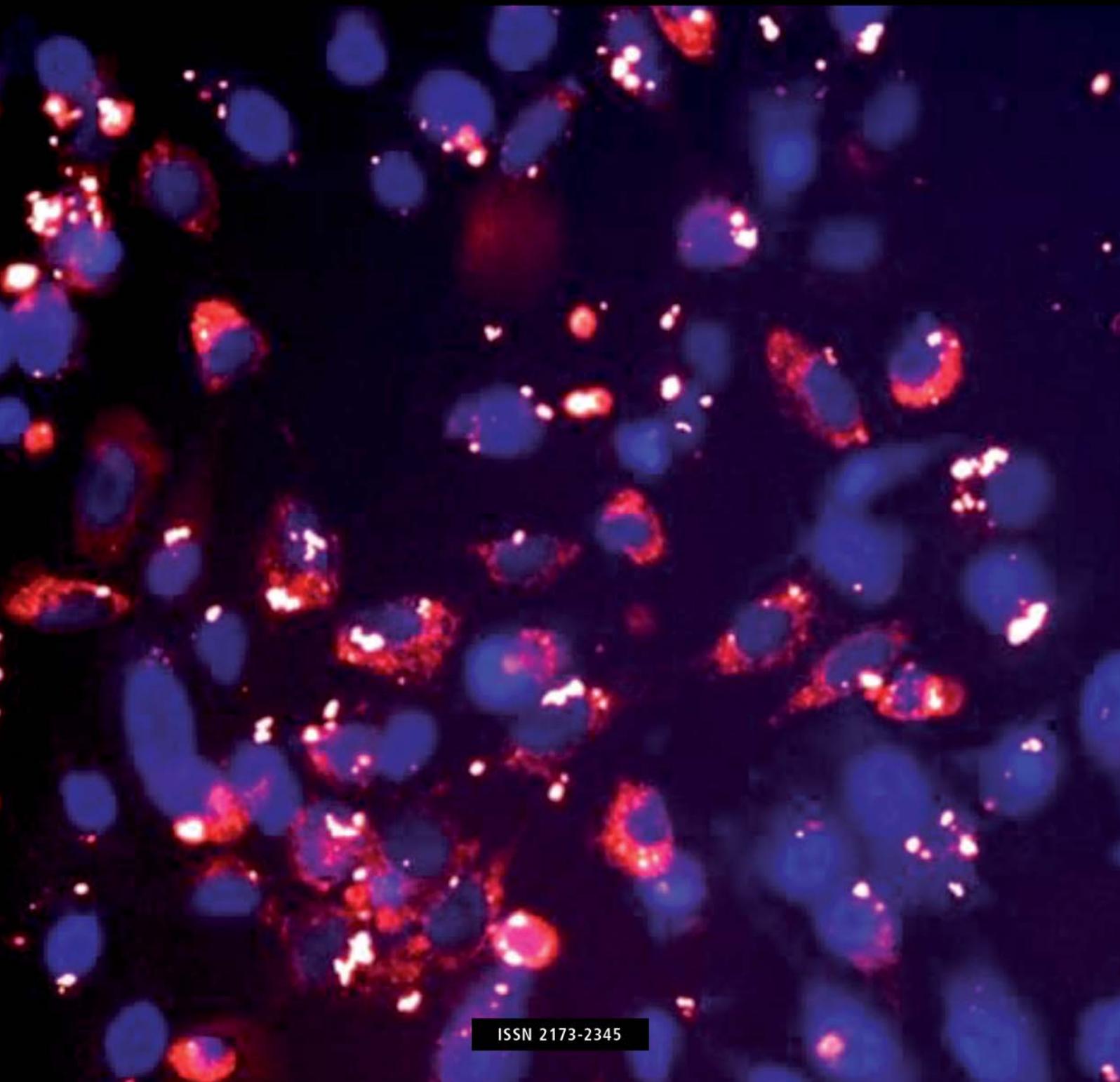


Volumen 11 · Número 1 · Enero-Marzo 2019

Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com





XXIV Congreso de la SEIOMMM

16, 17 y 18 de Octubre de 2019

Girona

<https://seiommm.org/congreso-seiommm/>

Director
Manuel Sosa Henríquez

Redactora
M^a Jesús Gómez de Tejada Romero



Nuestra portada: Transfección de osteoblastos humanos con el microRNA Mimic miRIDIAN con Dy547 a 100 nM. Los núcleos están teñidos con DAPI. Amplificación 20x con el microscopio invertido Leica DM IL LED.

Autora: Dra. Natalia García-Giralt. Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM). CIBER de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES). Barcelona (España).



Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)

Presidente
Josep Blanch Rubió

Vicepresidenta
M^a Jesús Moro Álvarez

Secretario
Enrique Casado Burgos

Tesorera
Mercedes Giner García

Vocales
Guillermo Martínez Díaz-Guerra
Manuel Ciria Recasens

Presidente Electo
Manuel Naves Díaz

Velázquez, 94 (1^a planta)
28006 Madrid

Tel: +34-625 680 737
Fax: +34-917 817 020

seiomm@seiomm.org
www.seiomm.org

Sumario

Vol. 11 - Nº 1 - Enero-Marzo 2019

EDITORIAL

Vitamina D y función muscular

Quesada Gómez JM, Sosa Henríquez M 3

ORIGINALES

Niveles de calcidiol y mantenimiento de la función muscular, capacidad funcional y densidad mineral ósea en población española no seleccionada

Gómez Alonso C, Díaz López JB, Rodríguez Rebollar A, Martínez Arias L, Martín Virgala J, Martín Carro B, Marqués Álvarez L, Palomo Antequera C, Cannata Andía JB, Naves Díaz M 6

Efectos de la estimulación mecánica en la comunicación entre células óseas

Cadenas Martín M, Tirado I, Martín E, Ardura JA, Bravo B, Gortazar AR 12

El papel de la determinación de un marcador de resorción, el telopéptido carboxiterminal del colágeno I, en la valoración del cumplimiento terapéutico en pacientes tratadas con bifosfonatos orales

Martínez-Laguna D, Nogués X, Carbonell-Abella C, Soria Castro A, Orozco López P, Poza Martínez R, Díez-Pérez A, Prieto-Alhambra D 19

Diferente evolución de la esclerostina sérica respecto de otros marcadores de remodelado óseo en el primer año tras un trasplante hepático

Martín González A, Allo Miguel G, Aramendi Ramos M, Librizzi S, Jiménez C, Hawkins F, Martínez Díaz-Guerra G 25

REVISIÓN

Vitamina D libre: una determinación en aumento

Quesada Gómez M, Heureux N 30

Edición



Avda. Reina Victoria, 47
28003 Madrid
Telf. +34-915 538 297
correo@ibanezyplaza.com
www.ibanezyplaza.com

Maquetación
Concha García García

Traducción inglés
David Shea

ISSN: 2173-2345

Envío de originales:
romm@ibanezyplaza.com

Indexada en las siguientes bases de datos: Scielo, Web of Sciences, IBECS, Scopus, SIIC Data Bases, embase, Redalyc, Emerging Sources Citation Index, Open J-Gate, DOAJ, Free Medical Journal, Google Academic, Medes, Electronic Journals Library AZB, e-revistas, WorldCat, Latindex, EBSCOhost, MedicLatina, Dialnet, SafetyLit, Mosby's, Encare, Academic Keys, ERIH plus, British Library, ROAD.

Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral ha sido aceptada para su inclusión en "Emerging Sources Citation Index", la nueva edición de Web of Sciences que funciona desde noviembre de 2015. Por ello, los artículos publicados en nuestra revista serán indexados en Web of Sciences desde el mismo momento de su publicación.

Comité Editorial

Dra. Teresita Bellido

Departamento de Anatomía y Biología Celular. Departamento de Medicina, División de Endocrinología. Universidad de Indiana. Facultad de Medicina. Richard Roudebush Centro Médico de la Administración de Veteranos de los Estados Unidos. Indianápolis, Indiana (Estados Unidos)
Correo electrónico: tbellido@iupui.edu

Dr. Ernesto Canalis

Director, Centro de Investigaciones del Hueso. Profesor de Ortopedia y de Medicina. Centro de Salud de la Universidad de Connecticut. Farmington, CT (Estados Unidos)
Correo electrónico: canalis@uchc.edu

Dra. Patricia Clark Peralta

Jefa de la Unidad de Epidemiología Clínica. Hospital Infantil Federico Gómez-Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad de México (México)
Correo electrónico: patriciaclark@prodigy.net.mx

Dr. Oswaldo Daniel Messina

Jefe de Reumatología. Hospital Argerich de Buenos Aires (Argentina). Profesor Asociado de Reumatología y Director de la carrera de post grado en Reumatología. Universidad de Buenos Aires (Argentina). Director Médico de Investigaciones Reumatológicas y Osteológicas de Buenos Aires (IRO SRL) (Argentina). Miembro del Board y del Comité de Asesores Científicos de la International Osteoporosis Foundation (IOF)
Correo electrónico: drosvaldodanielmessina@gmail.com

Dra. Lilian I Plotkin

Departamento de Anatomía y Biología Celular y Centro de Indiana para la Salud Muscoloesquelética. Facultad de Medicina, Universidad de Indiana. Indianápolis, Indiana (Estados Unidos)
Correo electrónico: lplotkin@iupui.edu

Dr. Josep Blanch Rubió

Unidad de Osteoporosis y de Metabolismo Óseo. Servicio de Reumatología. Departamento de Medicina. Hospital Universitario del Mar. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina. Barcelona (España)
Correo electrónico: JBlanch@parcdesalutmar.cat

Dr. Manuel Díaz Curiel

Ex-Director de la Cátedra de Enfermedades Metabólicas Óseas. Universidad Autónoma Madrid. Consultor de Enfermedades Metabólicas Óseas. Fundación Jiménez Díaz, Madrid. Presidente Honorífico de la Fundación Hispana de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas (FHOEMO) (España)
Correo electrónico: mdcuriel@fjd.es

Dr. Adolfo Díez Pérez

Instituto Hospital del Mar de Investigación Médica (IMIM) y Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario del Mar. Universidad Autónoma de Barcelona. CIBER en Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES), Instituto Carlos III, Barcelona (España)
Correo electrónico: Adiez@parcdesalutmar.cat

Dr. José Antonio Riancho Moral

Departamento de Medicina y Psiquiatría, Universidad de Cantabria. Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), Santander (España)
Correo electrónico: rianchoj@unican.es

Metodología, estudio de datos y estadística: Pedro Saavedra Santana

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Departamento de Matemáticas. Las Palmas de Gran Canaria (España)
Correo electrónico: pedro.saavedra@ulpgc.es

Dr. Manuel Sosa Henríquez (Director)

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS). Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral. Unidad Metabólica Ósea. Hospital Universitario Insular. Las Palmas de Gran Canaria (España)
Correo electrónico: manuel.sosa@ulpgc.es

Dra. María Jesús Gómez de Tejada Romero (Redactora)

Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla. Sevilla (España). Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria (España)
Correo electrónico: mjtr@us.es

Vitamina D y función muscular

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2019000100001>

Quesada Gómez JM^{1,2}, Sosa Henríquez M^{3,4}

1 Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición - Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) - Hospital Universitario Reina Sofía - Córdoba (España)

2 Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES) - Instituto de Salud Carlos III - Madrid (España)

3 Universidad de Las Palmas de Gran Canaria - Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias - Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral - Las Palmas de Gran Canaria (España)

4 Hospital Universitario Insular - Unidad Metabólica Ósea - Las Palmas de Gran Canaria (España)

En 1922, en la Universidad Johns Hopkins de Baltimore, el profesor McCollum descubrió un factor, desde entonces denominado vitamina D siguiendo el orden alfabético de las otras vitaminas identificadas hasta el momento, capaz de curar el raquitismo en niños y la osteomalacia en adultos. Enfermedades en las que, como sabemos desde las primeras descripciones científicas publicadas en Londres a mediados del siglo XVII, se asocia la afectación muscular consistente en debilidad e hipotonía generalizada a la afectación ósea, característica principal de la misma. Por tanto, desde el descubrimiento de la vitamina D, esta se ha asociado no solo a la salud ósea sino también a la salud muscular¹. Paradójicamente, en la actualidad no hay consenso sobre los efectos beneficiosos potenciales de la suplementación con vitamina D en la función muscular, el equilibrio y los riesgos de caídas, situación destacada en el último metaanálisis publicado por Bolland *et al.*², quienes revisan en 81 ensayos clínicos aleatorizados (ECA) que incluyen 53.537 participantes el efecto de la vitamina D sobre fracturas y caídas como resultado primario. Los análisis agrupados mostraron que la suplementación con vitamina D no tenía efecto sobre las caídas (37 ECA; n=34.144; RR=0,97; intervalo de confianza -IC- del 95%: 0,93 a 1,02), por lo que los autores concluyeron que “la suplementación con vitamina D no ejerce efectos significativos en caídas”, y afirmando que “potenciales ensayos futuros probablemente no alterarán esas conclusiones, y que, por lo tanto, hay poca justificación para el uso de suplementos de vitamina D para mantener o mejorar la salud músculo-esquelética, indicando que las guías clínicas deben reflejar estos hallazgos”². A partir de esta publicación, muchos médicos y pacientes podrían concluir engañosamente que pueden dejar de prescribir o tomar suplementos de vitamina D, lo cual es un mensaje potencialmente peligroso, dada la prevalencia elevada de deficiencia de vitamina D en España³.

La pérdida de fuerza y/o función muscular, la miopatía invalidante grave de predominio proximal con dolor esquelético o muscular difuso en adultos, la atrofia muscular generalizada y anomalías electromiográficas, tales como unidad motora polifásica, potenciales con duración acortada y amplitud disminuida, afectación de atrofia de la fibra muscular tipo II (de contracción rápida) y notable infiltración grasa, son hallazgos en el déficit severo y sostenido de vitamina D, en la insuficiencia renal grave, o en la ausencia congénita del gen CYP27B1

por incapacidad de síntesis adecuada de 1,25 dihidroxi-vitamina D (1,25DHCC), metabolito hormonalmente activo del sistema endocrino de la vitamina D, con mejoría rápida de la función muscular después de la suplementación con vitamina D ó 1,25DHCC a dichos pacientes. Se pueden observar cambios más sutiles en la función muscular en sujetos con deficiencia de vitamina D menos grave y quizás menos crónica⁴.

Gómez Alonso *et al.*⁵, publican en este número un artículo en el que observan que en los pacientes de ambos sexos de la cohorte EVOS (*European Study of Vertebral Osteoporosis*) que mantienen niveles séricos de calcidiol superiores a 20 ng/mL presentan mayor fuerza muscular de agarre en las manos, mantenimiento de actividades cotidianas y menores pérdidas de densidad mineral ósea en la cadera, medida por densitometría en la extremidad proximal del fémur⁵, efectos beneficiosos constatados que constituyen la novedad de este estudio. Los mecanismos de acción de la vitamina D en la biología muscular y el impacto de su deficiencia muestran que es plausible un posible vínculo entre músculo y vitamina D⁶.

De hecho, estudios observacionales muestran una correlación entre el estado deficiente de vitamina D y fragilidad, debilidad muscular o fatiga y caídas. Mientras un metaanálisis de 15 estudios de intervención realizados en un total de 2.866 participantes no reveló una mejoría significativa en la fuerza de agarre de la mano o en las pruebas de marcha⁷, otros metaanálisis mostraron un efecto beneficioso discreto sobre la fuerza muscular y el equilibrio⁸, o tan solo evidenciaron beneficios en personas con los niveles de 25 hidroxivitamina D (25OHD) más bajos (<10 ng/mL)⁹. Beaudart *et al.* tampoco encontraron efecto en la masa muscular, pero observaron un pequeño efecto positivo en la fuerza muscular en pacientes mayores de 65 años con deficiencia en vitamina D (<12 ng/mL)¹⁰. Estos datos están avalados con estudios en pacientes con deficiencia grave en vitamina D en los cuales la administración de vitamina D mejoran los síntomas de fatiga, cansancio y dolor, y la recuperación de energía después del ejercicio físico demostrada *in vivo* por técnicas de espectrometría de resonancia magnética nuclear¹¹. Algunos estudios de intervención demuestran que la administración de 800-1.000 UI de vitamina D₃ por día, o algo más de su equivalente semanal, mejora la fuerza y el equilibrio en ancianos con deficiencia en vitamina D¹²⁻¹⁴.



Además de la función, disponemos de múltiples estudios observacionales que relacionan la deficiencia en vitamina D con la fragilidad y la incidencia de caídas. Así, un análisis de 18 estudios reveló una *odds ratio* (OR) de caídas significativamente mayor de 1,23–1,44 para sujetos con concentraciones de 25OHD por debajo de 10–20 ng/mL¹⁵.

La fuerza muscular (especialmente de músculo proximal) puede mejorar modestamente con la suplementación con vitamina D en ancianos con niveles séricos de 25OHD <12 ng/mL¹⁶. De acuerdo con este concepto, la suplementación durante 9 meses con 1.000 UI de vitamina D₃ diarias disminuyeron significativamente las primeras caídas y el total de las mismas en más del 50% de los pacientes¹³.

Varios ensayos han examinado el efecto de la suplementación con vitamina D en las tasas de caídas. Un metaanálisis de 9 ECA mostró que la suplementación diaria de menos de 600 UI de vitamina D no fue eficaz, mientras que la administración de entre 700 y 1.000 UI disminuyó significativamente el riesgo de caídas¹⁷.

En una revisión Cochrane se concluyó que la suplementación con vitamina D redujo el riesgo de caídas en pacientes institucionalizados (RR=0,63; IC del 95%: 0,46–0,85)¹⁸. En sujetos ambulatorios, la suplementación con vitamina D no redujo el riesgo de caídas en un metaanálisis de todos los ECA combinados (RR=0,57; IC del 95%: 0,37–0,89), sino que redujo el riesgo de caídas en cuatro estudios que seleccionaron pacientes con niveles más bajos de vitamina D (los cuatro estudios tuvieron puntos de corte de <12, <20, <24 y <31 y ng/mL; índice de riesgo=0,70; IC del 95%: 0,56 a 0,87). La reducción del 30% en el riesgo de caídas en estos estudios (índice de riesgo=0,70; IC del 95%: 0,56 a 0,87) fue significativamente menor que en los otros 9 estudios evaluados en el metaanálisis que no seleccionaron participantes según el estado de vitamina D (índice de riesgo=1,00; IC del 95%: 0,93–1,07; interacción $p < 0,01$)¹⁹.

Apoyando estos datos, un metaanálisis más reciente de ECA encontró que la suplementación con vitamina D redujo la tasa de caída solo en sujetos con una concentración sérica inicial de 25OHD por debajo de 20 ng/mL²⁰.

Las megadosis emplean regímenes de suplementos intermitentes con intervalos de dosificación largos y variables de 100.000 UI de colecalciferol por vía oral, cada cuatro meses²¹, o al mes²²; 30.000 UI de vitamina D₂ por vía intramuscular una vez al año^{21,23} ó 500.000 UI anuales²⁴, de los cuales se conoce su ausencia de efectos o, incluso, los efectos negativos aumentando el riesgo de fracturas y caídas, y, por tanto, no se recomiendan en guías ni en la práctica habitual porque se asocian con oscilaciones en las

concentraciones séricas de 25OHD (lo que significa que las concentraciones séricas no se mantienen por encima del umbral normal durante todo el período de tratamiento), y han quedado obsoletos e ineficaces o perjudiciales. Por lo tanto, estos diseños con esa posología no deberían ser incluidos en los metaanálisis^{25–27} y, sin embargo y sorprendentemente, tienen un peso del 50% del metaanálisis propuesto por Bolland *et al.*

En un estudio realizado en mujeres ancianas con deficiencia basal de vitamina D las caídas ocurrieron en el 48% del grupo tratado con 24.000 UI de vitamina D₃, en el 67% del grupo tratado con 60.000 UI de vitamina D₃, y en el 66% del grupo que recibió 24.000 UI de vitamina D₃ o más de 300 µg de calcifediol; los autores concluyeron a partir de un análisis *post hoc* que las concentraciones de 25OHD superiores a 45 ng/mL pueden estar asociadas con un mayor riesgo de caídas²⁸. En concordancia, Smith *et al.*²⁹, en un estudio realizado en mujeres con deficiencia en vitamina D (<15 ng/dL) tratadas con un rango completo de dosis diarias de vitamina D₃ (de 400 a 4.800 UI) vs. placebo durante 1 año, encontraron una asociación en forma de U en las caídas, cuyo nadir ocurrió en el rango de dosis de 1.600 a 3.200 UI por día; observándose un mayor número de caídas en las pacientes que recibieron las dosis más altas de vitamina D.

Por lo tanto, en nuestra práctica habitual debemos tener claro que la evidencia disponible indica de forma consistente que la vitamina D tiene efectos fisiológicos importantes sobre el músculo esquelético y cardíaco, que estos efectos se observan de un modo consistente cuando los pacientes incluidos en los estudios tienen niveles de 25OHD con puntos de corte al menos por debajo de 30 ng/mL. Que la administración entre 800 y 1.000 UI diarias de vitamina D₃ son las recomendadas, salvo en obesos o en tratamientos que aumentan el catabolismo de la vitamina D₃³⁰, para obtener los beneficios propuestos; que dosis mayores pueden resultar perjudiciales y que no se deben administrar dosis masivas que se tornan ineficaces o perjudiciales aumentando el riesgo de caídas y, potencialmente, la tasa de fracturas, por lo que aprender a mantener niveles adecuados de 25OHD en los pacientes debe ser un objetivo irrenunciable de la Sanidad Pública.

Para obtener resultados el tratamiento debe mantenerse a largo plazo tanto a título individual como en el diseño de ensayos clínicos. La administración a pacientes con niveles séricos de 25OHD normales no aportará nada al paciente, no mejorará la salud muscular, ni evitará las caídas y, probablemente, tampoco en otros objetivos de salud.



Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Bibliografía

- O'Riordan JLH, Bijvoet OLM. Rickets before the discovery of vitamin D. *Bonekey Rep.* 2014;3:478.
- Bolland MJ, Grey A, Avenell A. Effects of vitamin D supplementation on musculoskeletal health: a systematic review, meta-analysis, and trial sequential analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6:847-58.
- Quesada-Gómez JM, Díaz-Curiel M, Sosa-Henríquez M, Malouf-Sierra J, Noguees-Solan X, Gómez-Alonso C, et al. Low calcium intake and inadequate vitamin D status in postmenopausal osteoporotic women. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013;136:175-7.
- Bouillon R. Extra-skeletal effects of vitamin D. *Front Horm Res.* 2018;50:72-88.
- Gómez Alonso C, Díaz López JB, Rodríguez Rebollar A, Martínez Arias L, Martín Virgala J, Martín Carro B, et al. Niveles de calcidiol y mantenimiento de la función muscular, capacidad funcional y densidad mineral ósea en población española no seleccionada. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2019;11(1):6-11.
- Girgis CM, Clifton-Bligh RJ, Hamrick MW, Holick MF, Gunton JE. The roles of vitamin D in skeletal muscle: form, function, and metabolism. *Endocr Rev.* 2013;34:33-83.
- Rosendahl-Riise H, Spielau U, Ranhoff AH, Gudbrandsen OA, Dierkes J. Vitamin D supplementation and its influence on muscle strength and mobility in community-dwelling older persons: a systematic review and meta-analysis. *J Hum Nutr Diet.* 2017;30:3-15.
- Muir SW, Montero-Odasso M. Effect of vitamin D supplementation on muscle strength, gait and balance in older adults: a systematic review and meta-analysis. *J Am Geriatr Soc.* 2011;59:2291-300.
- Stockton KA, Mengersen K, Paratz JD, Kandiah D, Bennell KL. Effect of vitamin D supplementation on muscle strength: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2011;22:859-71.
- Beaudart C, Buckinx F, Rabenda V, Gillain S, Cavalier E, Slomian J, et al. The effects of vitamin D on skeletal muscle strength, muscle mass, and muscle power: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(11):4336-45.
- Sinha A, Hollingsworth KG, Ball S, Cheetham T. Improving the vitamin D status of vitamin D deficient adults is associated with improved mitochondrial oxidative function in skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3):E509-13.
- Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Suppan K, Fahrleitner-Pammer A, Dobnig H. Effects of a long-term vitamin D and calcium supplementation on falls and parameters of muscle function in community-dwelling older individuals. *Osteoporos Int.* 2009;20(2):315-22.
- Cangussu LM, Nahas-Neto J, Orsatti CL, Poloni PF, Schmitt EB, Almeida-Filho B, et al. Effect of isolated vitamin D supplementation on the rate of falls and postural balance in postmenopausal women fallers: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Menopause.* 2016;23(3):267-74.
- Lips P, Binkley N, Pfeifer M, Recker R, Samanta S, Cohn DA, et al. Once-weekly dose of 8400 IU vitamin D3 compared with placebo: effect on neuromuscular function and tolerability in older adults with vitamin D insufficiency. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(4):985-91.
- Annweiler C, Beauchet O. Questioning vitamin D status of elderly fallers and nonfallers: a meta-analysis to address a 'forgotten step'. *J Intern Med.* 2015;277(1):16-44.
- Beaudart C, Buckinx F, Rabenda V, Gillain S, Cavalier E, Slomian J, et al. The effects of vitamin D on skeletal muscle strength, muscle mass, and muscle power: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(11):4336-45.
- Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Staehelin HB, Orav JE, Stuck AE, Theiler R, et al. Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMJ.* 2009;339:b3692.
- Cameron ID, Gillespie LD, Robertson MC, Murray GR, Hill KD, Cumming RG, et al. Interventions for preventing falls in older people in care facilities and hospitals. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;12:CD005465.
- Gillespie LD, Robertson MC, Gillespie WJ, Sherrington C, Gates S, Clemson LM, et al. Interventions for preventing falls in older people living in the community. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012(9):CD007146.
- LeBlanc ES, Chou R. Vitamin D and falls-fitting new data with current guidelines. *JAMA Intern Med.* 2015;175(5):712-3.
- Lyons RA, Johansen A, Brophy S, Newcombe RG, Phillips CJ, Lervy B, et al. Preventing fractures among older people living in institutional care: a pragmatic randomized double blind placebo controlled trial of vitamin D supplementation. *Osteoporos Int.* 2007;18(6):811-8.
- Khaw KT, Stewart AW, Waayer D, Lawes CMM, Toop L, Camargo CA Jr, et al. Effect of monthly high-dose vitamin D supplementation on falls and non-vertebral fractures: secondary and post-hoc outcomes from the randomized, double-blind, placebo-controlled ViDA trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017 Jun;5(6):438-47.
- Smith H, Anderson F, Raphael H, Maslin P, Crozier S, Cooper C. Effect of annual intramuscular vitamin D on fracture risk in elderly men and women—a population-based, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Rheumatology (Oxford).* 2007;46(12):1852-7.
- Sanders KM, Stuart AL, Williamson EJ, Simpson JA, Kotowicz MA, Young D, et al. Annual high-dose oral vitamin D and falls and fractures in older women: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2010;303(18):1815-22.
- Bolland MJ, Grey A, Avenell A. Assessment of research waste part 2: wrong study populations— an exemplar of baseline vitamin D status of participants in trials of vitamin D supplementation. *BMC Med Res Methodol.* 2018;18(1):101.
- Bolland MJ, Grey A, Avenell A. Assessment of research waste part 1: an exemplar from examining study design, surrogate and clinical endpoints in studies of calcium intake and vitamin D supplementation. *BMC Med Res Methodol.* 2018;18(1):103.
- Scragg R. Emerging evidence of thresholds for beneficial effects from vitamin D supplementation. *Nutrients.* 2018;10(5). pii: E561.
- Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Orav EJ, Staehelin HB, Meyer OW, Theiler R, et al. Monthly high-dose vitamin D treatment for the prevention of functional decline: a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med.* 2016;176(2):175-83.
- Smith LM, Gallagher JC, Suiter C. Medium doses of daily vitamin D decrease falls and higher doses of daily vitamin D3 increase falls: A randomized clinical trial. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;173:317-22.
- Bischoff-Ferrari HA, Shao A, Dawson-Hughes B, Hathcock J, Giovannucci E, Willett WC. Benefit-risk assessment of vitamin D supplementation. *Osteoporos Int.* 2010;21(7):1121-32.

Niveles de calcidiol y mantenimiento de la función muscular, capacidad funcional y densidad mineral ósea en población española no seleccionada

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2019000100002>

Gómez Alonso C¹, Díaz López JB², Rodríguez Rebollar A³, Martínez Arias L¹, Martín Virgala J¹, Martín Carro B¹, Marqués Álvarez L⁴, Palomo Antequera C², Cannata Andía JB¹, Naves Díaz M¹

1 Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo - Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA) - Red de Investigación Renal (REDinREN) del Instituto de Salud Carlos III - Universidad de Oviedo - Oviedo (España)

2 Servicio de Medicina Interna - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

3 Laboratorio de Medicina - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

4 Unidad de Cuidados Intensivos - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

Fecha de recepción: 16/11/2018 - Fecha de aceptación: 29/01/2019

Trabajo remitido como prestación por la beca FEIOMM de Investigación Básica 2016

Resumen

Introducción: La vitamina D posee efectos beneficiosos que supuestamente contribuirían a mantener la función músculo-esquelética.

Objetivo: Analizar en una población no seleccionada el efecto de los niveles de calcidiol sobre la función muscular en ambas manos, sobre actividades de la vida cotidiana y sobre los cambios en la densidad mineral ósea (DMO).

Material y métodos: Se utilizó la cohorte del estudio EVOS que realizó, entre otros, medidas de fuerza muscular de agarre en ambas manos, preguntas relativas a la dificultad para realizar actividades cotidianas, estudio densitométrico en columna lumbar y cadera, y bioquímica para determinar los niveles de calcidiol.

Resultados: Valores de calcidiol ≥ 20 ng/mL se asociaron con mayor fuerza muscular de agarre en ambas manos. Tras ajuste por edad, sexo, IMC y estacionalidad, niveles de calcidiol < 20 ng/mL se asociaron independientemente con menor fuerza muscular de agarre solo en la mano izquierda (OR=2,35; IC 95%: 1,03-5,38). Del mismo modo, la incapacidad o tener dificultades para "coger un libro u objeto de una estantería alta" e "incorporarse de la cama" se asociaron significativamente con niveles de calcidiol < 20 ng/mL. Niveles de calcidiol < 20 ng/mL se asociaron con mayores pérdidas de DMO en cuello femoral y cadera total. Estas asociaciones se mantuvieron en el análisis multivariante.

Conclusiones: Mantener niveles de calcidiol ≥ 20 ng/mL se asociaron con mayor fuerza muscular de agarre en las manos, mantenimiento de actividades cotidianas y menores pérdidas de DMO en cadera. Este estudio corrobora la utilidad de mantener niveles adecuados de vitamina D para mantener la función músculo-esquelética.

Palabras clave: calcidiol, fuerza muscular, capacidad funcional, densidad mineral ósea.

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento se asocia con una pérdida de masa y fuerza muscular, así como con una disminución en la densidad mineral ósea (DMO), lo que puede condicionar una movilidad reducida, mayor riesgo de caídas y aparición de fracturas^{1,2}. En los últimos años se ha hecho especial hincapié en mantener un estado adecuado de vitamina D para optimizar la fuerza muscular y la DMO con objeto de reducir caídas y fracturas³⁻⁵. Si bien, un reciente meta-análisis cuestiona la utilidad de los suplementos de vitamina D para reducir el riesgo de caídas, disminución de DMO y fracturas⁶, existen suficientes argumentos que evidencian la importancia de la vitamina D sobre la salud muscular y ósea. La vitamina D estimula la absorción de calcio del intestino y mantiene los niveles séricos de calcio que se re-

quieren para una mineralización ósea normal y para el mantenimiento de la función muscular⁷. Varios estudios *in vivo* sugieren el papel de la vitamina D en la regulación de la masa muscular y su función. Estudios observacionales demuestran que la deficiencia de vitamina D en personas de edad avanzada está asociada con una masa y fuerza muscular reducidas⁸⁻¹⁰, un rendimiento físico más bajo^{8,11}, y un mayor riesgo de caídas¹². Además, un meta-análisis de 17 ensayos clínicos mostró que la suplementación con vitamina D en sujetos con niveles basales de calcidiol inferiores a 10 ng/mL tuvo un efecto positivo en la fuerza muscular de la cadera¹³. Los estudios descritos anteriormente sugieren que la vitamina D puede afectar la masa muscular y su función; sin embargo, no está claro si la vitamina D desempeña un papel directo o indirecto. En los



Correspondencia: Manuel Naves Díaz (mnaves.huca@gmail.com)

últimos años se le ha dado cada vez más importancia a la conversión local de calcidiol a calcitriol, el metabolito de la vitamina D más activo, que se sintetiza principalmente en el riñón a través de su precursor el calcidiol⁷. Esta síntesis local se ha demostrado en otros varios tipos de células, como en osteoblastos¹⁴⁻¹⁷, células de la próstata¹⁸ y monocitos¹⁹, lo que refuerza la importancia de alcanzar unos niveles adecuados de calcidiol en el organismo.

Por tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar en una población no seleccionada el efecto de los niveles de calcidiol (25-OHD) sobre la fuerza muscular en ambas manos, las actividades de la vida cotidiana relacionadas con la capacidad funcional del individuo y sobre los cambios en la DMO.

MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo inicial del estudio se diseñó para conocer la prevalencia de fractura vertebral. Para ello, se seleccionaron al azar del registro municipal de Oviedo 624 hombres y mujeres mayores de 50 años. El protocolo consistió en que todos los sujetos completaron un cuestionario sobre factores de riesgo relacionados con la osteoporosis. Este cuestionario que fue diseñado para el estudio EVOS, traducido a varios idiomas, y tuvo un adecuado índice de reproducibilidad^{20, 21}. Asimismo a toda la cohorte se le realizó dos radiografías laterales (el estudio radiográfico no se completó solo en 2 casos), la recogida de mediciones antropométricas como altura y peso para determinar el índice de masa corporal (IMC), y un estudio densitométrico. Todos los sujetos tenían suficiente capacidad ambulatoria para subir dos pisos sin ascensor, y el 99% vivía en su propio domicilio.

Después del estudio de prevalencia, esta cohorte se siguió de forma prospectiva durante 4 años mediante 2 cuestionarios postales para averiguar la incidencia de fractura osteoporótica no vertebral. En el cuarto año del período de seguimiento (entre el segundo y el tercer cuestionario postal), se invitó a los participantes que habían contestado al menos uno de los dos cuestionarios anteriores a repetir las mismas pruebas realizadas en el estudio de prevalencia, a lo que se le sumó medidas de fuerza muscular de agarre en ambas manos con un dinamómetro que posee un escala que va desde el mínimo 0 al máximo de 300 mm de Hg, una encuesta con 12 ítems sobre la dificultad o no para realizar actividades de la vida cotidiana, así como un estudio bioquímico de marcadores generales y del metabolismo óseo y mineral. En este segundo estudio transversal participaron 404 sujetos (212 mujeres y 192 hombres), de los que 322 estuvieron de acuerdo en realizar el estudio bioquímico. Un total de 32 sujetos (9,9%) se excluyeron del análisis por haber recibido tratamiento osteoporótico, incluyendo tratamiento con vitamina D. De un total de 290 sujetos dispusimos de todos los datos en ambos cortes transversales.

Evaluación densitométrica

La DMO se midió con un densitómetro Hologic® QDR-1000 DXA (Hologic Inc., Waltham, Massachusetts, EE.UU.). En todos los casos, se analizaron la columna lumbar anteroposterior (L2-L4) y la densidad del fémur derecho. Para la evaluación de la DMO lumbar, se excluyeron 4 sujetos con artrosis degenerativa marcada. Los coeficientes de variación (CV) fueron 1,2% y 1,9%, respectivamente²². El control de calidad diario a largo plazo fue seguido por un *phantom* de la columna lumbar, con CV=0,0 ± 0,1%²⁰. En el cuarto año del período de seguimiento, la DMO también se deter-

minó en las mismas áreas que se midieron en el primer estudio transversal, utilizando la tasa de cambio en la DMO entre ambos estudios transversales como un método para evaluar la evolución de la DMO a lo largo del tiempo.

Análisis bioquímico

En el cuarto año de seguimiento y a lo largo de 1 año, se tomó una muestra de sangre y orina en ayunas de cada sujeto: el 33% de las muestras de sangre se tomaron en primavera, el 12% en verano, el 32% en otoño y el 23% en invierno. Una vez separado el suero, se mantuvo congelado junto con la orina a -80°C hasta que se realizaron los análisis. Los niveles séricos de calcio, creatinina, fosfatasa alcalina total y fosfatasa ácido tartrato resistente se determinaron utilizando un autoanalizador (Hitachi Mod. 717, Ratigen, Alemania). Los niveles séricos de calcidiol (25OHD) se determinaron mediante extracción previa con acetonitrilo (IDS, Ltd., Bolton, Reino Unido), cuyos coeficientes de variación (CV) intra e interensayo fueron, respectivamente, del 5,2% y del 8,2%.

Los niveles de 1,25-dihidroxivitamina D se midieron a través de radio-inmunoensayo (IDS, Ltd.); los CV intra e interensayo fueron 6,5% y 9%, respectivamente. Los niveles intactos de PTH se midieron utilizando métodos de radio-inmunoensayo (Instituto Nichols, San Juan de Capistrano, California, EE.UU.); los valores de CV intra e interensayo fueron 2,6% y 5,8%, respectivamente.

Todos los estudios realizados siguieron los principios enunciados en la declaración de Helsinki y fueron formalmente aprobados por el Comité de Ensayos Clínicos del Principado de Asturias.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando la versión 17.0 de SPSS para Windows. Las variables cuantitativas se analizaron mediante t de Student. Las variables cualitativas se analizaron mediante chi cuadrado.

Para analizar a nivel multivariante el efecto de los niveles de calcidiol sobre la fuerza muscular, la fuerza muscular de agarre en ambas manos se categorizó como 0 para valores iguales a 300 mm de Hg (máxima presión del dinamómetro) y 1 para valores <300 mm de Hg. El análisis de regresión logística se ajustó por edad, sexo, IMC y estacionalidad (estación del año en el que se hubiera realizado la extracción de sangre).

Para estudiar la asociación entre la realización de las actividades de la vida cotidiana con los niveles séricos de calcidiol se realizó un análisis de regresión logística tras ajuste por edad, sexo, IMC y estacionalidad.

Cuando se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre los niveles de calcidiol con la tasa de cambio en la DMO en el análisis univariado, se realizó una regresión lineal ajustada por edad, sexo, IMC y estacionalidad.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran características sociodemográficas, antropométricas, variables clínicas y marcadores bioquímicos de la cohorte analizada en función de los niveles séricos de calcidiol. En los que tenían niveles de calcidiol ≥20 ng/mL había una predominancia de hombres, presentaban menor edad, valores superiores de DMO en todos los segmentos esqueléticos analizados, menor frecuencia de fracturas previas, mayores niveles de calcitriol y menores niveles de PTH y fosfatasa alcalina total.

Tabla 1. Características demográficas, antropométricas, variables clínicas y marcadores bioquímicos en función de los niveles séricos de calcidiol

	Calcidiol <20/mL	Calcidiol ≥20 ng/mL	Valor de p
Sexo hombre (n)	95 (45,4%)	53 (63,9%)	0,005
Edad (años)	69,0 ± 8,4 (n=207)	65,7 ± 8,2 (n=83)	0,002
IMC (kg/cm ²)	28,3 ± 84,2 (n=207)	27,7 ± 3,3 (n=83)	0,249
DMO columna lumbar (g/cm ²)	0,932 ± 0,179 (n=153)	1,003 ± 0,158 (n=61)	0,007
DMO cuello femoral (g/cm ²)	0,743 ± 0,129 (n=207)	0,788 ± 0,130 (n=83)	0,008
DMO cadera total (g/cm ²)	0,858 ± 0,147 (n=207)	0,910 ± 0,149 (n=83)	0,007
Fractura vertebral según Genant (n)	36 (17,4%)	11 (13,3%)	0,362
Fractura previa (n)	53 (25,6%)	11 (13,3%)	0,032
Caídas (n)	49 (23,7%)	27 (20,5%)	0,532
Calcio (mg/dL)	9,4 ± 0,3 (n=207)	9,4 ± 0,4 (N=83)	0,547
Calcidiol (ng/mL)	11,7 ± 4,2 (n=207)	27,7 ± 7,4 (n=83)	<0,001
Calcitriol (pg/mL)	38,7 ± 14,4 (n=207)	47,8 ± 18,2 (n=83)	<0,001
PTH (pg/mL)	55,4 ± 24,5 (n=207)	45,6 ± 18,7 (n=83)	<0,001
Fosfatasa alcalina total (UI/L)	183 ± 76 (n=207)	162 ± 54 (n=83)	0,025
Creatinina (mg/dL)	1,06 ± 0,16 (n=207)	1,01 ± 0,19 (n=83)	0,051
FATR (U/L)	2,1 ± 0,7 (n=207)	2,0 ± 0,5 (n=83)	0,547

Valores de calcidiol ≥20 ng/mL (28,6% de la cohorte) se asociaron con mayor fuerza muscular de agarre en ambas manos respecto a niveles <20 ng/mL (Figura 1). Tras ajustar por la edad, el sexo, el IMC y la estacionalidad, solo en la mano izquierda se asociaron niveles de calcidiol <20 ng/mL independientemente con densos en la fuerza muscular de agarre (OR=2,35; IC 95%: 1,03-5,38). Por contra, en la mano derecha se perdió esa asociación (OR=1,91; IC 95%: 0,92-3,98).

Las actividades de la vida cotidiana en función de los niveles de calcidiol se reflejan en la tabla 2. De las 12 actividades analizadas, la incapacidad o dificultad para “inclinarse para coger un objeto del suelo” se asoció significativamente con niveles más bajos de calcidiol (p=0,009, tabla 2). Asimismo, se asoció con niveles menores de calcidiol la dificultad o la incapacidad para: “incorporarse de la cama”; “coger un libro u objeto de una estantería alta”; “inclinarse desde una silla para coger un objeto del suelo”; “quitarse las medias o calcetines” y “correr 100 metros sin parar” (Tabla 2). Solamente “inclinarse para coger un objeto del suelo” e “incorporarse de la cama” se asociaron significativamente con los niveles de calcidiol tras el ajuste multivariante por la edad, el sexo, el IMC y la estacionalidad. Así, incrementos de 10 ng/mL de calcidiol se asociaron con una disminución

del 30% y 58%, respectivamente, en la dificultad o imposibilidad para “inclinarse para coger un objeto del suelo” o para “incorporarse de la cama”.

La estratificación de los niveles de calcidiol mostró que, en el ajuste multivariante, la presencia de deficiencia de calcidiol (<10 ng/mL), no solo incrementó significativamente la incapacidad o dificultad para “incorporarse de la cama: (OR=2,14; IC 95%: 1,21-3,77)” sino también para “coger un libro u objeto de una estantería alta: (OR=2,02; IC 95%: 1,09-3,73)”, “inclinarse desde una silla para coger un objeto del suelo: (OR=1,78; IC 95%: 1,03-3,07)” y “permanecer sentado en una silla dura durante 1 hora: (OR=1,78; IC 95%: 1,03-3,07)”.

El porcentaje de cambio en DMO a nivel de columna lumbar, cuello femoral y cadera total en función de los niveles séricos de calcidiol se reflejan en la tabla 3. La presencia de niveles de calcidiol <20 ng/mL se asoció con mayores pérdidas de DMO tanto a nivel de cuello femoral como de cadera total, no habiendo diferencias significativas a nivel lumbar. Tras un análisis multivariante, los cambios en DMO a nivel de cuello femoral y de cadera total se asociaron independientemente con niveles de calcidiol <20 ng/mL (coeficiente beta tipificado=0,130, p=0,041 y coeficiente beta tipificado=0,142, p=0,033, respectivamente).

Figura 1. Medidas de fuerza de agarre (mm de Hg) en la mano A) izquierda; B) derecha en función de los niveles séricos de calcidiol. *p<0,05 respecto a calcidiol <10 ng/mL y a calcidiol entre 10-20 ng/mL

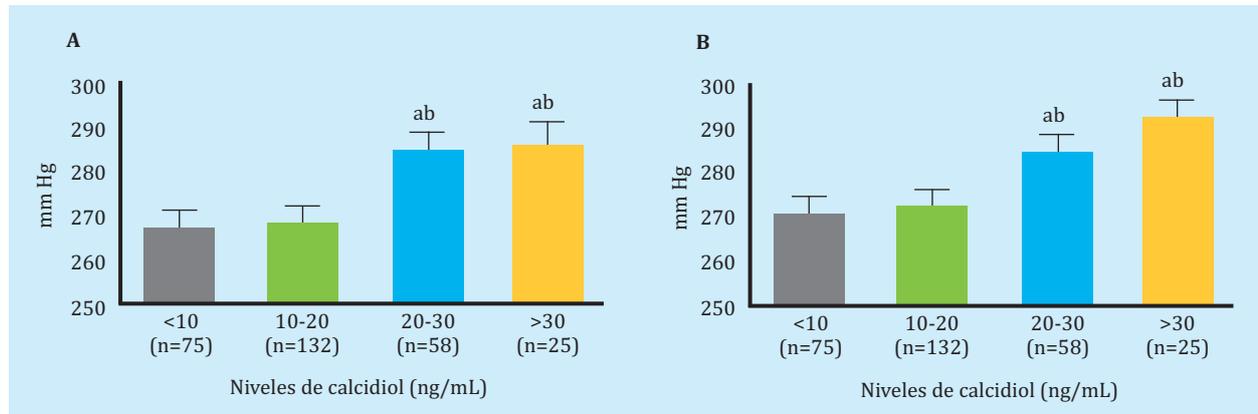


Tabla 2. Niveles de calcidiol (ng/mL) en función de la dificultad o no para realizar determinadas actividades de la vida cotidiana

	Sin dificultad	Incapaz de hacerlo o con dificultades	Valor de p
Coger un libro o un objeto de una estantería alta	16,9 ± 8,9 (n=232)	13,5 ± 8,4 (n=58)	0,009
Transportar un objeto de 10 kg durante 10 metros	16,8 ± 8,6 (n=169)	15,4 ± 9,4 (n=120)	0,186
Lavarse y secarse por sí mismo	16,3 ± 8,8 (n=257)	15,7 ± 10,4 (n=33)	0,718
Inclinarse hacia adelante para recoger un objeto del suelo	17,4 ± 9,2 (n=174)	14,6 ± 8,3 (n=116)	0,009
Lavarse el pelo en un lavabo	16,3 ± 8,8 (n=251)	15,8 ± 9,7 (n=39)	0,728
Sentarse una hora en una silla dura	16,7 ± 8,6 (n=203)	15,2 ± 9,7 (n=85)	0,179
Estar de pie en una cola durante 30 minutos	17,0 ± 9,2 (n=157)	15,4 ± 8,6 (n=133)	0,137
Incorporarse de la cama	17,4 ± 9,2 (n=214)	13,1 ± 7,2 (n=76)	0,000
Quitarse calcetines o prendas similares de los pies	17,0 ± 9,0 (n=193)	14,7 ± 8,7 (n=97)	0,040
Inclinarse desde una silla para recoger un objeto del suelo	17,4 ± 9,0 (n=183)	14,4 ± 8,4 (n=107)	0,006
Levantar una caja de 6 botellas llenas y colocarlas en una mesa	16,8 ± 8,5 (n=176)	15,5 ± 9,5 (n=114)	0,226
Correr 100 metros sin parar	17,4 ± 9,2 (n=167)	14,8 ± 8,4 (n=123)	0,015

Tabla 3. Porcentaje de cambio en DMO a nivel de columna lumbar, cuello femoral y cadera total entre los dos estudios transversales en función de los niveles séricos de calcidiol

	Calcidiol <20 ng/mL	Calcidiol ≥20 ng/mL	Valor de p
% cambio en DMO a nivel lumbar	-0,59 ± 4,14 (n=153)	0,39 ± 5,29 (n=61)	0,193
% cambio en DMO a nivel de cuello femoral	-1,49 ± 5,29 (n=160)	-0,10 ± 5,09 (n=66)	0,036
% cambio en DMO a nivel de cadera total	-0,30 ± 3,61 (n=160)	1,08 ± 4,54 (n=66)	0,017

DISCUSIÓN

En este estudio se ha observado que niveles bajos de calcidiol (<20 ng/mL) contribuyen a una menor fuerza muscular de agarre en las manos, a más dificultades para realizar determinadas actividades de la vida diaria, así como a mayores pérdidas de DMO en la cadera.

Existen evidencias tanto básicas como clínicas que apoyan la participación de la vitamina D en la función del músculo esquelético²³. En un trabajo reciente en personas con lesiones en la médula espinal que requieren rehabilitación, los niveles bajos de calcidiol fueron predictores independientes de la disminución de la función física²⁴. La menor fuerza muscular de agarre en relación con los bajos niveles de calcidiol encontrados en nuestro estudio ha sido también reportada por otros autores²⁵. Así, en un estudio longitudinal de adultos holandeses, con edades comprendidas entre 55 y 85 años, los niveles séricos de calcidiol inferiores a 10 ng/mL se asociaron con una pérdida del 40% en la fuerza muscular de agarre en comparación con los valores basales²⁶.

En nuestro estudio se ha objetivado que algunas actividades de la vida diaria se vieron comprometidas por los bajos niveles de calcidiol, siendo más marcado este efecto en presencia de deficiencia de calcidiol (<10 ng/mL). Las actividades que se vieron más afectadas fueron las que tenían más que ver con la capacidad funcional del organismo que las dependientes de una mayor fuerza muscular como “transportar un objeto de 10 kg durante 10 metros” o “levantar una caja con 6 botellas llenas y colocarlas en una mesa”. Otros estudios recientes también han asociado niveles bajos de vitamina D con la mayor dificultad para realizar actividades de la vida diaria. Así, en un estudio reciente de Arbex Borim y cols. se observó que la reducción de fuerza muscular o dinapenia combinado con bajos niveles de calcidiol fueron un factor de riesgo que condicionó el desarrollo de las actividades de la vida cotidiana en una muestra de 4.630 mayores de 50 años libres de discapacidad al inicio del estudio, seguidos durante 2 años²⁷. De forma similar, Wicherts y cols., analizando un estudio de hombres y mujeres entre 65 y 88 años, encontraron que aquellos con niveles de calcidiol por debajo de 20 ng/mL presentaban un peor estado y rendimiento físico tanto a nivel basal como a 3 años de seguimiento en comparación con aquellos con niveles superiores a 30 ng/mL¹¹. Otro estudio prospectivo holandés mostró que los niveles de vitamina D se asociaron con limitaciones funcionales en el estrato de edad entre 55 a 65 años y en mayores de 65 años²⁸. Sin embargo, hay autores que no han encontrado asociación entre niveles de calcidiol por debajo de 10 ng/mL y una menor flexión de la cadera, fuerza de extensión de la rodilla, fuerza de agarre, velocidad en la marcha o discapacidad en actividades relacionadas con movilidad de las extremidades superiores. Este último estudio se realizó en 628 mujeres mayores de 65 años seguidas durante 3 años y que presentaban una discapacidad entre moderada a severa al inicio del estudio. Es posible que la existencia de muy pocos participantes con valores bajos de calcidiol limitase la posibilidad de obtener diferencias²⁹.

Más contradictoria es la asociación entre niveles de calcidiol y DMO puesta de manifiesto en un reciente metaanálisis⁶. Existen evidencias epidemiológicas que indican que los niveles de calcidiol más elevados se asocian con una mayor DMO tanto en la población joven como la envejecida, manteniendo una relación lineal hasta niveles de 30 ng/mL, asociación que no parece tan clara y sólida en poblaciones negras o hispanas de América del Norte³⁰. Nuestros datos indican una asociación

directa entre niveles de calcidiol <20 ng/mL y DMO a nivel de cuello femoral y cadera total. Un metaanálisis de 2014 concluyó que había muy poca evidencia de que la vitamina D influyese sobre la DMO, dado que no se observó relación consistente entre la suplementación con vitamina D y la DMO en la mayoría de los sitios anatómicos analizados (columna lumbar, cadera total, trocánter, cuerpo entero o antebrazo), si bien se observó una asociación positiva en cuello femoral al igual que lo observado en nuestro estudio³¹. De igual forma, un artículo reciente muestra que pacientes con fractura de cadera presentan niveles inferiores de calcidiol, menor masa ósea, disminución de la calidad ósea y aumento en el riesgo de fractura³². Es importante resaltar que en nuestro estudio se eliminaron todos aquellos sujetos que estaban recibiendo tratamiento para la osteoporosis, incluyendo los suplementos con vitamina D, hecho que no permite valorar el posible efecto de la suplementación con vitamina D sobre la masa ósea.

Nuestro estudio tiene limitaciones, pero también fortalezas. Respecto a las primeras, el hecho de disponer de una única determinación bioquímica (tras 4 años de seguimiento) sin conocer los valores en el inicio del estudio limita las asociaciones encontradas. Por otro lado, el cuestionario sobre dificultades para realizar actividades de la vida diaria no fue autoadministrado sino administrado por un entrevistador, lo que podría haber sesgado las respuestas de los participantes, especialmente en aquellas preguntas que hacían referencia a las dificultades para el propio aseo personal. Como fortalezas, la cohorte analizada participó en el estudio EVOS-EPOS, siendo de los pocos grupos que finalizaron y completaron todas las directrices del estudio. Los porcentajes de participación de más del 80% en los cuatro seguimientos postales realizados durante 8 años avala la representatividad de la muestra analizada. Además de los artículos publicados con datos de la cohorte completa del estudio EVOS-EPOS, la cohorte del municipio de Oviedo, que ha sido utilizada para este estudio, ha contribuido de forma individual a la publicación de varios artículos originales en revistas de alto impacto³³⁻³⁹.

A modo de resumen, los niveles de calcidiol por encima de 20 ng/mL se asocian con una mayor fuerza muscular de agarre en las manos, mejor desempeño en actividades de la vida cotidiana como “inclinarse para coger un objeto del suelo” e “incorporarse de la cama” y con una mayor DMO en cadera total y cuello femoral, sugiriendo que mantener niveles de calcidiol superiores a 20 ng/mL favorecerían una adecuada función músculo-esquelética.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido también parcialmente financiado por el Estudio Europeo sobre Osteoporosis Vertebral (EVOS), Unión Europea (1991–1993); Estudio Europeo Prospectivo sobre Osteoporosis (EPOS), Unión Europea (BIOMED 93–95), BMHI-CT 092-0182 (1993–1997); Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 94/1901-E); RETIC RedInRen del ISCIII – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (RD06/0016/1013, RD12/0021/1023 y RD16/0009/0017); Plan Nacional de I+D+I 2008-2011, Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII); Plan de la Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028); Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT) y Sociedad Asturiana Fomento Investigaciones Metabólicas.



Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Bibliografía

- Cederholm T, Cruz-Jentoft AJ, Maggi S. Sarcopenia and fragility fractures. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2013;49:111-7.
- Rizzoli R, Stevenson JC, Bauer JM, van Loon LJ, Walrand S, Kanis JA, et al. The role of dietary protein and vitamin D in maintaining musculoskeletal health in postmenopausal women: A consensus statement from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Maturitas.* 2014;79:122-32.
- Morgan KT. Nutritional determinants of bone health. *J Nutr Elder.* 2008;27:3-27.
- Lips P, van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25:585-91.
- Bischoff-Ferrari HA. Relevance of vitamin D in muscle health. *Rev Endocr Metab Disord.* 2012;13:71-7.
- Bolland MJ, Grey A, Avenell A. Effects of vitamin D supplementation on musculoskeletal health: a systematic review, meta-analysis, and trial sequential analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6:847-58.
- Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92:4-8.
- Tieland M, Brouwer-Brolsma EM, Nienaber-Rousseau C, van Loon LJ, de Groot LC. Low vitamin D status is associated with reduced muscle mass and impaired physical performance in frail elderly people. *Eur J Clin Nutr.* 2013;67:1050-5.
- Bischoff HA, Stahelin HB, Urscheler N, Ehrensam R, Vonthein R, Perrig-Chiello P, et al. Muscle strength in the elderly: Its relation to vitamin D metabolites. *Arch Phys Med Rehabil.* 1999;80:54-8.
- Zamboni M, Zoico E, Tosoni P, Zivelonghi A, Bortolani A, Maggi S, et al. Relation between vitamin D, physical performance, and disability in elderly persons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2002;57:M7-11.
- Wicherts IS, van Schoor NM, Boeke AJ, Visser M, Deeg DJ, Smit J, et al. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:2058-65.
- Snijder MB, van Schoor NM, Pluijm SM, van Dam RM, Visser M, Lips P. Vitamin D status in relation to one-year risk of recurrent falling in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:2980-5.
- Stockton KA, Mengersen K, Paratz JD, Kandiah D, Bennell KL. Effect of vitamin D supplementation on muscle strength: A systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2011;22:859-71.
- Howard GA, Turner RT, Sherrard DJ, Baylink DJ. Human bone cells in culture metabolize 25-hydroxyvitamin D3 to 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and 24, 25-dihydroxyvitamin D3. *J Biol Chem.* 1981;256:7738-40.
- van Driel M, Koedam M, Buurman CJ, Hewison M, Chiba H, Uitterlinden AG, et al. Evidence for auto/paracrine actions of vitamin D in bone: 1 α hydroxylase expression and activity in human bone cells. *FASEB J.* 2006;20:2417-9.
- Atkins GJ, Anderson PH, Findlay DM, Welldon KJ, Vincent C, Zannettino AC, et al. Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: Evidence for autocrine and paracrine activities of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3. *Bone.* 2007;40:1517-28.
- van der Meijden K, Lips P, van Driel M, Heijboer AC, Schulten EA, den Heijer M, et al. Primary human osteoblasts in response to 25-Hydroxyvitamin D3, 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 and 24R, 25-Dihydroxyvitamin D3. *PLoS ONE.* 2014;9:e110283.
- Schwartz GG, Whitlatch LW, Chen TC, Lokeshwar BL, Holick MF. Human prostate cells synthesize 1, 25-dihydroxyvitaminD3 from 25-hydroxyvitaminD3. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7:391-5.
- Bacchetta J, Sea JL, Chun RF, Lisse TS, Wesseling-Perry K, Gales B, et al. Fibroblast growth factor 23 inhibits extrarenal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D in human monocytes. *J Bone Miner Res.* 2013;28:46-55.
- O'Neill TW, Cooper C, Algra D, Pols HAP, Agnusdei D, Dequeker J, et al, on behalf of the European Vertebral Osteoporosis Study Group. Design and development of a questionnaire for use in a multicentre study of vertebral osteoporosis in Europe: The European vertebral osteoporosis study (EVOS). *Rheumatol Eur.* 1995;24:75-81.
- O'Neill TW, Cooper C, Cannata JB, Diaz Lopez JB, Hoszowski K, Johnell O, et al, on behalf of the European Vertebral Osteoporosis Study (EVOS) Group. Reproducibility of a questionnaire on risk factors for osteoporosis in a multicentre prevalence survey: the European Vertebral Osteoporosis Study. *Int J Epidemiol.* 1994;23:559-65.
- Gómez Alonso C. Valores de la densidad mineral ósea (BMD) en columna lumbar y cadera de la población sana española. En: Díaz Curiel M, Díez Pérez A, Gómez Alonso C, FHOEMO-SEIOMM-RPR (eds). *Nuevas fronteras en el estudio de la densidad ósea en la población española.* Madrid: Rhone Poulenc Rorer; 1996. p. 73-94.
- Girgis CM, Clifton-Bligh RJ, Hamrick MW, Holick MF, Gunton JE. The roles of vitamin D in skeletal muscle: form, function, and metabolism. *Endocr Rev.* 2013;34:33-83.
- Barbonetti A, D'Andrea S, Martorella A, Felzani G, Francavilla S, Francavilla F. Low vitamin D levels are independent predictors of 1-year worsening in physical function in people with chronic spinal cord injury: a longitudinal study. *Spinal Cord.* 2018;56:494-501.
- Nicoletti Gumieiro D, Murino Rafacho BP, Buzati Pereira BL, Alvisi Cavallari K, Erico Tanni S, Schmidt Azevedo P, et al. Vitamin D serum levels are associated with hand-grip strength but not with muscle mass or length of hospital stay after hip fracture. *Nutrition.* 2015;31:931-4.
- Visser M, Deeg DJH, Lips P. Low vitamin D and high parathyroid hormone levels as determinants of loss of muscle strength and muscle mass (sarcopenia): The Longitudinal Aging Study Amsterdam. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:5766e5772.
- Arbex Borim FS, da Silva Alexandre T, Liberalesso Neri A, de Oliveira Máximo R, Fernandes Silva M, de Oliveira C. Combined effect of dynapenia (muscle weakness) and low vitamin D status on incident disability. *J Am Med Dir Assoc.* 2019;20:47-52.
- Sohl E, van Schoor NM, de Jongh RT, Visser M, Deeg DJH, Lips P. Vitamin D status is associated with functional limitations and functional decline in older individuals. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:E1483-90.
- Verreault R, Semba RD, Volpato S, Ferrucci L, Fried LP, Guralnik JM. Low serum vitamin D does not predict new disability or loss of muscle strength in older women. *J Am Geriatr Soc.* 2002;50: 912-7.
- Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ, Dawson-Hughes B. Positive association between 25-hydroxy vitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *Am J Med.* 2004;116:634-9.
- Reid IR, Bolland MJ, Grey A. Effects of 2014 vitamin D supplements on bone mineral density: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2014;383:146-55.
- Montoya MJ, Vázquez MA, Miranda C, Miranda MJ, Pérez-Cano R, Giner M. Influencia de la vitamina D sobre la microestructura y propiedades biomecánicas de pacientes con fractura de cadera. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2017;9:121-9.
- Gómez C, Naves ML, Barrios Y, Díaz JB, Fernández JL, Salido E, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mass, bone loss and prevalence of vertebral fracture: differences in postmenopausal women and men. *Osteoporos Int.* 1999;10:175-82.
- Naves M, Díaz-López JB, Gómez C, Rodríguez-Rebollar A, Rodríguez-García M, Cannata-Andía JB. The effect of vertebral fracture as a risk factor for osteoporotic fracture and mortality in a Spanish population. *Osteoporos Int.* 2003;14:520-4.
- Naves M, Díaz-López JB, Gómez C, Rodríguez-Rebollar A, Serrano-Arias M, Cannata-Andía JB. Prevalence of osteoporosis in men and determinants of changes in bone mass in a non-selected Spanish population. *Osteoporos Int.* 2005;16:603-9.
- Naves M, Díaz-López JB, Gómez C, Rodríguez-Rebollar A, Cannata-Andía JB. Determinants of incidence of osteoporotic fractures in the female Spanish population older than 50. *Osteoporos Int.* 2005;16:2013-7.
- Naves M, Rodríguez-García M, Díaz-López JB, Gómez-Alonso C, Cannata-Andía JB. Progression of vascular calcifications is associated with greater bone loss and increased bone fractures. *Osteoporos Int.* 2008;19:1161-6.
- Naves-Díaz M, Cabezas-Rodríguez I, Barrio-Vázquez S, Fernández E, Díaz-López JB, Cannata-Andía JB. Low calcidiol levels and risk of progression of aortic calcification. *Osteoporos Int.* 2012;23:1177-82.
- Tuñón-Le Poutel D, Cannata-Andía JB, Román-García P, Díaz-López JB, Coto E, Gómez C, et al. Association of matrix Gla protein gene functional polymorphisms with loss of bone mineral density and progression of aortic calcification. *Osteoporos Int.* 2014;25:1237-46.

Efectos de la estimulación mecánica en la comunicación entre células óseas

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2019000100003>

Cadenas Martín M, Tirado I, Martín E, Ardura JA, Bravo B, Gortazar AR

Instituto de Medicina Aplicada de la Universidad San Pablo-CEU - Madrid (España)

Departamento de Ciencias Médicas Básicas - Facultad de Medicina - Universidad San Pablo CEU - Madrid (España)

Fecha de recepción: 10/07/2018 - Fecha de aceptación: 26/11/2018

Trabajo remitido como prestación de la beca FEIOMM TRASLACIONAL 2015

Resumen

La fuerza mecánica es importante para el modelado, el remodelado y la regeneración ósea; estimula a los osteocitos provocando una alteración en la producción y secreción de moléculas de señalización que regulan la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del medio condicionado de células osteocíticas de ratón estimuladas mecánicamente sobre la capacidad proliferativa y migratoria de células mesenquimales y células óseas. Para ello, se analizó la proliferación y migración de las células preosteoblásticas de ratón, células mesenquimales preadiposas humanas y macrófagos de ratón en presencia del medio condicionado de las células osteocíticas, tras 6 y 24 horas después de ser sometidas a un estrés mecánico de 10 dinas/cm² por flujo de fluido (FF) durante 10 minutos. Se encontró que la migración de células preosteoblásticas aumentó significativamente en presencia de medios condicionados de células osteocíticas con respecto al grupo control estático (SC) (SC=12,63±5,44; FF6h=23,03±11,57; FF24h=29,72±15,76; p<0,0001). De la misma manera, las células preadiposas también incrementaron significativamente su migración en presencia de dichos medios condicionados (SC=11,48±4,75; FF6h=18,43±9,94; FF24h=18,80±10,03; p≤0,0007). Sin embargo, la migración de los macrófagos disminuyó en presencia del medio condicionado recogido a las 24 horas con respecto al grupo control estático (SC=69±22,71; FF24h=26,57±5,47; p<0,0001). Estos efectos se asociaron con la disminución de la expresión proteica de ciertas quimioquinas, como la proteína quimiotáctica de monocitos de tipo I (SC=0,25±0,06; FF24h=0,09±0,005; p=0,0262), la proteína del grupo I de alta movilidad (SC=0,25±0,04; FF24h=0,15±0,05; p=0,0159) y la proteína reguladora de la activación de linfocitos T y monocitos (SC=3,29±0,88; FF6h=1,33±1,09; FF24h=0,97±0,66; p≤0,0314), por parte de los osteocitos en presencia de estímulo mecánico con respecto al grupo control estático. En conclusión, este estudio *in vitro* demuestra que la mecanotransducción de los osteocitos potencia el reclutamiento de osteoblastos y células mesenquimales preadiposas mientras que reduce la migración de los macrófagos.

Palabras clave: osteocitos, osteoblastos, macrófagos, células mesenquimales, estimulación mecánica, quimioquinas.

INTRODUCCIÓN

Uno de los estímulos más importantes que recibe el hueso para regular la masa ósea, la forma y la microarquitectura es la fuerza mecánica. El endoesqueleto reacciona ante un aumento de carga formando más hueso o disminuyendo su masa ante la falta de tensión mecánica¹. Esto es debido a que la estimulación desencadena el proceso de mecanotransducción en el cual los osteocitos, que se consideran las células clave mecanosensoras del hueso, cuando son estimulados, envían señales químicas que afectan a la regulación paracrina del comportamiento de los osteoblastos y los osteoclastos^{2,3}. También se ha observado que conlleva un efecto antiapoptótico de los osteocitos⁴.

Con la carga mecánica, la expresión de esclerostina, que es un inhibidor de la vía de señalización proteica Wnt/ β -catenina secretado de manera constitutiva por los osteocitos, disminuye provocando un incremento de la osteoblastogénesis^{5,6}. Por otra parte, los osteocitos apoptóticos inducen la secreción del ligando del recep-

tor activador del factor nuclear κ B (RANKL, del inglés *Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*), estimulando indirectamente la osteoclastogénesis⁷.

Además, algunas quimioquinas, una familia de citoquinas quimiotácticas, podrían estar involucradas en la remodelación ósea al ser expresadas por células óseas y proporcionar señales clave para reclutar diferentes subpoblaciones celulares⁸.

Hay estudios recientes que indican que la proteína del grupo 1 de alta movilidad (HMGB1, del inglés *High Mobility Group Box 1*), la proteína reguladora de la activación de linfocitos T y monocitos (RANTES o CCL5, del inglés *Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted/Chemokine (C-C motif) Ligand 5*, respectivamente) y la proteína quimiotáctica de monocitos de tipo 1 (MCP1 o CCL2, del inglés *Monocyte Chemoattractant Protein 1/Chemokine (C-C motif) Ligand 2*, respectivamente) intervienen en el reclutamiento de células madre mesenquimales para promover la reparación del tejido^{9,10}.



Correspondencia: Arancha R. Gortázar (argortazar@ceu.es)

En base a estas evidencias, los objetivos del presente trabajo se centran en recrear un modelo de carga *in vitro* para generar mecanotransducción en un entorno de cultivo controlado¹¹ y poder estudiar el efecto del medio condicionado secretado por los osteocitos tras ser estimulados mecánicamente en la promoción de la capacidad proliferativa y migratoria de células mesenquimales y células óseas; así como la posible expresión proteica de ciertos factores quimiotácticos implicados en procesos de proliferación y migración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares. Para los ensayos del presente trabajo se utilizaron diferentes tipos celulares:

- Células mesenquimales preadiposas (*adipose stromal cells*, ASC) obtenidas por cultivo primario de lipoaspirados humanos realizados en el Hospital HM Montepíncipe (HM Hospitales), según se describió en los trabajos de Zuk y cols. en 2001¹². Todos los donantes dieron su consentimiento informado, de acuerdo con el protocolo clínico apropiado. Los pacientes fueron operados en el Departamento de Cirugía Plástica de HM Hospitales (Madrid, España), y la recogida de muestra de tejido fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional/Comité Ético de Investigación Clínica de HM Hospitales (Madrid, España). Estas células se cultivaron con DMEM (*dulbecco modified Eagles minimal essential medium*) + GlutaMAX (Gibco, Life Technologies, Alcobendas, España) con 10% de suero fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS) y 1% de penicilina-estreptomina (Invitrogen) a 37°C con 5% de CO₂.

- Línea continua de osteocitos MLO-Y4 de huesos largos murinos extraídos según se describe en Kato y cols. en 1997, por cortesía de L. Bonewald¹³, que fue cultivada en placa de 100 mm de diámetro (Jet Biofil, Guangzhou, China) previamente colagenizada con Colágeno I (Sigma-Aldrich) con α -MEM (*Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification*) al 2,5% de suero de ternero (*calf serum*, CS) (Sigma-Aldrich), 2,5% de FBS y 1% de penicilina-estreptomina a 37°C con 5% de CO₂.

- Línea continua de preosteoblastos de ratón de hueso de la bóveda del cráneo, MC3T3-E1 subclone 4 (ATCC CRL-2593).

- Línea continua de macrófagos de ratón capaces de diferenciarse a osteoclastos, RAW 264.7 (ATCC TIB-71), que fueron cultivadas con α -MEM con 10% de FBS, 1% de penicilina-estreptomina y 2 mM de L-glutamina a 37°C con 5% de CO₂.

Ensayos de estimulación mecánica por paso de fluido

(Fluid Flow, FF). Es una técnica para generar estímulo mecánico, fisiológicamente relevante, en las células óseas *in vitro*¹¹. Para ello, se sembraron 250.000 células MLO-Y4 en portaobjetos de cristal delimitados con teflón dejando un espacio de 15 cm² previamente colagenizado y se incubaron al menos 48 horas a 37°C con 5% de CO₂ hasta que llegaron a la confluencia. Posteriormente, las células fueron sometidas a estímulo mecánico o no (control estático o SC) con el dispositivo Flexcell Streamer de tensión de corte medio que produce un estrés de 10 dinas/cm² durante 10 minutos (Flexcell Internacional Corporation, Hillsborough, Carolina del Norte, EE.UU.). A continuación, las células se incubaron con α -MEM Medium sin rojo fenol (Gibco) con 0,5% de CS, 0,5% de FBS y 1% de penicilina-estreptomina para obtener medios condicionados (CM) de

los diferentes grupos experimentales: CM de células estimuladas (FF) recogido a las 6 horas después del estímulo, CM de células SC recogido a las 24 horas después del estímulo y CM de células FF recogido a las 24 horas tras el estímulo.

Ensayo de proliferación. Para realizar el ensayo de proliferación, tanto las células preosteoblásticas de ratón como las células preadiposas humanas fueron sembradas a una concentración de 6.000 células/pocillo en placas de cultivo de 12 pocillos (Jet Biofil), una placa por condición con cada una de las líneas celulares, e incubadas a 37°C con 5% de CO₂. Al día siguiente se cambió el medio por 20% de medio condicionado y 80% de su medio de cultivo ajustando el FBS al 10%. Pasadas 24 horas de incubación a 37°C con 5% de CO₂, se levantaron las células con Tripsina-EDTA y se hizo un recuento celular con Trypan Blue 0,4% en PBS (GE Healthcare, Hyclone, Logan, Utah, EE.UU.) en la cámara de Neubauer. Se repitió el proceso a las 48 y 72 horas, obteniéndose así una valoración de proliferación con cada uno de los medios condicionados durante 3 días y por triplicado.

Ensayo de migración en Transwell. Se sembraron en 4 placas de cultivo de 6 pocillos Transwell (Corning, Costar, Life Sciences, Nueva York, EE.UU.) 75.000 células/pocillo con su medio de cultivo sobre la membrana, y abajo se puso 20% de medio condicionado y 80% de su medio de cultivo al 1% de FBS. Pasadas 24 horas de incubación a 37°C con 5% de CO₂, se retiraron ambos medios y la capa celular superior de la membrana con la ayuda de un hisopo de algodón. Las células que quedaron en la parte inferior de la membrana se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS (Alfa Aesar, Thermo Fisher) durante 10 minutos y se tiñeron con 0,1% de cristal violeta en agua destilada (MERCK, Kenilworth, Nueva Jersey, EE.UU.) durante 15 minutos. Finalmente, las membranas se montaron en portaobjetos y se observaron en el microscopio de contraste de fase (Leica Microsystems DM5500 CTR6000) de donde se obtuvieron 20 imágenes a 50 μ m por pocillo para analizar el número de células que habían migrado en función del medio condicionado utilizado.

Western Blot. Las células se prepararon para extraer la proteína total con *buffer* RIPA (Sigma-Aldrich) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Calbiochem). Por otro lado, el medio condicionado se liofilizó y el *pellet* se resuspendió en agua MilliQ. Para cuantificar la cantidad de proteína que había en cada una de las muestras, tanto del medio condicionado liofilizado como del lisado celular, se utilizó el Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific) con una plantilla Comassie. Una vez cuantificadas, se separaron en geles de 15% de acrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. A continuación, se bloqueó la membrana con albúmina de suero bovino (en inglés BSA) al 5% disuelta en TBS con Tween 20 (Sigma-Aldrich) durante una hora a temperatura ambiente y se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos policlonales de conejo: anti-HMGB1, anti-MCP1 y anti-RANTES (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Como control, se usó el anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -tubulina. Después se incubó durante una hora a temperatura ambiente con la correspondiente IgG acoplada a peroxidasa y se reveló la membrana en el transiluminador (Syngene DYV 6-E) con el sistema ECL (Electro-químico-luminiscencia, GE-Amersham, Pittsburgh, EE.UU.). Las intensidades de las bandas fueron cuantificadas por densitometría.

Análisis estadístico. En el análisis estadístico de los resultados, los datos se expresan como media \pm desviación estándar de al menos dos experimentos llevados a cabo por triplicado. Se realizó utilizando el programa GraphPad Prism V 7.0 (*software* GraphPad, La Jolla, California, EE.UU.), mediante un estudio no paramétrico usando t-test de dos colas o test de U-Mann-Whitney para las comparaciones dos a dos, y el test de Kuskal-Wallis para comparaciones de grupos. Se detectaron y se excluyeron los *outliers* mediante el programa GraphPad QuickCalcs ©2018 que utiliza el test de Grubb, y se consideraron como resultados significativos los valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Efecto de los medios condicionados de los osteocitos estimulados mecánicamente en la proliferación de preosteoblastos y células mesenquimales preadiposas

Se realizó un estudio de proliferación de células preosteoblásticas de ratón MC3T3-E1 y de células mesenquimales preadiposas con 20% de medios condicionados de células osteocíticas de ratón MLO-Y4 en presencia (FF 6 horas y FF 24 horas) y ausencia (SC o control estático) de estímulo mecánico por paso de fluido.

Tal y como se representa en la figura 1A, no hay diferencias significativas en la proliferación de la línea celular MC3T3-E1 tras 24 horas ni tras 72 horas en presencia de medios condicionados de 6 y 24 horas. En el caso de las células mesenquimales preadiposas, los resultados tampoco mostraron diferencias significativas tras 24 horas ni tras 72 horas en presencia de los medios condicionados anteriormente mencionados (Figura 1B).

Efecto de los medios condicionados de los osteocitos estimulados mecánicamente en la migración de preosteoblastos, células mesenquimales preadiposas y macrófagos

El estudio de migración de células preosteoblásticas MC3T3-E1, células mesenquimales preadiposas y macrófagos RAW 264.7 se realizó con medio de cultivo específico de cada estirpe celular (control) y los medios condicionados de células osteocíticas MLO-Y4 en presencia (FF 6 horas y FF 24 horas) y ausencia (SC) de estimulación mecánica.

Las células preosteoblásticas duplicaron y triplicaron su migración en presencia de los medios condicionados de los osteocitos recogidos tras 6 y 24 horas de ser sometidos a estímulos por paso de fluido, respectivamente (Figura 2).

De la misma manera, las células mesenquimales preadiposas también duplicaron su migración en presencia de dichos medios (Figura 3).

En el caso de la línea de macrófagos de ratón RAW 264.7, nuestros resultados señalan una disminución de tres veces su migración en presencia de medios condicionados recogidos tras 24 horas de realizarles el *Fluid Flow* (Figura 4).

Análisis de la expresión y secreción de quimioquinas tras estimular mecánicamente los osteocitos

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos anteriormente, se llevó a cabo el análisis de la expresión de proteínas quimioatrayentes mediante la técnica de *Western Blot*. Para ello se obtuvieron por un lado los lisados de células osteocíticas MLO-Y4 en presencia y ausencia de estimulación mecánica por paso de fluido y, por otro, el liofilizado de sus respectivos medios condicionados, tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos.

Se estudiaron tres posibles proteínas implicadas en la migración de las células mesenquimales tras un estímulo mecánico, dos de ellas pertenecientes a la familia de las quimioquinas con patrón C-C: MCP1 y RANTES, y la proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1). Para normalizar las muestras de lisado celular se utilizó la tubulina.

Como se observa en la figura 5, en los lisados celulares de MLO-Y4 estimuladas mecánicamente se produjo una disminución de dos veces en la expresión de la proteína quimiotáctica MCP1 (Figuras 5A-5B). En las muestras de medios condicionados liofilizados se observó que la secreción de MCP1 también disminuyó en las condiciones de estímulo mecánico, en este caso disminuyó tres veces (Figuras 5C-5D).

En los lisados celulares de MLO-Y4 estimuladas mecánicamente se observó una disminución de dos veces en la expresión de la proteína quimiotáctica HMGB1 en la condición de FF a 24 horas (Figuras 5E-5F).

De forma similar, en los lisados celulares de MLO-Y4 estimuladas mecánicamente se observó una disminución de tres veces en la expresión de la proteína quimiotáctica RANTES en las condiciones de FF a 6 y 24 horas (Figuras 5G-5H).

Figura 1. Proliferación celular de MC3T3-E1 (A) y ASC (B) (células mesenquimales de origen adiposo) en presencia y ausencia de medios condicionados de 6 y 24 horas tras estímulo mecánico. Los valores son la media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. Resultados presentados como número de células vs. control

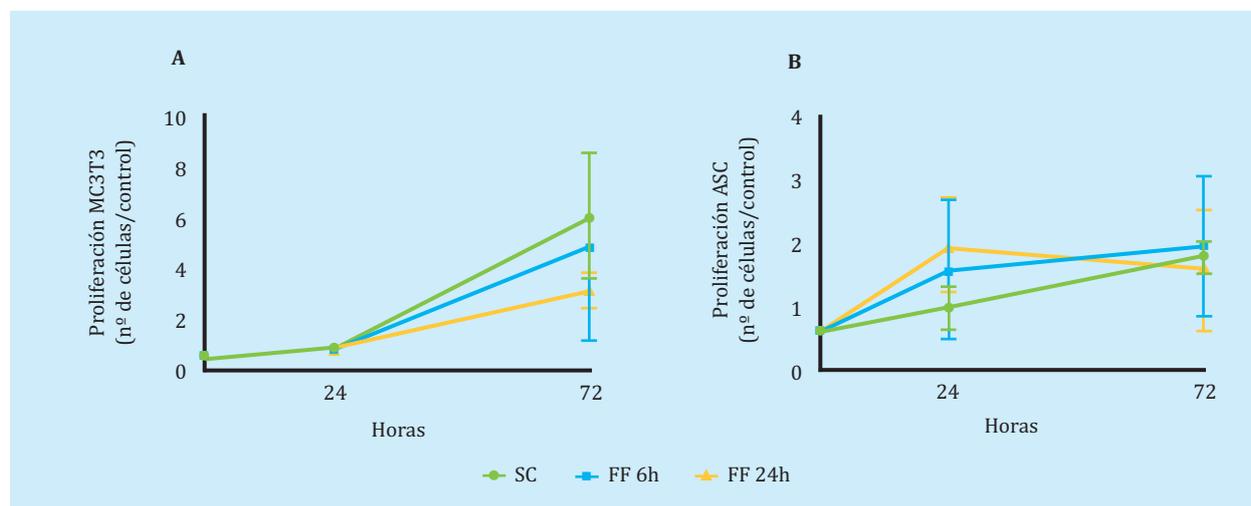


Figura 2. Migración de células MC3T3-E1. Imágenes representativas correspondientes a la migración de MC3T3-E1 en cada una de las condiciones de estudio (A-C). Número de células por campo de la migración de MC3T3 en ausencia y presencia de los medios condicionados de estudio (D). Los valores son la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes por triplicado. **p<0,001 vs. control estático****

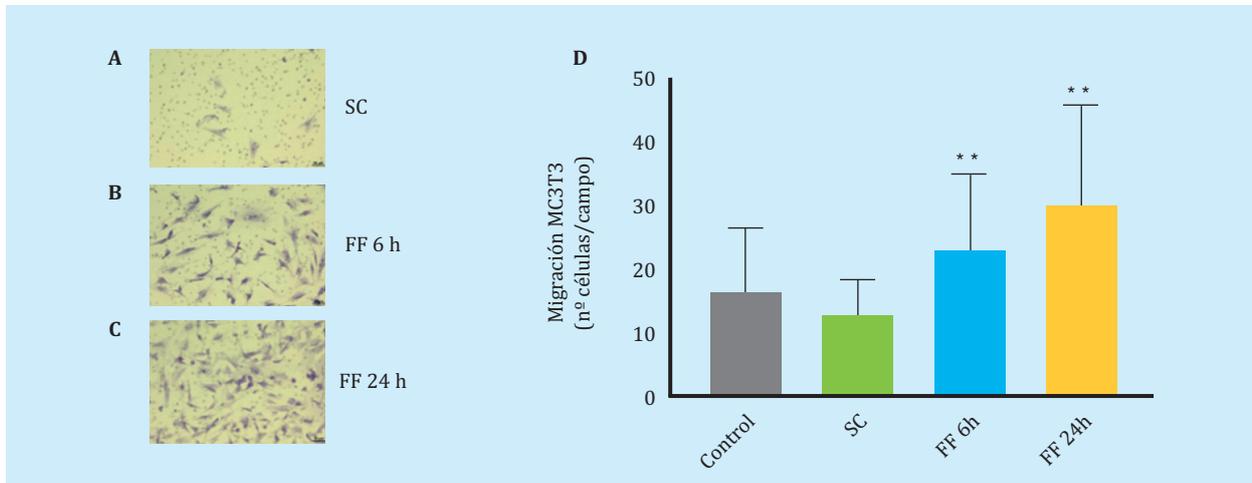


Figura 3. Migración de células ASC (células mesenquimales de origen adiposo). Imágenes representativas correspondientes a la migración de ASC en cada una de las condiciones de estudio (A-C). Número de células por campo de la migración de ASC en ausencia y presencia de los medios condicionados de estudio (D). Los valores son la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes por triplicado. **p<0,001 vs. control estático****

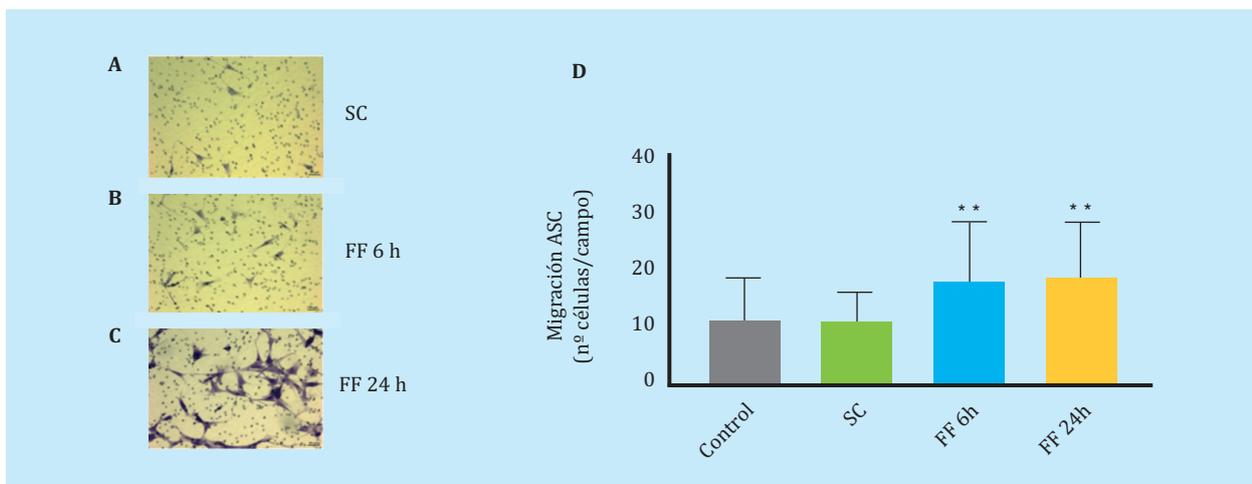


Figura 4. Migración de células RAW 264.7. Imágenes representativas correspondientes a la migración de RAW 264.7 en cada una de las condiciones de estudio (A-C). Número de células por campo de la migración de RAW 264.7 en ausencia y presencia de los medios condicionados de estudio (D). Los valores son la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes por triplicado. **p<0,001 vs. control estático****

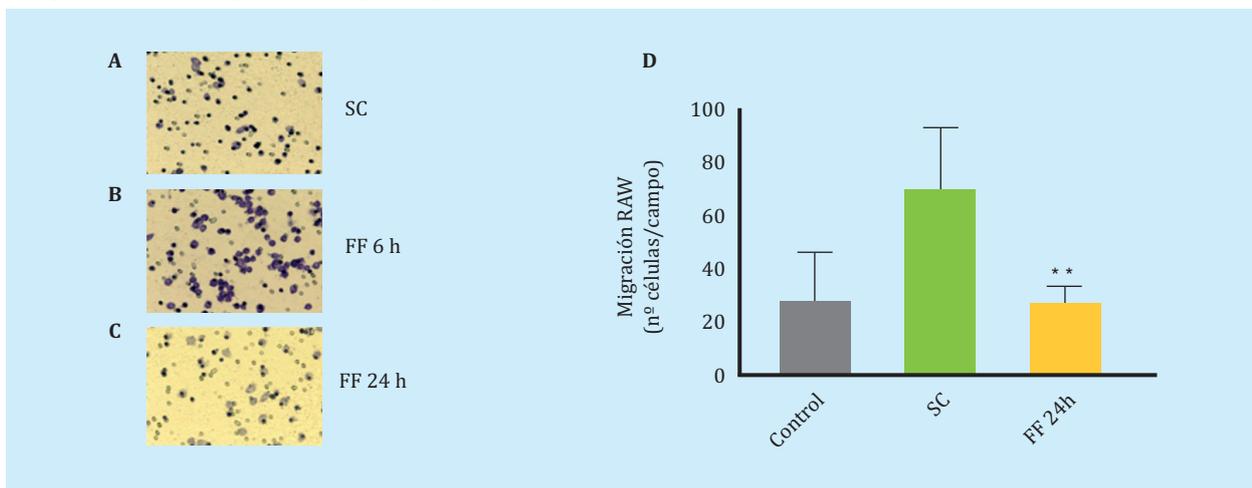
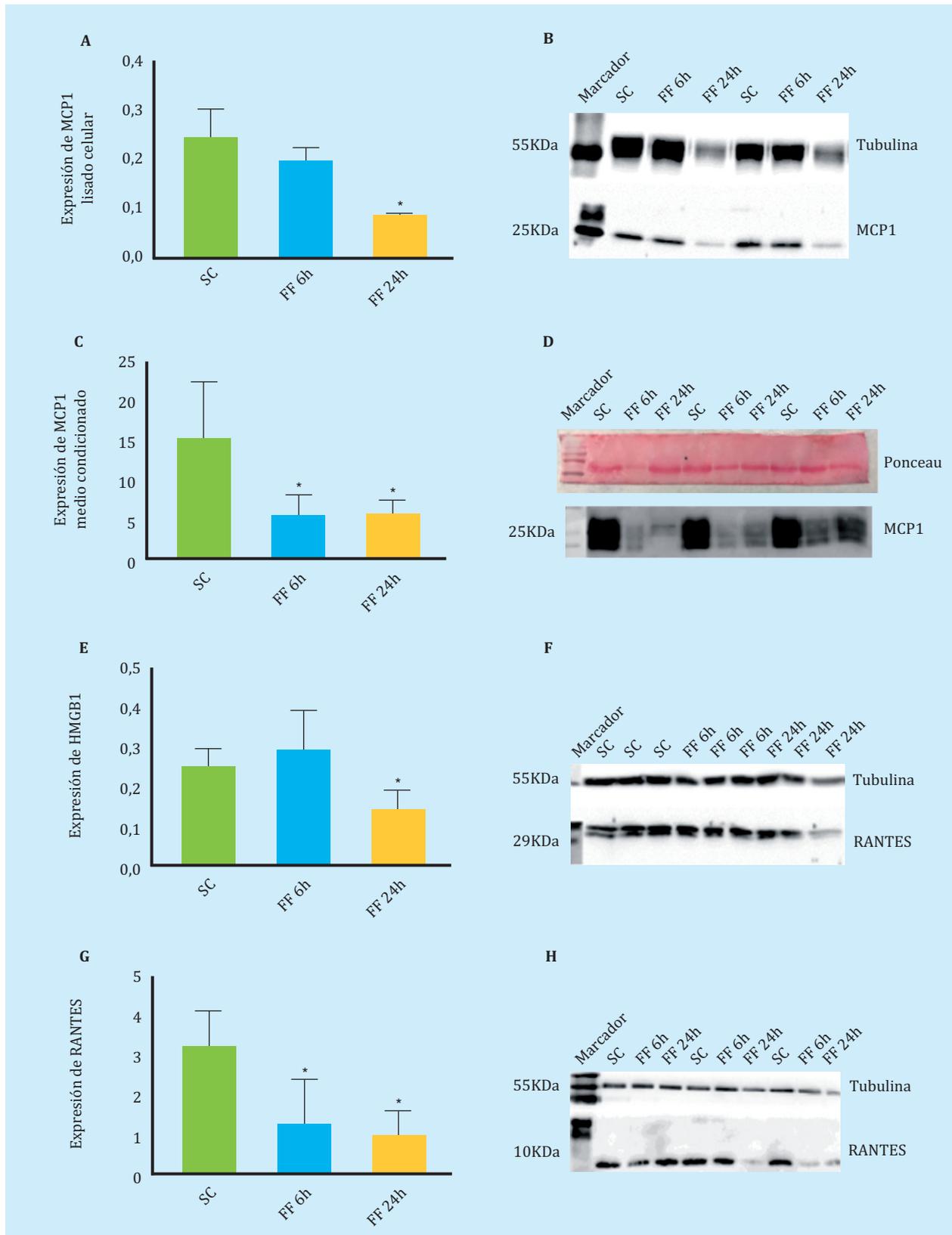


Figura 5. Secreción y expresión de proteínas quimiotácticas medidas por *Western Blot* (A-C). Expresión de la proteína MCP1 en lisado celular de MLO-Y4 en ausencia de estímulo mecánico (SC) y tras 6 y 24 horas de realizar FF durante 10 minutos (FF6h y FF24h) (C-D). Secreción de la proteína MCP1 en medios condicionados de MLO-Y4 en ausencia y presencia de estímulo mecánico (E-F). Expresión de HMGB1 en lisado celular de MLO-Y4 en ausencia y presencia de estímulo mecánico (G-H). Expresión de RANTES en lisado celular de MLO-Y4 en ausencia y presencia de estímulo mecánico. Los valores densitométricos relativos son la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes por triplicado. * $p < 0,05$ vs. control estático



DISCUSIÓN

El envejecimiento, la pérdida de esteroides sexuales, el exceso de glucocorticoides y ciertas enfermedades óseas como la osteoporosis, provocan un desacoplamiento en el remodelado óseo y una pérdida de la calidad de la masa ósea por la acumulación de osteocitos apoptóticos que preceden el reclutamiento de precursores osteoclásticos y su diferenciación para llevar a cabo el proceso de resorción ósea dirigida^{14,15}.

Sin embargo, niveles fisiológicos de estimulación mecánica como el ejercicio físico mantiene la viabilidad de los osteocitos y, además, como se demuestra en este trabajo, actúa sobre su comportamiento modificando la producción de ciertas quimioquinas y regulando la migración de diferentes tipos celulares.

En nuestros resultados encontramos que la exposición de las células preosteoblásticas MC3T3-E1 y de las células mesenquimales preadiposas humanas a medios condicionados de células osteocíticas MLO-Y4 de ratón estimuladas mecánicamente no afecta a su proliferación, pero si aumenta su capacidad migratoria. Estudios anteriores ya evidenciaron que el medio condicionado de los osteocitos estimulados mecánicamente es capaz de reclutar osteoprogenitores (células mesenquimales y osteoblastos) y promover el compromiso del linaje osteogénico de estas células para reponer los osteoblastos agotados, mejorar la formación ósea y fortalecer el tejido^{16,17}.

Por otra parte, nuestros resultados señalan una disminución de la migración de los macrófagos RAW 264.7 en presencia de medios condicionados de células MLO-Y4 recogidos tras 24 horas de realizarles el *Fluid Flow*. Lo que corrobora lo observado por otros autores que in-

dican que dicho medio condicionado también es capaz de inhibir la osteoclastogénesis¹⁸.

Todo esto sugiere un mecanismo de retroalimentación negativa mediado por factores paracrinos que regularían el proceso de formación y resorción del hueso. Por ello, comprobamos si ciertas quimioquinas seleccionadas intervinieron en este proceso a través de ensayos de *Western Blot* tanto de las células osteocíticas estimuladas mecánicamente como de los medios condicionados. Según nuestros resultados, aunque se observa una disminución significativa de la proteína quimiotáctica de monocitos de tipo 1 (MCP-1), de la proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1) y de la proteína quimiotáctica RANTES en los lisados celulares de MLO-Y4 estimuladas mecánicamente, no parecen estar directamente asociadas con la migración de las células formadoras y repobladoras del hueso.

No obstante, a diferencia de lo que ocurre en nuestro trabajo, hay estudios previos que señalan que la HMGB1 es liberada en el entorno extracelular mediante la secreción activa de células estimuladas¹⁹ y promueve la migración y diferenciación osteogénica de las MSC^{9,20}. En el caso de la MCP-1, se ha observado que las células madre mesenquimales de la médula ósea migran en respuesta a esta quimioquina²¹. Y hay hallazgos que indican que la RANTES es capaz de provocar la migración de diferentes tipos celulares, entre ellos las células madre mesenquimales de médula ósea, mediante la inducción de autofagia²²⁻²⁴.

Para futuras investigaciones, sería necesario realizar un estudio proteómico de los medios condicionados de los osteocitos tanto sin estímulo como con estímulo mecánico para profundizar en los procesos de comunicación de los osteocitos con su entorno.



Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Bibliografía

- Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res.* 2006;21(4):605-15.
- Hoey DA, Kelly DJ, Jacobs CR. A role for the primary cilium in paracrine signaling between mechanically stimulated osteocytes and mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;412(1):182-7.
- Klein-Nulend J, Bakker AD, Bacabac RG, Vatsa A, Weinbaum S. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone.* 2013;54(2):182-90.
- de Castro LF, Maycas M, Bravo B, Esbrit P, Gortazar A. VEGF Receptor 2 (VEGFR2) Activation Is Essential for Osteocyte Survival Induced by Mechanotransduction. *J Cell Physiol.* 2015;230(2):278-85.
- Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, et al. Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem.* 2006;281(42):31720-8.
- Yavropoulou MP, Yovos JG. The molecular basis of bone mechanotransduction. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2016;16(3):221-36.
- Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int.* 2014;94(1):25-34.
- Gortazar AR, Martin-Millan M, Bravo B, Plotkin LI, Bellido T. Crosstalk between caveolin-1/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and β -catenin survival pathways in osteocyte mechanotransduction. *J Biol Chem.* 2013;288(12):8168-75.
- Feng L, Xue D, Chen E, Zhang W, Gao X, Yu J, et al. HMGB1 promotes the secretion of multiple cytokines and potentiates the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the Ras/MAPK signaling pathway. *Exp Ther Med.* 2016;12(6):3941-7.
- Zhao H, Chen D, Cao R, Wang S, Yu D, Liu Y, et al. Alcohol consumption promotes colorectal carcinoma metastasis via a CCL5-induced and AMPK-pathway-mediated activation of autophagy. *Sci Rep.* 2018;8(1):8640.
- Michael Delaine-Smith R, Javaheri B, Helen Edwards J, Vazquez M, Rumney RM. Preclinical models for in vitro mechanical loading of bone-derived cells. *Bonekey Rep.* 2015;19;4:728.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-28.
- Kato Y, Windle JJ, Koop BA, Mundy GR, Bonewald LF. Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Res.* 1997;12(12):2014-23.
- Lee K, Kim H, Kim JM, Kim JR, Kim KJ, Kim YJ, et al. Systemic transplantation of human adipose-derived stem cells stimulates bone repair by promoting osteoblast and osteoclast function. *J Cell Mol Med.* 2011;15(10):2082-94.
- Kogianni G, Mann V, Noble BS. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *J Bone Miner Res.* 2008;23(6):915-27.
- Brady RT, O'Brien FJ, Hoey DA. Mechanically stimulated bone cells secrete paracrine factors that regulate osteoprogenitor recruitment, proliferation, and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;459(1):118-23.
- Turner CH, Owan I, Alvey T, Hulman J, Hock JM. Recruitment and proliferative responses of osteoblasts after mechanical loading in vivo determined using sustained-release bromodeoxyuridine. *Bone.* 1998;22(5):463-9.
- Suzuki N, Yoshimura Y, Deyama Y, Suzuki K, Kitagawa Y. Mechanical stress directly suppresses osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med.* 2008;21(3):291-6.
- Naglova H, Bucova M. HMGB1 and its physiological and pathological roles. *Bratisl Lek Listy.* 2012;113(3):163-71.
- Xue D, Zhang W, Chen E, Gao X, Liu L, Ye C, et al. Local delivery of HMGB1 in gelatin sponge scaffolds combined with mesenchymal stem cell sheets to accelerate fracture healing. *Oncotarget.* 2017;8(26):42098-115.
- Ryan CM, Brown JA, Bourke E, Prendergast AM, Kavanagh C, Liu Z, et al. ROCK activity and the G β y complex mediate chemotactic migration of mouse bone marrow-derived stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:136.
- Lechner J, von Baehr V. Chemokine RANTES/CCL5 as an unknown link between wound healing in the jawbone and systemic disease: is prediction and tailored treatments in the horizon? *EPMA J.* 2015;6(1):10.
- Lu L, Zhang X, Zhang M, Zhang H, Liao L, Yang T, et al. RANTES and SDF-1 Are Keys in Cell-based Therapy of TMJ Osteoarthritis. *J Dent Res.* 2015;94(11):1601-9.
- Wright LM, Maloney W, Yu X, Kindle L, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone.* 2005;36(5):840-53.

El papel de la determinación de un marcador de resorción, el telopéptido carboxiterminal del colágeno I, en la valoración del cumplimiento terapéutico en pacientes tratadas con bifosfonatos orales

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2019000100004>

Martínez-Laguna D^{1,2,3}, Nogués X^{3,4}, Carbonell-Abella C^{1,2,3}, Soria Castro A^{1,2}, Orozco López P¹, Poza Martínez R¹, Díez-Pérez A^{3,4}, Prieto-Alhambra D^{2,3,5}

1 Atención Primaria Barcelona Ciudad - Instituto Catalán de Salud - Barcelona (España)

2 Grupo de Investigación en Enfermedades Prevalentes del Aparato Locomotor (GREMPAL) - Instituto de Investigación en Atención Primaria (IDIAP) Jordi Gol - Universidad Autónoma de Barcelona - Barcelona (España)

3 Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES) - Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Barcelona (España)

4 Departamento de Medicina Interna - Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM) - Universidad Autónoma de Barcelona - Barcelona (España)

5 Departamento de Ortopedia, Reumatología y Ciencias Músculoesqueléticas Nuffield - Instituto Nacional para la Investigación de la Salud (NIHR) - Unidad de Investigación Biomédica Musculoesquelética - Universidad de Oxford - Oxford (Reino Unido)

Fecha de recepción: 15/09/2018 - Fecha de aceptación: 28/10/2018

Trabajo remitido como prestación de una beca para asistir al 34º Congreso de la ASBMR (Minneapolis 2012)

Resumen

Objetivo: Se estima que al año entre el 50-60% de los pacientes tratados con fármacos para la osteoporosis son incumplidores. Disponemos de diferentes métodos indirectos de valoración del cumplimiento. Nuestro objetivo es testar una única determinación del telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I (CTX) para valorar el cumplimiento en pacientes tratadas con bifosfonatos, de forma aislada o junto al cuestionario de Morinsky-Green.

Material y método: Estudio de validación diagnóstica realizado en 10 centros de Cataluña. Mediante muestreo consecutivo se seleccionaron mujeres postmenopáusicas con osteoporosis y tratadas con un mismo fármaco antirresortivo en el último año; se excluyeron aquellas tratadas con un fármaco diferente a bifosfonato, con deterioro cognitivo, enfermedad terminal, o insuficiencia renal avanzada, o fractura en el año previo. Se recogieron datos sobre el diagnóstico de osteoporosis y tipo de tratamiento. Se solicitó analítica con determinación del CTX. Como *gold-standard* se utilizó la tasa de posesión de medicación (*Medication Possession Ratio*, MPR). Mediante metodología de la curva ROC se estableció el punto de corte teórico del CTX. Se calculó la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivos para estimar el cumplimiento terapéutico.

Resultados: Se incluyeron 100 pacientes, de las cuales más de la mitad recibían alendronato. Según la MPR, un 70% eran cumplidoras. El valor medio del CTX fue de $0,193 \pm 0,146$ ng/ml, siendo inferior en las pacientes cumplidoras. Se estableció como punto de corte para valorar el cumplimiento un valor de 0,196 ng/ml. La valoración conjunta del CTX junto al cuestionario de Morinsky-Green presentó mayor capacidad discriminativa.

Conclusiones: La realización de una única determinación del CTX ($<0,196$ ng/ml) junto al cuestionario de Morinsky-Green permite valorar mejor el cumplimiento terapéutico en pacientes tratadas con bifosfonatos.

Palabras clave: osteoporosis, bifosfonatos, cumplimiento terapéutico, marcadores de remodelado óseo.



INTRODUCCIÓN

La osteoporosis es una enfermedad metabólica que se caracteriza por una baja masa ósea y un deterioro de la microestructura del tejido óseo que conducen a un aumento de la fragilidad del hueso, siendo su principal complicación la aparición de fracturas por fragilidad¹. Las fracturas osteoporóticas representan un importante problema de salud² y se asocian a un elevado gasto sanitario³. Para prevenir la aparición de fracturas se dispone de diferentes fármacos que actúan sobre el metabolismo óseo y se asocian a una reducción del riesgo de fracturas⁴. Los más utilizados en nuestro país son los bifosfonatos⁵. Pero, para observar este efecto protector, es necesario que exista un adecuado cumplimiento terapéutico⁶. En la osteoporosis, como en toda enfermedad crónica, el cumplimiento es bajo. En un reciente estudio realizado en nuestro medio la persistencia global al año de haber iniciado un fármaco para la osteoporosis es del 47%, y a los dos años, cercano al 27%⁷.

Por tanto, es necesario realizar una correcta valoración del cumplimiento terapéutico en nuestras consultas para asegurar un adecuado efecto en la reducción del riesgo de fractura. Clásicamente se han utilizado cuestionarios autoadministrados para valorar el cumplimiento terapéutico, como los cuestionarios de Morinsky-Green y de Haynes-Sackett, si bien este último tiende a sobrestimar el cumplimiento⁸. En los últimos años, gracias a la informatización de los sistemas sanitarios, es posible en determinados casos tener acceso a los datos de dispensación de fármacos, por lo que es posible calcular la tasa de posesión de medicación (*Medication Possession Ratio*, MPR), sistema utilizado en multitud de estudios fármaco-epidemiológicos⁹⁻¹², pero no siempre disponible en las consultas del día a día.

Otra posibilidad para valorar el cumplimiento sería la utilización de los marcadores de remodelado óseo, si bien existe poca evidencia al respecto y requiere de diferentes determinaciones¹³. Se recomienda la determinación del telopeptido carboxiterminal del colágeno tipo I (CTX) como marcador de resorción y del propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I (P1NP) como marcador de formación¹⁴.

Nuestro objetivo es comprobar la utilidad de una única determinación del CTX para valorar el cumplimiento en pacientes tratadas con bifosfonatos (los fármacos más prescritos) durante como mínimo un año, de forma aislada o junto a un cuestionario clásico de cumplimiento terapéutico, el de Morinsky-Green.

MATERIAL Y MÉTODO

Diseño del estudio

Estudio de validación diagnóstica realizado en 9 centros urbanos de Atención Primaria del Instituto Catalán de Salud en Barcelona y el Hospital del Mar, realizado entre enero y diciembre de 2012. Aceptando un 95% de confianza y asumiendo un 55% de incumplidores una muestra de 93 pacientes detectaría una sensibilidad del 80% con una precisión del 10%.

Participantes

Mediante muestreo consecutivo se seleccionaron todas las pacientes con osteoporosis postmenopáusica y en tratamiento con un fármaco para la osteoporosis como mínimo durante el último año hasta completar un total de 115 pacientes, para cubrir posibles pérdidas. Se excluyeron aquellas pacientes en tratamiento con un fármaco antirresortivo diferente a un bifosfonato oral, con

deterioro cognitivo, enfermedad terminal, o insuficiencia renal crónica avanzada (filtrado glomerular <35 ml/min), o que hubieran presentado una fractura en el año previo a la inclusión.

Variables de estudio

Se recogió información sobre la edad, el diagnóstico de osteoporosis, el estudio con densitometría ósea y la presencia de fracturas previas; respecto al tratamiento para la osteoporosis, se recogió el tipo de fármaco, la posología y las condiciones de toma, así como el uso de suplementos de calcio y/o vitamina D. Para valorar el cumplimiento terapéutico se utilizó como *gold-standard* el cálculo de la MPR a través de los datos de dispensación de Farmacia en el año previo a la inclusión. Para su cálculo se utilizó la siguiente fórmula:

$$MPR = (\text{número de recetas recogidas en los últimos 12 meses} \times \text{días que cubre cada receta}) / 365.$$

De acuerdo con los estudios fármaco-epidemiológicos disponibles, se considera que una MPR $\geq 0,8$ es un indicador de cumplimiento terapéutico¹⁵. También se realizó el cuestionario autoadministrado de cumplimiento terapéutico de Morinsky-Green.

Se solicitó determinación plasmática del CTX, medido mediante método ELISA. Es un inmunoensayo por electroquimioluminiscencia (ECLIA) de Roche que utiliza dos anticuerpos monoclonales, que se analizan en el autoanalyzer MODULAR ANALYTICS E170 (Roche). El valor de coeficiente de variación intraserie es de 2,5% y el interserie de 4,1%. Los valores de referencia de la prueba son: 0,01-1,008 ng/mL. La determinación se realizó dentro del periodo de un mes antes de la visita del facultativo.

Análisis estadístico

Las características de la población estudiada se describen mediante análisis descriptivo univariante, calculando media y desviación estándar para variables continuas y frecuencia absoluta y porcentaje para variables categóricas. Para comparar proporciones se utilizó la prueba de Chi cuadrado y para comparar medias la prueba de T de Student.

Se utilizó la metodología de la curva *Receiver Operator Characteristics* (ROC) para determinar el área bajo la curva y el punto de corte teórico del CTX con mejor suma de sensibilidad y especificidad. Se calculó la sensibilidad, la especificidad, y los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) para estimar el cumplimiento terapéutico mediante: 1) cuestionario de Morinsky-Green, 2) punto de corte del CTX y 3) la valoración conjunta del Morinsky-Green y el valor del CTX. Para valorar la concordancia entre los diferentes sistemas para valorar el cumplimiento se utilizó el coeficiente Kappa.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un intervalo de confianza (IC) del 95%. Se utilizó para todos los análisis el paquete estadístico SPSS versión 13.0 para Windows y EPIDAT (programa para análisis epidemiológico de datos) Versión 3.1.

Aspectos éticos

El estudio se llevó a cabo siguiendo los principios contenidos en la Declaración de Helsinki, las normas de buena práctica clínica, y según lo propuesto en la Guía de Buenas Prácticas en Investigación en Ciencias de la Salud del Instituto Catalán de Salud (Segunda edición)¹⁶. Se solicitó consentimiento informado a las pacientes. Los datos de contacto y personales de las pacientes participantes sólo fueron accesibles para los investigadores del estudio.

RESULTADOS

De las 115 pacientes seleccionadas, se excluyeron 15 por tomar un fármaco diferente a un bifosfonato oral (9, ranelato de estroncio y 6, raloxifeno). Las características basales se recogen en la tabla 1, observándose una mayor proporción de densitometrías previas al tratamiento y una menor proporción de pacientes tratadas con alendronato en el grupo de pacientes cumplidoras. En 11 mujeres se identificaron diferentes errores en la toma de la medicación (un error en la toma de la medicación –no en ayunas–, un error en la forma de tomar la medicación –con leche– y 10 errores en el tiempo de espera en mantener el ayuno). Como en estos 11 casos la MPR fue <0,8 y, por tanto, se consideraron incumplidoras, no se excluyeron del análisis.

El cumplimiento terapéutico valorado por la MPR fue del 70% (Tabla 2), no observándose diferencias en la proporción de cumplidoras en función de si el tratamiento era semanal o mensual (68,2% vs. 73,5%; $p=0,580$). El cumplimiento valorado mediante el cuestionario de Morinsky-Green autoadministrado fue del 73%, con una concordancia moderada en comparación con la valoración por la MPR (coeficiente Kappa=0,436).

El valor medio de la determinación del CTX fue de $0,193 \pm 0,146$ ng/ml (mediana=0,158 ng/ml), siendo infe-

rioren las pacientes cumplidoras en comparación con las no cumplidoras ($0,182 \pm 0,143$ ng/ml vs. $0,2190 \pm 0,152$ ng/ml; $p=0,247$). Un punto de corte del CTX de 0,196 ng/ml fue el que presentó una mejor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de cumplimiento terapéutico. Considerando este valor del CTX, el cumplimiento terapéutico fue del 64%, con una concordancia baja en comparación con la valoración por la MPR (coeficiente Kappa=0,234). Al considerar conjuntamente el resultado del cuestionario Morinsky-Green junto con el valor del CTX, el cumplimiento fue del 51%, con una concordancia moderada (coeficiente Kappa=0,415).

En la tabla 3 se recogen los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las diferentes formas utilizadas para estimar el cumplimiento terapéutico. El área bajo la curva ROC (IC 95%) para la valoración mediante el cuestionario de Morinsky-Green fue de 0,7119 (0,6127-0,8111), y de 0,6238 (0,5185-0,7291) para la valoración por un punto de corte del CTX de 0,196 ng/ml (Figura 1). Al considerar el resultado del cuestionario de Morinsky-Green junto con el valor del CTX, el área bajo la curva ROC fue de 0,7452 (0,6573-0,8332), algo superior que si sólo se considera el resultado de Morinsky-Green ($p=0,622$) (Figura 2).

Tabla 1. Características basales en el total de las pacientes y en función del cumplimiento del tratamiento

Variable	Pacientes total (n=100)	Pacientes cumplidoras (n=70)	Pacientes no cumplidoras (n=30)	Valor de p
Edad (años), media \pm DE	72,04 \pm 7,96	72,49 \pm 7,64	71,0 \pm 8,73	0,366
Diagnóstico registrado de osteoporosis, N (%)	99 (99)	69 (98,6)	30 (100)	0,511
Densitometría registrada previa al tratamiento, N (%)	94 (94)	69 (98,6)	25 (83,3)	0,003
Fractura previa a la inclusión, N (%)	54 (54)	36 (51,4)	18 (60)	0,431
Fármaco prescrito: N (%)				
Alendronato	51 (51)	31 (44,3)	20 (66,7)	0,004
Risedronato	30 (30)	24 (23,3)	6 (20,0)	0,153
Ibandronato	19 (19)	15 (21,4)	4 (13,3)	0,344
Uso de CaD	96 (96)	67 (95,7)	29 (96,7)	0,824

CaD: suplementos de calcio y vitamina D.

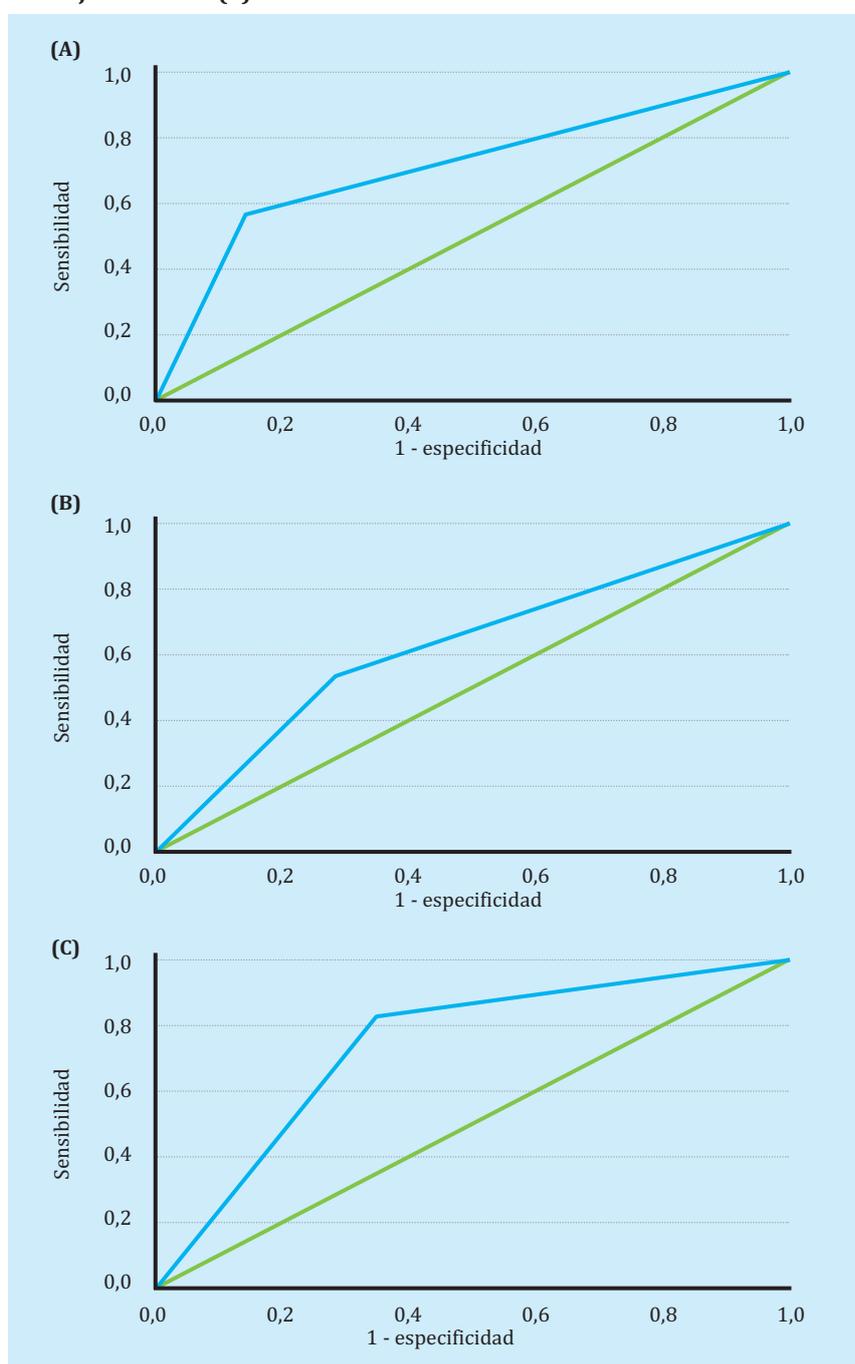
Tabla 2. Valoración del cumplimiento terapéutico en función de la MPR

	Clasificación del cumplimiento según MPR; N (%)			
	$\geq 0,8$	Entre 0,6 y 0,8	Entre 0,4 y 0,6	$\leq 0,4$
General	70 (70,0)	16 (16,0)	7 (7,0)	7 (7,0)
Alendronato	31 (60,8)	14 (27,4)	3 (5,9)	3 (5,9)
Risedronato	24 (80,0)	1 (3,3)	2 (6,7)	3 (10,0)
Ibandronato	15 (78,9)	1 (5,3)	2 (10,5)	1 (5,3)

Tabla 3. Valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos para las diferentes herramientas para estimar el cumplimiento terapéutico (IC 95%)

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Morinsky-Green	56,7 (37,3-76,1)	85,7 (76,8-94,6)	62,9 (42,9-83,0)	82,2 (72,7-91,6)
CTX	53,3 (33,8-72,8)	71,4 (60,1-82,7)	44,4 (26,8-62,1)	78,1 (67,2-89,0)
MG+CTX	83,3 (68,3-98,3)	65,7 (53,9-77,5)	51,0 (36,0-66,0)	90,2 (81,1-99,3)

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; MG+CTX: Morinsky-Green y CTX.

Figura 1. Curvas ROC para valorar el cumplimiento terapéutico mediante cuestionario de Morinsky-Green (A), el CTX (B) y la combinación del Morinsky-Green junto al CTX (C)

DISCUSIÓN

En nuestra muestra de pacientes tratadas con el mismo bifosfonato durante como mínimo el último año, una determinación del CTX inferior a 0,196 ng/ml es indicador de cumplimiento terapéutico en el último año, con una capacidad discriminativa moderada, inferior a la capacidad discriminativa del cuestionario de Morinsky-Green. Su valoración conjunta (CTX <0,196 ng/ml y Morinsky-Green) mejora la capacidad discriminativa, siendo una buena opción para valorar el cumplimiento terapéutico en las consultas. En un reciente documento de consenso¹³ se recomendaba la determinación inicial y a los tres meses de marcadores de remodelado óseo (CTX y P1NP) para valorar el incumplimiento en función del cambio observado (descenso del 56% del CTX y 38% del P1NP). Pero esto requiere de dos determinaciones de dos marcadores, los cuales no siempre son accesibles para los laboratorios de Atención Primaria. Además, no permite valorar el cumplimiento en aquellas pacientes que ya han iniciado el tratamiento y no se dispone de un valor basal, ni tampoco permite analizar el incumplimiento que se produce con el paso del tiempo.

Su determinación puntual junto con la administración de un cuestionario clásico de cumplimiento terapéutico, el de Morinsky-Green, presentan la mejor sensibilidad y el mejor valor predictivo negativo para el cumplimiento terapéutico.

En nuestra muestra el cumplimiento terapéutico observado (medido en función de la MPR) era elevado, del 70%, bastante superior al que dife-

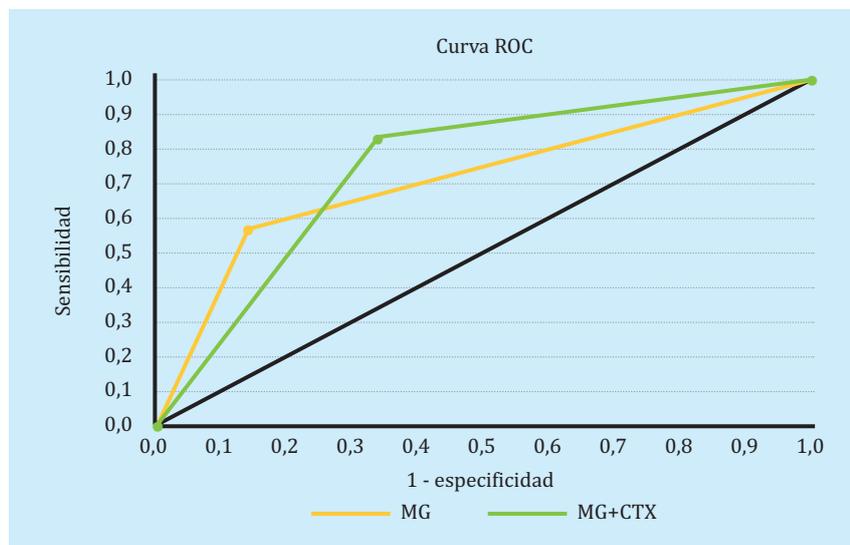
rentes estudios observacionales han descrito en nuestro medio⁷. Una de las posibles explicaciones es que nuestro estudio no se diseñó para valorar la proporción de cumplimiento terapéutico en nuestra población y, por tanto, no se realizó un muestreo aleatorio. Además, más de la mitad de las pacientes incluidas presentaban una fractura previa, si bien no existían diferencias significativas en el porcentaje de pacientes con fracturas previas entre pacientes cumplidoras e incumplidoras. La presencia de fracturas previas se asocian a unas mayores tasas de cumplimiento terapéutico¹¹.

También se identificó que en uno de cada diez pacientes se observaron errores en la forma correcta de la toma de la medicación, hecho que de por sí ya supone un incumplimiento terapéutico. Estos pacientes no fueron excluidos del análisis puesto que en todos los casos la MPR era inferior a 0,8 y todos serían clasificados como incumplidores. Sería de esperar que en estos casos el valor del CTX no estuviese disminuido ya que la absorción del fármaco se encontraría disminuida. En el caso de que la MPR hubiese sido igual a superior a 0,8, la paciente hubiera sido considerada como cumplidora sin serlo. Como esta situación no se ha dado, no han sido excluidas del estudio. Es necesario proporcionar una información clara y concisa sobre la administración del fármaco, así como asegurar una correcta comprensión de la misma, puesto que una toma incorrecta disminuye considerablemente la absorción del principio activo y, por tanto, del efecto anti-fractura esperado.

A diferencia de lo observado en estudios previos realizados en el ámbito de Atención Primaria en España, donde el registro del diagnóstico de osteoporosis era entre el 60-70%^{17,18} y de la densitometría previa al diagnóstico era de aproximadamente un 65%¹⁷⁻¹⁹, en nuestro estudio ambos registros eran superiores al 90%. Este mayor registro puede ser explicado en parte a un mejor registro de patologías y resultados con el tiempo, y al hecho de que las pacientes incluidas estuviesen asignadas a médicos más sensibilizados con la osteoporosis. Esta mayor sensibilización del profesional con la patología podría explicar, en parte, unas mayores tasas observadas de cumplimiento que el descrito en otros estudios de base poblacional^{7,10}.

Una de las limitaciones de este estudio es la forma en que se valora el cumplimiento terapéutico a través de

Figura 2. Comparación curvas ROC para valorar el cumplimiento mediante el cuestionario de Morinsky-Green (MG) o la combinación de MG y CTX



los datos de facturación a Farmacia puesto que no son un indicador directo de que el paciente realmente tome la medicación, sino exclusivamente de que la retira de la farmacia. A falta de métodos directos para valorar el cumplimiento, se trata de la medida más aproximada y recomendada para valorar el cumplimiento.

Se ha considerado como paciente incumplidora aquella con una MPR inferior al 80%, pero no se ha considerado si la no retirada de medicación se producía en los primeros o últimos meses del período previo a la determinación del CTX, y este hecho podría tener un impacto en el valor del CTX.

Otra de las limitaciones es que, una vez se dispone de un punto de corte del CTX para valorar el cumplimiento, sería necesario comprobarlo en otra muestra de pacientes para confirmar que se observan resultados similares.

Como fortaleza, el hecho de tratarse de una única determinación del CTX y que se puede realizar en cualquier momento del tratamiento, junto a la realización de un cuestionario de cumplimiento, permite valorar de una mejor forma el cumplimiento de las pacientes tratadas con bifosfonatos, aunque haga tiempo que lo esté tomando.

CONCLUSIONES

La valoración conjunta de una única determinación del CTX y del cuestionario de Morinsky-Green es la opción que presenta una mejor capacidad discriminativa para valorar el cumplimiento terapéutico. Un valor del CTX inferior a 0,196 ng/ml es el que presenta una mejor sensibilidad y especificidad.



Declaración de intereses: DML ha recibido honorarios personales de Eli Lilly, Amgen, Ferrer, Rubió y Novartis; XN ha recibido honorarios por Amgen y Eli Lilly; ADP ha sido un orador o miembro de la junta consultiva para Lilly, Amgen, GSK y UCB; DPA declara que su departamento/grupo de investigación ha recibido becas de investigación sin restricciones de Amgen, Servier Laboratoires y Bioibérica, y ha recibido honorarios personales de Amgen y UCB; CCA, ASC, POL y RPM declaran no tener conflictos de interés.

Bibliografía

1. Consensus NIH. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*. 2001;285:785-95.
2. Cauley JA, Wampler NS, Barnhart JM, Wu L, Allison M, Chen Z, et al. Incidence of fractures compared to cardiovascular disease and breast cancer: the Women's Health Initiative Observational Study. *Osteoporos Int*. 2008;19:1717-23.
3. Caeiro JR, Bartra A, Mesa-Ramos M, Etxebarria I, Montejo J, Carpintero P, et al. Burden of first osteoporotic hip fracture in Spain: a prospective, 12-month, observational study. *Calcif Tissue Int*. 2017;100:29-39.
4. Nogués X, Martínez-Laguna D. Update on osteoporosis treatment. *Med Clin (Barc)*. 2018;150:479-86.
5. Martín-Merino E, Huerta-Álvarez C, Prieto-Alhambra D, Álvarez-Gutiérrez A, Montero-Corominas D. Secular trends of use of anti-osteoporotic treatments in Spain: A population-based cohort study including over 1.5 million people and more than 12 years of follow-up. *Bone*. 2017;105:292-8.
6. Soong Y-K, Tsai K-S, Huang H-Y, Yang R-S, Chen J-F, Wu PC-H, et al. Risk of refracture associated with compliance and persistence with bisphosphonate therapy in Taiwan. *Osteoporos Int*. 2013;24:511-21.
7. Reyes C, Tebe C, Martínez-Laguna D, Ali MS, Soria-Castro A, Carbonell C, et al. One and two-year persistence with different anti-osteoporosis medications: a retrospective cohort study. *Osteoporos Int*. 2017;28:2997-3004.
8. Carbonell Abella C, Guañabens Gay N, Regadera Anechina L, Marín Rives JA, Taverna Llauradó E, Ayeche Redín MP. Analysis of therapeutic compliance in women with osteoporosis. *Reumatol Clin*. 2014;7:299-304.
9. Cheng L, Durden E, Limone B, Radbill L, Juneau PL, Spangler L, et al. Persistence and compliance with osteoporosis therapies among women in a commercially insured population in the United States. *J Manag Care Spec Pharm*. 2015;21:824-33.
10. Carbonell-Abella C, Pages-Castella A, Javald MK, Nogués X, Farmer AJ, Cooper C, et al. Early (1-year) discontinuation of different anti-osteoporosis medications compared: a population-based cohort study. *Calcif Tissue Int*. 2015;97:535-41.
11. Klop C, Welsing PMJ, Elders PJM, Overbeek JA, Souverein PC, Burden AM, et al. Long-term persistence with anti-osteoporosis drugs after fracture. *Osteoporos Int*. 2015;26:1831-40.
12. Karlsson L, Lundkvist J, Psachoulia E, Intorcía M, Ström O. Persistence with denosumab and persistence with oral bisphosphonates for the treatment of postmenopausal osteoporosis: a retrospective, observational study, and a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2015;26:2401-11.
13. Díez-Pérez A, Naylor KE, Abrahamsen B, Agnusdei D, Brandi ML, Cooper C, et al. International Osteoporosis Foundation and European Calcified Tissue Society Working Group. Recommendations for the screening of adherence to oral bisphosphonates. *Osteoporos Int*. 2017;28:767-74.
14. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garner 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;22:391-420.
15. Caro JJ, Ishak KJ, Huybrechts KF, Raggio G, Naujoks C. The impact of compliance with osteoporosis therapy on fracture rates in actual practice. *Osteoporos Int*. 2004;15:1003-8.
16. Ariza A, Bosch X, Campos E, Vinyes J, Violan C, Visa J, et al. Guía de bona pràctica en la recerca en ciències de la Salut de l'ICS. 2015.
17. Martínez-Laguna D, Arias-Moliz I, Soria-Castro A, Estrada-Laza P, Coderch M, Nogués X, et al. Riesgo de fractura según FRAX®, hipovitaminosis D, y calidad de vida en una población con fractura osteoporótica atendida en Atención Primaria: descriptiva basal de la cohorte VERFOECAP. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2011;3:157-64.
18. Martínez-Laguna D, Sancho-Almela F, Cano-Collado E, Gardeñes-Moron M, Morro J, Cos X. Uso adecuado en Atención Primaria de los fármacos antirresortivos frente a la osteoporosis. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2011;3:77-83.
19. Arana-Arri E, Gutiérrez-Ibarluzea I, Gutiérrez Ibarzabal ML, Ortueta Chamorro P, Giménez Robredo AI, Sánchez Mata AM, et al. Evidence based comparative analysis for managing osteoporosis in a primary health care setting. *Aten Primaria*. 2008;40:549-54.

Diferente evolución de la esclerostina sérica respecto de otros marcadores de remodelado óseo en el primer año tras un trasplante hepático

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2019000100005>

Martín González A¹, Allo Miguel G¹, Aramendi Ramos M², Librizzi S¹, Jiménez C³, Hawkins F¹, Martínez Díaz-Guerra G¹

¹ Servicio de Endocrinología

² Servicio de Análisis Clínicos

³ Servicio de Cirugía General

Hospital Universitario 12 de Octubre - Madrid (España)

Fecha de recepción: 08/07/2018 - Fecha de aceptación: 27/11/2018

Trabajo premiado con una beca para asistir al 39º Congreso de la ASBMR (Denver, 2017)

Resumen

Objetivo: Nuestro estudio tiene como objetivo principal valorar la evolución de los niveles de esclerostina en pacientes con trasplante hepático, e investigar su relación con otros marcadores de remodelado óseo.

Material y método: Estudio observacional prospectivo. Se incluyeron 83 pacientes con trasplante hepático. Se determinaron los valores de esclerostina, β -crosslaps, fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina y proteína C reactiva la semana anterior al trasplante y posteriormente, a los 1, 3, 6 y 12 meses. Se determinaron basalmente la 25 hidroxivitaminas D y la paratohormona. En cada revisión se evaluó la existencia de fracturas. La evolución de los marcadores respecto del valor basal se determinó mediante la prueba t-Student. Un valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados: 56 varones y 27 mujeres (edad media: $56,2 \pm 10,4$ años). Los niveles basales de esclerostina ($0,76 \pm 0,35$ ng/ml) disminuyeron de forma significativa precozmente ($0,55 \pm 0,22$ ng/ml en el primer mes, $p=0,034$), tendencia que se mantuvo hasta los 12 meses ($0,62 \pm 0,22$ ng/ml, $p=0,047$). Al contrario, los niveles basales de osteocalcina ($17 \pm 10,3$ ng/ml) y β -crosslaps ($0,44 \pm 0,3$ ng/ml) se incrementaron significativamente a lo largo del estudio; en el caso de la osteocalcina, hasta los 12 meses ($37,27 \pm 26,84$ ng/ml, $p<0,01$) y el β -crosslaps, hasta los 6 meses ($0,62 \pm 0,34$ ng/ml, $p<0,01$), con un descenso posterior ($0,47 \pm 0,31$ ng/ml, $p=0,2$).

Conclusiones: Tras el trasplante hepático existe un descenso de los niveles de esclerostina, opuesto a la elevación de otros marcadores de remodelado, β -crosslaps y osteocalcina. Son necesarios más estudios para determinar si estos cambios tienen un impacto en la aparición de osteoporosis en pacientes sometidos a trasplante.

Palabras clave: esclerostina, trasplante hepático, resorción ósea, formación ósea, deficiencia de vitamina D.

INTRODUCCIÓN

El trasplante de órgano sólido constituye una alternativa eficaz en el estadio final de múltiples enfermedades crónicas, incrementando la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, dicha mejoría se asocia con ciertas complicaciones, como una mayor incidencia de osteoporosis y un riesgo aumentado de fracturas¹. Numerosos estudios han concluido que existe una pérdida de masa ósea tras el trasplante, más marcada entre los tres y seis primeros meses, que se prolonga hasta un año después del mismo. Posteriormente existe una estabilización e incluso recuperación de la masa ósea en los dos años posteriores²⁻⁴.

El trasplante hepático se considera un factor de riesgo independiente para desarrollar osteoporosis¹⁻³. En el caso de los pacientes con un injerto hepático, la incidencia de fractura se estima entre un 10-43%¹, siendo la localización más frecuente la columna vertebral²⁻⁴. Entre los factores que contribuyen al aumento de riesgo de osteoporosis y fracturas en estos pacientes se encuentran: el tratamiento prolongado con inmunosupresores (principalmente los inhibidores de la calcineurina)^{2,5-8} y glucocorticoides^{9,10}, la deficiencia de vitamina D (muy habitual por la existencia de malnutrición) y las alteraciones en la función hepática evidenciadas en la mayoría de los pacientes con cirrosis¹⁻³.



Correspondencia: Gonzalo Allo Miguel (gonzaloallo.endo@gmail.com)

Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo ofrecen información basada en la predicción dinámica del mismo, siendo su aplicación clínica más aceptada la evaluación de la respuesta terapéutica con antirresortivos^{11,12} y su potencial relación con el riesgo de fractura. Sin embargo, en el momento actual no existe consenso respecto a la determinación de marcadores bioquímicos de remodelado óseo en los pacientes con trasplante hepático³. La esclerostina (ESC) es una proteína sintetizada por el osteocito que tiene un papel central en la regulación del remodelado óseo, ya que, simultáneamente, actúa como regulador negativo de la formación ósea y estimula la resorción ósea a través del RANK-ligando¹³. Su utilidad como marcador bioquímico de remodelado óseo, en particular en pacientes trasplantados hepáticos, no ha sido establecida.

Así, nuestro estudio tiene como objetivo principal valorar la evolución de los niveles de esclerostina en pacientes con trasplante hepático y, por otro lado, investigar su relación con otros marcadores de remodelado óseo.

PACIENTES Y MÉTODOS

Diseño del estudio y selección de pacientes

Se trata de un estudio observacional prospectivo, desarrollado desde el año 2015 al 2017, en un único centro: el Hospital Universitario 12 de Octubre (Unidad de Metabolismo Óseo del Servicio de Endocrinología y Nutrición). Se incluyeron 83 pacientes caucásicos, cumpliendo la condición de ser candidatos a un trasplante hepático (independientemente de la etiología de la hepatopatía). Los pacientes que hubiesen recibido fármacos que pudiesen interferir en el remodelado óseo previamente al trasplante fueron excluidos. El Comité Ético del centro aprobó la realización del estudio y se obtuvo un consentimiento informado firmado de todos los participantes. En todos los pacientes se empleó una pauta descendente de esteroides hasta una dosis de prednisona de mantenimiento de 20 mg durante los seis primeros meses (como parte del protocolo habitual de trasplante del centro). Se determinaron los valores de ESC, β -crosslaps (CTX), fosfatasa alcalina ósea (FA), osteocalcina (OC) y proteína C reactiva (PCR) la semana anterior al trasplante y posteriormente, a los 1, 3, 6 y 12 meses. La determinación de 25 hidroxivitamina D [25(OH)D] y paratohormona intacta (PTH) se realizó basalmente. Así mismo, en cada una de las revisiones se evaluó la existencia de fracturas.

Determinaciones bioquímicas

Las muestras de suero de los pacientes se obtuvieron entre las 8:00 y las 9:00 horas, tras un ayuno nocturno, y se mantuvieron congeladas a -70°C . Los marcadores de metabolismo óseo incluyeron: OC (Cobas e602, electroquimioluminiscencia; rango de normalidad: 8-48 ng/ml) y FA (IDS, Roche Diagnostics, enzimoimmunoanálisis; rango de normalidad: 4,0-20,0 ng/ml) como parámetros de formación ósea, y CTX (Cobas e602, electroquimioluminiscencia; rango de normalidad: 0,200-0,704 ng/ml) como parámetro de resorción. Así mismo, se determinó la ESC mediante enzimoimmunoensayo (Human Sclerostin, TECO Medical Group; rango de normalidad: 0,22-1,1 ng/ml). Los niveles de PTH se determinaron mediante electroquimioluminiscencia (Cobas e602; rango de normalidad: 7,0-57,0 pg/ml). Los niveles séricos de 25(OH)D se determinaron mediante quimioluminiscencia (Architect 2000, Abbot Diagnostics). A pesar de no existir actualmente un criterio sobre los niveles séricos óptimos de

25(OH)D, la mayoría de los autores definen como deficiencia de la misma valores por debajo de 20 ng/ml. Niveles séricos entre 21 y 29 ng/ml pueden ser considerados como insuficiencia relativa, y superiores a 30 ng/ml indican suficiencia de la misma¹⁴. La determinación de PCR se realizó mediante inmunoturbidimetría (C-Reactive Protein Gen.3, Roche Diagnostics, rango de normalidad inferior a 0,1-0,5 mg/dl).

Fracturas

En cada una de las revisiones realizadas a los pacientes se evaluó la existencia de fracturas mediante anamnesis clínica realizada al paciente y reevaluación de factores de riesgo para las mismas. En el caso de sospecha de fracturas osteoporóticas asintomáticas o paucisintomáticas (como son los aplastamientos vertebrales) se realizó una radiografía dorsolumbar¹⁵.

Análisis estadístico

El análisis estadístico ha sido realizado mediante *Statistical Package for the Social Sciences*, SPSS (versión 21.0; IBM, Armonk, Nueva York, EE.UU.). Se confirmó la distribución normal mediante el test de *Shapiro Wilks*. La evolución de los marcadores respecto del valor basal se determinó mediante la prueba t-Student. Todos los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (SD). Un valor de p inferior a 0,05 se consideró como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Un total de 83 pacientes receptores de un trasplante hepático (56 varones y 27 mujeres) se incluyeron en el estudio. La edad media de los pacientes fue de $56,2 \pm 10,4$ años. El peso medio del grupo era de $72,1 \pm 18,7$ kg y su IMC de $27,7 \pm 7,5$ kg/m².

Evolución de los marcadores de remodelado óseo

Los niveles basales de ESC eran $0,76 \pm 0,35$ ng/ml y disminuyeron de forma significativa precozmente ($0,55 \pm 0,22$ ng/ml en el primer mes, $p=0,034$), tendencia que se mantuvo hasta la finalización del estudio ($0,62 \pm 0,22$ ng/ml, $p=0,047$) (Tabla 1). No existieron diferencias significativas entre ambos sexos en la evolución del citado marcador. Los niveles de ESC no se correlacionaron con el desarrollo de fracturas. Por el contrario, los niveles de OC ($17 \pm 10,35$ ng/ml) presentaron un aumento progresivo y significativo a partir del 3^o mes tras el trasplante ($31,85 \pm 26$ ng/ml, $p<0,01$), que se mantuvo hasta el final del período de seguimiento ($37,27 \pm 26,84$ ng/ml, $p<0,01$). En ambos sexos, la evolución de los niveles OC fue similar.

En relación al CTX, los niveles previos al trasplante eran de $0,44 \pm 0,35$ ng/ml. Al mes del trasplante se observó un incremento significativo ($0,81 \pm 0,47$ ng/ml, $p<0,01$) que persistía hasta los 6 meses ($0,62 \pm 0,34$ ng/ml, $p<0,01$) comparado con el nivel basal. A los 12 meses se objetivó un descenso marcado de CTX hacia el valor previo al trasplante ($0,47 \pm 0,31$ ng/ml, $p=0,2$). No hubo diferencias en cuanto a la evolución de CTX entre ambos sexos pero, desde el tercer mes, el grupo de mujeres presentaba niveles significativamente más elevados que los varones ($0,94 \pm 0,62$ ng/ml y $0,61 \pm 0,34$ ng/ml, respectivamente, $p<0,01$). Los niveles de FA presentaron discretas variaciones a lo largo del estudio, sin evidenciar cambios significativos en ninguna de las determinaciones (Tabla 1), ni diferencias entre ambos sexos.

Tabla 1. Evolución de la esclerostina y del resto de los marcadores de remodelado óseo a lo largo del estudio (media \pm desviación estándar)

	Basal	1º mes	3º mes	6º mes	12º mes
OC (ng/ml)	17 \pm 10,35	17,95 \pm 12,40	31,85 \pm 26	35,75 \pm 32,63	37,27 \pm 26,84
FA (ng/ml)	34,87 \pm 17,8	30,16 \pm 13,77	27,97 \pm 11,93	42,07 \pm 21,23	31,05 \pm 11,41
CTX (ng/ml)	0,44 \pm 0,35	0,81 \pm 0,47	0,72 \pm 0,48	0,62 \pm 0,34	0,47 \pm 0,31
ESC (ng/ml)	0,76 \pm 0,35	0,55 \pm 0,22	0,63 \pm 0,23	0,63 \pm 0,30	0,62 \pm 0,22

OC: osteocalcina; FA: fosfatasa alcalina; CTX: β -crosslaps; ESC: esclerostina.

No se evidenciaron correlaciones estadísticamente significativas entre los diferentes marcadores de metabolismo óseo del estudio.

Vitamina D y PTH

En el momento del trasplante, los niveles de 25(OH)D se encontraban en el rango de deficiencia: 10,4 \pm 6,5 ng/ml. El 82,1% de los pacientes presentaban deficiencia (niveles de 25(OH)D <20 ng/ml) y el 17,9% niveles de insuficiencia relativa. En cuanto a la PTH, el valor medio inicial se encontraba levemente por encima del límite alto del rango de normalidad (78,8 \pm 52 pg/ml). No se evidenciaron correlaciones de interés entre los valores séricos de PTH y 25(OH)D y los marcadores de remodelado óseo incluidos en el estudio.

Inflamación

Los niveles de proteína C reactiva (PCR) se encontraban elevados antes del trasplante (4,77 \pm 3,8 mg/dl). Tras la intervención, se evidenció un descenso progresivo y significativo durante los 3 primeros meses del estudio, hasta una cifra de 1,3 \pm 3,5 mg/dl (p <0,005).

Fracturas

A lo largo del año de seguimiento se objetivaron 3 fracturas: un aplastamiento vertebral y 2 fracturas de Colles (una de ellas tras un traumatismo en un accidente). No existió ninguna correlación estadísticamente significativa entre el desarrollo de fractura tras el trasplante y los diferentes marcadores de metabolismo óseo.

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha propuesto que la ESC, glicoproteína de 213 aminoácidos secretada por el osteocito, la que produce una inhibición de la formación ósea mediante supresión de la vía de señalización intracelular Wnt/ β -catenina, podría ser un biomarcador de importancia central en la evaluación del remodelado óseo¹⁶. Sin embargo, existe poca información acerca de los niveles de ESC después de un trasplante de órgano sólido, aunque los pacientes sometidos a dicho procedimiento sufren con elevada frecuencia osteoporosis y, en particular, fracturas vertebrales. Así, en un estudio realizado en biopsias óseas de pacientes sometidos a distintos tipos de trasplante (riñón, hígado, corazón) se ha descrito un aumento en la expresión de ESC evaluada mediante inmunohistoquímica¹⁷.

En el presente estudio prospectivo observacional se ha pretendido valorar la evolución de los niveles de es-

clerostina (ESC) y otros marcadores de remodelado óseo durante 12 meses después de un trasplante hepático. Nuestros resultados muestran un descenso significativo de los niveles séricos de ESC, en contraposición con un aumento del resto de marcadores de remodelado (OC y CTX).

Estos resultados son similares a los descritos en pacientes con trasplante renal, en los que se observa un descenso acusado (30-60%) de los niveles séricos de ESC después del trasplante^{18,19}, especialmente en los 2 primeros meses tras la intervención. En nuestro estudio el descenso más marcado también se produce en el primer mes. Hasta el momento, no se ha podido establecer una relación entre los niveles de ESC en pacientes con trasplante renal y el riesgo de fracturas o de eventos cardiovasculares, aunque sí con la presencia de calcificaciones vasculares²⁰.

En el trasplante renal se plantea que uno de los factores fundamentales que justifican el descenso inicial de la ESC podría ser una pérdida aumentada de la misma por la orina, debido a una disfunción tubular por sobrecarga, típica del período inicial posterior al trasplante²¹. En el caso del hígado, estudios previos han demostrado que en ciertas patologías que pueden precisar de la realización de un trasplante, como la cirrosis biliar primaria, los pacientes presentaban niveles de esclerostina aumentados²². Entre los posibles factores que justificarían el descenso inicial de la ESC podrían encontrarse la mejoría de la situación pro-inflamatoria tras la cirugía y la inmunosupresión.

En cuanto a la inflamación, en nuestro estudio los niveles de PCR se encontraban basalmente elevados y disminuyeron significativamente a lo largo del año (pese a que no se objetivó correlación entre el valor de la ESC y el de la PCR). Sin embargo, en la literatura existen ejemplos en los que no se ha confirmado la posible relación entre la ESC y la inflamación. Así, en un estudio previo en pacientes con artritis reumatoide tratados con inhibidores de TNF (factor de necrosis tumoral) no se evidenció ningún efecto del tratamiento antiinflamatorio sobre los niveles de ESC²³.

El descenso de la ESC objetivado en los pacientes de nuestro estudio podría ser una de las causas que justifiquen la mejoría en el metabolismo mineral tras la intervención, al igual que se ha planteado en los pacientes sometidos a un trasplante renal^{18,19}. Una de las hipótesis propuestas es que los cambios en la ESC reflejarían la optimización en el funcionamiento del osteocito tras el trasplante²⁴.

En un estudio realizado previamente en trasplantes renales, los varones presentaban un nivel similar de ESC que las mujeres antes de la intervención¹⁷. De forma similar, en nuestro estudio no observamos ninguna diferencia entre las concentraciones séricas de ESC en ambos sexos, ni al inicio del estudio ni durante el seguimiento.

Respecto al resto de marcadores del remodelado óseo, en nuestro estudio se objetivó un incremento de los marcadores de formación ósea (OC), así como de los de resorción ósea (CTX). Dichos resultados son coherentes con los ya presentados en la literatura, tras el trasplante hepático²⁵. Recientemente, se ha objetivado incremento de CTX y del propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I (P1NP) a los 6 meses del trasplante hepático²⁵. Estos resultados, similares a los de nuestro grupo, parecen confirmar la existencia de un elevado remodelado óseo en los pacientes sometidos a un trasplante. En este contexto, es necesario destacar la influencia de los esteroides (como parte del tratamiento tras el trasplante) favoreciendo la resorción y suprimiendo la formación ósea, especialmente durante los seis primeros meses tras la intervención^{9,10}.

Además de la determinación de marcadores de remodelado óseo, en nuestro estudio también se ha confirmado la existencia de una tasa elevada de deficiencia de 25(OH)D previa al trasplante (82,1%). Tras una suplementación adecuada se objetivó una mejoría significativa de los niveles de 25(OH)D, hasta situarse el valor medio en rango de insuficiencia. De manera paralela se objetivaron niveles levemente elevados de PTH (en contexto probable de hiperparatiroidismo secundario a deficiencia de vitamina D) antes de la cirugía, con una normalización a los 12 meses, tras la mejoría en las cifras de 25(OH)D. Son múltiples los factores que influyen en los niveles insuficientes de 25(OH)D previa-

mente al trasplante: estado proinflamatorio, mayor prevalencia de desnutrición, pérdida de la contribución hepática por la hidroxilación de su precursor, etc.³ En varios estudios previos se han evidenciado tasas elevadas de deficiencia de 25(OH)D, aunque no tan elevadas como las mostradas en nuestra cohorte. Así, en un grupo de pacientes sometidos a un trasplante hepático se objetivó una tasa de deficiencia de 25(OH)D del 37%, con una mejoría a los 6 meses, situándose la tasa de deficiencia en el 17%²⁵.

Nuestro estudio presenta varias fortalezas. En primer lugar, la existencia de un tamaño muestral óptimo (n=83). Así mismo, se trata de un estudio longitudinal y prospectivo. Finalmente, es el primer estudio que incluye la determinación de la ESC tras el trasplante hepático. Pese a ello, el estudio presenta ciertas limitaciones. No se evaluó la densidad mineral ósea, ni la etiología de la hepatopatía que motivó el trasplante. Por otro lado, el bajo número de fracturas observadas no permite extraer conclusiones acerca del impacto real de estos cambios sobre el riesgo de osteoporosis post-trasplante²⁶.

En resumen, nuestros resultados encuentran un descenso de los niveles de ESC después del trasplante hepático, que va en sentido opuesto a las variaciones observadas en otros marcadores de remodelado como CTX y OC.

La deficiencia de 25(OH) vitamina D pre-trasplante es elevada y mejora tras suplementación. Son necesarios más estudios para determinar si estos cambios tienen un impacto relevante en la aparición de osteoporosis o enfermedades cardiovasculares a largo plazo en pacientes sometidos a trasplante.

Financiación: El estudio recibió una dotación económica dentro del proyecto PIE 13/00045. Instituto de Salud Carlos III.



Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Bibliografía

1. Lan GB, Lan GB, Xie XB, Peng LK, Liu L, Song L, Dai HL. Current status of research on osteoporosis after solid organ transplantation: pathogenesis and management. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:413169.
2. Kulak CA, Borba VZ, Kulak Júnior J, Custódio MR. Bone disease after transplantation: osteoporosis and fractures risk. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(5):484-92.
3. Yadav A, Carey EJ. Osteoporosis in chronic liver disease. *Nutr Clin Pract.* 2013;28(1):52-64.
4. Premaor MO, Das TK, Debiram I, Parker RA, Ninkovic M, Alexander GT, et al. Fracture incidence after liver transplantation: results of a 10-year audit. *QJM.* 2011;104(7):599-606.
5. Marcén R, Caballero C, Pascual J, Teruel JL, Tenorio M, Ocaña J, et al. Lumbar bone mineral density in renal transplant patients on neoral and tacrolimus: a four-year prospective study. *Transplantation.* 2006;81(6):826-31.
6. Monegal A, Navasa M, Guañabens N, Peris P, Pons F, Martínez de Osaba MJ, et al. Bone mass and mineral metabolism in liver transplant patients treated with FK506 or cyclosporine A. *Calcif Tissue Int.* 2001;68(2):83-6.
7. Dissanayake IR, Goodman GR, Bowman AR, Ma Y, Pun S, Jee WS, et al. Mycophenolate mofetil: a promising new immunosuppressant that does not cause bone loss in the rat. *Transplantation.* 1998;65(2):275-8.
8. Bryer HP, Isserow JA, Armstrong EC, Mann GN, Rucinski B, Buchinsky FJ, et al. Azathioprine alone is bone sparing and does not alter cyclosporin A-induced osteopenia in the rat. *J Bone Miner Res.* 1995;10(1):132-8.
9. Canalis E, Delany AM. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;966:73-81.
10. Kogianni G, Mann V, Ebetino F, Nuttall M, Nijweide P, Simpson H, et al. Fas/CD95 is associated with glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis. *Life Sci.* 2004;75(24):2879-95.
11. Melton LJ, Khosla S, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL. Relationship of bone turnover to bone density and fractures. *J Bone Miner Res.* 1997;12:1083-91.
12. Bauer DC, Black DM, Bouxsein ML, Lui LY, Cauley JA, de Papp AE, et al. Foundation for the National Institutes of Health (FNIH) Bone Quality Project. Treatment-related changes in bone turnover and fracture risk reduction in clinical trials of anti-resorptive drugs: a meta-regression. *J Bone Miner Res.* 2018;33(4):634-42.
13. Sølling ASK, Harsløf T, Langdahl B. The clinical potential of romosozumab for the prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2018;10(5-6):105-15.
14. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1911-30.
15. Bousson V, Royer M, Cortet B. Osteoporotic fractures: challenging cases and diagnostic pitfalls. *Joint Bone Spine.* 2012;79(Suppl 2):S91-5.
16. Weivoda MM, Oursler MJ. Developments in sclerostin biology: regulation of gene expression, mechanisms of action, and physiological functions. *Curr Osteoporos Rep.* 2014;12(1):107-14.
17. Pereira RC, Valta H, Tumber N, Salusky IB, Jalanko H, Mäkitie O, et al. Altered osteocyte-specific protein expression in bone after childhood solid organ transplantation. *PLoS One.* 2015; 10(9):e0138156.
18. Makówka A, Głyda M, Majewska ER, Nowicki M. Varying patterns of biomarkers of mineral and bone metabolism after kidney transplantation. *Horm Metabolism Res.* 2017;49(8):618-24.
19. Evenepoel P, Claes K, Viaene L, Bammens B, Meijers B, Naesens M, et al. Decreased circulating sclerostin levels in renal transplant recipients with persistent hyperparathyroidism. *Transplantation.* 2016;100:2188-93.
20. Jørgensen HS, Winther S, Dupont L, Bøttcher M, Rejnmark L, Hauge EM, et al. Sclerostin is not associated with cardiovascular event or fracture in kidney transplantation candidates. *Clin Nephrol.* 2018;90(1):18-26.
21. Evenepoel P, Goffin E, Meijers B, Kanaan N, Bammens B, Coche E, et al. Sclerostin serum levels and vascular calcification progression in prevalent renal transplant recipients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100:4669-76.
22. Guañabens N, Ruiz-Gaspà S, Gifre L, Miquel R, Peris P, Monegal A, et al. Sclerostin expression in bile ducts of patients with chronic cholestasis may influence the bone disease in primary biliary cirrhosis. *J Bone Miner Res.* 2016;31(9):1725-33.
23. Adami G, Orsolini G, Adami S, Viapiana O, Idolazzi L, Gatti D, et al. Effects of TNF inhibitors on parathyroid hormone and wnt signaling antagonists in rheumatoid arthritis. *Calcif Tissue Int.* 2016;99:360-4.
24. Rojas R, Carlini RG, Clesca P, Arminio A, Suniaga O, De Elguezal K, et al. The pathogenesis of osteodystrophy after renal transplantation as detected by early alterations in bone remodeling. *Kidney Int.* 2003;63:1915-23.
25. Schreiber PW, Bischoff-Ferrari HA, Boggian K, Bonani M, van Delden C, Enriquez N, et al. Bone metabolism dynamics in the early post-transplant period following kidney and liver transplantation. *PLoS One.* 2018; 13(1):e0191167.
26. Nanda KS, Ryan EJ, Murray BF, Brady JJ, McKenna MJ, Nolan N, et al. Effect of chronic hepatitis C virus infection on bone disease in postmenopausal women. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7(8):894-9.

Vitamina D libre: una determinación en aumento

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2019000100006>

Quesada Gómez M¹, Heureux N²

*1 Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición - Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES) - Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) - Hospital Universitario Reina Sofía - Córdoba (España)
2 DIAsource ImmunoAssays - Louvain-la-Neuve (Bélgica)*

Resumen

La vitamina D es un concepto familiar para cualquier profesional que trabaje en biología clínica, pero ahora lo es también para una gran parte de la población. Los colosales esfuerzos de investigación desarrollados durante la última década han conducido a una explosión del número de determinaciones solicitadas del metabolito más cualificado para expresar el estado corporal de la vitamina D, 25-OH vitamina D (25-OHD) libre, representa la pequeña fracción no ligada a las proteínas transportadoras. De acuerdo con la hipótesis de la hormona libre, debería ser considerada como la mejor representación del estado corporal de la vitamina D. Lamentablemente, se ha prestado poca atención a esta determinación ya que, hasta hace poco, la comunidad científica solo disponía de métodos indirectos y tediosos para medirla. Hace unos pocos años que se publicó un método de medición directa del 25-OHD libre ya disponible para efectuar estudios de investigación con resultados prometedores.

Palabras clave: cáncer colorrectal, envejecimiento, osteoporosis, gestación, infertilidad, 25-hidroxivitamina D, 25 hidroxivitamina D libre, 1,25-dihidroxivitamina D.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la vitamina D ha suscitado un creciente interés, no solo en el entorno médico, sino también entre la población en general. Inicialmente, la evaluación de la vitamina D era parte de la evaluación del metabolismo óseo cuando, por ejemplo, se sospechaba raquitismo u osteomalacia, o en poblaciones en riesgo de osteoporosis¹. El 25-hidroxivitamina D (25-OHD) es el metabolito circulante de mayor concentración y vida media más larga, y se emplea para monitorizar el estado corporal de la vitamina D, aunque los pacientes con enfermedad renal crónica y sometidos a tratamiento de diálisis también son controlados mediante mediciones de la evaluación de dicho estado². En este caso, además del 25-OHD, también se mide el metabolito activo de la vitamina D, el 1,25-dihidroxivitamina D (1,25-(OH)2D), que se produce principalmente en las células del túbulo proximal de la nefrona.

En el pasado, las mediciones de vitamina D realizadas por los laboratorios era limitadas y casi siempre con fines de investigación. Desde hace unos diez años la situación ha cambiado. La petición de determinaciones ha aumentado drásticamente y en la actualidad se publican cada año más de 4.500 artículos³ sobre vitamina D, habiéndose incluso sensibilizado a la opinión pública general. Esto se debe al conocimiento de la implicación de los metabolitos de la vitamina D en múltiples procesos fisiológicos⁴, a su asociación con diversas patologías y a la divulgación de estudios clínicos, así como a la difusión del concepto de 'vitamina del sol' para la población en general.

En la actualidad, aproximadamente el 90% de las determinaciones solicitadas y realizadas en el laboratorio

se refieren a la forma 25-OHD total. Una concentración por debajo de 20 ng/mL se acepta como deficiencia, y una concentración inferior a 30 ng/mL se considera insuficiente. Los niveles ideales son los superiores a 30 ng/mL, mientras que los de toxicidad se encuentran por encima de 100-150 ng/mL. Este tema es en la actualidad motivo de debate, habiéndose descrito casos reales de intoxicación, principalmente debido a errores de formulación y/o errores en la toma diaria^{5,6}. El 10% restante de las solicitudes de metabolitos de la vitamina D lo son del metabolito activo, el 1,25-(OH)2D, las cuales en su mayor parte son solicitadas por error, por confusión entre ambos metabolitos por el prescriptor⁷. Los resultados de esas pruebas, realizados para evaluar el sistema endocrino de la vitamina D en poblaciones sanas y enfermas, siguen siendo controvertidos, y esto se debe a múltiples razones⁸.

Para facilitar el trabajo de investigadores y clínicos se han desarrollado varios ensayos nuevos. El epímero C3, un estéreo-isómero del 25-OHD, ahora se puede medir fácilmente mediante métodos de cromatografía líquida-espectrometría de masas (HPLC-MS/MS), aunque su importancia clínica no se comprende claramente⁹. El 24,25-dihidroxivitamina D (24,25-(OH)2D), que es un catabolito del 25-OHD, también se puede medir por métodos de HPLC-MS/MS, y es útil en el diagnóstico de hipercalcemia infantil idiopática¹⁰. La medición de niveles de 25-OHD biodisponible y libre también se han incorporado como nuevos marcadores del estado de la vitamina D y, aunque el concepto se conoce desde la década de los 80, no se ha estado utilizando habitualmente, debido a la falta de un método adecuado para su cuantificación¹¹.



Correspondencia: Nicolas Heureux (Nicolas.Heureux@diasource.be)

FISIOLOGÍA DE LA VITAMINA D LIBRE

El 25-hidroxivitamina D libre (25-OHD libre) representa la fracción de 25-OHD que no está unida a proteínas ligadoras de vitamina D. Debido a su naturaleza hidrofóbica, los metabolitos de la vitamina D, especialmente el 25-OHD, se unen a proteínas transportadoras. La principal es la proteína de unión a la vitamina D (VDBP o DBP), también conocida como GC-globulina, la cual se une a todos los metabolitos de la vitamina D pero con mayor afinidad por el 25-OHD, ligando aproximadamente el 90% de su concentración circulante. La albúmina, debido a su alta concentración en sangre, aunque con una afinidad mucho menor que la VDBP por la 25-OHD, se une al 10% restante¹². Una pequeña fracción, que representa menos del 0,1% del total, circula en forma libre, no ligada¹³. La suma del 25-OHD libre y la fracción unida a la albúmina se denomina 25-OHD biodisponible, ya que se cree que el complejo albúmina-25-OHD, de baja afinidad, permite que las moléculas de 25-OHD estén

disponibles fácilmente para producir sus efectos biológicos¹⁴. Sin embargo, este concepto tiende a abandonarse a favor de la hipótesis de la hormona libre (Figura 1).

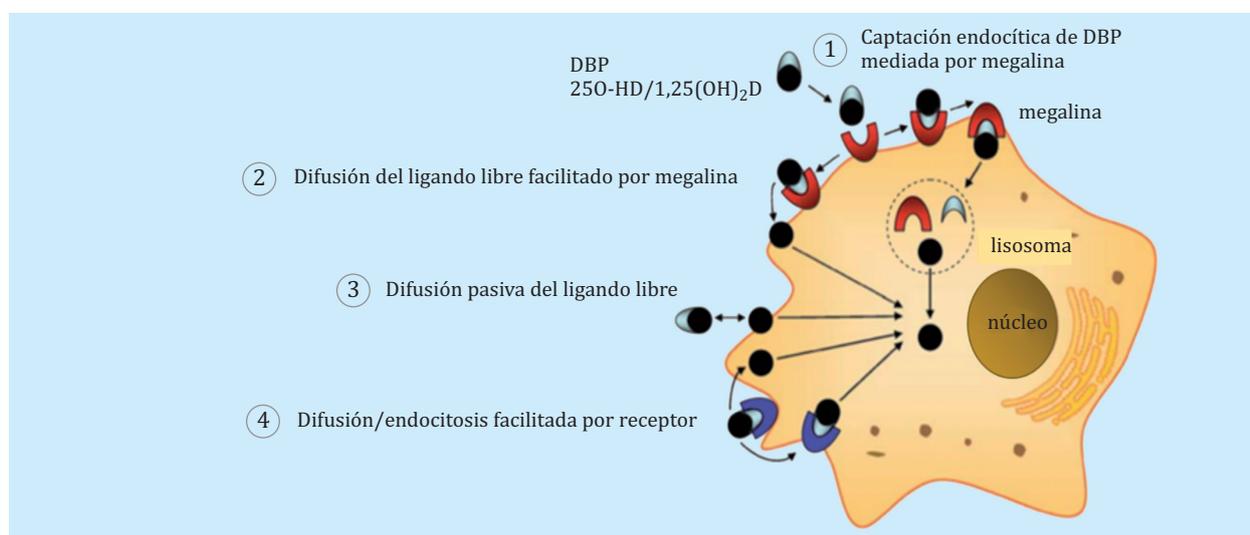
HIPÓTESIS DE LA HORMONA LIBRE

La hipótesis de la hormona libre establece que la actividad biológica de una hormona se ve afectada por su concentración no ligada a proteína (libre) en lugar de la concentración ligada a proteínas plasmáticas. En 1989, Mendel propuso que esta hipótesis "probablemente sea válida con respecto a todos los tejidos para hormonas tiroideas, cortisol y metabolitos hidroxilados de la vitamina D"¹⁵. Más tarde, Chun *et al.*¹⁶ conjeturaron que "la unión de 25-OHD a VDBP dificulta el aporte de 25-OHD a los tejidos diana, lo que finalmente impide su metabolismo a la forma activa, 1,25-(OH)₂D. Por el contrario, es la forma no ligada y libre la que puede atravesar la membrana celular y, por lo tanto, ejercer las acciones biológicas" (Figura 2).

Figura 1. Vitamina D libre y biodisponible: 25-OH vitamina D libre, biodisponible, y total. Unión de 25-OH vitamina D a albúmina y DBP (proteína transportadora de la vitamina D)



Figura 2. Mecanismos de transporte: Mecanismos mediados por receptor de membrana e independientes de receptor para la captación celular de vitamina D. Los metabolitos de la vitamina D se unen a la DBP en suero y líquido extracelular. La entrada a la célula de metabolitos de vitamina D puede ocurrir a través de uno de los mecanismos diferentes de los cuatro descritos en el esquema



Esta hipótesis de la hormona libre ha sido validada clínicamente para las hormonas tiroideas, con la aparición de ensayos para las T3 y T4 libres. Estos ensayos han reemplazado en la práctica a la mayoría de las determinaciones de T3 y T4 totales que se efectuaban previamente en laboratorios clínicos¹⁷. La historia es similar, aunque en menor medida, para la testosterona y el cortisol¹⁸. Para la vitamina D la situación es algo diferente, ya que el metabolito medido (25-OHD) no es la forma hormonalmente activa (lo es el 1,25-(OH)2D). No obstante, como explicaron previamente Chun *et al.*¹⁶, la conversión de 25-OHD en 1,25-(OH)2D, y, en consecuencia, la actividad biológica de la vitamina D, está muy influenciada por la concentración de 25-OHD libre en el plasma.

MÉTODOS PARA LA MEDICIÓN DE 25-OHD LIBRE

Históricamente se han medido los metabolitos 25-OHD y 1,25-(OH)2D libres mediante ultrafiltración centrífuga y diálisis en equilibrio usando el metabolito tritiado, que constituye el inmunoensayo clásico para la medición de las concentraciones totales. Se han empleado ecuaciones simples para calcular la concentración de hormona libre¹⁹ y, aunque estos métodos proporcionan resultados fiables, son extremadamente complicados de montar, además de precisar mucho tiempo y un gran volumen de muestra, además de requerir la manipulación de material marcado con tritio y/o carbono-14. Por lo tanto, a lo largo del tiempo se han desarrollado otros métodos de cuantificación los cuales se basan en la medición del metabolito total de la vitamina D y las concentraciones de proteína ligadora, empleando las constantes de afinidad relacionadas²⁰. Mientras que en los laboratorios clínicos la cuantificación de albúmina y 25-OHD total forman parte de los análisis de rutina, la cuantificación de VDBP se basa en kits para uso tan solo en investigación (*Research Use Only, RUO*), habitualmente no validados. Los ensayos que emplean anticuerpos monoclonales han demostrado ser poco fiables, ya que no miden por igual los diferentes polimorfismos de VDBP. Sin embargo, los ensayos y las técnicas que emplean inmunodifusión radial usando anticuerpos policlonales producen excelentes resultados²⁰. Como en las diferentes muestras de suero a evaluar se encuentran formas diferentes de VDBP, y, aunque esto todavía es motivo de debate dado que estas diferentes formas tienen diferentes coeficientes de unión para 25-OHD, el cálculo de cada muestra debería incluir, idealmente, el genotipado del paciente para emplear el coeficiente apropiado²¹. En la práctica clínica esto se hace muy excepcionalmente (Figura 3).

En el año 2017 se desarrolló un nuevo método directo y se puso a disposición de la comunidad científica. La cantidad de 25-OHD libre se mide mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA; del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). La separación de las formas libre y unida, así como la captura de la primera, se consigue mediante el uso de un anticuerpo monoclonal (anti-25-OHD), alterando lo menos posible

el equilibrio entre ambas formas²², habiéndose validado la precisión, sensibilidad, exactitud y especificidad del ensayo. Por otro lado, esta metodología genera resultados similares a los obtenidos mediante ultrafiltración centrífuga y se ha empleado con éxito en muchos estudios clínicos. El ensayo obtuvo el marcado de Conformidad Europea (CE) de la Unión en el 2018, lo cual permite su uso en laboratorios de diagnóstico *in vitro* (IVD; del inglés, *In-Vitro Diagnostic*).

25-OHD LIBRE EN ESTUDIOS CLÍNICOS

Recientemente, Tsuprykov *et al.*²³ publicaron un método de medición directa para los 25-OHD libre y total, en una cohorte de 297 mujeres caucásicas sanas embarazadas (la edad gestacional varió desde la semana cuarta hasta la cuadragésima), junto con el 25-OHD total, y otros parámetros (Tabla 1). El 25-OHD libre se correlacionó mejor que la total con diversos parámetros, por lo que se concluyó que la monitorización óptima del estado de vitamina D en mujeres embarazadas debería consistir en mediciones de 25-OHD libre al comienzo y al final del embarazo.

El mismo año, Franasiak *et al.* estudiaron el 25-OHD libre en un pequeño grupo de pacientes infértiles²⁴. El 25-OHD libre fue calculado usando los datos de DBP obtenidos con un ensayo basado en anticuerpos, y mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de infértiles y control (6,3±2,9 pg/mL vs. 4,3±1,8 pg/mL), diferencias que no se observaron para el 25-OHD total (30,3±9,8 ng/mL vs. 28,9±8,7 ng/mL). Estos resultados se explican por la menor concentración de DBP en el grupo infértil, que influye en el equilibrio entre las formas libre y unida de 25-OHD. Aunque estos datos solo representaban un estudio piloto, concluyeron que la cuantificación de 25-OHD total puede ser engañosa al evaluar el estado de la vitamina D en situaciones de infertilidad.

El 25-OHD libre también se ha estudiado en mujeres ancianas afroamericanas sanas mayores de 60 años²⁵, analizando la relación entre el rendimiento físico y la prevención de la osteoporosis con vitamina D en esta población. Se trata de un estudio de 3 años de duración, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, que examinó el efecto de la vitamina D sobre el rendimiento físico y la pérdida ósea en 260 mujeres. El 25-OHD libre predijo significativamente la fuerza de prensión en un modelo de regresión lineal ($R^2=0,02$; $F=5,22$, coeficiente de regresión $[\beta]=1,52$; $p=0,023$), sugiriendo que para cada incremento de 1 pg/mL de 25-OHD libre se producía un aumento en la fuerza de prensión de 1,52 lb, no encontrándose esta asociación para el 25-OHD total. Estos resultados sugieren la utilidad de 25-OHD libre como predictor del rendimiento físico con el envejecimiento de las mujeres afroamericanas. La asociación de 25-OHD libre con medidas del rendimiento de las extremidades superiores e inferiores respalda el examen adicional del papel del 25-OHD libre de suero en el rendimiento físico para prevenir la fragilidad y las fracturas en adultos mayores (Figura 4).

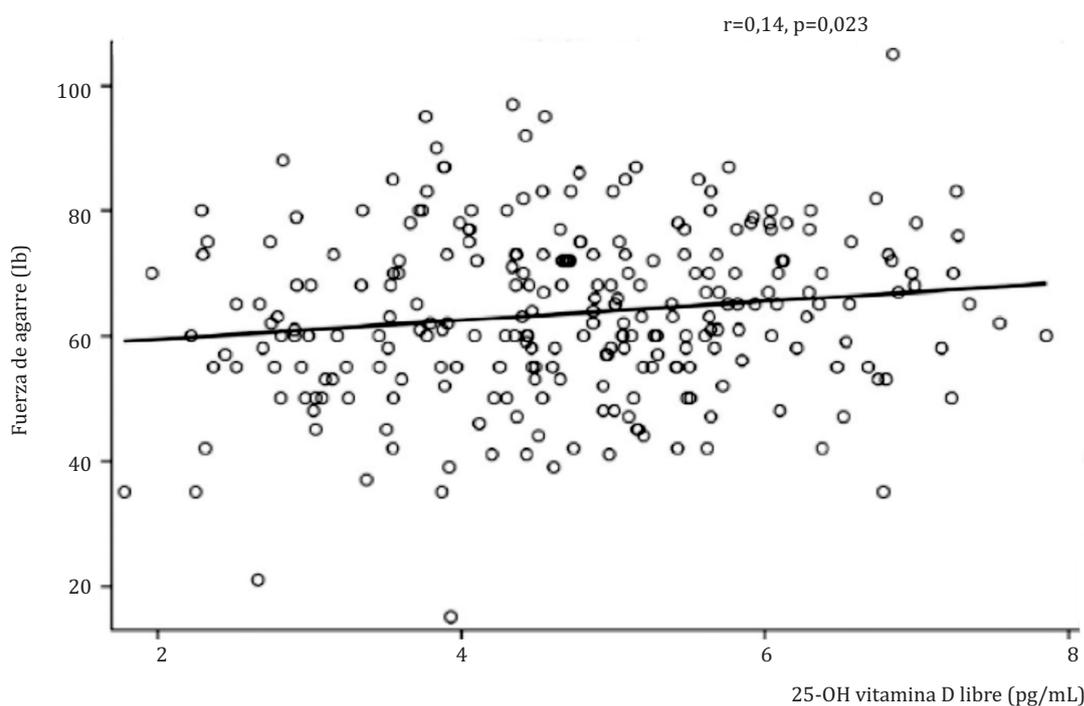
Figura 3. Cálculo de 25-OH de vitamina D libre. BC: coeficiente de unión. DBP: proteína transportadora de la vitamina D

$$25\text{-OHD libre} = \frac{25\text{-OHD total}}{BC \text{ albúmina} \times [\text{albúmina}] + BC \text{ DBP} \times [\text{DBP}]}$$

Tabla 1. Correlación de metabolitos de vitamina D 25-OH vitamina D total de, 25-OH vitamina D libre y 1,25(OH)₂ vitamina D con parámetros de la gestación y otros parámetros bioquímicos. En negrita, los resultados estadísticamente significativos

Parámetro	Total 25(OH)D (ng/mL)	25(OH)D libre (pg/mL)	1,25(OH) ₂ D total (pg/mL)
Edad gestacional (días)	p=0,957	p=0,003	p<0,001
Edad materna (años)	p<0,001	p<0,001	p=0,564
PTH (pg/mL)	p<0,001	p=0,010	p=0,014
Calcio (mmol/L)	p=0,238	p=0,006	p<0,001
Fosfato (mmol/L)	p=0,119	p=0,920	p=0,867
Fosfatasa alcalina (µg/mL)	p=0,037	p<0,001	p<0,001
Albumina (g/dL)	p=0,101	p=0,010	p<0,001
LDL (mg/dL)	p=0,527	p<0,001	p<0,001
Urea (mg/dL)	p=0,860	p=0,028	p<0,001
Adiponectina (µg/mL)	p=0,302	p=0,009	p=0,001
Sodio (mmol/L)	p=0,335	p=0,505	p=0,588
Vitamina B12 (pg/mL)	p=0,055	p<0,001	p<0,001
TSH (uU/mL)	p=0,319	p=0,089	p=0,816
Tiroxina libre (ng/dL)	p=0,183	p=0,033	p<0,001
Triiodotironina (pg/mL)	p=0,028	p=0,001	p=0,401
HDL (mg/dL)	p=0,001	p=0,449	p<0,001
Cociente LDL/HDL	p=0,161	p=0,003	p<0,001
Vitamina B6 (ng/mL)	p=0,024	p<0,001	p<0,001
Zinc (µmol/L)	p=0,822	p=0,090	p<0,001
Hemoglobina (g/dL)	p=0,382	p=0,065	p<0,001
Hematies (10 ⁶ /µL)	p=0,841	p=0,313	p=0,002
Leucocitos (10 ³ /µL)	p=0,789	p=0,024	p<0,001

Figura 4. Relación entre el 25-OHD libre y la fuerza de prensión²⁶



Otra aplicación, en Oncología, fue propuesta por el grupo de Yang²⁶. El objetivo de este estudio fue evaluar exhaustivamente el valor pronóstico de la VDBP, el 25-OHD total y el libre y su biodisponible en pacientes con cáncer colorrectal en los estadios I-III. Los resultados mostraron que la elevación de 25-OHD libre y su biodisponible se asoció significativamente con una mejor supervivencia a los 5 años, tras la realización de un análisis estadístico univariado. Al completar el estudio efectuando un análisis multivariado de Cox, también encontraron que los niveles altos de 25-OHD libre (HR=0,442; IC 95%=0,238-0,819; p<0,010) podría identificarse como factor independiente para predecir una mejor supervivencia. En conclusión, el estudio sugirió que niveles más altos de 25-OHD libre y biodisponible se asociaban a una mayor supervivencia en los pacientes con cáncer colorrectal en los estadios I-III. Además, el 25-OHD libre podría considerarse como un biomarcador de pronóstico independiente para supervivencia. Más recientemente se han publi-

cado muchos otros artículos incluyendo revisiones y estudios clínicos, que destacan la importancia del 25-OHD libre²⁷.

CONCLUSIÓN

Aunque el concepto de hormona libre y su importancia fisiológica y clínica se conoce desde hace mucho tiempo, el metabolito 25-OHD libre todavía es un tema relativamente nuevo de investigación. La ausencia de un procedimiento de medición directa ha sido probablemente una de las razones para explicar esta situación. Con el inmunoensayo directo ya disponible, la cantidad de estudios está creciendo rápidamente y las posibles aplicaciones clínicas están apareciendo en la literatura. El verdadero potencial de este parámetro todavía tiene que establecerse en la práctica clínica habitual, a través de estudios clínicos más amplios en áreas relevantes, principalmente en el embarazo, la fertilidad, las enfermedades renal y hepática, así como en los pacientes críticos.



Conflicto de intereses: Nicolas Heureux trabaja para DIAsource ImmunoAssays. José Manuel Quesada Gómez declara no tener conflicto de interés

Bibliografía

- Lips P, van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25:585-91.
- Al-Badr W, Martin KJ. Vitamin D and kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:1555-60.
- Búsqueda en el PubMed realizada el 1 de marzo de 2018, con la palabra clave 'Vitamin D'.
- Feldman D, Pike JW, Bouillon R, Edward Giovannucci E, Goltzman D, Hewison M (eds.). *Vitamin D. Volume 1: Biochemistry, Physiology and Diagnostics.* London; Elsevier Academic Press; 2018.
- Benhamou CL, Souberbielle JC, Cortet B, Fardellone P, Gauvain JB, Thomas T, et al. La vitamine D chez l'adulte: recommandations du GRIO. *Presse Med.* 2011;40:673-82.
- Lee JP, Tansey M, Jetton JG, Krasowski MD. Vitamin D toxicity: a 16-year retrospective study at an Academic Medical Center. *Lab Med.* 2018;49:123-9.
- Dale JC. Common Test-Ordering Errors Part 1: Misordered Tests, <http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/hotspots/2010-04borderingtests-pt1.html>, consultada el 26 de abril de 2017.
- Lucas RM, Gorman S, Black L, Neale RE. Clinical, research, and public health implications of poor measurement of vitamin D status. *J AOAC Int.* 2017; 100:1225-9.
- Bailey D, Veljkovic K, Yazdanpanah M, Adeli K. Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D(3) C3-epimer. *Clin Biochem.* 2013;46:190-6.
- Kaufmann M, Morse N, Molloy BJ, Cooper DP, Schlingmann KP, Molin A, et al. Improved screening test for idiopathic infantile hypercalcemia confirms residual levels of serum 24,25-(OH)₂D₃ in affected patients. *J Bone Miner Res.* 2017;32:1589-96.
- Chun RF, Nielson CM. Free Vitamin D: concepts, assays, outcomes, and prospects. In: Feldman D, Pike JW, Bouillon R, Edward Giovannucci E, Goltzman D, Hewison M (eds.). *Vitamin D. Volume 1: Biochemistry, Physiology and Diagnostics.* London: Elsevier Academic Press; 2018. p. 925-37.
- Pop LC, Shapses SA, Chang B, Sun W, Wang X. Vitamin D-Binding Protein in healthy pre- and postmenopausal women: relationship with estradiol concentrations. *Endocr Pract.* 2015; 21:936-42.
- Bikle DD, Bouillon R, Thadhani R, Schoenmakers I. Vitamin D metabolites in captivity? Should we measure free or total 25(OH)D to assess vitamin D status? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017; 173:105-16.
- Hewison M. Ligand regulation and nuclear receptor action. In: Bunce CM, Campbell MJ (eds). *Nuclear Receptors. Current Concepts and Future Challenges.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2010. p. 381-417.
- Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev.* 1989;10: 232-74.
- Chun RF, Peercy BE, Orwoll ES, Nielson CM, Adams JS, Hewison M. Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;144:132-7.
- Shepherd HG. Practical clinical laboratory assessment of thyroid function today. *Lab Med.* 1974;5:9-12.
- Faix JD. Principles and pitfalls of free hormone measurements. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013;27: 631-45.
- Bikle DD, Halloran BP, Gee E, Ryzen E, Haddad JG. Free 25-hydroxyvitamin D levels are normal in subjects with liver disease and reduced total 25-hydroxyvitamin D levels. *J Clin Invest.* 1986; 78:748-52.
- Nielson CM, Jones KS, Bouillon R, Chun RF, Jacobs J, Wang Y, et al. Role of assay type in determining free 25-hydroxyvitamin D levels in diverse populations. *N Engl J Med.* 2016;374:1695-6.
- Johnsen MS, Grimnes G, Figenschau Y, Torjesen PA, Almqvist B, Jorde R. Serum free and bio-available 25-hydroxyvitamin D correlate better with bone density than serum total 25-hydroxyvitamin D. *Scand J Clin Lab Invest.* 2014;74:177-83.
- Heureux N, Lindhout E, Swinkels L. A direct assay for measuring free 25-hydroxyvitamin D. *J AOAC Int.* 2017; 100:1318-22.
- Tsuprykov O, Buse C, Skoblo R, Haq A, Hoher B. Reference intervals for measured and calculated free 25-hydroxyvitamin D in normal pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;181:80-7.
- Franasiak J, Shapses S, Sun W, Scott R, Wang X. Vitamin D binding protein is lower in infertile patients compared to fertile controls: a case control study. *Fertil Res Pract.* 2017;3:14.
- Dhaliwal R, Mikhail M, Usera G, Stolberg A, Islam S, Ragolia L, et al. The relationship of Physical performance and Osteoporosis prevention with vitamin D in older African Americans (PODA). *Contemp Clin Trials.* 2018;65:39-45.
- Yang L, Chen H, Zhao M, Peng P. Prognostic value of circulating vitamin D binding protein, total, free and bioavailable 25-hydroxy vitamin D in patients with colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8:40214-21.
- Heureux N. Vitamin D testing-where are we and what is on the horizon? *Adv Clin Chem.* 2017;78:59-101.

