados no se han encontrado diferencias

significativas de DMO entre los distintos genotipos. Sin embargo, casi todos los polimorfismos analizados siguen en la línea de lo publicado por otros autores.

#### 5.4.4.2. Gen del receptor de calcitonina (CTR)

Otro gen posiblemente implicado en la patogénesis de la osteoporosis es el gen CTR, concretamente un polimorfismo de nucleótido simple presente en la región 3' del gen (CTR-AluI). Varias publicaciones realizadas durante los últimos años muestran una asociación significativa entre el polimorfismo CTR-AluI y la DMO, como es el caso del estudio de *Tsai et al* en un grupo de mujeres postmenopáusicas en el que se detecta asociación entre la presencia del polimorfismo y la DMO; en concreto en dicho estudio se pone de manifiesto que aquellas mujeres con genotipo AA presentan una menor DMO que el resto de participantes. El autor acaba concluyendo que la presencia del polimorfismo CTR-AluI puede interpretarse como un marcador de riesgo para el desarrollo de osteoporosis tanto a nivel de la columna lumbar como del cuello femoral, aunque sugiere que dichos datos deben interpretarse con cautela debido a la baja prevalencia del genotipo AA en la cohorte estudiada (68). Asimismo, *Zhang et al* llegan a esta misma conclusión tras realizar un metaanálisis en el que se engloban mujeres de seis diferentes estudios pero todas ellas postmenopáusicas; en este caso los autores del trabajo asocian la presencia del polimorfismo con la DMO a nivel lumbar afirmando que el análisis de éste puede suponer una herramienta más para el estudio del riesgo de desarrollar osteoporosis (284). En otro metaanálisis publicado por *Xiong et al* que engloba los datos de más de 3000 mujeres y 650 hombres del sudeste asiático se asigna un papel protector a la presencia del polimorfismo del CRT-AluI demostrando que los individuos con genotipo aa presentan una mayor DMO a nivel de la columna que el resto de genotipos, mientras que dicho genotipo se asocia a un mayor riesgo de presentar una DMO disminuída a nivel del cuello femoral (176). En nuestro caso no se han detectado diferencias significativas entre los integrantes del grupo de estudio que presentan diferentes genotipos, aunque sí se aprecia una menor DMO en aquellos pacientes con genotipo silvestre AA. Sin embargo, uno de los pocos estudios realizados sobre población española, concretamente sobre una cohorte de 177 mujeres postmenopáusicas de la Comunidad Foral de Navarra, concluye afirmando que las mujeres con un genotipo aa presentan una DMO menor a nivel del cuello femoral que el resto de mujeres, o lo que es lo mismo, que las mujeres con dicho genotipo presentan un

mayor riesgo para desarrollar osteoporosis y, finalmente, una fractura ósea (285). Teniendo en cuenta la discrepancia encontrada en los estudios publicados respecto a este polimorfismo sería conveniente seguir profundizando en dicha investigación para esclarecer la influencia de dicho polimorfismo sobre la salud ósea.

#### 5.4.4.3. Gen del receptor de vitamina D (VDR)

A raíz de los estudios realizados por *Morrison et al* en los que quedaba reflejada la asociación entre la presencia del polimorfismo BsmI del gen VDR y la DMO (51) se han llevado a cabo multitud de trabajos para seguir analizando dicha asociación, obteniéndose resultados contradictorios. En este primer trabajo se describía una asociación ente el genotipo *BB* del polimorfismo y la presencia de una menor masa ósea; dichos resultados fueron confirmados por otros autores y varios metaanálisis han surgido desde entonces defendiendo dicha idea como el publicado por *Jia et al* en 2013 en el que después de analizar los resultados de 26 trabajos con un total de más de 2200 pacientes y 3150 controles llegan a la conclusión de que el genotipo *bb* del polimorfismo BsmI del VDR puede suponer un mecanismo protector frente al desarrollo de la osteoporosis en aquellos sujetos que lo posean (53). Sin embargo, también hay en la bibliografía otra vertiente en la que los autores no llegan a la misma conclusión, como por ejemplo el metaanálisis realizado por *Qin et al* en el que se analizan 41 trabajos de los cuales 20 corresponden a población caucásica y 14 a población asiática. En dicho metaanálisis no se encuentra asociación evidente entre la presencia del polimorfismo y la DMO y/o el riesgo de fracturas (286). O el trabajo realizado por un grupo español en el que se analizó el genotipo del VDR-BsmI de 210 mujeres postmenopáusicas sanas a las que también se les realizó una densitometría ósea. Los resultados recogidos en este estudio muestran la ausencia de asociación entre el polimorfismo citado y la DMO en mujeres sanas españolas (287). Recientemente ha sido publicado un metaanálisis en el que se analizan los resultados de 58 estudios en el que se incluyen los datos de pacientes de diferentes etnias. A pesar de encontrar resultados muy dispares entre todos ellos sus autores acaban concluyendo que dado que el polimorfismo VDR-BsmI no afecta a la secuencia de aminoácidos del VDR es comprensible pensar que el genotipo no sea responsable de variaciones en la DMO a nivel de la columna lumbar o el cuello femoral (288).

Existen otros polimorfismos en el gen VDR, quizá menos estudiados que el anterior como es el caso del VDR-FokI, que también se ha asociado con la salud ósea. *Yasovanthi et al* describieron en su artículo una clara asociación entre el genotipo *ff* del VDR-FokI y la baja DMO, tanto en personas sanas como en mujeres con osteoporosis de la India (289). De acuerdo con estos resultados están los publicados por *Wang et al* sobre su cohorte de mujeres asiáticas postmenopáusicas que demostraron que la presencia del alelo *f* del VDR-FokI se asociaba con una disminución de la DMO (290). En contra de estas afirmaciones han sido publicados algunos artículos en los que también se encuentra una asociación entre el polimorfismo *ff* del VDR-FokI y la DMO pero inversa a la previamente descrita, de manera que aquellos individuos con genotipo *ff* presentan una mayor DMO que el resto (55,291).

Al estudiar el gen VDR en nuestro grupo de estudio no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la DMO de los pacientes con distintos genotipos, ni al analizar el polimorfismo VDR-BsmI ni el VDR-FokI. Sin embargo, sí parece que aquellos participantes del estudio con genotipo *BB* presentan menor DMO que el resto de pacientes estudiados, siendo esta diferencia más notable a nivel femoral. Igualmente, los pacientes con genotipo *ff* presentan DMO discretamente inferiores a los pacientes homocigotos salvajes *FF* o heterocigotos *Ff*. A pesar de no encontrar una significación estadística tal que nos permita afirmar que existe asociación entre dichos genotipos y la DMO parece haber cierta tendencia hacia la pérdida de masa ósea en aquellos pacientes con el genotipo previamente descrito como “patológico” por lo que quizá ampliando el número de pacientes incluidos en el estudio podríamos obtener diferencias más notables que nos permitiesen afirmar esto sin condiciones. Son pocas las publicaciones encontradas en la bibliografía que estudien este tipo de asociación en pacientes epilépticos; entre ellos destaca una recientemente publicada que incluye los datos de 87 pacientes pediátricos con epilepsia en tratamiento con FAE durante más de un año, a los cuales se les determinaron los cinco polimorfismos conocidos del VDR (BsmI, FokI, ApaI, TaqI y Cdx-2). De los pacientes incluidos, 19 presentaban osteopenia y ninguno presentaba osteoporosis o historial de fracturas previas y sus autores concluían exponiendo que no existía asociación entre ninguno de los polimorfismos del VDR estudiados y la DMO, aunque asumían las limitaciones del estudio aceptando que esta falta de asociación podía deberse al tamaño relativamente pequeño de su cohorte (201). Otro de los artículos referentes a los polimorfismos del VDR en población epiléptica es

el publicado por *Jiang et al* en el que estudian el genotipo de 82 pacientes y 150 controles referentes a los polimorfismos del VDR. Sin embargo, este estudio simplemente hace un análisis de las frecuencias genotípicas de cada uno de los polimorfismos sin asociarlo a la DMO. Sus autores afirman que el genotipo *Ff* es significativamente más frecuente en el grupo control que en los pacientes epilépticos indicando esto un posible papel neuroprotector de dicho genotipo. Por otra parte, el genotipo *aa* del polimorfismo *ApaI* es más frecuente en pacientes epilépticos sugiriendo esto cierta susceptibilidad a padecer epilepsia del lóbulo temporal (202).

Es muy probable que la discordancia entre los resultados de la multitud de estudios publicados pueda deberse a la inclusión en cada uno de los trabajos de grupos étnicos muy diferentes, hecho que condiciona enormemente las conclusiones extraídas. Además, hay un concepto importante a tener en cuenta y es que la expresión de los genes puede verse afectada por las condiciones ambientales, hecho que se conoce como epigenética. En base a esto se podría explicar que la homeostasis del calcio jugase un papel importante de la expresión del gen VDR. Así *Stathopoulou et al* afirmaban que bajo condiciones de bajo consumo de calcio la presencia del alelo B del polimorfismo *BsmI* aumentaba sustancialmente el riesgo de osteoporosis y en situaciones con una adecuada ingesta de calcio la influencia del genotipo del polimorfismo *BsmI* era prácticamente indetectable. Con esto parecían concluir que la adecuada ingesta de calcio podría contrarrestar los efectos perjudiciales que conlleva la presencia del alelo B (292).

#### **5.4.4.4. Gen del receptor de estrógenos (ER)**

El último de los genes estudiados es el gen  $ER\alpha$ , que como ya se ha comentado previamente, es otro de los genes candidatos para estudiar el efecto del componente genético de la osteoporosis. Los estrógenos juegan un papel crítico en la homeostasis del metabolismo óseo, hecho que queda demostrado al observar la pérdida acelerada de masa ósea que se produce en las mujeres postmenopáusicas al producirse el déficit estrogénico característico de esta época de la vida reproductiva de la mujer. Los bajos niveles de estrógenos dan lugar a un desequilibrio del metabolismo óseo y al aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ . La IL6 facilita la proliferación de precursores de los osteoclastos en tanto que la IL-1 y el TNF- $\alpha$  potencian la función de los osteoclastos, incrementándose con todo la resorción ósea

(293). Los estrógenos llevan a cabo su papel principalmente a través del ER $\alpha$ , conociéndose ampliamente dos polimorfismos que pueden afectar su función, el ESR1-PvuII y el ESR1-XbaI. Diversos estudios han encontrado una asociación entre la presencia/ausencia de dichos polimorfismos con la DMO, de manera que podrían considerarse un factor de riesgo de fractura ósea. De la misma forma que para el resto de polimorfismos estudiados, existen diferencias entre los resultados obtenidos en los diferentes estudios publicados. En el año 2013 fue publicado un metaanálisis en el que se incluyeron los datos de 5000 mujeres pertenecientes a 22 estudios en el cual se demostró que la presencia del genotipo *XX* del polimorfismo XbaI se asociaba con un mayor valor de DMO, tanto a nivel de la columna lumbar como del cuello femoral, al compararlos con los portadores del alelo *x*. Asimismo, se analizó la influencia del polimorfismo PvuII sobre la incidencia de fractura ósea asociando la presencia del alelo *P* con una menor incidencia de fracturas en comparación con los portadores del alelo *p* (294). Igualmente, en la mayoría de estudios realizados en poblaciones de origen asiático admiten que los genotipos *PP* o *xx* se asocian con valores más bajos de DMO mientras que en población caucásica son los pacientes con genotipos *pp* y/o *xx* los que muestran un mayor riesgo de sufrir osteoporosis (62).

En nuestro grupo de estudio ni los pacientes con genotipo *PP* ni aquellos con genotipo *xx* muestran una DMO significativamente menor que el resto de pacientes con diferentes genotipos. A pesar de todo, sí parece haber cierta tendencia hacia una mayor pérdida de masa ósea en aquellos pacientes con genotipo heterocigoto *Pp* para el polimorfismo ESR1-PvuII, reflejándose este efecto principalmente a nivel lumbar, hecho que coincide con lo publicado por *Salmen et al* (61), así como una discreta disminución de la DMO que queda reflejada tanto en el T-Score como en el Z-score de los pacientes con genotipo *xx* a nivel lumbar (Tabla 42).

Nuestros resultados están en concordancia además con los expuestos en un metaanálisis publicado en 2010 en el que se incluía 1279 pacientes que habían sufrido una fractura ósea y más de 6000 pacientes como grupo control en el que se evaluó el efecto del polimorfismo PvuII sobre el riesgo de fracturas, no encontrando asociación ninguna entre ambos. Sin embargo, al estudiar el tipo de fractura en este mismo grupo de estudio se encontró una asociación entre la presencia de fracturas vertebrales y la presencia del genotipo *pp* (295). Asimismo, los resultados del proyecto GENOMOS referentes a los polimorfismos del gen ER $\alpha$  publicados por *Ioannidis et al* y que hacen

referencia a 20.000 sujetos procedentes de ocho centros europeos siguen esta misma línea, demostrando que la presencia de ninguno de los dos polimorfismos tuvo efecto significativo sobre la DMO de los participantes (64).

En cuanto al estudio de los polimorfismos ESR1-PvuII y ESR1-XbaI en población española encontramos varios trabajos en concordancia con nuestros resultados, entre ellos unos realizado en población diabética de la Región de Murcia en el que tampoco se encuentra asociación entre la DMO y el genotipo (206) y otro publicado en población del Norte de España en el que los resultados son similares (296). Actualmente, no se han publicado ningún artículo que estudie dichos polimorfismos en pacientes epilépticos.

#### **5.4.5. Polimorfismos genéticos y su relación con los marcadores bioquímicos de remodelado óseo**

##### **5.4.5.1. Gen del colágenot tipo I (COL1A1)**

En nuestro grupo de estudio no se han encontrado diferencias significativas entre los pacientes con distintos genotipos para el polimorfismos del gen COL1A1-Sp1 y ninguno de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo analizados. En uno de los escasos estudios que relacionan el genotipo y la concentración de diferentes marcadores, el estudio OFELIA, únicamente se encuentran diferencias significativas en los niveles de PICP siendo menores en pacientes con genotipo *ss*; en cuanto al resto de marcadores estudiados, tanto de formación como de resorción, las concentraciones no difieren entre pacientes con distintos genotipos (297). Tampoco encontraron diferencias destacables el grupo de *Sainz et al* cuando estudiaron la influencia del polimorfismo COL1A1-Sp1 sobre la salud ósea de 109 pacientes sanas de entre 6 y 12 años (298). En ambas publicaciones, al igual que en nuestro caso, el genotipo *ss* se asociaba a los menores resultados de DMO, sin corresponderse con los marcadores bioquímicos.

##### **5.4.5.2. Gen del receptor de calcitonina (CTR)**

En la cohorte estudiada en esta Tesis Doctoral se ha detectado que aquellos pacientes con genotipo *AA* del polimorfismo CTR-AluI presentan concentraciones significativamente mayores de ALPo que las del resto de pacientes con diferentes

genotipos, hecho que parece estar reflejando una mayor tasa de formación ósea en estos pacientes ya que como hemos dicho la ALPo es uno de los marcadores de síntesis de hueso por excelencia. Sin embargo, este dato no estaría en concordancia con los datos obtenidos en las densitometrías que muestran que dichos pacientes presentan valores de DMO inferiores al resto de participantes con diferentes genotipos. No obstante, como ya hemos dicho previamente, la concentración de los marcadores de remodelado óseo en nuestro caso no parece corresponderse con el estado de la masa ósea del individuo en un momento concreto, sino que más bien parece reflejar la tasa metabólica de síntesis y/o degradación de hueso. Quizá por tanto, podríamos pensar que en pacientes con genotipo AA, que presentan una DMO menor que el resto de pacientes, hay una mayor tasa de síntesis de hueso como mecanismo compensatorio a dicha predisposición genética.

Contrariamente a nuestros resultados se encuentran los obtenidos en un grupo de mujeres españolas postmenopáusicas en las cuales el genotipo homocigoto para el polimorfismo *aa* se asoció con una menor DMO a nivel femoral, hecho que posiblemente se acompañase de bajos niveles de ALPo y otros marcadores de formación de hueso como P1NP (285), lo cual podría corresponderse con los datos obtenidos en nuestro grupo a nivel bioquímico. Sin embargo, la mayor parte de estudios encontrados en la bibliografía asocian la presencia del genotipo AA con una menor DMO aunque ninguno de los artículos encontrados referentes al polimorfismo CTR-AluI no analizan las concentraciones de los biomarcadores de remodelado óseo por lo que no es posible comparar nuestros resultados con los de otros autores.

#### **5.4.5.3. Gen del receptor de la vitamina D (VDR)**

Atendiendo al polimorfismo VDR-BsmI hemos detectado en nuestros pacientes que aquellos con genotipo homocigoto *BB* para el polimorfismo son los que menores concentraciones de NTX poseen. Dichos pacientes son además los que mayores valores de T y Z-Score presentan (aunque sin apreciarse diferencias significativas entre genotipos) tanto a nivel lumbar como femoral, resultados que como ya hemos visto previamente coinciden con lo publicado por otros autores (299). Siguiendo el mismo razonamiento que con el gen del CTR podemos pensar que en aquellos pacientes con genotipo *BB*, en los que parece estar determinada genéticamente la menor DMO, la tasa de remodelado óseo esté disminuída para intentar compensar dicha pérdida intrínseca de



masa ósea, de manera que haya menores tasas de resorción ósea. A pesar de que la diferencia entre las concentraciones del resto de marcadores de remodelado óseo no difiere significativamente entre los distintos genotipos, sí parece que aquellos pacientes con genotipo *BB* también presentan concentraciones discretamente menores de marcadores de formación como PINP u OC que las de pacientes con genotipos diferentes. Reforzando dicha idea se encuentran los resultados obtenidos en el trabajo de *Ramirez Ruiz* en una población de pacientes diabéticos de la Región de Murcia (206); en dicha población sí se detectaron diferencias significativas en la concentración de determinados marcadores de remodelado, entre ellos la OC, cuya concentración fue menor en pacientes con genotipo *BB*. La síntesis de OC es inducida por el calcitriol, forma activa de la vitamina D, que ejerce su efecto a través de su unión al VDR. Por este motivo no es extraño pensar que la presencia de polimorfismos en el gen del VDR pueda dar lugar a variaciones en las concentraciones séricas de OC o, lo que es lo mismo, que las concentraciones de ésta estén bajo una fuerte influencia genética. *Morrison et al* demostraron por primera vez que pacientes con genotipo *bb* del polimorfismo VDR-BsmI se asociaba con concentraciones superiores de OC (300) afirmación que otros muchos autores han ido confirmando años posteriores con sus publicaciones (239).

No obstante, no todos los trabajos publicados siguen la misma dirección y encontramos otros en los cuales no se observan diferencias significativas en la concentración de los marcadores de remodelado óseo en función del genotipo del VDR-BsmI, como es el caso del trabajo publicado por *Laaksonen et al* realizado sobre 93 mujeres del Norte de Europa en las que solo difieren las concentraciones de vitamina D, siendo mayores en las pacientes con genotipo *BB* (301). En esta misma línea están los resultados de *Garnero et al* que, tras estudiar los resultados de 589 mujeres postmenopáusicas, no encontraron diferencias significativas en la concentración de los diferentes biomarcadores analizados (302).

En cuanto al polimorfismo VDR-FokI no se han encontrado diferencias notables en las concentraciones de ninguno de los biomarcadores de remodelado óseo entre los pacientes con distintos genotipos. En artículo realizado sobre 114 mujeres europeas, 33 sanas y 81 que presentaban osteopenia u osteoporosis, analizaron las concentraciones de ALPo y PICP en función de los distintos genotipos de los polimorfismos del VDR, entre ellos FokI, sin encontrar tampoco diferencias apreciables entre estos (303). Sin

embargo, en el trabajo realizado sobre población diabética de *Ramírez Ruíz* ha quedado demostrada la existencia de diferencias en la concentración de  $\beta$ -CTX, siendo más elevada en pacientes con el genotipo *ff* (206); siendo este marcador un reflejo de la resorción ósea coincide con otros artículos publicados en que dicho genotipo se asocia a valores más bajos de DMO (290).

#### **5.4.5.4. Gen del receptor de estrógenos (ER)**

En el grupo de pacientes incluídos en nuestro estudio aquellos con genotipo *PP* del polimorfismo ESR1-PvuII muestran concentraciones notablemente superiores de NTX que el resto de pacientes, lo cual podría estar reflejando una tasa acelerada de resorción ósea. Sin embargo, atendiendo a los datos de las densitometrías son los pacientes con genotipo heterocigoto *Pp* los que menor DMO presentan, aunque sin diferir significativamente del resto de pacientes. De esto podemos deducir que es la presencia del alelo P la que marca la tendencia hacia una mayor tasa de resorción ósea.

Por otra parte, diversas publicaciones exponen la idea de que la presencia del alelo *x* se asocia a la menor DMO, yendo más allá algunos autores afirmando que el hecho de poseer el haplotipo *Px* se asocia con niveles más bajos de DMO (241,304). Sin embargo son pocos los trabajos que relacionan el genotipo con las concentraciones de los diferentes biomarcadores de remodelado óseo y de los que lo hacen, la mayoría no encuentra una asociación significativa entre ambos (305). En nuestro trabajo, tampoco se ha encontrado asociación alguna entre el polimorfismo ESR1-XbaI y los biomarcadores de remodelado óseo.

### **5.5. Establecer la combinación más adecuada de marcadores de remodelado óseo y SNPs con las variables clínicas para el diagnóstico y seguimiento de la patología ósea en pacientes epilépticos.**

Como ya se ha comentado previamente la realización de las densitometrías óseas, y en concreto densitometrías mediante DEXA, sigue siendo a día de hoy el *gold standard* para el diagnóstico y seguimiento de la osteoporosis. No obstante, tiene como inconvenientes no sólo el alto coste de la prueba si no la información limitada que refleja. Como bien sabemos, la densitometría ósea nos aporta información muy útil

acerca de la DMO de un individuo, es decir, de la masa de hueso por unidad de superficie ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ), y del contenido mineral óseo (CMO) que corresponde al peso de la parte mineral ósea por unidad de longitud de barrido ( $\text{g}/\text{cm}$ ) y que tiende a ser asimilado al concepto de masa ósea, ya que el componente mineral es el componente mayoritario del tejido óseo. Estos datos reflejan el estado óseo en un momento determinado y, atendiendo a los criterios propuestos por la OMS, permiten clasificar al individuo como individuo sano desde el punto de vista de la salud ósea, individuo con osteopenia o individuo con osteoporosis y relacionar este dato a su vez con el riesgo de fractura. Sin embargo, esta prueba no aporta información dinámica del metabolismo óseo ni permite valorar que otros factores a parte de la masa y composición ósea pueden afectar a la salud del hueso. Como hemos visto hasta ahora, la determinación de ciertos parámetros bioquímicos de remodelado óseo no refleja fielmente el estado óseo de un individuo en un momento determinado pero sí nos permiten hacernos una idea de la tasa de remodelado óseo de dicho individuo en el tiempo. Asimismo, hemos comprobado como el estudio de determinados factores genéticos tiene una influencia notable sobre la DMO de los pacientes epilépticos incluidos en el estudio, demostrando que aquellos individuos con genotipo *xx* del polimorfismo del gen del colágeno COL1A1-Sp1 presentan menor DMO que el resto de pacientes con otros genotipos. Es por esto que durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral nos planteamos crear diferentes modelos diagnósticos que, incluyendo la información que aportan unos y otros factores, nos permitiesen predecir el riesgo de desarrollar osteopenia/osteoporosis sin necesidad de la realización de una densitometría ósea y poder así adelantarnos a sus fatales consecuencias. Al mismo tiempo, el empleo de dichos modelos supondría una ventaja económica para el sistema sanitario ya que ambos tipos de determinaciones (bioquímicas y genéticas) son más económicas que las pruebas de imagen.

Por tanto, a raíz del planteamiento anteriormente expuesto, elaboramos distintos modelos diagnósticos con el objetivo de predecir la probabilidad o riesgo de que un paciente epiléptico en tratamiento con FAE durante más de doce meses desarrollase patología ósea, entendiendo como tal la osteopenia u osteoporosis diagnosticada mediante densitometría por DEXA según criterios de la OMS (T-Score inferior a -1). Se ha hecho el estudio por duplicado, analizando los resultados de las densitometrías a nivel femoral y lumbar, ya que al haber distintos tipos de hueso en cada una de las localizaciones estudiadas el efecto puede variar.

A nivel femoral se han elaborado tres modelos diagnósticos. El primero incluye distintas variables clínicas y variables directamente relacionadas con la epilepsia, todas ellas recogidas durante las entrevistas realizadas en cada una de las visitas. El segundo modelo incluye, a parte de las variables clínicas que resultaron relevantes del modelo I, los marcadores bioquímicos de remodelado óseo analizados en el estudio, tanto de formación como de resorción. Y en el tercer y último modelo se incluyen los resultados de los polimorfismos relacionados con el metabolismo óseo estudiados.

Para elaborar cada modelo se ha llevado a cabo un estudio de regresión logística binaria y posteriormente se ha evaluado su utilidad como predictor de patología ósea en el grupo de pacientes epilépticos estudiados. Según el Modelo I, que sólo incluye variables clínicas, la presencia de hipertensión arterial es el único factor predictor de patología ósea de forma independiente. En el Modelo II, que incluye los marcadores bioquímicos de remodelado óseo, además de la hipertensión arterial la cuantificación de los niveles de ALPo pueden considerarse una herramienta útil predecir la enfermedad de manera independiente. En contra de lo que cabía esperar, a pesar de que en nuestro estudio ha quedado demostrado que la presencia del polimorfismo COL1A1-Sp1 del gen del colágeno se asocia a menores valores de DMO en la cohorte de pacientes epilépticos estudiada, este no puede considerarse de forma independiente como un factor capaz de predecir la osteopenia u osteoporosis a nivel femoral.

Los tres modelos diagnósticos elaborados presentan una adecuada capacidad para realizar estimaciones no sesgadas de la probabilidad de osteopenia/osteoporosis, lo cual se deduce tras realizar el test de Hosmer Lemeshow, test que permite analizar la calibración del test o lo que es lo mismo, analizar la concordancia entre los resultados observados y las predicciones arrojadas por el modelo.

Al comparar los tres modelos elaborados no encontramos diferencias significativas entre ellos a la hora de diagnosticar patología ósea, aunque sí parece que el Modelo III es el que más información aporta, con un mayor área bajo la curva en el análisis de curvas ROC. Esto es lógico si tenemos en cuenta que es el modelo que más información recoge, incluyendo como variables clínicas la presencia de hipertensión arterial y DM, el consumo de tabaco, los niveles de calcio y vitamina D en la dieta y el tiempo de diagnóstico de la epilepsia, como marcador bioquímico la determinación de las concentraciones de ALPo y como factores genéticos, el genotipado del polimorfismo

## COL1A1-Sp1.

Como hemos visto, la hipertensión arterial es una de las variables clínicas que se recoge en los tres modelos elaborados, pudiendo considerarse en los tres como un factor predictor de osteoporosis incluso valorado de forma independiente. Sin embargo, estos resultados sería conveniente contrastarlos con otros trabajos similares o realizarlos con un mayor número de pacientes ya que el bajo número de participantes con hipertensión incluidos en el estudio podría estar limitando las conclusiones extraídas del análisis estadístico. No obstante, a raíz de los resultados obtenidos se ha procedido a comparar la DMO medida como T y Z-Score a nivel femoral en función de si el paciente presentaba o no hipertensión arterial (Tensión Arterial Sistólica  $\geq 140$  mmHg y/o Tensión Arterial Diastólica  $\geq 90$  mmHg). Dicho estudio ha revelado que los pacientes hipertensos presentan valores de DMO significativamente menores que los normotensos (T-Score: -1,09 vs 0,45;  $p=0,019$ ), lo cual quiere decir que la hipertensión arterial podría considerarse como un factor de riesgo importante para el desarrollo de osteoporosis a la hora de la valoración inicial de un paciente epiléptico. Varios son los trabajos publicados que estudian la relación entre las cifras de presión arterial y la DMO, aunque los resultados de los mismos son dispares. El estudio de *Perez Castrillón et al* realizado sobre 82 mujeres españolas menopáusicas e hipertensas analizaba la DMO en columna lumbar mediante la realización de densitometrías. En dicho estudio, un 22% de las mujeres eran hipertensas pero no se encontró asociación significativa entre la presión arterial y la masa ósea. Sin embargo, sí se encontró una correlación negativa entre la presión arterial y los niveles de osteocalcina, lo cual permitió afirmar al autor de dicho estudio que en mujeres hipertensas hay una menor tasa de formación de hueso (306). En otro estudio publicado en España bajo los auspicios de la Sociedad Española de Hipertensión (SEH), la Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (LELHA) y la Fundación Hispana de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Oseas (FHOEMO) se hace referencia a un trabajo en el que 333 mujeres fueron estudiadas, realizándoseles una toma de la tensión arterial y una tomografía computarizada cuantitativa radial. El análisis de los datos observados evidenció una mayor prevalencia de hipertensión arterial en el grupo de mujeres que presentaban osteopenia que en el resto (307). 400 mujeres fueron incluidas en un estudio transversal realizado en Jordania por *Shilbayeh et al* en el que se analizaron los posibles factores de riesgo para el desarrollo de la osteoporosis. Tras realizar un ajuste por edad e IMC, el análisis

logístico consideró, al igual que en nuestro caso, la hipertensión arterial como factor independiente de riesgo para la osteoporosis, además de otras variables como la menopausia, el consumo de tabaco y la presencia de determinadas enfermedades como la enfermedad gastrointestinal o la artritis reumatoide (308). En sentido opuesto encontramos otro estudio en el que se investigó la relación entre osteoporosis e hipertensión arterial y que fue publicado por *Hanley et al.* Estos autores incluyeron 5566 mujeres y 2187 hombres con una edad media de 67 y 66 años, respectivamente. En este estudio, la prevalencia de hipertensión arterial (29,9% en hombres y 33,8% en mujeres) se asoció sin embargo a mayores medidas de masa ósea, siendo las diferencias más pronunciadas en columna lumbar y cuello femoral en mujeres y en columna lumbar en hombres (309).

Entre los marcadores bioquímicos de remodelado óseo cabe destacar el papel de la fosfatasa alcalina ósea (ALPo) ya que tras el estudio de regresión logística realizado ha resultado ser el único de los marcadores analizados capaz de predecir el riesgo de osteoporosis de forma individual. Como ya se ha dicho en apartados anteriores, el estudio de los marcadores bioquímicos no ha resultado ser útil a la hora de diagnosticar osteopenia/osteoporosis en la cohorte de pacientes epilépticos seleccionada. Sin embargo, y coincidiendo con la bibliografía, el estudio de los biomarcadores sí parece reflejar correctamente la tasa de remodelado óseo, por lo pensamos que el estudio de la concentración de ALPo junto con otras variables clínicas y polimorfismos genéticos dentro de un mismo modelo diagnóstico podría resultar ser una herramienta muy útil en la valoración inicial del paciente epiléptico que va a comenzar un nuevo tratamiento antiepiléptico, estimando el riesgo mayor o menor de sufrir osteopenia/osteoporosis asociada.

En cuanto a los polimorfismos de los genes relacionados con el metabolismo óseo solamente el estudio del polimorfismo COL1A1-Sp1 del gen del colágeno tipo 1 parece tener relevancia a la hora de determinar la masa ósea en los pacientes epilépticos. Aún con todo, el estudio de regresión logística realizado ha reflejado que no es buen predictor de osteopenia/osteoporosis estudiado de forma independiente por lo que su estudio no debe realizarse de forma aislada, aunque combinado con otras variables clínicas y junto a la cuantificación de la ALPo su capacidad diagnóstica mejora significativamente.

Al comparar la utilidad de los tres modelos mediante la diferencia de áreas y el IDI, no se observaron diferencias significativas al comparar los distintos modelos entre sí, aunque sí parece que al comparar el Modelo II con el Modelo III haya una tendencia hacia la significación estadística, reflejando quizá que el Modelo III sea el que mejor predice el riesgo de patología ósea frente al resto.

Actualmente, a pesar de que los efectos secundarios sobre la salud ósea asociados al tratamiento con FAE (fundamentalmente FAE clásicos) están perfectamente descritos y demostrados en diferentes estudios, no queda plasmada en las distintas guías sobre epilepsia la recomendación de realizar estudios del estado óseo en dichos pacientes antes de empezar un tratamiento antiepiléptico o durante el mismo, ni tampoco en las guías de prevención de osteoporosis. Algunos autores comienzan a barajar dicha opción, aunque por el momento no está claro ni cómo ni cuando hacer este tipo de cribados. Hasta ahora la técnica de elección es la densitometría ósea, pero como ya sabemos es una técnica cara y debe seleccionarse cuidadosamente a quien realizarla y cuando hacerlo. *Pack et al* proponen realizar una densitometría a aquellos pacientes tras un tratamiento con FAE durante 3 o 5 años, sin embargo no precisan la frecuencia con la que debe repetirse dicho estudio. Probablemente, la respuesta dependa de la edad del paciente, el tipo de tratamiento antiepiléptico asociado y el grado de patología ósea detectado (310). Una alternativa posible en el estudio de la salud ósea de pacientes epilépticos sería realizar el estudio del polimorfismo COL1A1-Sp1 al inicio del tratamiento, así como la cuantificación de los niveles de ALPo, lo cual nos daría una idea de la tasa de metabolismo óseo de individuo y de su mayor o menor predisposición genética a perder masa ósea a lo largo del tiempo. Estos datos, junto con la valoración de una serie de datos clínicos, entre ellos la hipertensión arterial, ayudarían al clínico a clasificar a cada paciente con un mayor o menor riesgo de pérdida de masa ósea y por tanto, una tendencia hacia el desarrollo de la osteoporosis. En aquellos pacientes en los que el riesgo fuese elevado estaría indicada la realización de densitometrías, tanto diagnóstica como de seguimiento, e incluso el tratamiento con fármacos antirresortivos.

Si tenemos en cuenta los datos obtenidos a nivel lumbar vemos que el estudio de regresión logística arroja resultados diferentes. En este caso, variables clínicas como el sexo o el tipo de FAE clásico/nuevo que toman los pacientes son capaces de predecir el riesgo de osteopenia/osteoporosis de forma independiente. El sexo es uno de los factores de riesgo no modificables para el desarrollo de osteoporosis, aceptando que el

déficit estrogénico que se produce tras la menopausia conduce a una mayor pérdida de masa ósea. Por otro lado, es importante tener en cuenta el tipo de FAE con el que se va a tratar al paciente, ya que según la bibliografía, los FAE clásicos con efecto inductor enzimático se asocian a menores valores de DMO (256). En nuestro caso no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas a nivel densitométrico que puedan nos permitan afirmar esto con rotundidad, aunque sí parece haber cierta diferencia entre los valores de DMO, siendo mayor en aquellos pacientes en tratamiento con FAE de nueva generación. Quizá, un mayor número de pacientes o la mayor duración del estudio permitirían comprobar dicho efecto. No obstante, consideramos que incluir este tipo de variables clínicas en un modelo diagnóstico, junto con otras variables bioquímicas y/o genéticas aumentaría la eficacia diagnóstica del mismo.

A esto se suma la información proporcionada por la presencia de dos polimorfismos, el polimorfismo COL1A1-Sp1 y el ESR1-XbaI, que también han mostrado ser herramientas útiles de manera independiente en la predicción de patología ósea. Esto aportaría grandes ventajas ya que las variables clínicas son recogidas al inicio del estudio de cada paciente antes de realizar ningún tipo de intervención, como parte de la anamnesis, y no requieren ningún coste adicional. Dicha información podría ayudar al clínico a tomar determinada actitud frente a un paciente epiléptico que, a *priori*, presentase mayor probabilidad de desarrollar osteopenia/osteoporosis al iniciar el tratamiento antiepiléptico. Si a esto se suma la información aportada por el estudio de los polimorfismos genéticos, que simplemente es necesario realizar una vez en la vida, y teniendo en cuenta que el modelo V ha presentado un AUC adecuada, sería posible categorizar a los pacientes en función del riesgo de desarrollar alguna alteración a nivel óseo, suponiendo esto una herramienta muy útil para el clínico a la hora de seleccionar pacientes candidatos a la realización de densitometrías al inicio del tratamiento, o de identificar a aquellos que a *priori* requiriesen tratamientos antirresortivos para prevenir la pérdida acelerada de hueso.

Esta diferencia entre los modelos obtenidos a nivel femoral y lumbar podría explicarse por la presencia de distinto tipo de hueso en cada una de las localizaciones; a nivel lumbar existe una mayor proporción de hueso trabecular, que como ya hemos dicho previamente es metabólicamente más activo, lo cual podría suponer que la fuerza de las variables clínicas ya estuviese ejerciendo un efecto tal sobre el hueso que fuese capaz de predecir por sí sólo el riesgo de desarrollar patología ósea.



Por tanto, se puede afirmar que la aplicación de este tipo de modelos permitiría realizar un screening en los pacientes epilépticos para seleccionar a aquellos condidatos a un seguimiento más exhaustivo por presentar mayor riesgo de desarrollar osteopenia/osteoporosis. Sin embargo, sería necesario realizar más estudios en esta línea para poder afirmar esto con más certeza y poder comprobar si la aplicación de los mismos aporta las ventajas que en principio parecen tener.

### **5.6. Limitaciones del estudio**

El desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha enfrentado a dos limitaciones importantes. La primera de ellas es el bajo número de pacientes incluidos en la misma. A pesar de que la epilepsia es una enfermedad frecuente en nuestro medio no ha sido fácil encontrar pacientes dispuestos a participar en el proyecto; como ya se ha dicho previamente, la epilepsia es una enfermedad que acarrea importantes problemas médicos y sociales como consecuencia por un lado de la aparición de crisis recurrentes y los efectos secundarios de la medicación, y por otro de la estigmatización social. Todo esto hace que estas personas, en ocasiones, vean disminuía su calidad de vida y en muchos casos limitada su movilidad y no se presten fácilmente a participar en un proyecto que implica un mayor número de visitas médicas. A todo esto se suma el hecho de que cada tipo de FAE tenga un efecto diferente sobre el metabolismo óseo, lo que hace que cada subgrupo tenga un menor número de pacientes y a veces resulte insuficiente el tamaño muestral de cada subgrupo para sacar conclusiones robustas.

Otro aspecto importante del proyecto que supone una limitación a la hora de interpretar los resultados es el corto periodo de tiempo transcurrido entre las dos visitas. A pesar de que se considera que un ciclo de remodelado óseo se completa en tres meses aproximadamente y que tras seis meses sería posible observar variaciones en la DMO, las guías clínicas recomiendan realizar densitometría de control transcurrido al menos un año desde la última densitometría. Sin embargo, a la hora de plantear el estudio se decidió adelantar la visita de control para disminuir el tiempo de seguimiento y evitar así en lo posible el abandono por parte de los pacientes por miedo a perder pacientes que tan difíciles son de seleccionar.



## VI. CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer de esta Tesis Doctoral se enumeran a continuación:

1. Los pacientes incluidos en nuestro grupo de estudio difieren de lo descrito en la bibliografía en cuanto a edad y sexo, siendo en nuestro caso más prevalentes los hombres de entre 20 y 40 años. Respecto a la etiología de la epilepsia y el tipo de FAE asociado, los datos obtenidos son acordes a lo descrito por otros autores, siendo la epilepsia de tipo estructural la más frecuente y el FAE más utilizado el Levetiracetam.
2. Los genotipos más frecuentes de cada uno de los polimorfismos estudiados son: para el gen VDR, genotipo *Bb* del polimorfismo BsmI y genotipo *Ff* del polimorfismo FokI; para el ESR1, genotipo *PP* del polimorfismo PvuII y genotipo *xx* del polimorfismo XbaI; genotipo *aa* del polimorfismo CTR-AluI y genotipo *SS* del polimorfismo COL1A1-Sp1, no existiendo diferencias entre hombres y mujeres. Los genotipos *PP*, *xx*, *aa* y *ss* son más frecuentes en pacientes epilépticos que en población sana de referencia.
3. A) Se ha detectado un aumento de la concentración de vitamina D a lo largo del estudio, y en aquellos pacientes en tratamiento con FAE de nueva generación se ha detectado además un aumento de la calcemia. El tratamiento con FAE de efecto inductor enzimático conlleva una reducción significativa de la calcemia, aunque no se acompaña de disminución de niveles de vitamina D. El genotipo *BB* promueve el aumento de los niveles de calcio en suero, el genotipo *Pp* conduce a una reducción de los niveles de fósforo y PTH y el genotipo *XX* a un aumento de la concentración de fósforo en orina.  
  
B) El tratamiento con FAE, independientemente del mecanismo de acción, está asociado al metabolismo lipídico de los pacientes, disminuyendo tanto el colesterol total como de colesterol LDL. Los pacientes con el genotipo *aa* del polimorfismo CTR-AluI presentan mayores concentraciones de triglicéridos y colesterol LDL, y menores de colesterol HDL.

- C) Ni los distintos tipos de FAE ni los genotipos de los diferentes polimorfismos estudiados influyen sobre la función renal de los pacientes epilépticos.
4. A) El tratamiento con FAE no parece tener un efecto perjudicial a corto plazo sobre la salud ósea ya que no se han detectado diferencias en las densitometrías. La DMO es menor en mujeres que en hombres, sin haber diferencias entre aquellos pacientes en tratamiento con FAE clásicos o de nueva generación.
- B) El uso de la herramienta informática FRAX<sup>®</sup> no es apropiado para valorar el riesgo de fractura en pacientes epilépticos al no considerar la toma de FAE como un factor de riesgo de osteoporosis.
- C) Los marcadores de remodelado óseo no pueden considerarse una herramienta útil para el diagnóstico de la osteoporosis ni para valorar el riesgo de fractura en nuestro estudio. Sin embargo, sí reflejan la tasa de remodelado óseo y por tanto pueden ser útiles para evaluar la respuesta del tejido óseo tras el inicio del tratamiento con FAE.
- D) La presencia del genotipo ss del polimorfismo del gen del colágeno tipo 1 COL1A1-Sp1 se asocia a menores valores de DMO obtenidos por densitometría.
5. El uso de modelos diagnósticos que incluyan variables clínicas, bioquímicas y la determinación de polimorfismos genéticos aporta información útil para la identificación de pacientes epilépticos con más riesgo de desarrollar osteopenia/osteoporosis.

## VII. BIBLIOGRAFÍA





---

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Fisher RS, Boas W van E, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005 Apr;46(4):470–2.
2. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010 Apr;51(4):676–85.
3. Mercadé Cerdá JM, Sancho Rieger J, Mauri Llerda JA, López González FJ, Salas Puig X S. Guías diagnósticas y terapéuticas de la Sociedad Española de Neurología 2012. Guía oficial de práctica clínica en epilepsia © 2012, Sociedad Española de Neurología. Madrid; 2012. 236 p.
4. El Achkar CM, Olson HE, Poduri A, Pearl PL. The Genetics of the Epilepsies. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2015 Jul 26;15(7):39.
5. Helbig I, Scheffer IE, Mulley JC, Berkovic SF. Navigating the channels and beyond: unravelling the genetics of the epilepsies. *Lancet Neurol*. 2008 Mar;7(3):231–45.
6. Micheli F. Tratado de neurología clínica. 1<sup>a</sup>. Micheli F; Nogués MA, Asconapé JJ, Fernández Pardal MM BJ, editor. Madrid: Médica Panamericana; 2003. 778-789 p.
7. Jallon P. Epilepsy and epileptic disorders, an epidemiological marker? Contribution of descriptive epidemiology. *Epileptic Disord*. 2002 Mar;4(1):1–13.
8. Global Campaign against Epilepsy., Programme for Neurological Diseases and Neuroscience (World Health Organization), International Bureau of Epilepsy., International League against Epilepsy. Atlas : epilepsy care in the world. Programme for Neurological Diseases and Neuroscience, Dept. of Mental Health and Substance Abuse, World Health Organization; 2005. 91 p.
9. Megiddo I, Colson A, Chisholm D, Dua T, Nandi A, Laxminarayan R. Health and economic benefits of public financing of epilepsy treatment in India: An agent-based simulation model. *Epilepsia*. 2016 Mar;57(3):464–74.
10. Ochoa Sangrador C, Palencia Luaces R. Study of the prevalence of epilepsy among schoolchildren in Valladolid, Spain. *Epilepsia*. 32(6):791–7.

11. Luengo A, Parra J, Colás J, Rámos F, Carreras T, Fernández-Pozos MJ, et al. Prevalence of epilepsy in northeast Madrid. *J Neurol*. 2001 Sep;248(9):762–7.
12. Durá-Travé T, Yoldi-Petri ME, Gallinas-Victoriano F. Incidence of Epilepsies and Epileptic Syndromes Among Children in Navarre, Spain: 2002 Through 2005. *J Child Neurol*. 2008 Aug;23(8):878–82.
13. Benavente I, Rubio E, Morales C, Tajada N, Tamargo P. Prevalence of epilepsy amongst adolescents in Huesca, Spain: a community-based study. *Eur J Neurol*. 2009 Oct;16(10):1138–43.
14. Garcia-Martin G, Perez-Erazquin F, Isabel Chamorro-Muñoz M, Romero-Acebal M, Martin-Reyes G, Dawid-Milner MS. Prevalence and clinical characteristics of epilepsy in the South of Spain. *Epilepsy Res*. 2012 Nov;102(1–2):100–8.
15. Serrano-Castro PJ, Mauri-Llerda JA, Hernández-Ramos FJ, Sánchez-Alvarez JC, Parejo-Carbonell B, Quiroga-Subirana P, et al. Adult Prevalence of Epilepsy in Spain: EPIBERIA, a Population-Based Study. *Sci World J*. 2015 Dec 10;2015:1–8.
16. Pedroza GF. Epidemiología clínica de la epilepsia. *Rev Mex Neurocienc*. 2010;11(182–102).
17. García-Ramos R, Pastor AG, Masjuan J, Sánchez C, Gil A. FEEN: Informe sociosantario FEEN sobre la epilepsia en España. *Neurología*. 2011 Nov;26(9):548–55.
18. Mercadé Cerdá JM, Argani MT, Llerda JAM, Gonzalez FJL, Puig XS, Rieger JS. Guía oficial de la Sociedad Española de Neurología de práctica clínica en epilepsia. *Neurología*. 2016;31(2):121–9.
19. Sánchez Álvarez J. Diagnóstico y tratamiento de la epilepsia en niños y adultos SOCIEDAD ANDALUZA DE EPILEPSIA. 2015;59–101.
20. Kumar A, Chugani HT. The Role of Radionuclide Imaging in Epilepsy, Part 2: Epilepsy Syndromes. *J Nucl Med Technol*. 2017 Mar 21;45(1):22–9.
21. Herranz Fernández JL. Tratamiento antiepiléptico. Vigilancia y controles. *Protoc Diagnóstico Ter la AEP Neurol Pediátrica*. 2008;52–8.
22. Nieto Barrera M. Evolución del tratamiento antiepiléptico desde los bromuros a la farmacogenética. *Soc pediatría Andalucía Occident y Extrem Hosp Infant Univ Virgen del Rocío Sevilla*. 2011;

23. Schmidt D. The clinical impact of new antiepileptic drugs after a decade of use in epilepsy. *Epilepsy Res.* 2002 Jun;50(1–2):21–32.
24. Löscher W, Schmidt D. New Horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. *Epilepsy Res.* 2006 Jun;69(3):183–272.
25. Luszczki JJ. Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Rep.* 61(2):197–216.
26. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e igualdad. Utilización de medicamentos antiepilépticos en España durante el periodo 2008-2016. Agencia española del Medicam y Prod Sanit. 2017;
27. Stephen LJ, Brodie MJ. Pharmacotherapy of Epilepsy. *CNS Drugs.* 2011 Feb;25(2):89–107.
28. Perucca P, Jacoby A, Marson AG, Baker GA, Lane S, Benn EKT, et al. Adverse antiepileptic drug effects in new-onset seizures: A case-control study. *Neurology.* 2011 Jan 18;76(3):273–9.
29. Cramer JA, Mintzer S, Wheless J, Mattson RH. Adverse effects of antiepileptic drugs: a brief overview of important issues. *Expert Rev Neurother.* 2010 Jun 9;10(6):885–91.
30. Frey N, Bodmer M, Bircher A, Rüegg S, Jick SS, Meier CR, et al. The risk of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in new users of antiepileptic drugs. *Epilepsia.* 2017 Oct 13;
31. Tangamornsuksan W, Chaiyakunapruk N, Somkrua R, Lohitnavy M, Tassaneeyakul W. Relationship Between the HLA-B\*1502 Allele and Carbamazepine-Induced Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis. *JAMA Dermatology.* 2013 Sep 1;149(9):1025.
32. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and T. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA.* 2001 Feb 14;285(6):785–95.
33. Gonzalez Macías J, Marín F, Vila J, Diez Pérez A, Abizanda M, Álvarez R, Gimeno A, Pegenaute E. Prevalencia de factores de riesgo de osteoporosis y fracturas osteoporóticas en una serie de 5.195 mujeres mayores de 65 años. *Med Clin (Barc).* 2004 Jun 1;123(3):85–9.
34. Weaver CM, Gordon CM, Janz KF, Kalkwarf HJ, Lappe JM, Lewis & R, et al. The National Osteoporosis Foundation’s position statement on peak bone mass development

- and lifestyle factors. *Osteoporos Int*. 2016;27:1281–386.
35. Guía de Práctica Clínica sobre Osteoporosis y Prevención de Fracturas por Fragilidad. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. 2010;
  36. Cantabrana Alùtiz A. Prevalencia de la osteoporosis determinada por densitometría en la población femenina española. *Med Clin (Barc)*. 2001 Jan;117(1):38.
  37. Muñoz-Torres M, Alonso G, Mezquita Raya P. Prevención y tratamiento de la osteoporosis. *Endocrinol y Nutr*. 2003 Jan;50(1):1–7.
  38. Grupo de Trabajo de la Sociedad Española de Investigaciones Óseas y Metabolismo Mineral (SEIOMM). Osteoporosis postmenopáusica. Guía de práctica clínica. *Rev Clínica Española*. 2003 Jan 1;203(10):496–506.
  39. González LA, Vásquez GM, Molina JF. Epidemiología de la osteoporosis. *Rev Colomb Reumatol*. 2009;16(1):61–75.
  40. Bastida Calvo J. ¿Cómo se puede medir el riesgo de fractura? In: Guía práctica del manejo de la Osteoporosis y prevención de la fractura por fragilidad en At Primaria. Pontevedra; 2014. p. 39–48.
  41. Pérez Edo L, Alonso Ruiz A, Roig Vilaseca D, García Vadillo A, Guañabens Gay N, Peris P, et al. Actualización 2011 del consenso Sociedad Española de Reumatología de osteoporosis. *Reumatol Clínica*. 2011 Nov 1;7(6):357–79.
  42. Carbonell Abella C, Martín Jimenez JA V y LC. Identificación de los pacientes con riesgo de osteoporosis. In: Guía de Buena Práctica Clínica en OSTEOPOROSIS. 2nd ed. Madrid; 2011. p. 25–41.
  43. Grupo de trabajo de enfermedades reumatológicas de la Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria /semFYC). Osteoporosis. Manejo: prevención, diagnóstico y tratamiento. Barcelona; 2014. 15-21 p.
  44. Nguyen T V., Eisman JA. Genetics of Fracture: Challenges and Opportunities. *J Bone Miner Res*. 2000 Jul 1;15(7):1253–6.
  45. You L, Chen L, Pan L, Chen J. New insights into the gene function of osteoporosis. [bioscience.org](http://bioscience.org).
  46. Kılıç S, Silan F, Hız MM, Işık S, Öğretmen Z, Özdemir Ö. Vitamin D Receptor Gene BSMT, FOKI, APAI, and TAQI Polymorphisms and the Risk of Atopic Dermatitis. *J*

- Investig Allergol Clin Immunol J Investig Allergol Clin Immunol VDR Gene Risk Atopic Dermat J Investig Allergol Clin Immunol. 2016;26(262):106–10.
47. Palomer X, González-Clemente JM, Blanco-Vaca F, Mauricio D. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obes Metab.* 2008 Mar;10(3):185–97.
  48. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta.* 2006 Sep;371(1–2):1–12.
  49. Falchetti A, Sferrazza C, Cepollaro C, Gozzini A, Del Monte F, Masi L, et al. FokI Polymorphism of the Vitamin D Receptor Gene Correlates with Parameters of Bone Mass and Turnover in a Female Population of the Italian Island of Lampedusa. *Calcif Tissue Int [Internet].* 2007 Jan 8 [cited 2017 Dec 20];80(1):15–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17164973>
  50. Lisker R, López MA, Jasqui S, Ponce De León Rosales S, Correa-Rotter R, Sánchez S, et al. Association of vitamin D receptor polymorphisms with osteoporosis in mexican postmenopausal women. *Hum Biol.* 2003 Jun;75(3):399–403.
  51. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen T V., et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature.* 1994 Jan 20;367(6460):284–7.
  52. Thakkestian A, D'Este C, Eisman J, Nguyen T, Attia J. Meta-Analysis of Molecular Association Studies: Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and BMD as a Case Study. *J Bone Miner Res.* 2003 Dec 29;19(3):419–28.
  53. Jia F, Sun R-F, Li Q-H, Wang D-X, Zhao F, Li J-M, et al. Vitamin D Receptor Bsm I Polymorphism and Osteoporosis Risk: A Meta-Analysis from 26 Studies. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013 Jan;17(1):30–4.
  54. Li Y, Xi B, Li K, Wang C. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in Chinese women. *Mol Biol Rep.* 2012 May 23;39(5):5709–17.
  55. Yoldemir T, Yavuz DG, Anik G, Verimli N, Erenus M. Vitamin D receptor gene polymorphisms in a group of postmenopausal Turkish women: association with bone mineral density. *Climacteric.* 2011 Jun 17;14(3):384–91.
  56. Álvarez-Hernández D, Naves Díaz M, Gómez Alonso C, Cannata Andía JB. Los polimorfismos del gen del receptor de la vitamina D (VDR) modulan la respuesta a la

- vitamina D de forma tejido específica. *Rev Española Enfermedades Metabólicas Óseas*. 2007 Jan 1;16(1):20–7.
57. Jiménez-Salas Z, Hernández-Tobías EA, Ramírez-López TE, Campos-Góngora E. Asociación del polimorfismo TaqI del gen del receptor de la vitamina D con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas jóvenes. *Nutr Hosp*. 2012;27(5):1505–10.
  58. Stykarsdottir U, Halldorsson B V., Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. Multiple Genetic Loci for Bone Mineral Density and Fractures. *N Engl J Med*. 2008 May 29;358(22):2355–65.
  59. Bland R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin Sci (Lond)*. 2000 Feb;98(2):217–40.
  60. Rauschemberger M, Polini N, Sola M, Bonacorsi S, Massheimer V. *Revista argentina de endocrinología y metabolismo*. Vol. 49, *Revista argentina de endocrinología y metabolismo*. Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo; 2012. 0-0 p.
  61. Salmén T, Heikkinen A-M, Mahonen A, Kröger H, Komulainen M, Saarikoski S, et al. Early Postmenopausal Bone Loss Is Associated with PvuII Estrogen Receptor Gene Polymorphism in Finnish Women: Effect of Hormone Replacement Therapy. *J Bone Miner Res*. 2010 Feb 18;15(2):315–21.
  62. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabrò A, Becherini L, Martini G, et al. Estrogen Receptor Gene Polymorphisms and the Genetics of Osteoporosis: A HuGE Review. *Am J Epidemiol*. 2005 Feb 15;161(4):307–20.
  63. Ioannidis JPA, Ralston SH, Bennett ST, Brandi ML, Grinberg D, Karassa FB, et al. Differential Genetic Effects of ESR1 Gene Polymorphisms on Osteoporosis Outcomes. *JAMA*. 2004 Nov 3;292(17):2105.
  64. Ioannidis JPA, Stavrou I, Trikalinos TA, Zois C, Brandi ML, Gennari L, et al. Association of Polymorphisms of the Estrogen Receptor  $\alpha$  Gene With Bone Mineral Density and Fracture Risk in Women: A Meta-Analysis. *J Bone Miner Res*. 2002 Nov 1;17(11):2048–60.
  65. Wang C-L, Tang X-Y, Chen W-Q, Su Y-X, Zhang C-X, Chen Y-M. Association of estrogen receptor  $\alpha$  gene polymorphisms with bone mineral density in Chinese women: a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2007 Mar 7;18(3):295–305.
  66. Masi L, Brandi ML. Calcitonin and calcitonin receptors. *Clin Cases Miner Bone Metab*.

- 2007 May;4(2):117–22.
67. Nakamura M, Zhang ZQ, Shan L, Hisa T, Sasaki M, Tsukino R, et al. Allelic variants of human calcitonin receptor in the Japanese population. *Hum Genet.* 1997 Jan;99(1):38–41.
  68. Tsai F-J, Chen W-C, Chen H-Y, Tsai C-H. The ALUI calcitonin receptor gene polymorphism (TT) is associated with low bone mineral density and susceptibility to osteoporosis in postmenopausal women. *Gynecol Obstet Invest.* 2003;55(2):82–7.
  69. Xu X-H, Dong S-S, Guo Y, Yang T-L, Lei S-F, Papasian CJ, et al. Molecular Genetic Studies of Gene Identification for Osteoporosis: The 2009 Update. *Endocr Rev.* 2010 Aug;31(4):447–505.
  70. Mann V, Hobson EE, Li B, Stewart TL, Grant SFA, Robins SP, et al. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest.* 2001 Apr 1;107(7):899–907.
  71. Stewart TL, Roschger P, Misof BM, Mann V, Fratzl P, Klaushofer K, et al. Association of COL1A1 Sp1 Alleles with Defective Bone Nodule Formation In Vitro and Abnormal Bone Mineralization In Vivo. *Calcif Tissue Int.* 2005 Aug 19;77(2):113–8.
  72. Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, Balcells S, Langdahl BL, Lips P, et al. Large-Scale Evidence for the Effect of the COL1A1 Sp1 Polymorphism on Osteoporosis Outcomes: The GENOMOS Study. Lewis C, editor. *PLoS Med.* 2006 Feb 21;3(4):e90.
  73. Gartner LP, Hiatt JL. Atlas en color y texto de histología. Médica Panamericana; 2015.
  74. M. Lyons K. Molecular, Cellular, and Genetic Determinants of Bone Structure and Formation. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* Ames, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 49–59.
  75. Lorenzo Sellares V. Atlas de osteodistrofia renal. Patología óseo metabólica: Introducción al conocimiento e interpretación de las lesiones histológicas óseas. Sociedad Española de Nefrología (SEN). 2011.
  76. Wheeler G, Elshahaly M, Tuck SP, Datta HK, van Laar JM. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *J Transl Med.* 2013 Aug 29;11(1):201.
  77. L.Kasper D. Metabolismo óseo y mineral en salud y enfermedad. In: McGraw-Hill Medical, editor. *Harrison Principios de Medicina Interna.* 19th ed. 2016.

78. Pogoda P, Priemel M, Rueger JM, Amling M. Bone remodeling: new aspects of a key process that controls skeletal maintenance and repair. *Osteoporos Int.* 2005 Mar 16;16(S02):S18–24.
79. Mellibovsky Saidler L, Díez Pérez A. Qué significa la calidad ósea. *Semin la Fund Española Reumatol.* 2006 Dec;7(4):165–76.
80. Arthur C.Guyton y John E.Hall. Hormona paratiroidea, calcitonina, metabolismo del calcio y el fosfato, vitamina D, huesos y dientes. In: *Tratado de fisiología médica* (Guyton y Hall). 12th ed. Barcelona; 2011. p. 978–95.
81. Han Y, Cowin SC, Schaffler MB, Weinbaum S. Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 23;101(47):16689–94.
82. Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene.* 2006 Feb 15;367:1–16.
83. Cosman F, Lindsay R. Therapeutic potential of parathyroid hormone. *Curr Osteoporos Rep* [Internet]. 2004 Mar [cited 2017 Dec 12];2(1):5–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16036076>
84. van Leeuwen JP, van Driel M, van den Bemd GJ, Pols HA. Vitamin D control of osteoblast function and bone extracellular matrix mineralization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2001;11(1–3):199–226.
85. Felsenfeld AJ, Levine BS. Calcitonin, the forgotten hormone: does it deserve to be forgotten? *Clin Kidney J.* 2015 Apr;8(2):180–7.
86. Molina PE. Glándula paratiroides y regulación del calcio y fosfato. In: McGraw-Hill Medical, editor. *Fisiología médica Un enfoque por aparatos y sistemas.* 2013.
87. Reyes García R, Rozas Moreno P, Muñoz-Torres M. Regulación del proceso de remodelado óseo. *Rev Española Enfermedades Metabólicas Óseas.* 2008 Jan;17(1):10–4.
88. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Angel Alobera Gracia M, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L, Juan Carlos R, Titular P, et al. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2004;11:2–8.
89. Minuto F, Palermo C, Arvigo M, Barreca AM. The IGF system and bone. *J Endocrinol Invest.* 2005;28(8 Suppl):8–10.



90. Lind M, Böniger C. Factors stimulating bone formation. *Eur Spine J.* 2001 Oct 1;10(0):S102–9.
91. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone Morphogenetic Proteins, Their Antagonists, and the Skeleton. *Endocr Rev.* 2003 Apr;24(2):218–35.
92. Kim JG, Lim KS, Ku S-Y, Kim SH, Choi YM, Moon SY. Relations between interleukin-1, its receptor antagonist gene polymorphism, and bone mineral density in postmenopausal Korean women. *J Bone Miner Metab.* 2005 Dec 27;24(1):53–7.
93. McGrath EE. OPG/RANKL/RANK Pathway as a Therapeutic Target in Cancer. *J Thorac Oncol.* 2011 Sep;6(9):1468–73.
94. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med (Berl).* 2001 Jun;79(5–6):243–53.
95. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):337–42.
96. Sociedad Española de Investigaciones Óseas y Metabolismo Mineral. JN, Sánchez AC, Gil-Antuñano SP. Revista de osteoporosis y metabolismo mineral. Vol. 3, Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral. [Ibáñez & Plaza]; 2009. 105-112 p.
97. Gomez-Veiga F, Ponce-Reixa J, Martinez-Breijo S, Planas J, Morote J. Advances in prevention and treatment of bone metastases in prostate cancer. Role of RANK/RANKL inhibition. *Actas Urológicas Españolas (English Ed.)* 2013 May 1;37(5):292–304.
98. Gordon MD, Nusse R. Wnt Signaling: Multiple Pathways, Multiple Receptors, and Multiple Transcription Factors. *J Biol Chem.* 2006 Aug 11;281(32):22429–33.
99. Lin C, Jiang X, Dai Z, Guo X, Weng T, Wang J, et al. Sclerostin Mediates Bone Response to Mechanical Unloading Through Antagonizing Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *J Bone Miner Res.* 2009 Oct 1;24(10):1651–61.
100. Velasco J, Riancho JA. La vía Wnt y el hueso. *Rev Española Enfermedades Metabólicas Óseas.* 2008 Jan;17(1):5–9.
101. Lorente Ramos RM, Azpeitia Armán J, Arévalo Galeano N, Muñoz Hernández A, García Gómez JM, Gredilla Molinero J. Absorciometría con rayos X de doble energía. Fundamentos, metodología y aplicaciones clínicas. *Radiología.* 2012 Sep;54(5):410–23.
102. Lorente-Ramos R, Azpeitia-Armán J, Muñoz-Hernández A, García-Gómez JM, Díez-

- Martínez P, Grande-Bárez M. Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in the Diagnosis of Osteoporosis: A Practical Guide. *Am J Roentgenol*. 2011 Apr;196(4):897–904.
103. World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. WHO Tech Rep Ser. 1994;843:1–129.
104. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, McCloskey E. FRAX™ and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporos Int*. 2008 Apr 22;19(4):385–97.
105. Kanis JA, McCloskey E V., Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster J-Y, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2013 Jan 19;24(1):23–57.
106. Azagra R, Roca G, Martín-Sánchez JC, Casado E, Encabo G, Zwart M, et al. Umbrales de FRAX® para identificar personas con alto o bajo riesgo de fractura osteoporótica en población femenina española. *Med Clin (Barc)*. 2015 Jan;144(1):1–8.
107. Kyriakos G, Vidal-Casariago A, Quiles-Sánchez LV, Calleja-Fernández A, Ávila-Turcios D, Urosa-Maggi JA, et al. Estudio comparativo de la aplicación de la calibración FRIDEX y de la guía NOGG en el manejo de la osteoporosis en la práctica clínica habitual. *Reumatol Clínica*. 2017 Sep 1;13(5):258–63.
108. Watts NB, Lewiecki EM, Miller PD, Baim S. National Osteoporosis Foundation 2008 Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis and the World Health Organization Fracture Risk Assessment Tool (FRAX): What They Mean to the Bone Densitometrist and Bone Technologist. *J Clin Densitom*. 2008 Oct;11(4):473–7.
109. Olmo JA. ¿Podría el índice FRAX® modificar el tratamiento de la osteoporosis? *Orig / Rev Osteoporos Metab Min*. 2012;41:23–6.
110. Villarín Castro A, Hernández Sanz A. Valoración del riesgo de fractura osteoporótica. *Rev Clínica Med Fam*. 2015 Feb;8(1):48–58.
111. Hippisley-Cox J, Coupland C. Predicting risk of osteoporotic fracture in men and women in England and Wales: prospective derivation and validation of QFractureScores. *BMJ*. 2009 Nov 19;339:b4229.
112. Lenora J, Ivaska KK, Gerdhem P. Use of Bone Turnover Markers in Osteoporosis. *Clin Rev Bone Miner Metab*. 2010 Mar 12;8(1):1–14.

113. Brown JP, Albert C, Nassar BA, Adachi JD, Cole D, Davison KS, et al. Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. *Clin Biochem.* 2009 Jul;42(10–11):929–42.
114. Eastell R, Hannon RA. Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. *Proc Nutr Soc.* 2008 May 15;67(2):157–62.
115. Burch J, Rice S, Yang H, Neilson A, Stirk L, Francis R, et al. Systematic review of the use of bone turnover markers for monitoring the response to osteoporosis treatment: the secondary prevention of fractures, and primary prevention of fractures in high-risk groups. *Health Technol Assess (Rockv).* 2014 Feb;18(11):1–180.
116. Ivaska KK, Käkönen S-M, Gerdhem P, Obrant KJ, Pettersson K, Väänänen HK. Urinary Osteocalcin as a Marker of Bone Metabolism. *Clin Chem.* 2005 Mar 1;51(3):618–28.
117. Iki M, Tamaki J, Fujita Y, Kouda K, Yura A, Kadowaki E, et al. Serum undercarboxylated osteocalcin levels are inversely associated with glycemic status and insulin resistance in an elderly Japanese male population: Fujiwara-kyo Osteoporosis Risk in Men (FORMEN) Study. *Osteoporos Int.* 2012 Feb 25;23(2):761–70.
118. Zhang Q, Riddle RC, Clemens TL. Bone and the regulation of global energy balance. *J Intern Med.* 2015 Jun;277(6):681–9.
119. Dreyer P, Vieira JGH. Bone turnover assessment: a good surrogate marker? *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010 Mar;54(2):99–105.
120. Rodriguez-Pascual F, Slatter DA. Collagen cross-linking: insights on the evolution of metazoan extracellular matrix1. Rodriguez-Pascual F, Slatter DA. Collagen cross-linking: insights on the evolution of metazoan extracellular matrix. *Sci Rep.* 2016 Dec 23;6(1):37374. *Sci Rep.* 2016 Dec 23;6(1):37374.
121. Vasikaran S, Cooper C, Eastell R, Griesmacher A, Morris HA, Trenti T, et al. International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Position on bone marker standards in osteoporosis. *Clin Chem Lab Med.* 2011 Jan 1;49(8):1271–4.
122. Simsek B, Karacaer O, Karaca I. Urine products of bone breakdown as markers of bone resorption and clinical usefulness of urinary hydroxyproline: an overview. *Chin Med J (Engl).* 2004 Feb;117(2):291–5.
123. Montecinos BR, Zeni SN. Biochemical markers of bone remodelling. Clinical utility.

- Acta Bioquím Clín Latinoam. 2009;43(2):177–93.
124. Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Väänänen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab*. 2006;52(9–10):499–509.
  125. Rissanen JP, Suominen MI, Peng Z, Halleen JM. Secreted Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5b is a Marker of Osteoclast Number in Human Osteoclast Cultures and the Rat Ovariectomy Model. *Calcif Tissue Int*. 2008 Feb 15;82(2):108–15.
  126. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int*. 2011 Feb 24;22(2):391–420.
  127. Garnero P, Cloos P, Sornay-Rendu E, Qvist P, Delmas PD. Type I Collagen Racemization and Isomerization and the Risk of Fracture in Postmenopausal Women: The OFELY Prospective Study. *J Bone Miner Res*. 2002 May 1;17(5):826–33.
  128. Okabe R, Inaba M, Nakatsuka K, Miki T, Naka H, Moriguchi A, et al. Significance of serum CrossLaps as a predictor of changes in bone mineral density during estrogen replacement therapy; comparison with serum carboxyterminal telopeptide of type I collagen and urinary deoxypyridinoline. *J Bone Miner Metab*. 2004 Mar 1;22(2):127–31.
  129. Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep*. 2007 Sep;5(3):98–104.
  130. Chapurlat RD, Confavreux CB. Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatology*. 2016 Oct;55(10):1714–25.
  131. Grupo de trabajo de la Guía de práctica clínica sobre osteoporosis y prevención de fracturas por fragilidad. *Guía de Práctica Clínica sobre Osteoporosis y Prevención de Fracturas por Fragilidad*.
  132. Huang Z-B, Wan S-L, Lu Y-J, Ning L, Liu C, Fan S-W. 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*. 2015 Mar 17;26(3):1175–86.
  133. Sjögren K, Engdahl C, Henning P, Lerner UH, Tremaroli V, Lagerquist MK, et al. The gut microbiota regulates bone mass in mice. *J Bone Miner Res*. 2012 Jun;27(6):1357–67.
  134. Ohlsson C, Sjögren K. Effects of the gut microbiota on bone mass. *Trends Endocrinol*

- Metab. 2015 Feb;26(2):69–74.
135. Delmas PD, Genant HK, Crans GG, Stock JL, Wong M, Siris E, et al. Severity of prevalent vertebral fractures and the risk of subsequent vertebral and nonvertebral fractures: results from the MORE trial. *Bone*. 2003 Oct;33(4):522–32.
  136. Anastasilakis AD, Toulis KA, Polyzos SA, Anastasilakis CD, Makras P. Long-term treatment of osteoporosis: safety and efficacy appraisal of denosumab. *Ther Clin Risk Manag*. 2012;8:295–306.
  137. Papapoulos S, Lippuner K, Roux C, Lin CJF, Kendler DL, Lewiecki EM, et al. The effect of 8 or 5 years of denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis: results from the FREEDOM Extension study. *Osteoporos Int*. 2015 Dec 23;26(12):2773–83.
  138. Cummings SR, Martin JS, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, et al. Denosumab for Prevention of Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med*. 2009 Aug 20;361(8):756–65.
  139. Iñiguez-Ariza NM, Clarke BL. Bone biology, signaling pathways, and therapeutic targets for osteoporosis. *Maturitas*. 2015 Oct;82(2):245–55.
  140. Ashworth B, Horn DB. Evidence of osteomalacia in an outpatient group of adult epileptics. *Epilepsia*. 1977 Mar;18(1):37–43.
  141. Kruse R. Osteopathies in antiepileptic long-term therapy (preliminary report). *Monatsschr Kinderheilkd*. 1968 Jun;116(6):378–81.
  142. Christiansen C, Rodbro P, Lund M. Incidence of anticonvulsant osteomalacia and effect of vitamin D: controlled therapeutic trial. *Br Med J*. 1973 Dec 22;4(5894):695–701.
  143. Pack AM, Morrell MJ, Marcus R, Holloway L, Flaster E, Doñe S, et al. Bone mass and turnover in women with epilepsy on antiepileptic drug monotherapy. *Ann Neurol*. 2005 Feb;57(2):252–7.
  144. Sheth RD, Gidal BE, Hermann BP. Pathological fractures in epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2006 Dec;9(4):601–5.
  145. Andress DL, Ozuna J, Tirschwell D, Grande L, Johnson M, Jacobson AF, et al. Antiepileptic drug-induced bone loss in young male patients who have seizures. *Arch Neurol*. 2002 May;59(5):781–6.

146. Beerhorst K, Schouwenaars FM, Tan IY, Aldenkamp AP. Epilepsy: fractures and the role of cumulative antiepileptic drug load. *Acta Neurol Scand.* 2012 Jan;125(1):54–9.
147. Shen C, Chen F, Zhang Y, Guo Y, Ding M. Association between use of antiepileptic drugs and fracture risk: A systematic review and meta-analysis. *Bone.* 2014 Jul;64:246–53.
148. Menon B, Harinarayan CV. The effect of anti epileptic drug therapy on serum 25-hydroxyvitamin D and parameters of calcium and bone metabolism—A longitudinal study. *Seizure.* 2010 Apr;19(3):153–8.
149. Khanna S, Pillai KK, Vohora D. Insights into liaison between antiepileptic drugs and bone. *Drug Discov Today.* 2009 Apr;14(7–8):428–35.
150. Ramírez-Jiménez, JJ; Alfaro-Velásquez J. Efecto de los medicamentos antiepilépticos en el metabolismo de la vitamina D y el impacto negativo relacionado al déficit. *Med Lab.* 2015;21:131–48.
151. Hernández JL, Garcés CM, Sumillera M, Fernández-Aldasoro E V., García-Ibarbia C, Ortiz-Gómez JA, et al. Aromatase expression in osteoarthritic and osteoporotic bone. *Arthritis Rheum.* 2008 Jun;58(6):1696–700.
152. Apeland T, Mansoor MA, Strandjord RE. Antiepileptic drugs as independent predictors of plasma total homocysteine levels. *Epilepsy Res.* 2001 Nov;47(1–2):27–35.
153. Ecevit Ç, Aydoğan A, Kavakli T üla., Altinöz S. Effect of carbamazepine and valproate on bone mineral density. *Pediatr Neurol.* 2004 Oct;31(4):279–82.
154. Borusiak P, Langer T, Heruth M, Karenfort M, Bettendorf U, Jenke AC. Antiepileptic Drugs and Bone Metabolism in Children. *J Child Neurol.* 2013 Feb;28(2):176–83.
155. Schroeder TM, Nair AK, Staggs R, Lamblin A-F, Westendorf JJ. Gene profile analysis of osteoblast genes differentially regulated by histone deacetylase inhibitors. *BMC Genomics.* 2007 Oct 9;8:362.
156. Fuller HR, Man NT, Lam LT, Shamanin VA, Androphy EJ, Morris GE. Valproate and Bone Loss: iTRAQ Proteomics Show that Valproate Reduces Collagens and Osteonectin in SMA Cells. *J Proteome Res.* 2010 Aug 6;9(8):4228–33.
157. Nakken KO, Taubøll E. Bone loss associated with use of antiepileptic drugs. *Expert Opin Drug Saf.* 2010 Jul 4;9(4):561–71.

158. Anil M, Helvacı M, Ozbal E, Kalenderer O, Anil AB, Dilek M. Serum and Muscle Carnitine Levels in Epileptic Children Receiving Sodium Valproate. *J Child Neurol.* 2009 Jan;24(1):80–6.
159. Elwakkad ASE, Elshamy KAI El, Sibaii H. 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.* 2008;80:47–56.
160. Coppola G, Fortunato D, Auricchio G, Mainolfi C, Operto FF, Signoriello G, et al. Bone mineral density in children, adolescents, and young adults with epilepsy. *Epilepsia.* 2009 Sep;50(9):2140–6.
161. Heo K, Rhee Y, Lee HW, Lee SA, Shin DJ, Kim W-J, et al. The effect of topiramate monotherapy on bone mineral density and markers of bone and mineral metabolism in premenopausal women with epilepsy. *Epilepsia.* 2011 Oct 1;52(10):1884–9.
162. Takahashi A, Onodera K, Kamei J, Sakurada S, Shinoda H, Miyazaki S, et al. Effects of chronic administration of zonisamide, an antiepileptic drug, on bone mineral density and their prevention with alfacalcidol in growing rats. *J Pharmacol Sci.* 2003 Apr;91(4):313–8.
163. Mintzer S, Boppana P, Toguri J, DeSantis A. Vitamin D Levels and Bone Turnover in Epilepsy Patients Taking Carbamazepine or Oxcarbazepine. *Epilepsia.* 2006 Mar;47(3):510–5.
164. Cansu A, Yesilkaya E, Serdaroğlu A, Hirfanoğlu TL, Camurdan O, Gülbahar O, et al. Evaluation of bone turnover in epileptic children using oxcarbazepine. *Pediatr Neurol.* 2008 Oct 1;39(4):266–71.
165. Bauer S, Hofbauer LC, Rauner M, Strzelczyk A, Kellinghaus C, Hallmeyer-Elgner S, et al. Early detection of bone metabolism changes under different antiepileptic drugs (ED-BoM-AED) – A prospective multicenter study. *Epilepsy Res.* 2013 Oct;106(3):417–22.
166. Sheth RD, Hermann BP. Bone Mineral Density With Lamotrigine Monotherapy for Epilepsy. *Pediatr Neurol.* 2007 Oct;37(4):250–4.
167. Koo DL, Joo EY, Kim D, Hong SB. Effects of levetiracetam as a monotherapy on bone mineral density and biochemical markers of bone metabolism in patients with epilepsy. *Epilepsy Res.* 2013 Mar;104(1–2):134–9.
168. Pack A. Levetiracetam treatment does not result in broken bones. *Epilepsy Curr.* 2013

- Mar;13(2):83–4.
169. Fekete S, Simko J, Gradosova I, Malakova J, Zivna H, Palicka V, et al. The effect of levetiracetam on rat bone mass, structure and metabolism. *Epilepsy Res.* 2013 Nov;107(1–2):56–60.
170. Nissen-Meyer LSH, Svalheim S, Taubøll E, Reppe S, Lekva T, Solberg LB, et al. Levetiracetam, Phenytoin, and Valproate Act Differently on Rat Bone Mass, Structure, and Metabolism. *Epilepsia.* 2007 Oct;48(10):1850–60.
171. Hakami T, Terence O BJ, Sandra Petty BJ, Mary Sakellarides B, Jemma Christie B, Susan Kantor B, et al. Monotherapy with Levetiracetam Versus Older AEDs: A Randomized Comparative Trial of Effects on Bone Health. *Calcif Tissue Int.* 2016;98(6):556–65.
172. Simko J, Fekete S, Malakova J, Kremlacek J, Horacek J, Zivna H, et al. The effect of lacosamide on bone tissue in orchidectomised male albino wistar rats. *Biomed Pap.* 2014 Jan 27;159(3):394–9.
173. Lambrinouadaki I, Kaparos G, Armeni E, Alexandrou A, Damaskos C, Logothetis E, et al. BsmI vitamin D receptor's polymorphism and bone mineral density in men and premenopausal women on long-term antiepileptic therapy. *Eur J Neurol.* 2011 Jan;18(1):93–8.
174. Phabphal K, Geater A, Limapichart K, Sathirapanya P, Setthawatcharawanich S, Witeerungrot N, et al. The association between BsmI polymorphism and bone mineral density in young patients with epilepsy who are taking phenytoin. *Epilepsia.* 2013 Feb;54(2):249–55.
175. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015 Sep 30;526(7571):68–74.
176. Xiong Q, Xin L, Zhang L, Mao Z, Tang P. Association between calcitonin receptorAluI gene polymorphism and bone mineral density: A meta-analysis. *Exp Ther Med.* 2015 Jan;9(1):65–76.
177. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, et al. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia.* 2009 Nov 3;51(6):1069–77.
178. Offermann G, Pinto V, Kruse R. Antiepileptic drugs and vitamin D supplementation.



- Epilepsia. 1979 Feb;20(1):3–15.
179. Pato Pato A, Cebrián Pérez E, Cimas Hernando I, Lorenzo González JR, Rodríguez Constenla I, Gude Sampedro F. Análisis de costes directos, indirectos e intangibles de la epilepsia. *Neurología*. 2011 Jan;26(1):32–8.
  180. Linehan C, Kerr MP, Walsh PN, Brady G, Kelleher C, Delanty N, et al. Examining the prevalence of epilepsy and delivery of epilepsy care in Ireland. *Epilepsia*. 2010 May;51(5):845–52.
  181. Banerjee PN, Filippi D, Allen Hauser W. The descriptive epidemiology of epilepsy—A review. *Epilepsy Res*. 2009 Jul;85(1):31–45.
  182. Cruz-Campos GA, Baquero-Toledo M. Epilepsies in an outpatient setting: a study of 150 cases. *Rev Neurol*. 2010;30(12):1108–12.
  183. Salas-Puig, J; Méndez-Castrillón, J; Fernández-Suárez E. Fármacos antiepilépticos genéricos en España. *Neurol Supl*. 2008;4(1):25–8.
  184. Lyseng-Williamson KA. Levetiracetam: a review of its use in epilepsy. *Drugs*. 2011 Mar 5;71(4):489–514.
  185. Garcia-Martin G, Chamorro-Muñoz MI, Martin-Reyes G, Dawid-Milner MS, Perez-Erazquin F, Romero-Acebal M. Perfil de consumo de antiepilépticos en los pacientes epilépticos del Área Oeste de Málaga. *Neurología*. 2015 Jan;30(1):67–9.
  186. J P. ¿Qué aportan los nuevos fármacos antiepilépticos? *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2013;24:995–1003.
  187. Wahab A. Difficulties in Treatment and Management of Epilepsy and Challenges in New Drug Development. *Pharmaceuticals*. 2010;3:2090–110.
  188. Chowdhury D. New Drugs for the Treatment of Epilepsy : A Practical Approach. *Suppl TO J Assoc PhysiciaNS iNdia @BULLET aUgUST*. 2013;61:19–39.
  189. Carmona-Vazquez CR, Ruiz-Garcia M, Pena-Landin DM, Diaz-Garcia L, Greenawalt SR. The prevalence of obesity and metabolic syndrome in paediatric patients with epilepsy treated in monotherapy with valproic acid. *Rev Neurol*. 2015 Sep 1;61(5):193–201.
  190. Sarangi SC, Tripathi M, Kakkar AK, Gupta YK. Comparison of body composition in persons with epilepsy on conventional and new antiepileptic drugs. *Indian J Med Res*.

- 2016;143:323–30.
191. Reiter E, Feucht M, Hauser E, Freilinger M, Seidl R. Changes in body mass index during long-term topiramate therapy in paediatric epilepsy patients—a retrospective analysis. *Seizure*. 2004;13:491–3.
192. Uludag IF, Kulu U, Sener U, Kose S, Zorlu Y. The effect of carbamazepine treatment on serum leptin levels. *Epilepsy Res*. 2009 Sep;86(1):48–53.
193. Mintzer S, Skidmore CT, Abidin CJ, Morales MC, Chervoneva I, Capuzzi DM, et al. Effects of antiepileptic drugs on lipids, homocysteine, and C-reactive protein. *Ann Neurol*. 2009 Apr;65(4):448–56.
194. Instituto Nacional de Estadística / Ministerio de Sanidad SS e I. La salud y el sistema sanitario en 100 tablas. Encuesta Eur Salud en España [Internet]. 2016 [cited 2018 Apr 3]; Available from: [https://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/SaludSistemaSanitario\\_100\\_Tablas1.pdf](https://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/SaludSistemaSanitario_100_Tablas1.pdf)
195. Fundación Gaspar Casal. La sanidad española en cifras 2016. Círculo la Sanid. 2017;
196. Observatorio español de las drogas y las adicciones. Ministerio de Sanidad SS e I. ESTADÍSTICAS 2017 Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España [Internet]. 2018 [cited 2018 May 21]. Available from: <https://www.google.com/search?q=ESTADÍSTICAS+2017+Alcohol%2C+tabaco+y+drogas+ilegales+en+España&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b>
197. Bartolomei F. Epilepsy and alcohol. *Epilepsy other Neurol Disord*. 2006;8:72–8.
198. Ong M-S, Kohane I, Cai T, Gorman MP, Mandl K, Mandl KD. Population-Level Evidence for an Autoimmune Etiology of Epilepsy. *JAMA Neurol*. 2014;71188(5):569–74.
199. Yun C, Xuefeng W. Association between seizures and diabetes mellitus: a comprehensive review of literature. *Curr Diabetes Rev*. 2013 Jul;9(4):350–4.
200. Menéndez E, Delgado E, Fernández-Vega F, Prieto MA, Bordiú E, Calle A, et al. Prevalencia, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial en España. Resultados del estudio Di@bet.es. *Rev Española Cardiol*. 2016 Jun 1;69(6):572–8.
201. Fong CY, Kong AN, Noordin M, Poh BK, Ong LC, Ng CC. Determinants of low bone mineral density in children with epilepsy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2018 Jan;22(1):155–63.

202. Jiang P, Zhu W-Y, He X, Tang M-M, Dang R-L, Li H-D, et al. Association between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms with Childhood Temporal Lobe Epilepsy. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 Oct 30;12(11):13913–22.
203. Mahmoud AA, Ali AHK. Vitamin D receptor gene polymorphism and 25 hydroxy vitamin D levels in Egyptian patients with pulmonary tuberculosis. *Egypt J Chest Dis Tuberc*. 2014 Jul 1;63(3):651–5.
204. Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2009 Dec 3;10(9):1283–8.
205. Martínez Villanueva M. Enfermedad ósea en el trasplante renal: marcadores bioquímicos de remodelado óseo y genotipado de polimorfismos. Univ Murcia [Internet]. 2012 Jun; Available from: <https://digitum.um.es/xmlui/handle/10201/27995>
206. Ramírez Ruiz C. Estudio de polimorfismos y biomarcadores de remodelado óseo y de inflamación en la diabetes mellitus. Univ Murcia [Internet]. 2017; Available from: <https://digitum.um.es/xmlui/handle/10201/56369>
207. Pennell PB. Hormonal Aspects of Epilepsy. *Neurol Clin*. 2009 Nov;27(4):941–65.
208. Taubøll E, Sveberg L, Svalheim S. Interactions between hormones and epilepsy. *Seizure*. 2015 May;28:3–11.
209. Herzog AG. Catamenial epilepsy: Update on prevalence, pathophysiology and treatment from the findings of the NIH Progesterone Treatment Trial. *Seizure*. 2015 May;28:18–25.
210. Killer N, Hock M, Gehlhaus M, Capetian P, Knoth R, Pantazis G, et al. Modulation of androgen and estrogen receptor expression by antiepileptic drugs and steroids in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2009 Aug;50(8):1875–90.
211. Sundermann EE, Maki PM, Bishop JR. A Review of Estrogen Receptor  $\alpha$  Gene (ESR1) Polymorphisms, Mood, and Cognition.
212. Thiel R. Might calcium disorders cause or contribute to myoclonic seizures in epileptics? *Med Hypotheses*. 2006 Jan;66(5):969–74.
213. Aksoy D, Solmaz V, Erbas O. Positive effect of calcitonin on the seizures induced by pentylenetetrazole in rats. *Epilepsy Res*. 2014 Mar;108(3):390–5.

214. Sheth RD. Metabolic concerns associated with antiepileptic medications. *Neurology*. 2004 Nov 23;63(10 Suppl 4):S24-9.
215. Ali II, Schuh L, Barkley GL, Gates JR. Antiepileptic drugs and reduced bone mineral density. *Epilepsy Behav*. 2004 Jun;5(3):296–300.
216. Pack AM, Morrell MJ. Epilepsy and bone health in adults. *Epilepsy Behav*. 2004 Feb;5:24–9.
217. Kim SH, Lee JW, Choi K-G, Chung HW, Lee HW. A 6-month longitudinal study of bone mineral density with antiepileptic drug monotherapy. *Epilepsy Behav*. 2007 Mar;10(2):291–5.
218. Pack AM, Morrell MJ, Randall A, McMahon DJ, Shane E. Bone health in young women with epilepsy after one year of antiepileptic drug monotherapy. *Neurology*. 2008 Apr 29;70(18):1586–93.
219. El-Hajj Fuleihan G, Dib L, Yamout B, Sawaya R, Mikati MA. Predictors of bone density in ambulatory patients on antiepileptic drugs. *Bone*. 2008 Jul;43(1):149–55.
220. Oliveira V de, Lara GM, Lourenço ED, Boff, Bruna Daniele, Stauder GZ. Influencia de la vitamina D en la salud humana. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2014;48(3):329–37.
221. Tsukahara H, Kimura K, Todoroki Y, Ohshima Y, Hiraoka M, Shigematsu Y, et al. Bone mineral status in ambulatory pediatric patients on long-term anti-epileptic drug therapy. *Pediatr Int [Internet]*. 2002 Jun [cited 2018 Apr 18];44(3):247–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11982890>
222. Kulak CAM, Borba VZC, Bilezikian JP, Silvado CE, Paola L de, Boguszewski CL. Bone mineral density and serum levels of 25 OH vitamin D in chronic users of antiepileptic drugs. *Arq Neuropsiquiatr [Internet]*. 2004 Dec [cited 2018 Apr 18];62(4):940–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15608949>
223. Lee RH, Lyles KW, Colón-Emeric C. A review of the effect of anticonvulsant medications on bone mineral density and fracture risk. *Am J Geriatr Pharmacother*. 2010 Feb;8(1):34–46.
224. Pascussi JM, Robert A, Nguyen M, Walrant-Debray O, Garabedian M, Martin P, et al. Possible involvement of pregnane X receptor–enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest [Internet]*. 2005 Jan 3 [cited 2018 Apr 18];115(1):177–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15630458>

225. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Informe mensual de La AEMPS - Octubre 2011 [Internet]. 2011. Available from: <https://www.aemps.gob.es/informa/boletines-AEMPS/boletinMensual/2011/octubre/informe-octubre.htm>
226. Garg A, Dabla S, Nagenhalli S, Fotedar S. Levetiracetam monotherapy effect on serum calcium and serum vitamin D in patient of epilepsy. *Int J Res Med Sci* [Internet]. 2017 Jan 23 [cited 2018 Apr 18];5(2):503. Available from: <http://www.msjonline.org/index.php/ijrms/article/view/2256>
227. Hamed SA. The effect of antiepileptic drugs on the kidney function and structure. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2017 Sep 2;10(9):993–1006.
228. Giannopoulou EZ, Gortner L, Peterlini S, Gottschling S, Yilmaz U, Meyer S. Topiramate-induced nephrolithiasis. *Clin case reports*. 2015 Jun;3(6):508–9.
229. Maalouf NM, Langston JP, Van Ness PC, Moe OW, Sakhaee K. Nephrolithiasis in topiramate users. *Urol Res* [Internet]. 2011 Aug 17 [cited 2018 Apr 18];39(4):303–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00240-010-0347-5>
230. Gibbons GF. The role of cytochrome P450 in the regulation of cholesterol biosynthesis. *Lipids*. 2002 Dec;37(12):1163–70.
231. Elliott JO, Jacobson MP, Haneef Z. Homocysteine and bone loss in epilepsy. *Seizure*. 2007 Jan;16(1):22–34.
232. LoPinto-Khoury C, Mintzer S. Antiepileptic Drugs and Markers of Vascular Risk. *Curr Treat Options Neurol*. 2010 Jul 22;12(4):300–8.
233. Belcastro V, Striano P, Gorgone G, Costa C, Ciampa C, Caccamo D, et al. Hyperhomocysteinemia in epileptic patients on new antiepileptic drugs. *Epilepsia*. 2010 Feb;51(2):274–9.
234. Svalheim S, Luef G, Rauchenzauner M, Mørkrid L, Gjerstad L, Taubøll E. Cardiovascular risk factors in epilepsy patients taking levetiracetam, carbamazepine or lamotrigine. *Acta Neurol Scand*. 2010 Jul;122(190):30–3.
235. Nakken K. Adverse Metabolic Effects of Antiepileptic Drug Treatment. In: *Novel Treatment of Epilepsy*. InTech; 2011. p. 83–94.
236. Mujgan Sonmez F, Demir E, Orem A, Yildirmis S, Orhan F, Aslan A, et al. Effect of Antiepileptic Drugs on Plasma Lipids, Lipoprotein (a), and Liver Enzymes. *J Child*

- Neurol. 2006 Jan 26;21(1):70–4.
237. Bhosale U, Loharkar N, Yegnanarayan R, Quraishi N. Study of effects of antiepileptic therapy on various biochemical and hematological parameters patients suffering of epilepsy. *Int J Basic Clin Pharmacol*. 2014;3(1):79.
238. Manimekalai K, Visakan B, Salwe KJ, Murugesan S. Evaluation of Effect of Antiepileptic Drugs on Serum Lipid Profile among Young Adults with Epilepsy in a Tertiary Care Hospital in Pondicherry. *J Clin Diagn Res*. 2014 Aug;8(8):HC05-9.
239. Howard G, Nguyen T, Morrison N, Watanabe T, Sambrook P, Eisman J, et al. Genetic influences on bone density: physiological correlates of vitamin D receptor gene alleles in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Sep;80(9):2800–5.
240. Lewiecki EM, Miller PD. Skeletal Effects of Primary Hyperparathyroidism: Bone Mineral Density and Fracture Risk. *J Clin Densitom*. 2013 Jan;16(1):28–32.
241. Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res*. 2009 Dec 3;11(3):306–11.
242. Han K, Choi J, Moon I, Yoon H, Han I, Min H, et al. Non-association of Estrogen Receptor Genotypes with Bone Mineral Density and Bone Turnover in Korean Pre-, Peri-, and Postmenopausal Women. *Osteoporos Int*. 1999 Apr 1;9(4):290–5.
243. Taniguchi A, Kataoka K, Kono T, Oseko F, Okuda H, Nagata I, et al. Parathyroid hormone-induced lipolysis in human adipose tissue. *J Lipid Res*. 1987 May;28(5):490–4.
244. Lacour B, Basile C, Drüeke T, Funck-Brentano JL. Parathyroid function and lipid metabolism in the rat. *Miner Electrolyte Metab*. 1982 Mar;7(3):157–65.
245. Akmal M, Kasim SE, Soliman AR, Massry SG. Excess parathyroid hormone adversely affects lipid metabolism in chronic renal failure. *Kidney Int*. 1990 Mar 1;37(3):854–8.
246. Werner S, Löw H. Inhibitory Effects of Calcitonin on Lipolysis and Calcium Accumulation in Rat Adipose Tissue In Vivo. *Horm Metab Res*. 1974 Jan 7;6(1):30–6.
247. Nishizawa Y, Okui Y, Inaba M, Okuno S, Yukioka K, Miki T, et al. Calcium/calmodulin-mediated action of calcitonin on lipid metabolism in rats. *J Clin Invest*. 1988 Oct;82(4):1165–72.
248. Phabphal K, Limapichat K, Sathirapanya P, Setthawatcharawanich S, Leelawattana R,

- Thammakumpee N, et al. Bone mineral density following long-term use of antiepileptic drugs in a tropical Asian country. *Epileptic Disord.* 2008 Sep;10(3):213–8.
249. Farhat G, Yamout B, Mikati MA, Demirjian S, Sawaya R, El-Hajj Fuleihan G. Effect of antiepileptic drugs on bone density in ambulatory patients. *Neurology.* 2002 May 14;58(9):1348–53.
250. Petty SJ, Paton LM, O'Brien TJ, Makovey J, Erbas B, Sambrook P, et al. Effect of antiepileptic medication on bone mineral measures: *Neurology.* 2005 Nov 8;65(9):1358–65.
251. Beerhorst K, Tan IY, De Krom M, Verschuure P, Aldenkamp AP. Antiepileptic drugs and high prevalence of low bone mineral density in a group of inpatients with chronic epilepsy. *Acta Neurol Scand.* 2013 Oct 1;128(4):273–80.
252. Lado F, Spiegel R, Masur JH, Boro A, Haut SR. Value of routine screening for bone demineralization in an urban population of patients with epilepsy. *Epilepsy Res.* 2008 Feb 1;78(2–3):155–60.
253. Pack AM, Olarte LS, Morrell MJ, Flaster E, Resor SR, Shane E. Bone mineral density in an outpatient population receiving enzyme-inducing antiepileptic drugs. *Epilepsy Behav.* 2003 Apr;4(2):169–74.
254. Osman NMM, Abdel Aziz RA, Soliman GT, Gamal Mohamed A. Bone mineral density evaluation o epileptic children on anti-epileptic medications. *Egypt J Radiol Nucl Med.* 2017 Dec 1;48(4):1083–90.
255. Caramelo C, Rodríguez García M, Cannata, JCannata J, Nefrología, Ramos B, Díaz López JB RRA. Osteoporosis, estrógenos y metabolismo óseo. Implicaciones en la insuficiencia renal crónica. *Nefrología.* 2003;23(2):78–83.
256. Hamed SA, Moussa EMM, Youssef AH, Abd ElHameed MA, NasrEldin E. Bone status in patients with epilepsy: relationship to markers of bone remodeling. *Front Neurol.* 2014;5:142.
257. Nicholas JM, Ridsdale L, Richardson MP, Grieve AP, Gulliford MC. Fracture risk with use of liver enzyme inducing antiepileptic drugs in people with active epilepsy: Cohort study using the General Practice Research Database. *Seizure Eur J Epilepsy.* 2013;22:37–42.
258. Salimipour H, Kazerooni S, Seyedabadi M, Nabipour I, Nemati R, Iranpour D, et al.

- Antiepileptic Treatment Is Associated with Bone Loss: Difference in Drug Type and Region of Interest. *J Nucl Med Technol*. 2013 Sep 1;41(3):208–11.
259. Suzuki K, Ueda S, Umezu R, Matsuoka H, Sugihara S. Evaluation of bone mineral density using digital image processing in children receiving anticonvulsants. *Brain Dev*. 2007 Sep;39(5):351–5.
260. Vestergaard P. Effects of Antiepileptic Drugs on Bone Health and Growth Potential in Children with Epilepsy. *Pediatr Drugs*. 2015 Apr 8;17(2):141–50.
261. Kanis JA, McCloskey E V., Johansson H, Oden A, Ström O, Borgström F. Development and use of FRAX® in osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2010 Jun 13;21(S2):407–13.
262. Muñoz-Torres M, de la Higuera M, Fernández-García D, Alonso G, Reyes R. Densitometría ósea: indicaciones e interpretación. *Endocrinol y Nutr*. 2005 May 1;52(5):224–7.
263. Drezner MK. Treatment of anticonvulsant drug-induced bone disease. *Epilepsy Behav*. 2004 Feb;5:41–7.
264. Yokota I, Kuga A, Uenishi K, Ishihara H, Kageyama Y, Fujino M, et al. Bone metabolism in epilepsy patients: An analysis of 30 cases taking classic anti-epileptic drugs. *Neurol Clin Neurosci*. 2016 Mar 1;4(2):62–9.
265. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Fracture Risk Associated with Use of Antiepileptic Drugs. *Epilepsia*. 2004 Nov;45(11):1330–7.
266. Tekgul H, Serdaroglu G, Huseyinov A, Gökben S. Bone Mineral Status in Pediatric Outpatients on Antiepileptic Drug Monotherapy. *J Child Neurol*. 2006 May 2;21(5):411–4.
267. Kumandas S, Koklu E, Gümüs H, Koklu S, Kurtoglu S, Karakukcu M, et al. Effect of carbamazepine and valproic acid on bone mineral density, IGF-I and IGFBP-3. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2006 Apr;19(4):529–34.
268. Chou I-J, Lin K-L, Wang H-S, Wang C-J. Evaluation of bone mineral density in children receiving carbamazepine or valproate monotherapy. *Acta Paediatr Taiwan*. 48(6):317–22.
269. Lin C-M, Fan H-C, Chao T-Y, Chu D-M, Lai C-C, Wang C-C, et al. Potential effects of valproate and oxcarbazepine on growth velocity and bone metabolism in epileptic children- a medical center experience. *BMC Pediatr*. 2016 Dec 3;16(1):61.



- 
270. Rauchenzauner M, Griesmacher | Andrea, Tatarczyk | Tobias, Haberlandt | Edda, Strasak | Alexander, Zimmerhackl L-B, et al. Chronic antiepileptic monotherapy, bone metabolism, and body composition in non-institutionalized children 25OHD 25-Hydroxyvitamin D AED Antiepileptic drug BMD Bone mineral density CYP450 Cytochrome P450 DXA Dual-energy X-ray absorptiometry PTH Parathyroid. 2009;
271. Verrotti A, Greco R, Morgese G, Chiarelli F. Increased bone turnover in epileptic patients treated with carbamazepine. *Ann Neurol.* 2000 Mar;47(3):385–8.
272. Kulak CAM, Borba VZC, Silvado CE, Paola L de, Seibel MJ, Bilezikian JP, et al. Bone density and bone turnover markers in patients with epilepsy on chronic antiepileptic drug therapy. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Apr;51(3):466–71.
273. Hahn TJ, Birge SJ, Scharp CR, Avioli L V. Phenobarbital-Induced Alterations in Vitamin D Metabolism. *J Clin Invest.* 1972 Apr 1;51(4):741–8.
274. Bell RD, Pak CYC, Zerwekh J, Barilla DE, Vasko M. Effect of phenytoin on bone and vitamin D metabolism. *Ann Neurol.* 1979 Apr 1;5(4):374–8.
275. Boluk A, Guzelipek M, Savli H, Temel I, Ozişik HI, Kaygusuz A. The effect of valproate on bone mineral density in adult epileptic patients. *Pharmacol Res.* 2004 Jul;50(1):93–7.
276. Beniczky SA, Viken J, Jensen LT, Andersen NB. Bone mineral density in adult patients treated with various antiepileptic drugs. *Seizure.* 2012 Jul;21(6):471–2.
277. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J, Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation]. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int.* 2000;11 Suppl 6:S2-17.
278. Mann V, Ralston SH. Meta-analysis of COL1A1 Sp1 polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture. *Bone.* 2003 Jun;32(6):711–7.
279. Navarro MC, Sosa M, del Pino-Montes J, Torres A, Salido E, Saavedra P, et al. Collagen type 1 (COL1A1) Sp1 binding site polymorphism is associated with osteoporotic fractures but not with bone density in post-menopausal women from the Canary Islands: a preliminary study. *Aging Clin Exp Res.* 2007 Feb;19(1):4–9.
280. Peris P, Alvarez L, Oriola J, Guañabens N, Monegal A, de Osaba MJM, et al. Collagen type I $\alpha$ 1 gene polymorphism in idiopathic osteoporosis in men. *Rheumatology.* 2000

- Nov 1;39(11):1222–5.
281. Macdonald HM, McGuigan FA, New SA, Campbell MK, Golden MHN, Ralston SH, et al. COL1A1 Sp1 Polymorphism Predicts Perimenopausal and Early Postmenopausal Spinal Bone Loss. *J Bone Miner Res.* 2001 Sep 1;16(9):1634–41.
282. Jin H, Evangelou E, Ioannidis JPA, Ralston SH. Polymorphisms in the 5' flank of COL1A1 gene and osteoporosis: meta-analysis of published studies. *Osteoporos Int.* 2011 Mar 27;22(3):911–21.
283. Majchrzycki M, Bartkowiak-Wieczorek J, Wolski H, Drews K, Bogacz A, Czerny B, et al. Polymorphisms of collagen 1A1 (COL1A1) gene and their relation to bone mineral density in postmenopausal women. *Ginekol Pol.* 2015 Dec;86(12):907–14.
284. Zhang H, Tao X, Wu J. Association of calcitonin receptor gene polymorphism with bone mineral density in postmenopausal Chinese women: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2015 Jan 24;291(1):165–72.
285. Bandrés E, Pombo I, González-Huarriz M, Rebollo A, López G, García-Foncillas J. Association between bone mineral density and polymorphisms of the VDR, ER $\alpha$ , COL1A1 and CTR genes in Spanish postmenopausal women. *J Endocrinol Invest.* 2005 Jun 28;28(6):312–21.
286. Qin G, Dong Z, Zeng P, Liu M, Liao X. Association of vitamin D receptor BsmI gene polymorphism with risk of osteoporosis: a meta-analysis of 41 studies. *Mol Biol Rep.* 2013 Jan 11;40(1):497–506.
287. Moran JM, Pedrera-Canal M, Rodriguez-Velasco FJ, Vera V, Lavado-Garcia JM, Fernandez P, et al. Lack of association of vitamin D receptor BsmI gene polymorphism with bone mineral density in Spanish postmenopausal women. *PeerJ.* 2015 Jul 2;3.
288. Zhang L, Yin X, Wang J, Xu D, Wang Y, Yang J, et al. Associations between VDR Gene Polymorphisms and Osteoporosis Risk and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women: A systematic review and Meta- Analysis.
289. Yasovanthi J, Venkata Karunakar K, Sri Manjari K, Pulla Reddy B, Ajeya Kumar P, Sesha Charyulu M, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with BMD and their effect on 1, 25-dihydroxy vitamin D3 levels in pre- and postmenopausal South Indian women from Andhra Pradesh. *Clin Chim Acta.* 2011 Mar 18;412(7–8):541–4.

- 
290. Wang D, Liu R, Zhu H, Zhou D, Mei Q, Xu G. Vitamin D receptor Fok I polymorphism is associated with low bone mineral density in postmenopausal women: a meta-analysis focused on populations in Asian countries. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013 Jul;169(2):380–6.
  291. Pérez A, Ulla M, García B, Lavezzo M, Elías E, Binci M, et al. Genotypes and clinical aspects associated with bone mineral density in Argentine postmenopausal women. *J Bone Miner Metab.* 2008 Jul 4;26(4):358–65.
  292. Stathopoulou MG, Dedoussis GVZ, Trovas G, Theodoraki E V., Katsalira A, Dontas IA, et al. The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in the bone mineral density of Greek postmenopausal women with low calcium intake. *J Nutr Biochem.* 2011 Aug;22(8):752–7.
  293. Pfeilschifter J, Köditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in Proinflammatory Cytokine Activity after Menopause. *Endocr Rev.* 2002 Feb;23(1):90–119.
  294. Marini F, Brandi ML. The future of pharmacogenetics for osteoporosis. *Pharmacogenomics.* 2013 Apr;14(6):641–53.
  295. Lei M-M, Yang T-F, Tu Z-Q, Liu L, Fang Y, Wang G-L. Oestrogen Receptor- $\alpha$  Polymorphism and Risk of Fracture: A Meta-Analysis of 13 Studies Including 1279 Cases and 6069 Controls. *J Int Med Res.* 2010 Oct;38(5):1575–83.
  296. Botella Martínez S. Utilidad de los marcadores de remodelado óseo en el diagnóstico y seguimiento de la osteoporosis. *Univ Navarra.* 2014 Sep 1;
  297. Garnero P, Borel O, Grant SFA, Ralston SH, Delmas PD. Collagen I $\alpha$ 1 Sp1 Polymorphism, Bone Mass, and Bone Turnover in Healthy French Premenopausal Women: The OFELY Study. *J Bone Miner Res.* 1998 May 1;13(5):813–7.
  298. Sainz J, Van Tornout JM, Sayre J, Kaufman F, Gilsanz V. Association of Collagen Type 1  $\alpha$ 1 Gene Polymorphism with Bone Density in Early Childhood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Mar 1;84(3):853–5.
  299. Bao L, Chen M, Lei Y, Zhou Z, Shen H, Le F. Association between vitamin D receptor BsmI polymorphism and bone mineral density in pediatric patients. *Medicine (Baltimore).* 2017 Apr;96(17):e6718.
  300. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and

- circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 1;89(15):6665–9.
301. Laaksonen M, Kärkkäinen M, Outila T, Vanninen T, Ray C, Lamberg-Allardt C. Vitamin D receptor gene Bsm I-polymorphism in Finnish premenopausal and postmenopausal women: its association with bone mineral density, markers of bone turnover, and intestinal calcium absorption, with adjustment for lifestyle factors. *J Bone Miner Metab*. 2002 Nov 1;20(6):383–90.
302. Garnero P, Munoz F, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with the Risk of Fractures in Postmenopausal Women, Independently of Bone Mineral Density. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Aug;90(8):4829–35.
303. Zajičková K, Žofková I, Bahbouh R, Křepelová A. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms, Bone Mineral Density and Bone Turnover: FokI Genotype is Related to Postmenopausal Bone Mass. *Physiol Res*. 2002;51:501–9.
304. Sapir-Koren R, Livshits G, Kobylansky E. Genetic effects of estrogen receptor alpha and collagen IA1 genes on the relationships of parathyroid hormone and 25 hydroxyvitamin D with bone mineral density in Caucasian women. *Metabolism*. 2003 Sep;52(9):1129–35.
305. Välimäki V-V, Piippo K, Välimäki S, Löyttyniemi E, Kontula K, Välimäki MJ. The relation of the XbaI and PvuII polymorphisms of the estrogen receptor gene and the CAG repeat polymorphism of the androgen receptor gene to peak bone mass and bone turnover rate among young healthy men. *Osteoporos Int*. 2005 Dec 13;16(12):1633–40.
306. Perez-Castrillon J, Justo I, Sanz-Cantalapiedra A, Pueyo C, Hernandez G, Duenas A. Effect of the Antihypertensive Treatment on the Bone Mineral Density and Osteoporotic Fracture. *Curr Hypertens Rev*. 2005 Jan 1;1(1):61–6.
307. García-Testal A, Monzó A, Rabanaque G, González A, Romeu A. Relación entre hipertensión arterial y osteoporosis en la menopausia. *Hipertensión*. 2006 Mar 1;23(2):41–8.
308. Shilbayeh S. Prevalence of osteoporosis and its reproductive risk factors among Jordanian women: a cross-sectional study. *Osteoporos Int*. 2003 Nov 1;14(11):929–40.
309. Hanley D, Brown J, Tenenhouse A, Olszynski W, Ioannidis G, Berger C, et al. Associations Among Disease Conditions, Bone Mineral Density, and Prevalent Vertebral Deformities in Men and Women 50 Years of Age and Older: Cross-Sectional

- Results From the Canadian Multicentre Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res.* 2003 Apr 1;18(4):784–90.
310. Herman ST, MD. Screening bone mineral density in epilepsy: a call to action, but what action? *Epilepsy Curr.* 2009;9(2):44–6.



## VIII. ANEXOS





**ANEXO I: Hoja de recogida de datos**

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)**

<b>Basal:</b>	<b>6 meses:</b>
Diario <input type="checkbox"/>	Diario <input type="checkbox"/>
>2h,3v/sem <input type="checkbox"/>	>2h,3v/sem <input type="checkbox"/>
1-6h/sem <input type="checkbox"/>	1-6h/sem <input type="checkbox"/>
Esporádico <input type="checkbox"/>	Esporádico <input type="checkbox"/>
No realiza <input type="checkbox"/>	No realiza <input type="checkbox"/>

**TRATAMIENTOS ANTIEPILÉPTICOS PREVIOS:**

.....

**TRATAMIENTOS CONCOMITANTES:**

.....

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:**.....

## ANEXO II: Resolución del comité ético

Servicio  
**Murciano**  
de Salud

*Arrixaca*  
**Hospital Universitario**  
"Virgen de la Arrixaca"  
Ctra. Madrid - Cartagena • Telf. 968 36 95 00  
30120 El Palmar (Murcia)

Dr. D. Antonio Piñero Madrona  
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

**CERTIFICA**

Que el CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 26/01/2015, acta 01/15 ha evaluado la propuesta de la investigadora **Dra. Irene Villegas Martínez** referida al estudio:

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

**Código Promotor:** IRE-CBZ-2014-01  
**Promotor:** Dra. Irene Villegas Martínez  
**Versión Protocolo Evaluada:** Enero 2015  
**Versión Hoja Información al Paciente Evaluada:** GENERAL / Enero 2015

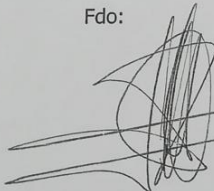
**1º.** Considera que

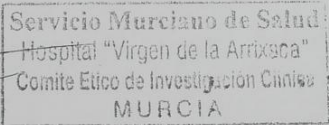
- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Orden SAS/3470/2009 del 16 de Diciembre de 2009 y las normas que lo desarrollan y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, las instalaciones y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

**2º.** Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE** y acepta la realización del estudio por la **Dra. Irene Villegas Martínez** como investigadora principal en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

Lo que firmo en Murcia, a 26 de enero de 2015

Fdo:





Dr. D. Antonio Piñero Madrona  
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca