

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Pediatría



**DÉFICIT DE VITAMINA D Y SALUD ÓSEA EN NIÑOS CON
ENFERMEDAD DE CÉLULAS FALCIFORMES EN LA
COMUNIDAD DE MADRID: MEDIDAS DE INTERVENCIÓN**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Carmen Garrido Colino

Bajo la dirección de las doctoras

Teresa Hernández-Sampelayo
Elena Cela de Julián

Madrid, 2013

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA.
FACULTAD DE MEDICINA.
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

Dra. Teresa Hernández-Sampelayo Matos, Jefe de Servicio de Pediatría- Especialidades Pediátricas del Hospital General Universitario Gregorio y Profesora de Pediatría de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA:

Que **Doña Carmen Garrido Colino** ha realizado bajo mi dirección y supervisión el proyecto de investigación titulado: **“Déficit de vitamina D y salud ósea en niños con Enfermedad de Células Falciformes de la Comunidad de Madrid: medidas de intervención”**.

Este estudio destaca por la aportación práctica para la mejoría en el manejo de un colectivo de pacientes casi desconocido en España hasta la última década.

El presente trabajo reúne a mi juicio, las condiciones de originalidad y rigor metodológico para ser leído y defendido públicamente ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a cinco de Septiembre de dos mil doce.

Fdo. Dra. Teresa Hernández-Sampelayo.

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA.
FACULTAD DE MEDICINA.
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

Dra. Elena Cela de Julián, adjunto de la Sección de Onco - Hematología pediátrica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y Profesora asociada de Pediatría de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA:

Que **Doña Carmen Garrido Colino** ha realizado bajo mi dirección y supervisión el proyecto de investigación titulado: **“Déficit de vitamina D y salud ósea en niños con Enfermedad de Células Falciformes de la Comunidad de Madrid: medidas de intervención”**.

Este estudio destaca por la aportación práctica para la mejoría en el manejo de un colectivo de pacientes casi desconocido en España hasta la última década.

El presente trabajo reúne a mi juicio, las condiciones de originalidad y rigor metodológico para ser leído y defendido públicamente ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a cinco de Septiembre de dos mil doce.

Fdo. Dra. Elena Cela de Julián.

TESIS DOCTORAL

DÉFICIT DE VITAMINA D Y SALUD ÓSEA EN
NIÑOS CON ENFERMEDAD DE CÉLULAS
FALCIFORMES DE LA COMUNIDAD DE
MADRID: MEDIDAS DE INTERVENCIÓN.

Carmen Garrido Colino

Madrid, 2012.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA

**Déficit de vitamina D y salud ósea en niños con
Enfermedad de Células Falciformes de la Comunidad
de Madrid: medidas de intervención.**

DIRIGIDA POR:

Teresa Hernández-Sampelayo.

Elena Cela de Julián.

TESIS DOCTORAL

Carmen Garrido Colino.

Madrid, 2012.

Agradecimientos.

Me gustaría agradecer a todas las personas que de una u otra manera me han ayudado a que este proyecto haya llegado a su fin. Es posible que me olvide de algunos y les pido de antemano mis disculpas, pues no es un olvido intencionado.

- A la Dra. Elena Cela que puso en mis manos varios artículos sobre la enfermedad de células falciformes, entre los que encontré la idea para este trabajo. Agradecerle también su confianza al aceptar colaborar en la dirección de esta tesis.
- A la Dra. Hernández-Sampelayo por aceptar igualmente dirigir este trabajo de tesis doctoral con su inestimable experiencia.
- A mis compañeros de la Sección de Hemato-Oncología Pediátrica por su ayuda en el seguimiento de los pacientes con ECF.
- A las Dras. Cruz Vecilla, Aurea Cervera y Lucía Llorente por su colaboración en la recogida de datos de pacientes.
- A las Dras. Pérez Díaz y Pérez-Gascón del servicio de radiología, por su colaboración en la realización de los

estudios de densitometría y su ayuda en el conocimiento de la técnica y sus resultados.

- A José María Bellón por su gran ayuda en el análisis estadístico de los datos, esa parte tan compleja de la investigación en la que la mayoría de clínicos nos sentimos inseguros.
- A todos aquellos que me han dado palabras de ánimo en los momentos duros a lo largo de un trabajo como éste, que se prolonga en el tiempo y a veces uno tiene ganas de abandonar.
- A la Dra. Galarón, nuestra querida Paloma, que tanto la echamos de menos en el día a día.
- A mis padres que tanto lucharon para que sus hijos vivieran un mundo mejor y me transmitieron ese sentido de sacrificio y lucha.
- A Arturo, Ángel y Amalia que me transmiten tanta energía para seguir adelante.

A los pacientes con Enfermedad de células falciformes y a todos los que luchan a diario, por saber algo más sobre esta patología y mejorar su calidad de vida.

A mi familia y a todos los que me aprecian.

Índice (página).

- I. Introducción (1).
 - a. Generalidades de la enfermedad de células falciformes (ECF) (6).
 - b. Definición y formas de presentación (8).
 - c. Diagnóstico (19).
 - d. Hitos en la supervivencia y perspectivas de futuro (21).
 - e. Metabolismo óseo en niños (29).
 - i. Definición de déficit de vitamina D (29).
 - ii. Determinación del estatus de vitamina D (32).
 - iii. Pruebas de laboratorio para estudiar el metabolismo óseo (34).
 - iv. Déficit de vitamina D en niños y adolescentes (40).
 - v. Déficit de vitamina D en niños con ECF y otras hemoglobinopatías (44).
 - vi. Osteopenia y osteoporosis (47).
 - vii. Técnicas para la valoración de la densidad mineral ósea (DMO) (53).
 - f. Tratamiento del déficit de vitamina D en niños (59).

- i. Experiencia en el tratamiento del déficit de vitamina D en hemoglobinopatías (70).

II. Justificación del estudio de déficit de vitamina D y salud ósea en niños con ECF (75).

III. Objetivos (85).

IV. Material y métodos (89).

a. Estudio transversal en niños con ECF (91).

i. Población de estudio (91)

- 1. Pacientes seleccionados (91).
- 2. Criterios de exclusión (92).
- 3. Variables de estudio (92).

ii. Métodos (95)

1. Pruebas de laboratorio (95).

Descripción (95).

Interpretación de los resultados (97).

2. Valoración DMO (DEXA) (98).

Descripción de la técnica (98).

Interpretación de los resultados (100).

b. Diseño estudio piloto de tratamiento con calcio y

vitamina D en niños con ECF (101).

- i. Objetivo (101).
- ii. Material y métodos (101).
- iii. Protocolo de actuación(102)
- iv. Monitorización del tratamiento (103).
- v. Valoración de la adherencia al tratamiento (104).

c. Análisis estadístico (107).

d. Consentimiento informado (108).

V. Resultados (109).

a. Estudio transversal para conocer el estatus de vitamina D en los niños con ECF de la Comunidad de Madrid (111).

- i. Descriptivo (111).
- ii. Estudios de correlación y modelos explicativos (121).
- iii. Test t-student (128).
- iv. Hiperparatiroidismo secundario (129).

b. Valoración de la densidad mineral ósea mediante densitometría en niños con ECF (134).

c. Grupo de niños que reciben tratamiento con calcio y vitamina D (143).

- i. Descripción del grupo de pacientes (143).
- ii. Comparación de medidas de laboratorio repetidas (143).
- iii. Efectos del tratamiento sobre los niveles de 25 (OH) D (146).
- iv. Resumen de las tablas de contingencia analizando niveles de 25 (OH) D \geq 20 ng/ml o 30 ng/ml en función de la adherencia al tratamiento (151).
- v. Cambios en la densidad mineral ósea (156).
- vi. Toxicidad del tratamiento (165).

VI. Discusión (167).

- a. Estudios sobre déficit de vitamina D en pacientes con ECF (169).
- b. Variables predictivas del déficit de vitamina D en las hemoglobinopatías (171).
- c. Evaluación de los marcadores del metabolismo óseo en la ECF (176).
- d. Valoración de la DMO en niños con ECF mediante DEXA (181).

e. Tratamiento con calcio y vitamina D (195).

f. Adherencia al tratamiento (200).

VII. [Conclusiones](#) (207).

VIII. [Comentarios finales](#) (212).

IX. [Anexos](#) (213).

X. [Bibliografía](#) (221).

Abreviaturas.

AAP	Academia Americana de Pediatría.
ATG	Timoglobulina.
BGP	Proteína GLA ósea.
Ca	Calcio.
CHCM	Concentración media de hemoglobina corpuscular.
Cr	Creatinina.
Cm ²	Centímetro cuadrado.
Cm ³	Centímetro cúbico.
Col.	Colaboradores.
DEXA	Densitometría.
DIPART	Vitamin D Individual Patient Analysis of Randomized Trials.
dl	decilitro.
DMO	Densidad mineral ósea.
ECF	Enfermedad de células falciformes.
EDTA	Plasma.
EEUU	Estados Unidos.
EICH	Enfermedad injerto contra huésped.
FA	Fosfatasa alcalina.
FAO	Fosfatasa alcalina ósea.
FIO	Fundación Internacional de Osteoporosis.
g	gramo.
GLA	ácido carboxiglutámico gamma.
Hb	Hemoglobina.
HCM	Hemoglobina corpuscular media.
HLA	Antígenos leucocitarios humanos

HPLC	Cromatografía líquida.
HU	Hidroxiurea.
I ¹²⁵	Iodo 125.
IL	Interleukina.
IMC	Índice de masa corporal.
IOM	Institute of Medicine.
IRMA	Ensayo inmunoradiométrico.
ISCD	Sociedad Internacional de Densitometría Clínica.
Kg	Kilogramo.
L	Litro.
Lat	latitud.
LES	Lupus eritematoso sistémico.
Mcg	microgramo.
mg	miligramo.
ml	mililitro.
Mmol	milimol.
ng	nanogramo.
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey.
NHLBI	National Heart, Lung and Blood Institute.
NIH	National Institute of Health.
NS	No significativo.
OI	Osteogénesis imperfecta.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PCR	Proteína C reactiva.
PTH	Hormona paratiroidea.
RDW	Índice de distribución de glóbulos rojos.
SEHP	Sociedad Española de Hematología Pediátrica.

SG	Supervivencia global.
SLE	Supervivencia libre de enfermedad.
STA	Síndrome torácico agudo.
TM	Talasemia mayor.
TMO	Trasplante de médula ósea.
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos.
TSCU	Trasplante de sangre de cordón.
Tto.	Tratamiento.
UI	Unidades Internacionales.
VCM	Volumen corpuscular medio.
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana.

I. INTRODUCCIÓN.

I. INTRODUCCIÓN

La ENFERMEDAD DE CÉLULAS FALCIFORMES (ECF) es la alteración genética más prevalente identificada en los estudios de cribado neonatal en varios países del mundo afectando aproximadamente a 90.000 personas en EEUU(1, 2). Los datos de la Comunidad de Madrid, donde se realiza cribado universal desde mayo de 2003, demuestran asimismo que es la alteración genética más frecuente (1 de cada 5000 recién nacidos vivos) (3).

Afecta preferentemente a individuos de etnia negra, por lo que se trataba de una enfermedad poco conocida en nuestro medio hasta los años 80. A partir de esta década, debido al aumento de inmigrantes africanos y afro-americanos, los casos de esta enfermedad han aumentado paulatinamente en nuestro país. Este hecho motivó que desde el laboratorio de metabolopatías de la Comunidad de Madrid, se plantease la importancia de realizar cribado neonatal de esta compleja enfermedad a todos los niños nacidos en dicha Comunidad. El cribado centralizado se inició en mayo del 2003, tras un primer estudio piloto en el año 1997, seguido de una beca FIS en 1998, con el fin de detectar de forma precoz la enfermedad y poder realizar una mejor atención temprana y seguimiento de la misma.

Introducción.

En la actualidad aproximadamente 120 pacientes son seguidos en la Sección de Hemato-Oncología Pediátrica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), en su mayoría diagnosticados desde el nacimiento mediante cribado neonatal. Una minoría había sido diagnosticada en su país de origen o en el nuestro a edades más tardías, lo que nos ha permitido conocer la historia natural de la enfermedad y poder realizar prevención e intervención precoz en caso de complicaciones propias de la misma.

El hecho de disponer de una población amplia de pacientes pediátricos con esta patología nos sitúa en situación ventajosa para seguir avanzando en el conocimiento de la enfermedad, así como brindar a estos niños los cuidados que les permitan mejorar su calidad y expectativas de vida. Los avances en los cuidados de estos pacientes han aumentado de forma significativa sus expectativas de vida, planteando nuevos retos a los equipos multidisciplinares que se ocupan de esta patología, los cuales deben garantizar una transición adecuada de sus pacientes a los centros de adultos. En este sentido se plantea este trabajo sobre el déficit de vitamina D y salud ósea en niños con ECF, un tema poco estudiado en la edad pediátrica como se detalla a lo largo del texto, y de gran relevancia en pacientes que

llegan a la edad adulta afectados de esta patología, en los que los problemas derivados del déficit mantenido de vitamina D, osteopenia y osteoporosis se traducen en un deterioro importante de calidad de vida y aumento de mortalidad.

Introducción.

a. Generalidades sobre la Enfermedad de Células Falciformes.

El término ECF describe un grupo de alteraciones crónicas caracterizadas por hemólisis y episodios intermitentes de oclusión vascular que causan isquemia tisular y disfunción orgánica aguda y crónica. Una atención médica experta e integral disminuye la morbilidad y aumenta la esperanza de vida de los enfermos.

La ECF es una enfermedad genética autosómico recesiva cuyo hallazgo principal es la presencia de hemoglobina (Hb) falciforme (HbS) en los eritrocitos. Los individuos **heterocigotos** o portadores de HbS tienen el llamado “rasgo falciforme” (fenotipo AS), una condición generalmente benigna y sin síntomas. Los individuos **homocigotos** o **heterocigotos compuestos** tienen enfermedad sintomática con cinco fenotipos posibles:

- Anemia falciforme (HbSS), que afecta aproximadamente al 75% de los pacientes.
- Enfermedad falciforme-Hemoglobina C (HbSC, 25% de los pacientes)
- Enfermedad falciforme-Talasemia (menos del 1% de los pacientes), con 2 subtipos:

HbS β^+ talasemia

HbS β^0 talasemia

- Enfermedad falciforme-Otras hemoglobinopatías (HbSD^{Punjab}, HbSO^{Arab} u otras)

En 1910 Herrick's describe el primer caso de enfermedad de células falciformes. Posteriormente en 1957 Ingrand VM describe cómo la sustitución de un único nucleótido en el codón 6 del gen de la globina β resulta en el cambio del glutámico original por valina. Este cambio permite a la HbS polimerizarse cuando está desoxigenada, lo que comporta el hecho primario de la patología de la célula falciforme. La polimerización de la HbS distorsiona el glóbulo rojo en su forma de hoz característica, y estas células pueden ocluir la circulación microvascular (vaso-oclusión) y causar hemólisis(4).

El término enfermedad de células falciformes (ECF) engloba a la anemia falciforme (HbSS) y a los síndromes falciformes por herencia de un gen S en heterocigosis compuesta con otros genes β mutados (HbSC, HbS- β talasemia u otros). La asociación en un mismo paciente de dos o más de estas alteraciones es relativamente frecuente y puede modificar la expresión fenotípica de la ECF.

b. Definición y formas de presentación.

Rasgo falciforme.

Es un estado de portador benigno sin manifestaciones hematológicas, con parámetros eritroides (morfología, índices corpusculares, reticulocitos) normales. La distribución habitual de HbA y HbS es de 60:40. Son sujetos no anémicos, que no necesitan tratamiento ni restricciones en la actividad diaria. El porcentaje de HbA₂ puede estar ligeramente elevado en el rasgo falciforme.

Los pacientes con **rasgo falciforme y α -talasemia heterocigoto u homocigoto asociada** pueden estar ligeramente anémicos y presentar el porcentaje HbS, VCM, HCM y CHCM significativamente menores que los sujetos sin la asociación. La morfología eritroide puede ser completamente normal o con microcitosis y/o dianocitos; en caso de ferropenia asociada a rasgo falciforme suele destacar la presencia de dianocitos.

Forma homocigoto HbSS.

En la HbSS, la hematimetría es normal al nacimiento. Durante el primer año de vida, según la HbF es reemplazada por

HbS, existe una caída de Hb con anemia y reticulocitosis que durarán toda la vida. La concentración de Hb en adultos es 6-10 g/dL (rango 5-12 g/dL, incluso más elevada), con un aumento postpuberal significativo de 1-2 g/dL en los varones. Los pacientes con HbF aumentada suelen tener cifra de Hb más elevada. La anemia puede empeorar en situaciones como crisis vasoclusivas, infecciones, estados carenciales o insuficiencia renal.

La reticulocitosis, ordinariamente de 5-20%, no aumenta en consonancia con la anemización, debido a que la HbS tiene menor afinidad por el oxígeno que la HbA y su repercusión sobre la eritropoyesis es menor que la esperada para la cifra de Hb.

En pacientes sin α -talasemia asociada, los índices eritrocitarios son normales, si bien VCM y HCM no están elevados en correlación con la cifra de reticulocitos, sugiriendo una relativa microcitosis. La cifra de leucocitos puede estar falsamente elevada por presencia de eritroblastos en sangre.

Puede existir neutrofilia. La cifra de leucocitos se correlaciona con la frecuencia de síndrome torácico agudo (STA) y es factor predictivo de muerte precoz. Las plaquetas están elevadas y con aumento de formas grandes, ambos datos atribuibles a hipoesplenismo.

Introducción.

La morfología eritrocitaria es generalmente normal al nacimiento mientras el porcentaje de HbS se mantiene relativamente bajo. Las anomalías comienzan sobre los 6 meses de edad, con la aparición de células falciformes ocasionales, dianocitos y cuerpos de Howell-Jolly (signos de hipoesplenismo). La mayoría de los niños tienen rasgos de hipoesplenismo al año de edad, que con los eritroblastos circulantes y las células falciformes van siendo más habituales según pasa el tiempo. Estas células falciformes representan hematíes irreversiblemente falciformados que no corrigen su forma con la exposición al oxígeno atmosférico. Existe policromasia y en algunos casos microcitosis e hipocromía. En los pacientes con HbF elevada las anomalías morfológicas son mucho menores, con menos anemia, reticulocitosis y número de células falciformes, retrasándose los signos de hipoesplenismo.

El diagnóstico requiere demostrar HbS, A2 y F, con la HbS como única Hb variante.

Los neonatos con anemia falciforme suelen mostrar predominio de HbF, siendo la HbS una pequeña parte del total de Hb, y no se detecta HbA. A veces solamente se observa HbF, por lo que resulta necesario para el diagnóstico repetir el estudio cuando el lactante tiene algunos meses de edad. En el periodo

neonatal puede existir confusión con HbS- β -talasemia. La caída postnatal de HbF es más lenta en lactantes con anemia falciforme que en bebés sanos, con niveles promedio de alrededor del 20% al año de edad.

En el adulto, la electroforesis de Hb y HPLC muestran Hb S, F y A2, siendo HbS la fracción más cuantiosa (90-95% del total de Hb), con HbA totalmente ausente. La HbA2 puede encontrarse en cantidades normales o ligeramente elevadas, habitualmente 2-4% (porcentajes mayores en los pacientes con α -talasemia coexistente). La síntesis de cadenas de globina α/β^S está balanceada salvo que exista rasgo α -talasémico.

La HbF es habitualmente 5-10%, pero puede ser superior (en ocasiones hasta el 40% de la Hb total). Es mayor en la infancia y tiende a ser más alta en mujeres que en varones. Se retrasa el switch fisiológico de la síntesis de cadenas α a β^S respecto de la normalidad. El porcentaje de HbF cae rápidamente en los tres primeros años de vida, y posteriormente más lentamente hasta la edad de 10 años, en la cual su nivel se aproxima al de la vida adulta (aunque puede continuar cayendo hasta los 20 años). Determinan el porcentaje de HbF factores relacionados y no relacionados con el genotipo β . El porcentaje de HbF tiene significado pronóstico, y aumenta de 2-16 veces

Introducción.

con el tratamiento con hidroxiaurea (HU).

Existe hiperbilirrubinemia de predominio indirecto, con aumento de LDH y a menudo hiperuricemia, así como haptoglobina baja. Los estudios de supervivencia eritroide muestran una vida media de 7-14 días, que puede ser menor si existe esplenomegalia y mayor en caso de α -talasemia coexistente. En caso de ferropenia asociada se produce considerable mejoría de la vida media eritroide, con disminución de bilirrubina y LDH. La terapia con HU también mejora la supervivencia media del hematíe y reduce los signos bioquímicos de hemólisis.

Forma homocigoto HbSS asociada a alfa-talasemia (5-7).

Se atenúa la gravedad de la hemólisis y la anemia. Su menor concentración media de hemoglobina corpuscular (CHCM) y tendencia a polimerizar tienen impacto clínico, si bien existen otros factores implicados. El % de HbS varía con el número de genes α en las formas heterocigotos (y con VCM y HCM), de forma que la coexistencia de rasgo α -talasémico supone reducción de VCM, HCM. *In vitro*, la serie roja de pacientes ECF α -talasémicos tiene menos formas irreversiblemente falciformadas, con hematíes más deformables e hidratados de

menor CHCM.

Existiría por tanto una mejoría y una disminución de la adhesividad eritrocitaria asociada a la expresión de menos genes alfa-globina, con un menor efecto lesivo sobre el endotelio y eventualmente menor daño orgánico. La delección de 1 solo gen alfa tiene efecto mínimo en la HbF, pero resulta en mejor hidratación y supervivencia del hematíe con menor falciformación y aumento de la concentración de Hb. La anemia es más leve en pacientes ECF con delección de 1 o 2 genes alfa (genotipos $-\alpha/\alpha$ y $-\alpha/-\alpha$), efecto relacionado con disminución de la hemólisis (aunque no demostrable hasta los 7 años de edad), con menor reticulocitosis y falciformación, pero con más hipocromía y microcitosis según crece el número de genes α delecionados. Aumenta HbA₂ (generalmente >2-4%, aunque es muy variable) a mayor número de genes α delecionados, sin afectación significativa de la Hb F.

Doble heterocigoto HbS- β -talasemia.

Resulta de herencia conjunta de un gen S de un progenitor y de un gen β -talasémico del otro progenitor. Las consecuencias clínicas y hematológicas de la interacción dependen principalmente del alelo β -talasémico y son función de la cantidad

Introducción.

de HbA. En la β^0 -talasemia, los hematíes contienen prácticamente sólo HbS y nada de HbA, mientras que en la β^+ -talasemia contienen mayoría de HbS, con 5-30% de HbA. En el periodo neonatal es difícil el diagnóstico de HbS- β -talasemia; sólo es posible un diagnóstico provisional y es necesario seguir el caso y estudio familiar.

En la HbS- β -talasemia la anemia es más leve que en la HbSS, variando la Hb desde 5 g/dL al rango normal. La distribución de la Hb es bimodal, siendo más alta en los afectos de HbS- β^+ -talasemia que en los casos HbS- β^0 -talasemia, con valores promedio de 10.7 y 8.5 g/dL respectivamente. Existe reducción de VCM, HCM y CHCM, también con distribución bimodal, con valores promedio de VCM de 72 y 69.8 fL, con HCM de 22.6 y 20.1 pg, y CHCM de 31.5 y 28.8 g/dL, respectivamente para las formas HbS- β^+ -talasemia y HbS- β^0 -talasemia, siendo los valores promedio de los índices eritrocitarios más bajos para ambos grupos que en las formas HbSS, aunque en cierta medida se solapan. El RDW está muy aumentado en las formas HbS- β^0 -talasemia y moderadamente aumentado en HbS- β^+ -talasemia.

Existe reticulocitosis. La α -talasemia coexistente en dicha heterocigocia compuesta aumenta la concentración de Hb, VCM

y HCM y reduce el recuento de reticulocitos.

En pacientes con HbS- β^0 -talasemia no existe HbA, mientras que en los HbS- β^+ -talasemia la cantidad de HbA varía de indetectable a 30%. Como en la forma HbSS, la concentración de HbF está influida por el haplotipo del gen β asociado a la mutación β^S (más alta en los haplotipos senegalés y árabe-indo). La HbA₂ suele estar elevada, habitualmente 3.5-5.5%. Cuando la mutación β -talasémica es una delección grande (290 pares de bases) existen mayores niveles de HbF y HbA₂, con más leve curso clínico. La mayor cantidad de HbA₂ en la HbS- β^0 -talasemia puede ser útil para diferenciar el estado de heterocigocia compuesta y la forma HbSS, con microcitosis consecuente con rasgo α -talasémico coexistente, en el que la HbA₂ es habitualmente 2-4%. Aunque existe más superposición en los porcentajes de HbA₂, es la variable más útil para el diagnóstico diferencial, ya que la concentración de Hb, el recuento de reticulocitos y el porcentaje de HbF muestran más superposición. En cualquier caso, cuando se requiera un diagnóstico preciso (consejo genético), es imprescindible realizar análisis de ADN y estudio de los progenitores.

Doble heterocigoto HbSC.

Se produce por herencia conjunta de los genes β^S y β^C . Como no existe gen β normal, no existe HbA. Esta heterocigocia compuesta produce un síndrome falciforme similar a la forma HbSS, pero generalmente de menor gravedad, ya que la interacción de la HbC con la membrana eritroide produce una intensa estimulación del co-transporte $K^+ Cl^-$ y consecuente deshidratación del hematíe, hecho combinado con una mayor cantidad de HbS (alrededor de 50% en lugar del 40% que suele presentar el rasgo falciforme HbAS) y mayor concentración de Hb.

La Hb es más alta que en la HbSS, desde 8 g/dL hasta el límite superior del rango normal. El VCM es menor que en la HbSS, con promedio alrededor del límite inferior de la normalidad, HCM es similar y CHCM es más elevado a causa de un más alto porcentaje de células hiperdensas. RDW está aumentado, generalmente menos que en la HbSS. La reticulocitosis suele ser menos elevada que en la HbSS, con un promedio de 3-6%. La exactitud en la medida automatizada de los índices eritrocitarios en la HbSC depende del analizador, ya que los hematíes en esta entidad son menos deformables de lo normal, dando lugar a falsas elevaciones del VCM y reducción

del CHCM (analizadores de impedancia y primeras generaciones de analizadores por difracción de luz). También en la HbSC están elevadas la cifra de leucocitos y plaquetas, pero en menor medida que en la HbSS.

La morfología eritroide no muestra frecuentes células falciformes típicas, siendo más comunes las células en forma de barco. Ocasionalmente las células pueden contener cristales de HbC, y aproximadamente la mitad de los pacientes muestra poikilocitos característicos que no se ven en la anemia de células falciformes o en la hemoglobinopatía C. Algunos tienen cristales de diferente forma y tamaño, sobresaliendo en varios ángulos; otros son curvados simulando células falciformes pero también parecen contener cristales. La HbC copolimeriza y cocrystaliza con la HbS, la deoxigenación favorece la polimerización tipo HbS y la oxigenación favorece la cristalización tipo HbC, y parece probable que la formación de tales poikilocitos SC sea el resultado de ambos procesos simultáneamente en el hematíe. Es menos frecuente la policromasia, normoblastemia y los signos de hipoesplenismo, observándose frecuentes dianocitos y más frecuentes hematíes contraídos irregularmente.

HbS y HbC se encuentran en similares proporciones. La HbF puede ser normal o levemente elevada (1.1-3.3%),

Introducción.

significativamente superior en mujeres que en varones, y como en todas las formas de ECF, el % de HbF depende del haplotipo del gen β^S . La información sobre la HbA₂ es escasa al migrar con la HbC en las electroforesis de Hb a pH alcalino.

c. Diagnóstico. (8, 9)

La analítica inicial para el diagnóstico debe incluir:

- Electroforesis de Hb a pH alcalino, test de solubilidad, test de falciformación, cuantificación de HbA₂ y HbF.

La HbA₂ suele estar alta cuando se combinan Hb falciforme con β talasemia. La electroforesis alcalina permite separar las Hb normales de un hemolizado, así como determinadas variantes estructurales (HbS, HbE, HbJ, etc.), pero HbC, HbE, HbA₂ y HbO migran de forma similar, al igual que HbS, HbD y HbG. Si se identifica alguna Hb anómala, se amplía el estudio con electroforesis a pH ácido, separación de cadenas de globina y, si es posible isoelectroenfoque (IEF). Si la Hb es inestable o con afinidad por el oxígeno alterada hay que añadir el test de estabilidad térmica (por calor) y química (isopropanol).

Alternativamente, es frecuente que muchos laboratorios realicen únicamente al principio sólo HPLC de intercambio iónico (cromatografía líquida de alta resolución), que identifica HbS, HbC y otras variantes como HbD, HbE. El instrumento más usado es el Variant[®] de Bio-Rad, pero el Sickle-Variant no permite diferenciar HbA₂ de HbE y la cuantificación de HbA₂ está aumentada en pacientes adultos con HbS; esto no ocurre en el cribado neonatal con muestra de 48 horas.

Introducción.

- Electroforesis de Hb de los padres. Es muy útil para establecer un diagnóstico definitivo sin tener que recurrir a estudios moleculares complejos, pero debe realizarse con precaución puesto que puede revelar paternidad equivocada. No debe realizarse si tras informar a la madre, ésta pone objeciones.

- Hemograma con reticulocitos y morfología eritroide. La Hb suele ser normal en las formas heterocigotas, mientras que en las formas graves, la Hb varía según la intensidad de la enfermedad. Las formas asociadas a talasemias suelen ser microcíticas e hipocromas, de ahí la importancia del VCM (fL). Un $VCM < 72\text{fL}$ es significativo y sugiere la coexistencia de un síndrome talasémico.

- Estudio molecular en algunos casos donde se sospechen variantes de Hb difíciles de diagnosticar por electroforesis, o mutaciones de α o β talasemia, o se precise para asesoramiento genético. Estas técnicas en desarrollo permitirán mejorar los sistemas de cribado en el futuro.

d. Hitos en la supervivencia y perspectivas de futuro en la ECF.

Los avances en esta patología han sido espectaculares en los últimos años, traduciéndose en un descenso de mortalidad, una esperanza de vida mayor, una disminución de morbilidad, una preocupación sanitaria y unos programas de salud cada vez más elaborados y exigentes (10).

Entre los años 1968 y 1992, la mortalidad descendió entre el 40-50% en niños(11), y la morbilidad ha disminuido en las dos últimas décadas. Este descenso de morbi-mortalidad se debe a varios factores:

1º- La instauración del cribado neonatal (12). A este respecto es en Estados Unidos donde debido al impacto de esta hemoglobinopatía, desde el 1967 se recomendó el cribado universal en todos los estados, poniéndose en marcha en 1973(13) y completándose en Mayo de 2006(14). En España, Madrid desde el año 2003, el País Vasco desde el año 2011 y Valencia en 2012 son las tres comunidades que disponen en la actualidad de cribado neonatal para esta enfermedad. Un diagnóstico temprano es crucial para un manejo adecuado de

Introducción.

salud, pues permite el inicio de prevención secundaria y terciaria en estos pacientes.

2º- El uso de penicilina profiláctica ha demostrado en un ensayo clínico ser efectiva para disminuir la infección bacteriana invasiva, sobre todo por gérmenes encapsulados, y la mortalidad en lactantes y niños (15). La aparición de nuevas vacunas, entre ellas la vacuna frente a *Neumococo*, *Haemofilus* y *Meningococo C*, mejoran al igual que en niños sanos las perspectivas de vida de esta población (16).

3º- La utilización de hidroxiurea (HU) en el tratamiento de pacientes con ECF ha demostrado beneficios importantes en pacientes con HbSS. También puede beneficiar a pacientes con HbS- β -talasemia y SC, si bien su uso en esta población está menos estudiado. Su mecanismo de acción es:

- Aumenta la HbF, debido a que promueve una eritropoyesis más inmadura. El aumento de HbF disminuye la polimerización de la HbS.
- Disminuye los neutrófilos y plaquetas circulantes, con reducción de su interacción con el endotelio y la adhesión de los hematíes al mismo.

- Aumenta el óxido nítrico (NO), vasodilatador potente.

En distintos estudios realizados en pacientes con anemia falciforme, que tomaban HU, se ha observado:

- Respuesta hematológica (aumento de Hb, HbF y VCM, con disminución de reticulocitos).
- Disminución de crisis vasooclusivas, de síndrome torácico agudo, de ingresos y de transfusiones.
- Toxicidad leve
- En un estudio prospectivo (HUSOFT) (17)., realizado en niños muy pequeños, con una mediana de 15 meses de edad, sin selección por criterios de gravedad y a dosis de 20 mg/Kg/d, la HU se toleró bien y no alteró el crecimiento. Se obtuvo una respuesta hematológica y en algunos casos retrasó la asplenia funcional.
- Está por demostrar su efecto en prevenir o reducir las complicaciones crónicas en órganos, pero hay datos a favor. En cuanto a los accidentes cerebro vasculares, hay datos de menor incidencia de la esperada en pacientes tratados con HU; sin embargo, incluso administrado desde edades muy tempranas, no evita todos los casos (17).
- Recientemente Wang y col (18), acaban de publicar los resultados del estudio (BABY HUG), en este momento el

único estudio multicéntrico, randomizado, controlado realizado en lactantes con ECF. El estudio se llevó a cabo en trece centros de EEUU, entre octubre de 2003 y septiembre de 2009. Dicho estudio tenía como objetivos determinar si el uso de hidroxurea (hydrea®) en lactantes entre 9 y 18 meses previene el daño en bazo y riñón en estos pacientes, y conocer el efecto sobre las complicaciones propias de la enfermedad y la toxicidad del fármaco. El estudio no encuentra diferencias significativas en cuanto al daño en bazo y riñón entre el grupo que recibe tratamiento y el control. Sin embargo, el grupo que recibe hidroxurea tiene una disminución significativa de complicaciones (dolor, síndrome torácico agudo, dactilitis, ingresos y transfusiones). Asimismo, se objetiva una mejoría significativa de los parámetros analíticos.

El único efecto adverso descrito es una neutropenia leve-moderada.

- En adultos parece reducir la mortalidad.

4º- La transfusión reduce el riesgo de accidentes cerebrales, aumenta la oxigenación de los tejidos y

reemplaza los hematíes rígidos por otros deformables, restaurando el flujo sanguíneo. Los infartos o accidentes cerebrales son una causa de morbimortalidad importante en niños con ECF. A la edad de 20 años un 11% de esta población podría sufrir un accidente cerebral y la recurrencia de estos episodios se cifra por encima del 50% (19, 20). Un estudio randomizado multicéntrico para la prevención de accidentes cerebrales en niños (STOP 1), demostró la posibilidad de que niños de alto riesgo tras monitorización con ecografía doppler transcraneal, se mantuviesen libres de infartos con un régimen hipertransfusional crónico (21). Un estudio reciente demostró un descenso de 75% de isquemia cerebral en niños, en los tres años siguientes a la publicación de los estudios STOP (22). Basándose en estos datos, el cribado con ecografía doppler transcraneal se recomienda para todos los niños con ECF entre 2 y 16 años de edad. El estudio STOP II, que randomizaba los pacientes que habían normalizado su eco-doppler en dos grupos, uno que continuaba con régimen transfusional y otro que lo discontinuaba, tuvo que ser detenido por el alto índice de accidentes en el grupo que dejaba de transfundirse. Un 34% de este grupo volvía a tener parámetros por eco-doppler de alto riesgo, lo que apoya la necesidad de mantener el régimen transfusional (23). En este

Introducción.

sentido, y para prevenir la sobrecarga férrica secundaria a las transfusiones, recientemente se han establecido guías de manejo dirigidas a los profesionales que trabajan con estos pacientes creadas por el National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) de EEUU, National Institute of Health (NIH) y Sickle Cell Society en Reino Unido.(24).

5º- El único tratamiento curativo de la ECF es el trasplante de médula ósea (TMO) (25). La decisión de realizar el procedimiento viene dada fundamentalmente por la edad del paciente, su estado clínico y la disponibilidad de un hermano HLA compatible. Aunque los resultados globales del TMO de hermano idéntico son satisfactorios, el procedimiento comporta un riesgo de morbi/mortalidad, siendo el fallo de injerto y la enfermedad de injerto contra huésped las complicaciones principales. La toxicidad del procedimiento en pacientes con formas avanzadas de la enfermedad puede ser muy grave. Aun así la variabilidad y lo impredecible del curso clínico hacen difícil establecer la decisión y el momento óptimo para el trasplante. Lo recomendado es el trasplante de hermano HLA idéntico.

Los resultados de las tres series más importantes publicadas, la serie belga, un estudio multicéntrico y la serie

francesa, son muy similares (26, 27). En todas ellas, la supervivencia global está entre el 93 y 97%, y la libre de enfermedad entre el 84 y 86%.

Los mejores resultados se obtienen en los pacientes trasplantados en fases muy precoces de la enfermedad, cuando los pacientes están asintomáticos. La serie belga demostró que la supervivencia global (SG) de los pacientes trasplantados con enfermedad asintomática era superior a la de los pacientes trasplantados con formas graves (100% *versus* 88%). Lo mismo sucedió con la supervivencia libre de enfermedad (SLE) (93% *versus* 83%) (26).

Las principales complicaciones post-trasplante en todas las series fueron el fallo de injerto (alrededor del 10%), la enfermedad injerto contra huésped (EICH) y las complicaciones neurológicas. La utilización de gammaglobulina antitimocítica (ATG) en el régimen de acondicionamiento disminuye la probabilidad de rechazo. Las principales complicaciones neurológicas fueron las convulsiones y la hemorragia intracraneal. Esta última fue más frecuente en los pacientes con antecedentes de infarto cerebral; en cambio, las convulsiones se presentaron en pacientes con y sin antecedentes de síntomas neurológicos previos al trasplante. La primera causa de muerte

Introducción.

en todas las series fue la EICH, y la segunda, la hemorragia intracraneal.

El seguimiento a largo plazo de los pacientes trasplantados ha demostrado una estabilización e incluso mejoría de la función pulmonar, neurológica, esplénica y del crecimiento. El problema más frecuente a largo plazo es la disfunción gonadal en las niñas (27-29).

Sólo en el seno de ensayos o protocolos de estudio se han realizado otros tipos de TPH de los que existe menos experiencia en la actualidad:

Trasplante de sangre de cordón umbilical (TSCU).(30, 31).

Trasplante de donante no emparentado.(32, 33).

Trasplante con regímenes de intensidad reducida.(33).

Los objetivos del trasplante son:

1- Conseguir una eritropoyesis derivada del donante (completa o parcial) con un quimerismo del donante estable (completo o parcial).

2- Ausencia de progresión de la enfermedad.

3-Toxicidad mínima derivada del procedimiento, inmediata y a largo plazo.

e. Metabolismo óseo en niños.

i. Definición de déficit de vitamina D.

El efecto de la vitamina D insuficiente en el metabolismo óseo durante el crecimiento del esqueleto en niños no está bien establecido. Definir los niveles normales o deseables de 25 (OH) vitamina D vuelve a ser objeto de debate en los últimos años. Estudios en Europa en niños sanos (España, Francia y Finlandia) encuentran que el 80% de los niños tienen niveles de 25 (OH) D insuficientes (<20 ng/ml en invierno) (34, 35). Hasta el momento, los niveles óptimos de 25 (OH) D no han sido establecidos en la población pediátrica, por lo que los estudios existentes se basan en valores para adultos (36).

Asimismo, la etnia también parece tener influencia en los niveles de 25 (OH) D óptimos para la mineralización ósea. El estudio Nacional Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) (37), un estudio transversal en adultos jóvenes, no afectos de ECF pero de diferentes etnias, encuentra una disminución de masa ósea cuando decrecen los niveles de 25 (OH) D en americanos blancos e hispanoamericanos, pero no en americanos negros.

Los individuos de piel negra parecen ser más eficientes en

Introducción.

la absorción del calcio de la dieta, conservando el calcio en el hueso y en el riñón, especialmente durante la adolescencia (38, 39). En resumen, la homeostasis del calcio se mantendría con menos niveles de 25 (OH) D en la etnia africana. La relación entre niveles de PTH y 25 (OH) D es inversa en blancos e hispanoamericanos según niveles de vitamina D $>$ y $<$ de 20 ng/ml., no así en negros americanos, lo que sugiere supresión de PTH en esta población cuando los niveles de 25 (OH) D son bajos (37, 40). Se necesitan más estudios a este respecto para evaluar de forma adecuada los niveles óptimos de 25 (OH) vitamina D en las diversas poblaciones. El estudio NHANES III, realizado en 3441 participantes de 12 a 19 años resume que la prevalencia de déficit de vitamina D cambia en función de la definición de déficit. Así si habitualmente se definía el déficit como niveles de 25(OH) vitamina D <11 ng/ml., tanto por la AAP como por el IOM, Tras la evidencia de que alteraciones bioquímicas y secuelas en el esqueleto suceden por encima de ese nivel, éste debería subirse al menos a 20 ng/ml.(41, 42) siendo el cut-off de vitamina óptimo para la salud entre 30-35ng/ml (43). Cambiando la definición de déficit, la prevalencia aumenta del 2% al 14%, y si se consideran niveles óptimos por encima de 30 ng/ml., entonces la prevalencia de déficit en este

estudio sube al 48%. Los negros no hispanos tienen a su vez aumentado el Odds ratio de déficit en 20,4 veces respecto a blancos no hispanos.

La tendencia a considerar niveles insuficientes de 25 (OH) D hasta 30 ng/ml, está cambiando por muchas razones. Primero, la mayoría de laboratorios de referencia ha aumentado el rango de normalidad a 30 ng/ml. Segundo, aunque existen diferentes técnicas para medir la 25 (OH) D, la precisión y fiabilidad de las técnicas continúa siendo problemática, sobre todo en laboratorios que no son de referencia. Tercero, los niveles cambian con las estaciones, exposición al sol y dieta (44).

Introducción.

Aunque no hay absoluto consenso, la mayoría de expertos después de varios estudios concluyen que:

1-Déficit de vit D equivale a cifras de 25 (OH) D <20 ng/ml. (50 nmol/L).

2- Vitamina D insuficiente serían valores de 25 (OH) D entre 21-29 ng/ml. (52,5-72,5 nmol/L)

3-Vitamina D normal equivaldría a valores 25 (OH) D >30 ng/ml. (75 nmol/L).

4-Intoxicación por vitamina D se define como 25 (OH) D > 150 ng/ml (350 nmol/L) asociado a hipercalcemia, hipercalciuria e hiperfosfatemia.

Estas definiciones aunque se basan en estudios en adultos, son cada vez más aplicables en la edad pediátrica (45, 46).

ii. Determinación del estatus de vitamina.

El estatus de vitamina D se basa en la medición de 25 (OH) D.

25 (OH) D es el metabolito de la vitamina D que se usa para definir: déficit, intoxicación o vitamina D normal. Es la mayor forma circulante de vitamina D, con vida media de 2-3 semanas,

y es la suma de la vitamina D procedente de la dieta y la exposición solar. Aunque la 1,25 OHD3 es la forma biológica activa de la vitamina D y cabría pensar que es el método ideal para medir vitamina D, no es así por varias razones:

- La vida media es muy corta (4-6h).
- Sus niveles en circulación son 1000 veces más bajos.
- Cuando hay déficit de vitamina D, esto implica una disminución en la absorción de calcio intestinal, que es reconocida por la paratiroides, la cual aumenta la hormona paratiroidea (PTH), que a su vez aumenta la movilización de calcio desde el esqueleto y la reabsorción tubular en riñón de 1,25 (OH) D. Por tanto, cuando un individuo tiene déficit de vitamina D, el aumento de PTH produce niveles normales o aumentados de 1,25 (OH) D, siendo un parámetro no valorable para estudiar el déficit de vitamina D.

1,25 (OH) D tiene su utilidad para medir trastornos hereditarios o adquiridos en el metabolismo del calcio y en las alteraciones renales o extra renales que alteran la producción de 1,25 (OH) D.

Introducción.

iii. Pruebas de laboratorio para estudiar el metabolismo óseo.

El déficit de vitamina D se mide mediante la determinación cuantitativa de la 25 (OH) D utilizando LIASON 25 OH Vitamin D TOTAL Assay (310600), un inmunoensayo competitivo directo por quimioluminiscencia para la determinación cuantitativa del total de 25 OH vitamina D en suero o plasma.

Existen controversias para definir el método ideal para la medición de la 25 (OH) D en el suero de los humanos. La técnica de inmunoensayo continúa siendo el “gold estándar”. Otras técnicas requieren la extracción de lípidos del suero y miden 25OHD2 y D3 de forma separada.

La hormona paratiroidea (PTH) es la encargada de mantener los niveles de calcio en suero en cifras normales. La PTH, está constituida por una única cadena polipeptídica de 84 aminoácidos, que posee una influencia significativa en el mantenimiento de la concentración del ión calcio, en el organismo. La PTH incrementa los niveles de calcio en suero, actuando directamente sobre el hueso y los riñones: el incremento de calcio viene dado por el flujo de calcio desde el hueso hacia el fluido extracelular y de la reabsorción en el túbulo

renal del ión calcio junto con la excreción de fosfato por parte del mismo. La regulación a largo plazo de los niveles totales del calcio del organismo está mediada por la estimulación del metabolismo de la vitamina D, la cual provoca la absorción intestinal de ión calcio.

En individuos sanos, la hormona PTH es secretada en respuesta a los niveles de ión calcio. Cualquier descenso por debajo de niveles normales desencadena un incremento en secreción de PTH. Los niveles de calcio vuelven a la normalidad ejerciendo un feedback negativo que inhibe a su vez la secreción de PTH. La PTH es metabolizada en su mayoría en el sistema periférico, especialmente en hígado, riñón y hueso, dando lugar a fragmentos N-terminal, C-terminal y fragmentos intermedios de elevada vida media. Los fragmentos de la región N-terminal confieren a la molécula la bioactividad. Los fragmentos C-terminal y N-terminal son generados inicialmente en igual proporción, pero el N-terminal se degrada rápidamente. El fragmento C-terminal tiene una vida media de varias horas; en caso de insuficiencia renal, el aclaramiento por filtración glomerular está disminuido, encontrándose niveles elevados del mismo. Por tanto, los ensayos que determinan fragmento C-terminal no son fiables.

Introducción.

Para la hormona intacta, la vida media es de 2 a 5 minutos. En condiciones de normalidad de la función renal, la PTH intacta es la mayor parte de la PTH activa circulante.

En condiciones de hipercalcemia debidas a hiperparatiroidismo primario o producción ectópica de PTH (pseudohiperparatiroidismo), los niveles de PTH se elevan en la mayoría de los pacientes. Por el contrario, en los casos de hipercalcemia debidos a procesos tumorales u otras causas, la concentración de PTH circulante se encuentra disminuida o normal. Los niveles de PTH también son típicamente altos en el hiperparatiroidismo secundario.

Los actuales ensayos para PTH intacta poseen la sensibilidad necesaria para detectar la PTH intacta circulante y discriminar entre individuos normales y pacientes con hiperparatiroidismo primario. El estudio se puede realizar tanto en plasma como en suero.

La osteocalcina es una proteína dependiente de la vitamina K de 5900 dalton que se ha descrito como una de las proteínas no de colágeno más abundantes en el hueso; contiene dos o tres residuos de ácido carboxiglutámico gamma (GLA), de ahí su designación como proteína GLA ósea (BGP). La osteocalcina sólo se encuentra en tejido óseo y se sabe que es

un producto del osteoblasto. Desempeña un papel en el proceso de mineralización y está bajo la influencia de otras hormonas reguladoras del calcio: calcitonina, PTH y vitamina D. Dado que los niveles de osteocalcina son un reflejo de la formación ósea, su medida se relaciona con el estado real del metabolismo óseo del paciente. Se ha encontrado osteocalcina elevada en las enfermedades siguientes: osteomalacia, osteítis deformante, hiperparatiroidismo, osteodistrofia renal y osteoporosis postmenopáusica.

Las mediciones de osteocalcina en suero se realizan mediante ensayo inmunorradiométrico (IRMA), que mide osteocalcina humana intacta sin reactividad cruzada 1-43. El ensayo utiliza la osteocalcina humana 1-49 y dos anticuerpos policlonales que son específicos para dos regiones distintas de la molécula de osteocalcina. El primer anticuerpo, específico del término amino, está unido a una fase sólida (glóbulos de poliestireno). El segundo anticuerpo es específico del término carboxi de la osteocalcina humana y se marca con I¹²⁵. Las muestras se incuban a temperatura ambiente en un agitador orbital durante dos horas. La osteocalcina humana intacta 1-49 es la única forma de osteocalcina que se une tanto con el anticuerpo de glóbulo como con el anticuerpo marcado con I¹²⁵.

Introducción.

Después del periodo de incubación, se lava cada glóbulo para retirar el anticuerpo marcado no unido. Luego se mide la radiactividad presente en el anticuerpo marcado usando un contador gamma. La concentración de osteocalcina 1-49 presente en la muestra es directamente proporcional a la radiactividad medida.

La sangre se obtiene por punción venosa en un tubo de vidrio, dejando que la muestra se coagule a temperatura ambiente. Se centrifugan las muestras durante quince minutos en una centrifugadora refrigerada para obtener suero no hemolizado. El suero se separa y se congela inmediatamente. La hora a la que se toma la muestra debe registrarse para interpretar los resultados ya que la osteocalcina tiene una marcada variación diurna, con un nivel máximo por la noche y uno mínimo al final de la mañana. Al contener material radioactivo todo el material se maneja adoptándose las precauciones necesarias y prácticas correctas de laboratorio.

La fosfatasa alcalina ósea (FAO) es un reflejo metabólico de los osteoblastos y se considera un marcador bioquímico útil en el seguimiento de la enfermedad ósea metabólica. Es un marcador específico y sensible en la osteoporosis.

El ensayo Acces Ostase es un ensayo in vitro

inmunoenzimático en una sola fase. Se añade un anticuerpo monoclonal murino específico para la FAO a una cubeta de reacción con partículas paramagnéticas recubiertas de anticuerpos policlonales de cabra anti-ratón. Se añaden calibradores, controles y las muestras que contienen FAO a las partículas recubiertas, que se unen al anticuerpo monoclonal anti-FAO. Después de la formación de un complejo fase sólida/anticuerpo de captura/FAO, los materiales unidos a la fase sólida son retenidos en un campo magnético mientras que los materiales que no han quedado unidos a la fase sólida se eliminan mediante lavado. A continuación se añade al vaso de reacción el sustrato quimioluminiscente Lumi-Phos 530 y se mide la luz generada por la reacción utilizando un luminómetro; la producción de luz es directamente proporcional a la concentración de FAO en la muestra. La cantidad de analito en la muestra se determina a partir de una curva de calibración de puntos múltiples almacenada.

Las muestras se recogen en suero y/o plasma según se recomienda dejando coagular las muestras antes del centrifugado. Inmediatamente después del centrifugado se transfiere al menos 500 mcL de muestra sin células a una probeta de conservación y se cierra la misma herméticamente guardando

Introducción.

las muestras en nevera a temperatura de 2-8° C si se va a realizar el ensayo en las siguientes 24-48h y, en caso contrario deben congelarse a -70 °C.

iv. Déficit de vitamina D en niños y adolescentes.

En el comienzo del siglo XXI, más del 90% de los niños que habitan en la ciudades industrializadas del norte de Europa y 80% de los niños en el noreste de Estados Unidos tienen evidencia de raquitismo. Estos niños presentan debilidad muscular, erupción dental alterada con caries precoces, e infecciones respiratorias repetidas. Son múltiples los estudios recientes en la literatura médica en relación con el déficit de vitamina D y aparición de casos de raquitismo en todo el mundo (47-49). La prevalencia varía en función de la definición de déficit y las técnicas de determinación de los niveles en los diferentes laboratorios. Muchos estudios incluyen un numero reducido de pacientes, lo que los hace poco significativos y debe tenerse en cuenta al comparar resultados. En Estados Unidos se han comunicado casos de raquitismo al menos en 17 estados. Asimismo se han publicado déficit de vitamina D subclínicos en niños sanos (45, 50-52) en EEUU y también en diversos países: Reino Unido, Turquía, Francia, Finlandia, Grecia, China, Líbano

Canadá y España (53-58). El déficit es muy común, pero especialmente en grupos de riesgo: niños pequeños, mujeres embarazadas, ancianos e inmigrantes (59).

En España un estudio reciente en 102 escolares con edades entre 9 y 13 años realizado en Madrid entre los años 2007-2008 muestra que la ingesta de vitamina D es inferior a la recomendada en el 86,9% de los niños, encontrando un déficit moderado (considerado como 25(OH) D <50 nmol/L o 20 ng/ml) en 51% de los niños, y en un 8% el déficit es grave (<30 nmol/L o 11 ng/ml) (34). Este mismo grupo mide la asociación entre la grasa abdominal y el índice de masa corporal en niños escolares, encontrando como posible etiología de niveles de 25(OH) D insuficientes (<70 nmol/L o 30 ng/ml) un mayor IMC y grasa abdominal (54).

Asimismo, muchos de estos estudios encuentran diferencias entre niños sanos de piel blanca y negra, aumentando la prevalencia de déficit de vitamina D en aquéllos de piel negra (60). A este respecto Dong y col (61) realizan un estudio transversal en Estados Unidos en una latitud 33° N en 559 adolescentes entre 14-18 años, (45% negros y 55% blancos) teniendo en cuenta talla, peso, IMC y obesidad. Los adolescentes negros tuvieron niveles de vitamina D inferiores en todas las

Introducción.

estaciones. Se encontraron niveles de vitamina insuficientes (<30 ng/ml) en 94.3% y 83.1% de mujeres y hombres de etnia africana, comparado con 29.6% y 30.3% en adolescentes blancos. Déficit de vitamina D (<20 ng/ml) se observó en 73.8% y 46.9% de mujeres y hombres de etnia negra y sólo en 2.6% y 3.9% en el grupo de control de etnia blanca. Encuentran asociación en este grupo con la obesidad y la actividad física. Willis CM realiza un estudio en niñas prepúberes (edades entre 1-8 años) residentes en Georgia (34° Lat N). Los niveles de 25-(OH) vitamina D declinan con la edad tanto para mujeres blancas como negras, aunque estas últimas tienen niveles más bajos durante todo el estudio y la diferencia entre grupos es más marcada en otoño e invierno. La variación estacional es menor en niñas negras que en blancas(62).

Weaver et al (63) estudia en adolescentes de etnia blanca y negra las diferencias en cuanto a ingesta de calcio, absorción y retención del mismo y niveles en suero de las hormonas reguladoras del mismo. Los niveles de vitamina D son menores en negras que en blancas como ya se ha descrito en otras publicaciones (62, 64, 65), con un 82% de déficit en negras y 47% en blancas cuando se consideran niveles adecuados 30 ng/ml. Los niveles de vitamina D no influyen en la retención ósea

de calcio en este grupo. Las adolescentes negras tienen una mayor retención y absorción de calcio.

v. Déficit de vitamina D en pacientes con enfermedad de células falciformes y otras hemoglobinopatías.

Cuando nos centramos en la enfermedad de células falciformes, patología predominante en la etnia africana, los estudios sobre déficit de 25 (OH) D son escasos tanto en niños como en adultos.

Los estudios que comparan niveles de 25 (OH) D entre enfermos y sanos de características similares demuestran mayor déficit de vitamina D en el grupo de enfermos. Rovner y col. (66) estudian 61 niños africanos residentes en Philadelphia con ECF entre 9 y 18 años de edad, y los comparan con niños sanos de iguales características en cuanto a etnia, zona geográfica, edad. Encuentran déficit grave (niveles < 11 ng/ml en un 33% de los niños con ECF frente a un 9% en el grupo control. Un 93% de los niños con ECF Hb SS tienen niveles insuficientes (< 30 ng/ml) y un 90% de los controles, también. El riesgo de presentar déficit de vitamina D en niños homocigotos para la Hb S es 5,3 veces mayor frente a controles sanos (IC 95%). También describen menor masa ósea y aumento de PTH en los enfermos. Buisson et al (67) comparan los niveles medios de 25 (OH) D en niños de 5 a 18 años de etnia africana y enfermos, con niños africanos sanos y niños sanos de etnia caucásica, residentes en

Philadelphia, con un tamaño muestral (n=65) en cada grupo estudiado. Los niveles de 25 (OH) D son significativamente más bajos ($p < 0,0001$), en el grupo de enfermos ($29,4 \pm 15,5$ nmol/L), ($60,7 \pm 21,29$) en africanos sanos y ($84,6 \pm 23,5$) en etnia caucásica. Encuentran déficit, considerado como niveles inferiores a 27.5 nmol/L (20 ng/ml), en un 65% del grupo de enfermos. Sadat Ali y col. (68), en adultos de Arabia Saudi afectados de ECF Hb SS (n=186), encuentran que sólo 6% de mujeres y 10,5% de hombres tienen niveles de 25 (OH) D > 30 ng/ml, frente a un 70% en ambos sexos del grupo control (n = 200). Cuando miden el déficit de vitamina D considerado como niveles de 25 (OH) D inferiores a 20 ng/ml, un 92% de mujeres y un 73,8% de hombres enfermos respectivamente presentan déficit. La prevalencia de déficit en el grupo control es de un 11% en el grupo de mujeres y un 10% en hombres.

El resto de estudios encontrados no utilizan grupo control y se centran en individuos afectados de ECF. Lal y col. estudian 25 niños en California, entre 10 y 19 años, con ECF y manifestaciones graves. Los niveles de 25 (OH) D son inferiores a 20 ng/ml en el 74% de los estudiados (69). Chapelon y col.(70, 71) en un grupo de 53 niños inmigrantes en Francia con ECF y rango de edad entre 9-19 años, realizan un estudio transversal

Introducción.

analizando los niveles de 25 (OH) D. Un 76% presentan déficit de vitamina D considerado como niveles $< 12\text{ng/ml}$. Goodman BM y col. miden los niveles de 25 (OH) D en 142 adultos, encontrando niveles medios de 9ng/ml en Virginia y $12,8\text{ng/ml}$ en Chicago Un 98% de los estudiados tienen niveles insuficientes ($< 30\text{ ng/ml}$ de 25 (OH) D)(67).

En pacientes pediátricos con talasemia mayor el déficit de vitamina D tampoco está bien estudiado, aunque va ganando mayor interés en los últimos años (72). Los estudios muestran que el déficit comienza de forma precoz, antes de que se establezca el hipoparatiroidismo, y contribuye potencialmente a la disminución de masa ósea. Estudios en niños (73) (74) y adultos (75, 76) más actuales observan déficit de vitamina D que aumenta con la edad, al igual que en el caso de nuestra población y parece ser también multifactorial (77, 78).

vi. Osteopenia y osteoporosis.

En los últimos años la alteración de la masa ósea o la baja densidad ósea es un tema de atención constante. La masa ósea adquirida al final del desarrollo es el mejor parámetro para predecir el riesgo de fracturas en el futuro. El 25% de la masa ósea se adquiere en los dos primeros años de vida, el 90% a los 18 años y sólo un 10% por encima de esa edad. Clásicamente se define baja densidad ósea como alteraciones en la microarquitectura del esqueleto. El esqueleto humano se compone en un 85% de hueso cortical y un 15% de trabéculas. La densidad ósea de las trabéculas está influida por factores hormonales y metabólicos relacionados con la maduración sexual, por lo que la variabilidad de estadio puberal debe ser un factor a tener en cuenta en la correcta evaluación de densidad ósea en niños y adolescentes. Asimismo la etnia, edad, sexo, talla e índice de masa corporal son otras variables a tener en cuenta en la valoración de la densidad de masa ósea en población pediátrica.

Los clínicos en general están familiarizados con los términos **“osteopenia” (disminución de masa ósea) y “osteoporosis” (una pérdida más severa de masa ósea, asociada a un riesgo de fractura aumentado)**. Un 42% de

Introducción.

niños y un 27% de niñas sanos son susceptibles de sufrir una fractura entre los 0 y 16 años de edad (79). Los primeros estudios evaluando el papel de la salud ósea en las fracturas se realizaron en niños blancos en Nueva Zelanda (80, 81). Los estudios se limitan sobre todo a lactantes y niños pequeños, y en menor número a niños de mayor edad y adolescentes. Un estudio prospectivo en chicas finlandesas de 9 a 15 años muestra un 4% menos de densidad ósea en aquéllas con niveles más bajos de vitamina D (82). En adultos, esta desviación estándar se relaciona con un aumento del riesgo de fracturas al doble.

Un estudio prospectivo realizado en niños africanos entre 5 y 9 años de edad para investigar la relación entre el nivel de vitamina D y las fracturas, mide la salud ósea en función de los niveles en suero de 25 OH vitamina D y la densidad ósea medida mediante técnica de DEXA. El estudio concluye que un número significativo de niños con fracturas, tienen a su vez niveles bajos de vitamina D (59%) (83). El déficit de vitamina D parece tener un papel previamente desconocido en las fracturas en la edad pediátrica.

La Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (ISCD) recomienda que el término osteoporosis no se utilice en niños y adolescentes, reservándose para condiciones con

elevada morbilidad. Esto se debe a que los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se basan en t- score y DS-score, en los cuales los valores de densidad ósea se comparan con el pico estándar en mujer adulta joven sana. Osteoporosis se ha definido por OMS como una alteración sistémica del esqueleto, con baja densidad ósea, deterioro de la micro arquitectura del tejido óseo y aumento de la fragilidad ósea con susceptibilidad a las fracturas (Assessment of fracture risk and its application to cribado for postmenopausal osteoporosis...Geneva 1994). Según esto, osteoporosis se define como densidad de masa ósea (DMO) > 2.5 DS de la media y T score < 2.5 , y osteopenia como DMO entre 1-2.5 DS por debajo de la media. La OMS aplica estos valores en el caso de mujeres menopáusicas, y no a niños y adolescentes (84, 85).

La ISCD define la osteoporosis en niños como la asociación de una disminución de DMO y una historia de fracturas con fractura de hueso largo en miembros inferiores o aplastamiento vertebral, o dos o más fracturas de hueso largo en miembros superiores.

Baja densidad de masa ósea se define como un Z-score ≤ -2 ajustado para la edad, sexo, etnia y talla(86).

Se han descrito en pediatría diferentes formas de

Introducción.

osteoporosis primaria y secundaria. En general las osteoporosis primarias son raras y muchas de ellas con determinación genética o familiar, como el caso de la osteogénesis imperfecta, Ehler –Danlos, síndrome de Bruck, Marfan, homocistinuria,... Por el contrario, son numerosas las formas de osteoporosis secundarias asociadas a enfermedades neuromusculares, endocrinas, metabólicas, tratamientos con corticoides o inmunosupresores y patologías crónicas (particularmente enfermedades severas en las que los avances de la medicina han permitido mejorar la esperanza de vida gracias a protocolos de tratamiento agresivos, una mejor profilaxis, etc.). En estos casos la disminución de masa ósea y el aumento de riesgo de fracturas puede ser consecuencia de la enfermedad de base (disminución de actividad física, déficit de vitamina D, malabsorción, malnutrición, retraso de crecimiento y desarrollo puberal, inflamación, aumento de citoquinas, hospitalización prolongada etc.) y /o sus tratamientos (corticoides, inmunosupresores) (tabla 1).

Aunque por falta de estudios la ECF no se incluye en estas tablas, hay indicios que nos llevan a creer, que los pacientes con enfermedad de células falciformes tendrían varios factores de riesgo para padecer osteoporosis: aumento de

inflamación, movilidad reducida por ingresos y a menudo ejercicio físico disminuido, retraso de pubertad por su enfermedad crónica,...

“En nuestra opinión, ya que osteopenia y osteoporosis son términos cada vez más reconocidos en la práctica pediátrica como consecuencia de algunos tratamientos médicos y del aumento de enfermedades crónicas complejas, con aumento de la supervivencia y calidad de vida, es posible que debamos contar entre éstas a la ECF”.

Tabla I. Clasificación de osteoporosis en niños

<p><u>Osteoporosis primaria</u></p> <p>Osteogénesis imperfecta</p> <p>Osteoporosis idiopática juvenil</p> <p>Síndrome osteoporosis-pseudoglioma</p> <p><u>Osteoporosis secundaria</u></p> <p>1-Disminución de la movilidad</p> <p>Parálisis cerebral</p> <p>Espina bífida y lesiones de cordón espinal</p> <p>Distrofia muscular de Duchenne</p> <p>Atrofia de la musculatura espinal</p> <p>Lesiones de la cabeza</p> <p>Trastornos neurológicos desconocidos</p> <p>2-Alteración de las citoquinas inflamatorias</p> <p>Artritis idiopática juvenil</p> <p>LES</p> <p>Dermatomiositis</p> <p>Enfermedad inflamatoria intestinal</p> <p>Síndrome nefrótico</p> <p>Distrofia muscular de Duchenne</p> <p>Fibrosis quística</p> <p>Leucemia</p> <p>Trasplante de médula y órganos sólidos</p> <p>3-Alteraciones de la pubertad</p> <p>Talasemia mayor</p> <p>Anorexia nerviosa</p> <p>Daño gonadal secundario a radioterapia y/o quimioterapia</p> <p>Síndrome de Klinefelter</p> <p>Galactosemia</p> <p>4- Estado nutricional deficiente</p> <p>Anorexia nerviosa</p> <p>Enfermedad crónica sistémica</p> <p>Enfermedad inflamatoria intestinal</p> <p>Fibrosis quística</p> <p>Cáncer</p>
--

vii. Técnicas para la valoración de la DMO.

El método óptimo para la evaluación y seguimiento de la densidad ósea, es debatido en pediatría.

Los ultrasonidos permiten un seguimiento fácil, sin radiación con un alto cumplimiento, por lo que ganan interés en la actualidad (84, 87, 88). Las mediciones se realizan en falanges y mide amplitud, basándose en la velocidad del sonido y el tiempo de transmisión. Esta técnica, es capaz de diferenciar distintas enfermedades del hueso y realizar la detección precoz del deterioro del esqueleto en niños con leucemia (89). No existe sin embargo una validación clínica completa de la técnica. En nuestro conocimiento, la experiencia con esta técnica en niños con ECF es limitada (90). Sí existe mayor experiencia en niños y adultos con β talasemia mayor dónde Christoforidis y col. (91) comparan el grado de correlación de esta tecnica con la DEXA en 33 pacientes sin encontrar resultados acordes entre las dos técnicas, y concluyen que no es una buena alternativa para sustituir a la DEXA en pacientes talasémicos. Un estudio más reciente en niños del sudeste asiático con talasemia mayor, propone esta técnica como método de cribado para valorar el estado de salud ósea y decidir cuándo realizar DEXA en niños con mayor riesgo de osteoporosis (92).

La tomografía computarizada cuantitativa de columna lumbar realiza medidas en tres dimensiones (g/cm^3) y es capaz de diferenciar trabéculas de cortical (93, 94). Sin embargo, aunque parece una técnica ideal el problema es la radiación, mucho mayor que con la DEXA, y la mayor dificultad de realización. En pacientes talasémicos sin una adecuada quelación, los depósitos de hierro en el hueso pueden provocar un aumento de la atenuación de la señal en las trabéculas con una interpretación errónea de la DMO (95). Su uso periférico en huesos como la tibia se ha utilizado en pacientes con β talasemia y edad inferior a 18 años para evaluar parámetros de fuerza y densidad ósea frente a controles sanos, encontrando una cortical más delgada con menor circunferencia periosteal en talasémicos (96). En la literatura reciente un nuevo índice óseo pediátrico se ha propuesto mediante radiografías digitales de los huesos de la mano. Su valor clínico no ha sido aún bien establecido (93).

Resonancia magnética de alta resolución y micro tomografía computarizada son otras técnicas experimentales que podrían subsanar las limitaciones de la DEXA (97).

En este momento, las recomendaciones de la SIDC continúan siendo la guía de referencia e interpretación de la

densitometría ósea en niños(93, 98).

La SIDC, fundada en 1993 y dedicada a los avances y conocimiento de la densitometría ósea, considera la DEXA como la técnica más recomendada en la actualidad para la evaluación del contenido mineral óseo y la densidad ósea en todas las edades, a pesar de estar lejos del ideal en niños. Desde el año 2001 organiza conferencias para dar pautas sobre la interpretación de la técnica, control de calidad.

La DEXA hace medidas en dos dimensiones de un objeto tridimensional las medidas son expresadas en gramos/cm^2 de tejido óseo. La densidad ósea debería expresarse en g/cm^3 . En adultos esto tiene una importancia relativa, ya que la longitud del hueso no cambia a lo largo del tiempo; sin embargo el tamaño del hueso en los niños en crecimiento si cambia en tres dimensiones. Esto hace que la interpretación en niños sea problemática, sobre todo en aquellos con retraso en la maduración ósea respecto a la edad cronológica. Estos niños no deben ser comparados con los de su misma edad, sino con aquéllos en estado de maduración ósea similar. Los investigadores han intentado solucionar este problema realizando mediciones en vértebras en niños. Otro problema en la interpretación de DEXA en pediatría respecto a adultos, es el

Introducción.

cambio en la composición corporal extraósea y el aumento de médula ósea.

La posición oficial de un panel de expertos de la SIDC, sobre el valor de la DEXA en niños y adolescentes y diferentes tópicos se publicó en el año 2008 y posteriormente 2010 (85, 99, 100).

Tópico 1: predicción de fracturas y definición de osteoporosis en niños y adolescentes: Las fracturas son comunes en niños, sobre todo en huesos largos. Entre 27-40% de niñas y 42-51% de niños sufrirán alguna fractura durante el crecimiento (101-103). Aunque existe algún estudio prospectivos y meta análisis que postulan la relación entre disminución de masa ósea y riesgo aumentado de fracturas(104), se necesitan estudios prospectivos más grandes para confirmar este dato y la SIDC está de acuerdo en que osteoporosis en niños no debe diagnosticarse en base a este hallazgo.

Tópico 2: valor de la DEXA en niños y adolescentes con enfermedades que pueden afectar el esqueleto: La ECF no se considera en esta revisión en el grupo de enfermedades con riesgo de afectación del esqueleto y riesgo aumentado de fracturas; la única enfermedad hematológica incluida es la talasemia. Se revisa la literatura médica para determinar el

papel de la DEXA en el manejo clínico de estos pacientes, la frecuencia con que debe utilizarse la técnica en función de cada enfermedad y, en los casos en que se aplique algún tratamiento, cuál debería ser la monitorización del mismo. El panel de expertos concluye, que la DEXA es una técnica útil que debe utilizarse como parte del estudio de salud ósea en aquellas enfermedades de riesgo en niños. El momento en que debe iniciarse este estudio en niños es controvertido, concluyen que debería iniciarse a los 10 años en el caso de la talasemia, y en casos de inmovilización crónica en el momento en que aparezcan fracturas. Asimismo, la frecuencia en que sería óptimo repetir la prueba, también esta poco definida. El panel de expertos de la SIDC aconseja que el intervalo mínimo para detectar cambios en la DEXA sea de 6 meses. Este intervalo es útil en aquellos niños en que se lleve a cabo alguna medida terapéutica, y en los casos de enfermedad moderada bastaría con intervalos más prolongados.

En cuanto a un tercer problema, que sería la interpretación de la DEXA en niños y adolescentes, el panel de expertos tras discutir la localización más adecuada, concluye que la columna postero anterior y un estudio de todo el cuerpo excluyendo la cabeza son las zonas mejor reproducibles y fiables para la

Introducción.

densidad ósea en niños. La cadera y el fémur no deben considerarse localizaciones para realizar mediciones durante el crecimiento, debido a la gran variabilidad y falta de reproducibilidad. Los resultados deben ser ajustados para la talla o edad ósea y comparados con tablas de referencia pediátricas expresadas en Z-score, tomando también en consideración la edad sexo y etnia. Aunque se han realizado avances en el conocimiento de la DEXA y su utilidad en la edad pediátrica todavía quedan varias cuestiones por resolver acerca de la relación entre la densidad ósea en niños determinada mediante DEXA y el riesgo real de fracturas o la frecuencia óptima en niños con enfermedad crónica, para disminuir radiaciones innecesarias.

f. Tratamiento del déficit de vitamina D en niños.

En el momento actual el tratamiento del déficit de vitamina D en niños se basa para la mayoría de expertos en aumentar la ingesta de calcio y vitamina D, fomentar el ejercicio y mantener niveles óptimos de 25(OH) vitamina D.

Las recomendaciones de ingesta de vitamina D han cambiado a través del tiempo y aún en la actualidad son controvertidas. El hecho de que 100 UI de vitamina D prevengan las manifestaciones de raquitismo hace que se tenga la idea errónea de que la ingestión dos veces de dicha cantidad es suficiente para satisfacer las necesidades del organismo al respecto. Datos epidemiológicos y científicos sugieren que las necesidades de 25 (OH) D son >30 ng/ml para una salud óptima (105). Se ha estimado que por cada 100 UI ingeridas de vitamina D los niveles en sangre aumentan 1ng/ml (106); para alcanzar niveles de 30 ng/ml se precisarían 3000 UI de vitamina D al día. Hay evidencia asimismo de que cuando los niveles de 25 (OH) D son inferiores a 15 ng/ml, el organismo es capaz de hacer un uso más eficiente de vitamina D para aumentar los niveles hasta 20 ng/ml (107). Por lo tanto, sería necesaria una dosis de al menos 1000 UI de vitamina D al día en adultos para adquirir

Introducción.

niveles deseados.

Para algunos expertos existe la necesidad de aumentar las recomendaciones de las necesidades de vitamina D (108). Los recién nacidos reciben durante su primer año de vida 400 UI de vitamina D, y aumentar este aporte a 1000 UI/ día supondría beneficios adicionales de salud. Niños mayores de un año deberían ingerir al menos 400 UI de vitamina D según recomendaciones recientes de la Academia Americana de Pediatría (AAP) (109), pero sería importante aumentar la ingesta hasta 2000 UI de vitamina D por día. Adolescentes y mujeres prepuberales que reciben 2000 UI de vitamina D al día tienen un desarrollo muscular esquelético mejor, sin toxicidad añadida (110). Un estudio reciente en adultos que toman 50.000 UI de vitamina D en dosis única, cada dos semanas, durante seis años, lo que equivaldría a tomar 3000 UI diarias, muestra que mantienen niveles adecuados entre 40-60 ng/ml, sin toxicidad (111).

Mansbach (profesor en pediatría de la Universidad de Harvard, Boston) (112), que estudia la relación entre niveles de vitamina D y síntomas respiratorios en niños, también es partidario de aumentar las recomendaciones de vitamina D. Para él las actuales son suficientes para prevenir raquitismo, pero

insuficientes para otras patologías de riesgo asociadas al déficit de vitamina D.

Para otros autores se debe actuar con cautela en el aumento de las dosis de vitamina D. La evidencia entre la asociación del déficit de vitamina D con varias enfermedades es en su mayoría epidemiológica, lo que para autores como Greer no significa relación causa efecto. Deberían realizarse estudios controlados randomizados para demostrar prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer etc. (113). Recientemente este autor, colaborando con la AAP, ha revisado sus guías al respecto, recomendando aumentar las dosis de vitamina D de 200 UI a 400 UI para lactantes, niños y adolescentes. Este cambio se basa en el potencial papel de esta vitamina en mantener la inmunidad innata (109). La AAP espera que el Institute of Medicine (IOM), que actualmente recomienda 200 UI, se posicione al respecto y cambie no sólo las recomendaciones sino también las dosis máximas que en la actualidad son de 1000 UI/día para menores de 1 año y 2000 UI para mayores de 1 año.

El IOM, perteneciente a la Academia de las Ciencias, cuya misión es aconsejar para mejorar la salud de la población de EEUU y Canadá, en noviembre de 2010 publicó las referencias

Introducción.

sobre ingesta de calcio y vitamina D para esta población. Para este Comité de expertos en nutrición, no existe evidencia de los beneficios de la ingesta de calcio y vitamina D para otras cuestiones diferentes de la salud ósea; y la investigación debe continuar (114). Este grupo de científicos indica que 500 mg/día de calcio son suficientes para niños entre 1 y 3 años, 800 mg/día para el grupo de 4 a 8 años, y 1.300 mg/día en adolescentes. Determinar los niveles de vitamina D adecuados resulta más complicado, ya que provienen en parte de la dieta y también de la síntesis en piel tras la exposición a la luz solar. Asumiendo mínima exposición solar, este Comité determina que los niños de EEUU y Canadá necesitan 400 UI de vitamina D. El estudio NANHES encuentra que, mientras la media de ingesta de vitamina D es inferior a la recomendada, los niveles en sangre están por encima de 20 ng/ml, niveles que para este Comité son suficientes para una buena salud ósea. Sin embargo, reconocen excepciones para aquéllos que viven en instituciones, son de mayor edad o de piel oscura(114).

En los años previos, se realizaban determinaciones analíticas para determinar niveles de vitamina D de forma infrecuente; actualmente se realizan con más frecuencia, y esto ha aumentado la confusión acerca de la cantidad de vitamina D

necesaria. Los puntos de corte de suficiencia y deficiencia usados por los laboratorios varían y no están basados en estudios rigurosos. Si se usan puntos de corte superiores a 20, en la opinión de este Comité el número de personas con deficiencia en EEUU estaría sobreestimado.

Se recogen también los niveles más altos permitidos de ingesta de calcio y vitamina D para este Comité. En general cuando los niveles sobrepasan 400 UI / día, aumenta el riesgo de complicaciones. Niveles superiores a 10.000 UI/día se ha demostrado que causan daño renal y en tejidos. Opinión a tener en cuenta dada la gran cantidad de comida con suplementos de calcio y vitamina D en estos países. Para Holick los límites en niños serían de 5000 UI/día sin ningún efecto secundario(111).

La toxicidad debida a exceso de vitamina D se ha comunicado con dosis que sobrepasan las 10.000 UI/día (115, 116). Casos de hipercalcemia se han publicado con dosis superiores a 40.000 UI/día ó una dosis aislada de 300.000 UI. Los síntomas de hipercalcemia incluyen debilidad, cefalea, somnolencia, nauseas, estreñimiento, dolor óseo y sabor metálico

Durante muchos años se pensó que suplementar el déficit de vitamina D con vitamina D2 (ergo calciferol) y vitamina D3

Introducción.

(cole calciferol) tenía efectos equivalentes sobre el organismo humano. En este momento algunos estudios sugieren que los suplementos con vitamina D2 son menos eficaces en humanos (117). Un meta análisis realizado por Bischoff Ferrari y col. en adultos concluye que existe una mayor reducción de fracturas con el uso de vitamina D3(118). Por el contrario, el grupo DIPART (Vitamin D Individual Patient Analisis of Randomized Trials) no encuentra diferencias entre ambos tipos de vitamina D (119). En general, la vitamina D3, conocida como cole calciferol, es la forma de suplemento preferida en niños (120).

Aunque la evidencia continúa siendo confusa, cada vez hay más consenso en la opción del uso combinado de calcio y vitamina D, ya que para reducir fracturas no vertebrales esta combinación es superior al uso de vitamina D aislada. El éxito del tratamiento se asocia al cumplimiento más prolongado y a la administración de dosis más altas de vitamina D en los casos con mayor déficit. Un meta análisis en adultos encontró un descenso del riesgo de fractura de cadera del 26% en el grupo de pacientes que recibieron una dosis de 800 UI de vitamina D, frente a 400 (118). El resultado de un meta análisis publicado en 2007 (121), comparando el aporte de calcio frente a calcio y vitamina D a dosis de 800 UI, demuestra reducción en el número

de fracturas y aumento de densidad ósea en adultos. Asimismo, en 2009 la Cochrane analiza los resultados de ocho trabajos en los que se administra calcio y vitamina D, frente a diez con administración exclusiva de vitamina D, sin encontrar una relación significativa cuando se administra exclusivamente vitamina D en la reducción de fracturas, mientras que cuando se asocia calcio, al igual que en el trabajo anterior, se reduce el riesgo de fracturas en personas ancianas de forma significativa (122). Se necesitan estudios para definir dosis, duración de terapia, vía de administración y sobre todo estudios en la edad pediátrica. (118, 119, 123).

En cuanto a la administración parenteral de vitamina D (124), aunque existen estudios en niños comparando la vía oral frente a la parenteral sin aumento de efectos secundarios tras el uso de esta última, es una opción cada vez menos contemplada, prefiriéndose la opción de aumentar la dosis de suplemento oral y realizar un mejor control de adherencia al tratamiento (125)

En el momento de elaborar este trabajo con la revisión efectuada desconozco la existencia de ningún estudio publicado sobre tratamiento o profilaxis con vitamina D en niños con ECF.

El uso de bifosfonatos, ampliamente extendido en pacientes adultos con osteoporosis y otras patologías, es aún limitado en pediatría como se expone a continuación.

Los bifosfonatos son análogos de pirofosfato inorgánico resistentes a la rotura de enzimas en tejidos humanos. Actúan penetrando en los osteoclastos e inhibiendo la destrucción ósea.

Los nuevos bifosfonatos sintetizados en las últimas dos décadas son más eficaces que sus predecesores y con menor afectación sobre el crecimiento óseo, siendo su uso en niños más aceptado. Los bifosfonatos tienen actividad antiinflamatoria, regulando citoquinas como TNF, IL-1 e IL-6.

El uso de bifosfonatos es controvertido en la edad pediátrica; su uso se limita sobre todo a la osteogénesis imperfecta (OI). Un análisis realizado por la librería Cochrane en el año 2007, evaluando datos sobre el uso de bifosfonatos en osteoporosis secundarias en niños tras revisar 807 artículos potencialmente relevantes, de los que se aprobaron sólo 33 para su análisis, concluyendo que los estudios existentes en niños son insuficientes para apoyar el uso de estos fármacos como terapia estándar. Sin embargo, los datos sobre seguridad y eficacia sí justifican su uso compasivo en casos severos de fragilidad ósea con fracturas y/o dolor. En estos casos el beneficio a corto y

medio plazo supera los riesgos potenciales a largo plazo de estos tratamientos (126, 127).

En la actualidad no existe consenso acerca de la dosis, la duración de la terapia y el tratamiento óptimo, debido a la falta de estudios randomizados, comparando fármaco y dosis en diferentes circunstancias clínicas. Asimismo, la terapia es segura en adultos durante 10 años o más. En niños se desconoce la duración óptima. En niños con OI, Rauch F y col. (128, 129) demuestran que la terapia deja de incrementar la masa ósea tras 2-4 años de tratamiento. En general los adolescentes con OI mantienen la densidad ósea dos años después de suspender el tratamiento, mientras que en niños en etapas de crecimiento rápido, la densidad ósea no se mantiene al suspender el tratamiento. (130, 131).

Poyrazoglu et al publican su experiencia en 35 niños con OI en la que objetivan aumento de masa ósea, disminución de fracturas y disminución del turnover óseo (131). Rauch también realiza un estudio doble ciego con bifosfonato oral en niños con OI, demostrando también aumento de densidad ósea(129).

Bachrach y Ward (132) revisan el uso de bifosfonatos en niños con osteoporosis primaria y secundaria. No es posible realizar un meta análisis debido al uso de diferentes compuestos,

Introducción.

dosis y mediciones; sin embargo revelan algunas claves sobre dicho tratamiento. Los bifosfonatos incrementan la densidad ósea en niños con osteoporosis, pero los resultados son insuficientes para soportar la disminución de fracturas con dicho tratamiento. El efecto beneficioso en niños con osteogénesis se limita a los cuerpos vertebrales, respecto a los huesos largos, demostrándose aumento significativo en la densidad en L4-L5 tanto con tratamiento oral como intravenoso. El mantenimiento de la estructura de los cuerpos vertebrales conlleva el mantenimiento de la capacidad torácica y la función respiratoria (133, 134). Asimismo, los estudios controlados no reportan disminución del dolor y mejoría funcional, como se había descrito previamente en estudios observacionales (134). En general su uso debe ser cauteloso, limitado a 2-4 años y a la dosis mínima eficaz. La vida media de los bifosfonatos en hueso puede ser superior a 10 años una vez que se cesa la terapia, los tratamientos prolongados incluso a dosis estándar interfieren con la remodelación ósea, y las dosis muy altas producen osteopetrosis que no se resuelve al cesar el tratamiento(130, 132, 135).

En general, fuera del tratamiento de la OI, en otros casos como prevención primaria en enfermedades con alto riesgo de

fracturas hay estudios limitados y el uso de bifosfonatos no parece indicado para los expertos, los cuales consideran que sería necesario un total de 406 pacientes para realizar estudios controlados fiables con estos fármacos en niños (126, 136).

Los efectos adversos descritos en niños no son graves: fiebre, malestar general, náuseas, diarrea, dolor muscular y óseo son comunes al inicio del tratamiento. Efectos adversos más severos descritos en adultos, como uveítis, trombocitopenia o úlceras orales, son raros en niños. Hasta el momento de esta revisión no se ha publicado ningún caso de necrosis avascular de mandíbula en niños, también descrita en adultos (137, 235, 138, 139) .

En adolescentes se recomienda el uso de medidas anticonceptivas seguras, ya que la vida media de estos fármacos es prolongada y en el caso del alendronato y pamidronato el paso a través de placenta puede afectar al feto.

En general los expertos, fuera de patologías como la OI, recomiendan eliminar riesgos, incrementar ingesta de calcio y vitamina D, mantener niveles óptimos de 25 (OH) D, evitar sobrepeso...

i. Experiencia en el tratamiento del déficit de vitamina D en hemoglobinopatías.

El uso de bifosfonatos en el caso de osteoporosis establecida, del que no hay experiencia en niños ni adultos con ECF, sí está adecuadamente estudiado en adultos con TM. El mecanismo de acción se basa en inhibir los osteoclastos induciendo su apoptosis. Morabito y col.l (37) realizan un estudio randomizado para investigar el efecto de la administración oral diaria de alendronato durante dos años, frente a la administración de clodronato intramuscular y un placebo, sobre la masa ósea, los marcadores de turnover óseo, seguridad y tolerabilidad. La densidad ósea se reduce de forma significativa tanto en columna lumbar como cabeza femoral en el grupo que recibe placebo. Clodronato resulta ineficaz para aumentar la densidad ósea aunque reduce los marcadores de reabsorción ósea. Dosis diarias de alendronato oral normalizan el turnover óseo, y aumentan la masa ósea en columna lumbar y cadera. Los efectos adversos derivados del tratamiento con alendronato son escasos, siendo los más comunes los digestivos.

Tin Fan Leung (140); en un estudio retrospectivo, compara pacientes adolescentes y adultos con talasemia mayor en tratamiento con calcio y vitamina D, otros sin tratamiento y un

tercer grupo en tratamiento con bifosfonatos (pamidronato). Se trata de una muestra de pacientes pequeña ($n=39$), de los cuales sólo 7 reciben pamidronato. El Z-score mejora de forma significativa en columna ($P=0,018$) en el grupo que recibe pamidronato, manteniéndose sin cambios significativos en los otros grupos. Cuando se evalúan los cambios de DMO en cadera también se observa un aumento significativo estadísticamente ($p=0,028$) en el grupo tratado con pamidronato, con empeoramiento significativo ($p= 0,034$) en el grupo no tratado, y sin diferencias significativas en el grupo con tratamiento estándar. Concluyen que el tratamiento con calcio y vitamina D no parece ser eficaz para corregir la DMO, mientras que los bifosfonatos demuestran mejoría significativa

Otrock y col.(141) administran ácido zolendróico a 18 pacientes (adultos) diagnosticados de talasemia mayor o intermedia con osteoporosis. La medicación se administró a dosis de 4 mg intravenosos cada 3 meses durante 12 meses. La eficacia se monitorizó con mediciones de DMO mediante DEXA basal a los 6 y 12 meses del tratamiento. La DMO estaba en rango de osteoporosis en la medición basal, a pesar de una quelación y régimen transfusional adecuados. El tratamiento aumenta la DMO a nivel de columna lumbar y cadera y reduce la reabsorción ósea

Introducción.

y el dolor. Perifanis y col.(142) también publican la eficacia del ácido zolendrónico en pacientes talasémicos.

Mamtani M. y col. (143) realizan un metaanálisis sobre el uso de ácido zolendronico, en talasemia mayor seleccionando 4 estudios randomizados controlados (141, 142, 144, 145). Concluyen que los estudios randomizados controlados apoyan el uso de ácido zolendrónico para el tratamiento de la osteoporosis en talasemia. El mecanismo por el que mejora este fármaco la masa ósea no está claro, aunque parece existir una reducción en el turnover óseo. Los efectos secundarios con el uso de este fármaco son escasos. De forma adicional se disminuye el dolor y aumenta la actividad eritropoyética (146). Tras cesar el tratamiento el efecto sobre la masa ósea continúa de forma prolongada (147).

En general, las anomalías en la remodelación ósea son multifactoriales con múltiples factores genéticos y adquiridos tanto en la ECF como en otras hemoglobinopatías, entre las que destaca la talasemia mayor como la más estudiada al respecto. La osteoporosis es una enfermedad progresiva, por lo tanto un diagnóstico precoz es muy importante para iniciar medidas preventivas (148). En los enfermos con TM una valoración anual a partir de los 10 años de la densidad ósea se considera una medida indispensable. Potenciar la actividad física se considera

igualmente importante. Administrar calcio y vitamina D durante la infancia puede prevenir la pérdida de masa ósea y las fracturas (149). En pacientes con talasemia, evitar la sobrecarga férrica y una quelación adecuada son medidas de gran importancia para la salud ósea. El camino principal para prevenir osteoporosis en esta población parece ser la prevención del hipogonadismo (149-152).

Trabajos actuales en pacientes menopáusicas con osteoporosis, refuerzan la importancia de mantener niveles adecuados de 25 (OH) D en esta población, ya que observan una mejor respuesta a los bifosfonatos y más prolongada cuando los niveles de 25 (OH) D son superiores a 30 ng/ml.(153, 154).

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO DE DÉFICIT DE VITAMINA D Y SALUD ÓSEA EN NIÑOS CON ECF.

La ECF, presenta morbimortalidad y pluripatología asociada, tal como se resume en el apartado de introducción, y uno de los problemas relevantes de esta patología que condiciona su calidad de vida sobre todo en la edad adulta, son las alteraciones del metabolismo óseo. En la actualidad la mayoría de los pacientes afectos de ECF vive al menos hasta la edad adulta madura, y todos tienen potencialmente la posibilidad de llevar una vida productiva. Un estudio multicéntrico en Estados Unidos del año 1994 mostró una supervivencia media de 42 años en varones y 48 en mujeres; otro estudio en Jamaica aportó cifras de 53 años para varones y 58 para mujeres (155). La esperanza de vida en España no se conoce, pero es probable que sea similar o que haya mejorado por los cuidados de la última década, ya que múltiples avances en el manejo y calidad de vida de los pacientes con ECF se han conseguido en este periodo de tiempo.

Están abiertos en la actualidad diferentes campos de investigación para seguir avanzando en aportar los mejores cuidados a estos pacientes y disminuir morbi-mortalidad, y a este

Justificación.

respecto la prevención de la osteoporosis nos parece uno de gran interés. A este propósito, son numerosos los indicios que apuntan a que la osteoporosis podría convertirse en un problema de salud pública importante, sobre todo si se inicia a edades tempranas. En la actualidad el coste de esta patología en Estados Unidos por año es aproximadamente de treinta mil millones de dólares (44). Una adecuada salud ósea, con la consiguiente disminución del riesgo de osteoporosis y fracturas patológicas en la edad adulta, podría ser un notable paso adelante en la mejora de calidad de vida de estos niños.

La mayoría de niños y adultos tienen el máximo nivel de 25 (OH) D al final del verano y el nadir al final del invierno. Durante tiempo se ha asumido que una dieta variada y vivir cerca del Ecuador eran los requisitos necesarios para mantener niveles adecuados de vitamina D. Sin embargo, existen publicaciones de déficit de vitamina D en todas las latitudes geográficas, lo que parece poner en tela de juicio la importancia de este último factor(107).

En el siglo XXI se estima que más del 90% de niños en ciudades industrializadas del norte de Europa y el 80% de aquellos residentes en el noreste de Estados Unidos, presentan alteraciones esqueléticas que, sin ser un raquitismo verdadero,

se manifiestan como debilidad muscular, pobre erupción dental, con mala calidad de la misma(48).

En el caso de niños con ECF, el hueso está afecto por microinfartos, osteoporosis, osteomielitis u osteonecrosis, lo que se asocia a un riesgo elevado de fracturas y/o deformaciones óseas (156, 157). Un estudio retrospectivo realizado en 100 enfermos para conocer la morfometría de las vértebras toracolumbares encontró que estos pacientes pueden experimentar colapso vertebral secundario a osteoporosis o infartos vertebrales con hiperplasia de médula (158). Cuando la masa eritroide aumenta, como sucede en estos pacientes, desplaza las trabéculas óseas; esto, unido a osteoporosis produce colapso o fracturas vertebrales con más frecuencia. En este estudio encuentran en una muestra de 30 casos la característica deformación en “H” por hernia del disco dentro del cuerpo vertebral que se considera patognomónica de ECF. Realizan radiografías antero-posteriores y laterales a nivel de L2 con diferentes mediciones vertebrales que comparan con individuos sanos, demostrando que las vértebras de los afectados por ECF pesan menos y son más pequeñas, a excepción del diámetro sagital que es mayor debido a la hipertrofia medular.

Justificación.

Los factores que podrían condicionar un mayor déficit de vitamina D en niños con ECF serían:

1. Ingesta insuficiente con mayor incidencia de malabsorción en esta población.
2. Piel oscura con aumento de melanina.
3. Pobre actividad física.
4. Obesidad.

1. Ingesta insuficiente con mayor tasa de malabsorción en esta población.

La ingesta de calcio, vitamina D, vitamina E, folatos y fibra suele ser inadecuada en esta población , empeorando con la edad, sobre todo de los 4 años en adelante (159, 160). La alta prevalencia de intolerancia a la lactosa en esta población puede también contribuir a las deficiencias nutricionales. En Estados Unidos se estima que hasta $\frac{3}{4}$ partes de la población afroamericana presenta síntomas de intolerancia a la lactosa (161).

2. Piel oscura con aumento de melanina.

Aproximadamente el 90% de los requerimientos de vitamina D provienen de la exposición a la luz solar. Los

individuos de piel oscura necesitan 5-10 veces más tiempo de exposición que los de piel blanca para producir niveles similares de vitamina D. El pigmento de la piel (melanina) absorbe la radiación ultravioleta y disminuye la producción cutánea de vitamina D3. Esto podría explicar en parte la alta incidencia de déficit de vitamina D en población africana y descendientes (162, 163).

3. Pobre actividad física.

Otros factores de riesgo para los niños con ECF son una menor actividad física y una mayor necesidad de vitamina D frente a la población sana (164). A este respecto, hay estudios en sujetos jóvenes sedentarios, en los que tras 5-8 semanas de ejercicio aeróbico intenso se demuestran cambios en la remodelación ósea, reduciéndose la reabsorción (165, 166), sin cambios o sólo aumentos transitorios en la formación (167, 168). En contraste, el ejercicio anaeróbico o de resistencia induce aceleración en el *turnover* óseo, a expensas de un aumento de la formación con descenso o no variación de la reabsorción (169, 170). Probablemente sean necesarios unos meses de actividad para estabilizar la remodelación ósea. En general, sujetos sometidos a un entrenamiento alto tienen una

Justificación.

remodelación ósea estable durante la temporada deportiva, mientras que los sujetos sedentarios sufren modificación de los osteoblastos / osteoclastos después de un periodo prolongado de actividad física. El ejercicio en estos sujetos no parece tener un efecto importante a corto plazo (171).

4. Obesidad.

Otra causa asociada a déficit de vitamina D en niños y adolescentes es la obesidad, más frecuente en etnia negra. El mecanismo por el cual la obesidad afecta de forma negativa los niveles de vitamina D se desconoce; alguna hipótesis postula que quedaría atrapada en el tejido adiposo (172).

Por otra parte, se han realizado estudios que demuestran déficit en niños con ECF en diferentes latitudes, encontrando rangos de vitamina D muy similares (66, 69). Esto refuerza la hipótesis de que una cohorte como la nuestra no está exenta de padecer déficit de vitamina D a pesar de residir en un país con mucha luz solar.

La justificación de este trabajo de tesis doctoral, se basa en el interés que puede tener un mejor conocimiento del estado de salud ósea en pacientes con ECF, donde los estudios al respecto son escasos, sobretodo en la edad pediátrica. Los

resultados derivados de estos estudios, pueden tener repercusión sobre la calidad de vida de los pacientes afectos de dicha patología.

III. OBJETIVOS.

III. OBJETIVOS.

1. Evaluar la salud ósea en niños de la Comunidad de Madrid con ECF, analizando déficit de vitamina D, marcadores de formación y resorción ósea, y densidad mineral ósea.
2. Analizar factores de riesgo asociados a las alteraciones en la salud ósea de los niños con ECF.
3. Realizar un estudio piloto de tratamiento con calcio y vitamina D en niños con ECF y niveles de 25 (OH) D insuficientes para valorar el beneficio del mismo sobre esta población.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

a. Estudio transversal en niños con ECF.

Se realiza un estudio transversal en un periodo comprendido entre octubre del año 2008 y febrero de 2011, en una cohorte de niños con ECF residentes en la Comunidad de Madrid y seguidos en la Sección de Hematología Pediátrica del HGUGM, con el fin de conocer el estado de salud ósea de dicha población.

i. Población de estudio.

1. Pacientes seleccionados. Los 78 niños estudiados con ECF fueron reclutados a través de la consulta de hemoglobinopatías del HGUGM en visitas clínicas rutinarias entre el año 2008 y 2011. En su mayoría (92%), habían sido diagnosticados al nacimiento a través del laboratorio de cribado neonatal de alteraciones estructurales de la hemoglobina, centralizado en el mencionado hospital, que realiza el cribado de la enfermedad desde mayo del 2003 en todos los niños nacidos en la Comunidad de Madrid, y una minoría (8%) fueron diagnosticados por otros métodos (electroforesis) a edades más tardías, en su país de origen o en el nuestro tras sospecha clínica y derivados a

esta consulta para seguimiento.

Los pacientes incluidos en el estudio se encontraban en el momento del mismo con buen estado de salud y no habían presentado fiebre o episodios de dolor óseo en las dos semanas previas a las determinaciones de laboratorio.

2. Criterios de exclusión. Fueron excluidos niños con ECF con alteraciones conocidas que afectan al crecimiento, estado nutricional, ingesta adecuada, alteración crónica de la función hepática y /o renal.

Así como aquellos en tratamiento crónico con fármacos que se conoce producen alteraciones en el esqueleto.

3. Variables de estudio. Coincidiendo con alguna visita rutinaria del seguimiento realizado en estos pacientes, se recogen los datos demográficos referentes a grupo étnico, edad, sexo, gravedad de la enfermedad (medida como días de ingreso/año), historia de fracturas y su localización, tipo de anemia, profilaxis con vitamina D en primer año de vida y tiempo de lactancia materna. (Ver tabla recogida de datos, tabla II). Asimismo se realiza una exploración física del paciente reflejando el estadio puberal (tanner), peso y talla.

El Z-score de peso, talla e IMC, al no disponer de tablas de cálculo específicas de niños con ECF, ni tampoco de

pacientes inmigrantes africanos o afro-americanos nacidos o residentes en España se calculó con el sistema de cálculo antropométrico aconsejado por la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica, disponible en su página web y actualizada en el año 2008. (www.webpediatria.com).

Tabla II. Resumen de variables recogidas.

Sexo.
Edad.
Etnia: africano / afro- americano /caucasiano.
Peso.
Talla.
Índice de masa corporal.
Estadio Tanner.
Lactancia materna (meses).
Profilaxis vitamina D primer año (400 UI) (meses).
Tratamiento con hidroxurea.
Régimen transfusional.
Tipo anemia falciforme SS/SC/ S+/S-.
Gravedad enfermedad: días totales hospitalización/ año.
Fracturas: 0: no. 1: fx hueso largo extremidad inferior. 2: ≥ 2 fx de MMsup. 3: fx con compresión vertebral (éstos son los criterios clínicos de osteoporosis grave unidos a densitometría Z-score ≤ -2).
Densitometría 1: Z-score ≤ -2 2: Z-score > 2
Test de laboratorio.
Hemoglobina.
Reticulocitos.
25 (OH) D.
Calcio iónico.
Calcio total.
Magnesio.
Fósforo.
PCR.
PTH.
Fosfatasa alcalina ósea. Fosfatasa alcalina.
Osteocalcina.

ii. Métodos.

1. Pruebas de Laboratorio.

Descripción. Las extracciones de sangre se hicieron coincidir con otros controles previstos en los pacientes para seguimiento de su enfermedad, con el fin de no aumentar el número de visitas y analíticas en los mismos. Fueron realizadas en el laboratorio de extracciones del hospital por personal de enfermería y procesados en los laboratorios pertinentes. Las determinaciones se realizaron en diferentes trimestres del año. Los niveles de hemoglobina, reticulocitos, calcio total, iónico, magnesio, fósforo, proteína C reactiva, se midieron en el laboratorio de bioquímica del HGUGM.

El resto de estudios para conocer el metabolismo óseo, se realizan en el laboratorio de hormonas del HGUGM con las técnicas que se enumeran a continuación:

La vitamina D se mide mediante la determinación cuantitativa de la 25 (OH) D utilizando LIASON 25 OH Vitamin D TOTAL Assay (310600), un inmunoensayo competitivo directo por quimiluminiscencia para la determinación cuantitativa del total de 25 (OH) D en suero o plasma.

La hormona paratiroidea (PTH) se mide en muestra recogida en la mañana, para evitar interferencia con la elevación nocturna fisiológica de dicha hormona. Se analiza mediante el **analizador IMMULITE 2000**, un ensayo secuencial inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida que mide PTH intacta y discrimina entre pacientes normales y aquéllos con hiperparatiroidismo primario.

La osteocalcina es una proteína dependiente de la vitamina K de 5900 dalton que se ha descrito como una de las proteínas no de colágeno más abundantes en el hueso; contiene dos o tres residuos de ácido carboxiglutámico gamma (GLA); de ahí su designación como proteína GLA ósea (BGP).

En nuestros pacientes se realizaron mediciones de osteocalcina en suero, mediante ensayo inmunorradiométrico (IRMA), que mide osteocalcina humana intacta sin reactividad cruzada 1-43.

La fosfatasa alcalina ósea (FAO) se determina mediante el ensayo Acces Ostase, un ensayo in vitro inmunoenzimático en una sola fase.

Interpretación de los resultados. A lo largo del trabajo se tendrán en cuenta los siguientes valores de referencia para definir los niveles de vitamina D.

- **Déficit de vit D:** cifras de 25 (OH) D <20 ng/ml. (50nmol/L).
- **Vitamina D insuficiente:** valores de 25(OH)D entre 21-29 ng/ml (52,5- 72,5nmol/L).
- **Vitamina D normal:** valores 25 (OH) D > o =30 ng/ml. (75nmol/L).
- **Intoxicación por vitamina D:** se define como 25 (OH) D>150 ng/ml (350nmol/L) asociado a hipercalcemia, hipercalciuria e hiperfosfatemia.

En cuanto a la hormona paratiroidea (PTH):

Hiperparatiroidismo secundario, se considerará cuando los valores de PTH sean superiores a 50 ng/L.

2. Valoración radiológica de la DMO.

Descripción. El estudio elegido para realizar mediciones de la densidad mineral ósea, tras revisar la literatura existente en el momento de la realización de este trabajo de tesis doctoral basado en la experiencia actual en niños y las recomendaciones de la ISDC, es la densitometría (DEXA).

Se realiza a los niños con ECF a partir de los 3-4 años de edad, por considerar que a partir de dicha edad pueden colaborar para realizar de forma correcta la técnica sin necesidad de sedación, que conllevaría riesgos añadidos al paciente.

El equipo utilizado en este trabajo es el LUNAR DPXIQ 5539, que cumple las condiciones requeridas para el estudio en pediatría.

La absorciometría de rayos X de doble energía (DEXA) es una prueba rápida y bien tolerada. Las medidas se harán en columna lumbar y caderas (densitometría central), siguiendo las recomendaciones de la ISDC. Los equipos de densitometría central constan de una mesa plana sobre la que se tiende el paciente y un brazo suspendido sobre la cabeza que se desplaza durante la exploración a medida que se realiza el estudio. Utiliza para su funcionamiento radiaciones ionizantes, generando dos

haces de rayos X con diferentes picos de energía. Uno de los haces es absorbido por las partes blandas y el otro por el hueso. El equipo detecta la absorción de cada uno de los haces al atravesar al paciente, y con esa información y mediante un programa informático calcula la densidad mineral ósea del hueso explorado.

La radiación absorbida por el paciente es extremadamente pequeña, menos de la décima parte de una radiografía de tórax convencional.

En nuestros pacientes, las mediciones se realizarán en espina postero-anterior y se obviarán la cadera y zona proximal del fémur dada la gran variabilidad de estas zonas durante el crecimiento.

Los resultados son interpretados por un radiólogo y en el caso de los niños se expresan en Z-score, comparando con otros niños de su edad, tamaño, sexo y etnia.

No hay complicaciones previsibles con el procedimiento descrito.

Siguiendo las recomendaciones de la ISDC, la DEXA mide la densidad mineral ósea en gramos por cm^2 ; este valor es el cociente entre el contenido mineral óseo y el área estudiada.

Material y Métodos.

Los resultados se expresan en Z-score calculado como DS comparando con controles sanos de igual edad, sexo, talla y etnia.

La interpretación de los resultados a tener en cuenta en nuestro estudio será la siguiente.

- Se considerará Z-score patológico el inferior a -2 DS.
- Se interpretará como baja densidad mineral ósea u osteopenia un Z-score entre -1 y -2 DS.
- Estudio normal: Z-score > -1 DS.

En ningún caso un resultado de Z-score patológico por sí sólo será interpretado como osteoporosis en nuestro estudio. El diagnóstico de osteoporosis en niños sólo se hará si se cumplen las dos condiciones siguientes: una disminución de DMO y una historia de fracturas con fractura de hueso largo en miembros inferiores o aplastamiento vertebral, o dos o más fracturas de hueso largo en miembros superiores.

b. Estudio piloto de tratamiento con calcio y vitamina D.

Estudio prospectivo longitudinal de tratamiento con calcio y vitamina D en pacientes con déficit de vitamina D demostrado y ECF.

Se diseñó un estudio en niños con ECF y déficit de vitamina D demostrado para conocer la eficacia del tratamiento con calcio y vitamina D. Dicho estudio fue aprobado por el comité ético del HGUGM y se resume a continuación.

i. Objetivo.

Analizar si el tratamiento con vitamina D y calcio en niños de nuestra Cohorte con déficit de vitamina D demostrado es eficaz para restablecer los niveles óptimos de vitamina D y mejorar la densidad mineral ósea.

ii. Material y métodos.

Se realiza un estudio prospectivo longitudinal de tratamiento con vitamina D y calcio con una duración de 12 meses.

1. Pacientes.

Criterios de inclusión. Se reclutan niños seguidos en la consulta de hemoglobinopatías en los que se haya demostrado valores insuficientes de vitamina D, considerando como tales niveles de 25 (OH) D < 30 ng/dl) +/- densitometría alterada (definida como Z-score inferior a -2).

Criterios de exclusión. La densitometría por sí sola no será un indicador para iniciar tratamiento.

iii. Protocolo de actuación. Los niños se reclutan en el momento en que se conocen los resultados de la valoración inicial de su salud ósea.

Previo al inicio del tratamiento se realiza determinación de calcio/creatinina en orina, para la posterior monitorización de la toxicidad derivada del tratamiento.

Existe una hoja de recogida de datos y seguimientos en la historia clínica. Anexo1.

Todos reciben dosis de vitamina D3 oral: 800 UI /día y calcio elemento 30mg/kg/día.

Se podrán utilizar tratamientos combinados existentes en el mercado (calcio + vitamina D) siempre que la dosis sea suficiente para las necesidades del niño según las pautas recomendadas. En caso contrario, se utilizará por separado calcio

en comprimidos y vitamina D3 en solución. Los datos en cuanto a dosis recomendadas y presentaciones existentes en el mercado se resumen en el anexo de tratamiento 2.

El seguimiento se realiza en la consulta de hemoglobinopatías por los médicos de la Sección de Onco-Hematología, y las extracciones necesarias se hacen en el laboratorio de extracciones del Hospital Materno Infantil por el personal habitual del mismo.

El tratamiento del estado carencial se debe mantener al menos 3 meses o hasta que los niveles de 25 (OH) D alcancen 30 ng/ml. Posteriormente se debe continuar con la pauta de profilaxis (vitamina D a dosis de 800 UI) hasta completar 12 meses.

Se prefiere el empleo de vit D3 frente a D2 y la administración diaria o semanal frente a las megadosis.

iv. Monitorización del tratamiento:

A los tres meses de inicio de tratamiento:

Calcio/creatinina en orina.

Niveles de 25 (OH) D en suero.

Calcio, fósforo, magnesio y PTH.

Valoración de adherencia al tratamiento. Anexo 3.

Material y Métodos.

A los 6 meses de inicio de tratamiento:

Se repetirán los estudios de laboratorio.

Se realizará densitometría de control si la previa estaba alterada.

Si la densitometría previa es normal se realizará de forma anual.

Valoración de la adherencia al tratamiento.

Los controles de laboratorio se repetirán cada 3-6 meses hasta que el paciente tenga niveles normales de 25 (OH) D y pase a una pauta de profilaxis con control de 25 (OH) D a los 12 meses.

v. Métodos empleados para valorar el cumplimiento terapéutico.

No existe un método único para evaluar el cumplimiento sino que el control se basa en el empleo de varios métodos que nos ayuden a obtener con mayor exactitud la información del cumplimiento. Será necesario evaluar no sólo la cantidad del fármaco tomado, sino también el horario y las características.

Determinación de niveles de fármacos:

Este método es objetivo y, además de servir para valorar la adherencia también es útil para conocer la farmacocinética del fármaco evaluado. Nos da una información precisa de si el paciente tomó el tratamiento

Entrevista estructurada y cuestionarios:

Para que este método sea fiable requiere de la confianza y de este modo sinceridad por parte de la familia y del paciente con el equipo sanitario, para ser capaz de reconocer el fallo en el cumplimiento. Aun así existen a veces discrepancias al comparar este método con otros más objetivos, como es el contar las pastillas por medio de pastilleros electrónicos. El cuestionario incluye habitualmente preguntas sobre el horario de la medicación, el número de dosis omitidas en el último mes o la última semana, y los motivos por los que no se administró el fármaco, además de preguntar la importancia que la familia o el paciente concede a la medicación.

Registro de farmacia

La farmacia que dispensa la medicación puede, al llevar un registro de la medicación suministrada, aportar información sobre si la retirada de la misma es la correcta o hay demoras o faltas en la misma, con lo que de este método se podrá obtener si han faltado dosis para administrar.

Debe hablarse con la familia para buscar soluciones a este problema apoyando con personal o recordando la cita de la retirada de la medicación de la farmacia con distintos métodos

Material y Métodos.

dependiendo del equipo sanitario y de las características del paciente y su familia.

Estimación del equipo asistencial:

El equipo sanitario que realiza el seguimiento personalizado e individualizado del paciente y su familia puede apreciar según la entrevista clínica y los parámetros analíticos si el paciente es adherente a la medicación o no. Es también una apreciación subjetiva y no precisa. Estudios realizados en adultos indican que en muchas circunstancias se tiende a sobreestimar el cumplimiento del paciente(173) .

En nuestro trabajo se valorará mediante encuesta clínica y resultados de analítica, en las diferentes visitas al hospital.

Factores que predicen una buena adherencia:

- Apoyo del equipo sanitario para analizar las dificultades e intentar solventarlas.
- Conocer y asumir por parte de la familia que el tratamiento es de suma importancia para la salud del niño.
- Incorporar la medicación en la rutina diaria
- Poder tomar la medicación libremente delante de otras personas del entorno familiar.

Limitaciones en la adherencia en pediatría:

- Falta de formulaciones apropiadas para niños
- Necesidad de colaboración de un adulto responsable en la administración de la medicación.
- Falta de colaboración del paciente debido a la falta de revelación de la enfermedad por la edad.
- Interferencia en la vida cotidiana del niño (salidas, campamentos...)
- Estigmatización de la enfermedad y por ello ocultismo en el tratamiento.
- Efectos secundarios de los fármacos: inmediatos y a largo plazo.

c. Análisis estadístico.

Todos los datos se registraron en una base de la versión SPSS statistics 18 y fueron analizados posteriormente con la misma.

Para resumir la población estudiada se usó estadística descriptiva. Las variables cuantitativas se describieron con medidas de centralización: media, mediana, moda y varianza y desviación típica para valorar la dispersión y forma de distribución. La comparación se realizó mediante T de Student y

Material y Métodos.

ANOVA para muestras paramétricas, y U Mann- Whitney, Wilcoxon Kruskal- Wallis, para no paramétricas

Las variables cualitativas se expresan en frecuencias y porcentajes y se compararon por medio de Chi- cuadrado, prueba exacta de Fisher o test de Mc Nemar, en función de la muestra.

La correlación para conocer la relación entre variables cuantitativas se midió mediante coeficientes de correlación de Pearson en caso de correlación paramétrica, y Spearman en no paramétricas.

Se realizaron estudios de regresión simple y múltiple con el fin de encontrar modelos explicativos.

Para el análisis de medidas repetidas se utilizó el test de rangos de Wilcoxon y el modelo lineal general.

d. Consentimientos informados

Las familias o responsables legales de los pacientes fueron informados, obteniéndose un consentimiento informado de los mismos y un asentimiento en menores.

V. RESULTADOS.

V. RESULTADOS.

a. Estudio transversal para conocer el estatus de vitamina D en los niños con ECF de la Comunidad de Madrid.

i. Estudio descriptivo.

Las variables epidemiológicas y pruebas de laboratorio de la población estudiada se resumen en la tabla III.

De 78 pacientes estudiados, 44,9% fueron niñas y 55,1%, niños.

Se incluyeron niños entre 0 y 16 años. La media de edad en el momento del estudio fue de $4,8 \pm 4,3$ años. En cuanto a la etnia, el 66,7% son de origen africano (mayoritariamente del África subsahariana), 29,3% afro-americanos, y un 4% de otras etnias (asiáticos). El tipo de anemia de células falciformes predominante es la Hb SS (76,9%), seguido de SC (14,1%), representando la $S\beta^0$ y la $S\beta^+$ el 8,9% restante. El estadio tanner es prepuberal (estadios 1 a 3 de tanner) en el 93,6% de los pacientes.

Veintidós pacientes, que representa un porcentaje del 28,2%, reciben tratamiento con hidroxurea y sólo 6 pacientes (7,7%) están en régimen hipertransfusional en el momento de realizar este estudio. El 47,5% habían recibido profilaxis con vitamina D un tiempo medio de $8,49 \pm 4,7$ meses durante el primer año de vida. Asimismo el 99% fueron alimentados con lactancia materna

Resultados.

durante un tiempo medio de $3,94 \pm 2,8$ meses. La media de días ingreso / año fue de $7 \pm 3,4$ días, rango (0-98 días) y mediana de 6,5 días. El 85,1% ingresaron un tiempo inferior a 30 días año. Cuatro pacientes (5,3%) presentaban historia de fracturas, dos de ellos en huesos largos de miembros inferiores y dos en columna vertebral con aplastamiento; estos últimos tenían Z-score patológico.

En cuanto a las pruebas de laboratorio realizadas para estudiar la salud ósea en los 78 niños con ECF de nuestra muestra de pacientes, los resultados se exponen igualmente en la tabla III. Los niveles medios de 25 (OH) D en el estudio son de $21,50 \pm 13,4$ ng/ ml. Del resto de parámetros de laboratorio analizados, reseñar que la media de hemoglobina es de $8,89 \pm 1,48$. Los niveles de reticulocitos están aumentados $231.500 \pm 154.212,09$. En cuanto a los parámetros que miden el metabolismo óseo: la PTH tiene valores medios de $49,69 \pm 39,05$; La fosfatasa alcalina total, valores de $210,55 \pm 71,19$; la fosfatasa alcalina ósea, marcador sensible y específico de osteoporosis, presenta valores medios aumentados $62,80 \pm 27,58$; la osteocalcina niveles medios de $8,45 \pm 12,27$ (normales). Los valores medios de calcio total, calcio iónico, fósforo y magnesio están dentro de la normalidad.

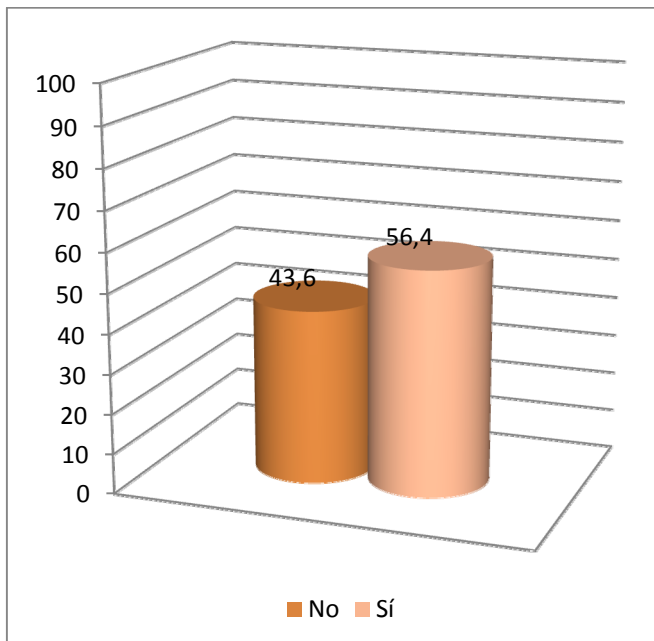
Tabla III. Datos epidemiológicos y de laboratorio de la muestra estudiada. (N=78).

Sexo	N (%)	Media± DS	Rango	Mediana			
Varón	43 (55,1)						
Mujer	35 (44,9)						
Edad (años)	78	4,8±4,3	0-16	3,50			
Estadio puberal							
Prepuberal	73 (93,6)						
Puberal	5 (6,4)						
Etnia							
Africana	53 (66,7)						
Afro-americana	22 (29,3)						
Otra (asiática, hindú)	3 (4)						
Tipo Hb							
Hb SS	60 (76,9)						
Hb SC	11 (14,1)						
Hb Sβ+	4 (5,1)						
Hb Sβ ⁰	3 (3,8)						
Tratamiento							
Hidroxiurea	22 (28,2)						
Régimen transfusional	6 (7,7)						
Fracturas							
Huesos largos	2 (1,56)						
Aplastamiento vertebral	2 (1,56)						
Días ingreso/año							
<30 días	(85,1)						
30-90	(7,5)						
>90	(7,5)						
Profilaxis vitamina D (meses)	(47)	3,94±2,88		1			
Laboratorio	N	Rango	Media (DS)	Mediana	Varianza	Asimetría	normal
25(OH)D ng/ml	78	4-66,80	21,50 (13,14)	17,90	172,70	1,30	30-100
Hb g/dl	78	5-11,30	8,87 (1,48)	8,95	2,21	-0,37	13-17
Reticulocitos	71	26-676800	231500,70(154212,9)	202.000	237813713	0,94	20-75
Calcio T mg/dl	78	7,40-11	9,59 (0,52)	9,60	37,04	-0,63	8,8-10,8
Calcio iónico mmol/L	66	0,64-1,30	1,12 (0,12)	1,13	0,27	-0,94	0,9-1,25
Mg ml/dl	76	1,70-3	2,22 (0,24)	2,20	0,01	0,68	1,6-2,5
P mg/dl	69	4-7,10	5,56 (0,65)	5,40	0,05	0,13	2,5-4,5
PTH ng/L	76	6-185	49,69 (39,09)	37	0,42	1,84	14-50
FA U/L	69	64-461	210,5(71,19)	206	1528,43	0,73	35-281
FA ósea mcg/L	46	19-115	62,80 (27,58)	57	760,73	0,57	3-15
Osteocalcina mcg/L	48	1-59,10	8,45 (12,27)	3,50	150,57	2,80	3-23
PCR mg/dl	56	0,10-2,60	0,47 (0,56)	0,25	0,32	2,04	0,0-0,5

Resultados.

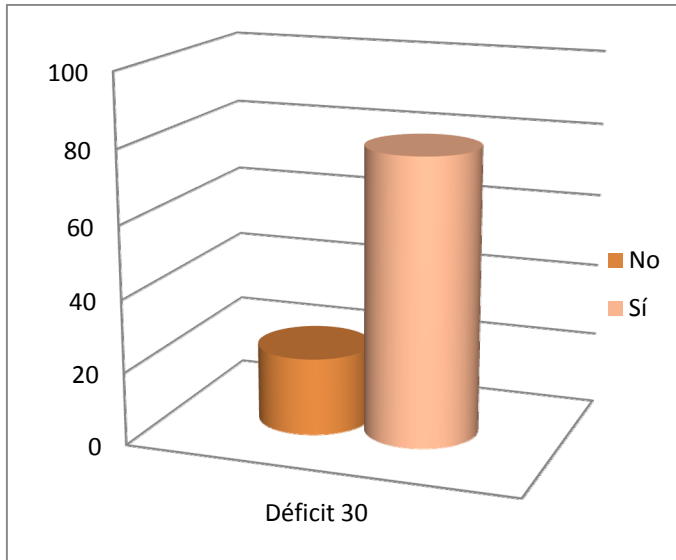
Según lo expuesto previamente en la Sección de Introducción, referente a la definición de déficit de vitamina D, cuando éste se considera como valores inferiores a 20 ng/ml. encontramos que un 56,4% de nuestros niños tienen déficit de vitamina D, frecuencia que aumenta hasta un 79,5% cuando el déficit se considera como un nivel de 25 (OH) D inferior a 30 ng/ml. Es importante reseñar que un 17,9 % tiene niveles de raquitismo (niveles inferiores a 10 ng/ml) sin manifestaciones clínicas. Figuras 1-3.

Figura 1. Déficit de 25 (OH) D considerado como niveles < 20 ng/ml.



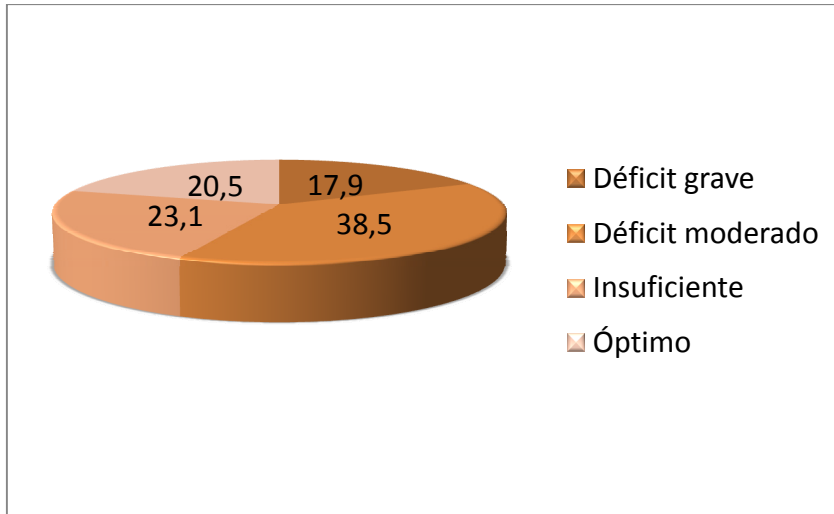
El gráfico muestra el porcentaje de niños con déficit de vitamina D en nuestra cohorte (56,4%), cuando dicho déficit se considera como niveles de 25 (OH) D, inferiores a 20 ng/ml.

Figura 2. Déficit de 25 (OH) D considerado como niveles < 30 ng/ml.



En el gráfico actual el porcentaje de niños con déficit de vitamina D es del 78,7%, cuando dicho déficit se considera como niveles de 25 (OH) D inferiores a 30 ng/ml.

Figura 3. Niveles de 25 (OH) D de la población estudiada.



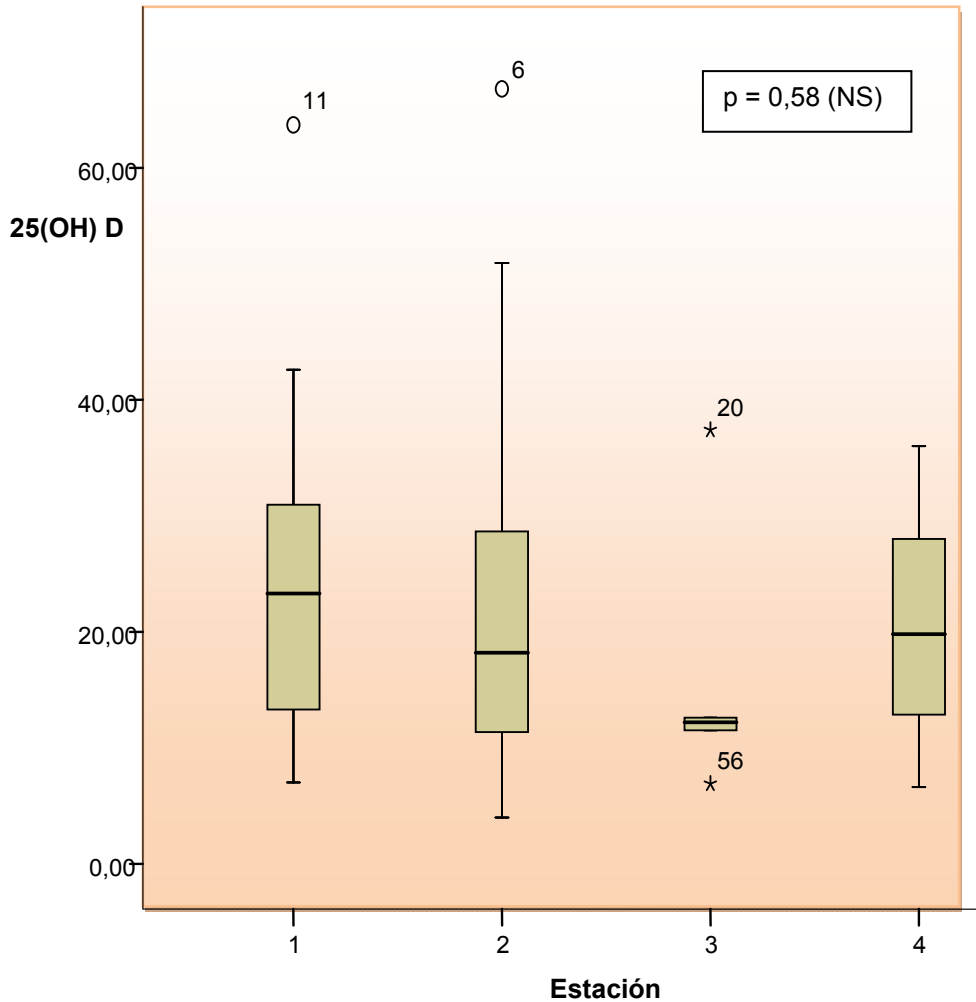
En el gráfico de sectores se representan los diferentes porcentajes de pacientes en función de sus niveles de 25 (OH) D. Déficit grave se considera cuando los niveles de 25 (OH) D son inferiores a 10 ng/ml, lo que equivaldría a una situación de raquitismo. Déficit moderado, niveles de 25 (OH) D entre 10-19 ng/ml. Niveles insuficientes para una adecuada salud ósea serían los comprendidos entre 20-29 ng/ml, y óptimos aquellos que son iguales o superiores a 30 ng/ml.

Debemos resaltar que sólo el 20,5% de nuestros niños tienen en el momento del estudio niveles óptimos de vitamina D (≥ 30 ng/ml., considerados como necesarios para conseguir una buena densidad mineral ósea. Asimismo, un 17,9% tienen niveles < 10 ng/ml, lo que corresponde a una situación de raquitismo. Un 38,5% tienen niveles entre 10 y 19 ng/ml, considerados como déficit moderado, y un 20,5% valores de 20 a 29 ng/ml, insuficientes para una salud ósea adecuada, según lo ya expuesto previamente en el apartado de introducción del presente estudio.

En un principio las determinaciones se realizaron en primavera, estación en la que se describe el nadir en los niveles de 25 (OH) D en enfermos de ECF, pero posteriormente se amplió la toma de muestras a diferentes estaciones del año, con el fin de analizar si existía una diferencia significativa entre los niveles de 25 (OH) D encontrados en las estaciones del año con más luz solar frente al resto, sin encontrarse diferencias significativas ($p > 0,58$). Utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, el valor más bajo se encuentra en los meses de verano, si bien las determinaciones realizadas en ese trimestre del año fueron escasas y, como ya se ha expuesto, sin valor estadístico. Todo ello se resume en el siguiente diagrama de cajas (figura 4).

Resultados.

Figura 4. Niveles de vitamina D en los diferentes trimestres del año.



1. Invierno. 2. Primavera 3. Verano 4. Otoño.

El diagrama de cajas resume los niveles medios de 25 (OH) D en los diferentes trimestres del año que equivaldrían a las diferentes estaciones: 1. Invierno 2. Primavera 3. Verano 4. Otoño. No se observan diferencias estadísticamente significativas.

Dado que la media de edad de nuestra muestra en el momento del estudio es baja ($4,8 \pm 4,3$), parece interesante analizar las características de esta población por separado. Cuando se estudia por separado el grupo de niños con edad inferior a 5 años ($n = 46$), que representa el 58,97% de nuestra cohorte, encontramos que a estas edades tempranas sólo el 32,6% de los niños tienen niveles de 25 (OH) D ≥ 30 ng/ml. considerados como óptimos para una salud ósea adecuada, aunque el porcentaje de hiperparatiroidismo secundario es aún bajo (6,7%).

Tabla IV. Niveles de 25 (OH) D e hiperparatiroidismo en menores de 5 años.

	N	Porcentaje%
25 (OH) D < 20 ng/ml	19	41,3
25 (OH) D < 30 ng/ml	31	67,4
Déficit vitamina D		
Grave	3	6,5
Moderado	16	34,8
Nivel insuficiente	12	26,1
Nivel óptimo	15	32,6
Hiperparatiroidismo secundario	3	6,7

Resultados.

Los resultados recogidos en la tabla en niños menores de 5 años muestran que a una edad temprana el porcentaje de niños con déficit de vitamina D, cuando éste se considera como niveles inferiores a 20 ng/ml es de un 41,3% y asciende a 67,4% cuando el nivel de déficit se aumenta a valores inferiores a 30 ng/ml. Asimismo, un 6,5% de los niños tiene niveles 25 (OH) D < 10 ng/ml considerados como niveles de raquitismo, y sólo un 32,6% mantiene a esta edad los niveles considerados como óptimos para conseguir una adecuada masa ósea (\geq 30 ng/ml). Sólo el 6,7% precisa aumentar sus niveles de hormona paratiroidea para mantener niveles correctos de calcio en sangre.

ii. Estudios de correlación y modelos explicativos.

Una vez analizada la muestra de niños con ECF mediante estadística descriptiva, y objetivado el déficit de vitamina D en un porcentaje muy importante de la misma, se pretende buscar qué variables se asocian a dicho déficit, variables que podrían explicarlo con vistas a poder realizar una intervención precoz y adecuada en esta población.

El primer paso en este sentido fue realizar estudios de correlación con tests paramétricos, Pearson y no paramétricos Spearman para medir fuerza de asociación entre variables cuantitativas. Los resultados son los siguientes: cuando se correlacionan variables cuantitativas mediante el test paramétrico de Pearson, se encuentra que existe fuerza de asociación entre la edad en el momento del estudio y los niveles de 25 (OH) D (-0,560, $p = 0,000$), siendo esta asociación negativa, es decir, a mayor edad, niveles más bajos de 25 (OH) D. Igualmente existe una correlación inversa entre niveles de 25 (OH) D y Z- score de la talla (-0,325, $p = 0,05$) y la PTH (-0,388, $p = 0,000$), existiendo correlación lineal con el fósforo (0,326, $p = 0,007$) y el magnesio (0,305, $p = 0,008$). En este último parámetro se ha realizado correlación de Spearman por no tener la muestra una distribución normal.

Resultados.

El resto de parámetros analíticos (osteocalcina, fosfatasa alcalina total, fosfatasa alcalina ósea, hemoglobina, reticulocitos, hierro, ferritina, proteína C reactiva) no muestran asociación en este estudio con los niveles de 25 (OH) D.

Tabla V. Estudios de correlación con resultado significativo $p < 0,01$.

	25(OH)D	Correlación Pearson	Significación bilateral p
Z-Talla		-,325	,005
Edad		-,560	,000
PTH		-,388	,001
Fósforo		,326	,007

Resultados significativos en los diferentes estudios de correlación entre variables cuantitativas.

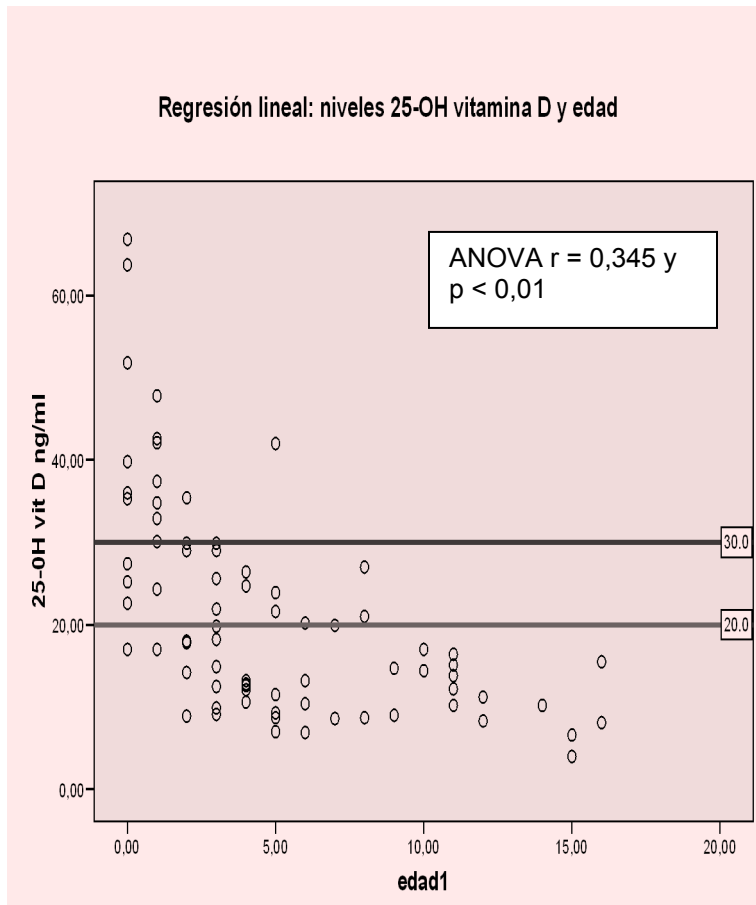
Dado que la correlación mide fuerza de asociación entre variables, pero no causa–efecto, se realizan estudios de regresión lineal simple y múltiple en un intento de encontrar un modelo explicativo para el déficit de vitamina D encontrado en nuestra población.

Del análisis de regresión simple entre las diferentes variables cuantitativas, siendo la variable dependiente los niveles de 25 (OH) D, cabe destacar que cuando se analiza la asociación lineal con la edad en el momento del estudio, como variable predictora o explicativa, el test de ANOVA de la regresión es significativo ($p < 0,01$) r cuadrado de 0,345. La edad es capaz de explicar el 34,5% de la variabilidad observada en los niveles de 25 (OH) D.

Figura 5.

Resultados.

Figura 5. Estudio de regresión lineal simple entre niveles de 25 (OH) D y edad en el momento del estudio.

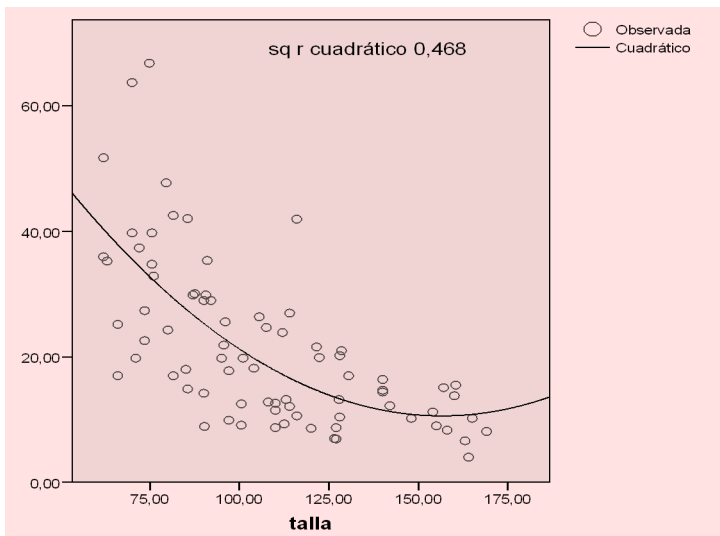


La figura 5 muestra la asociación lineal entre las dos variables cuantitativas: edad y niveles de 25 (OH) D. Se puede observar cómo en nuestra muestra existe déficit de vitamina D desde el primer año de vida. Asimismo, a partir de los 5 años ninguno de los niños seguidos en nuestro centro tiene niveles de 25 (OH) D ≥ 30 ng/ml considerados como óptimos para una buena salud ósea. A medida que la edad aumenta los niveles descienden, siendo inferiores a 20 ng/ml para todos los niños por encima de los diez años de edad.

En los estudios de regresión múltiple, cuando se añaden otras variables, se encuentra que el mejor modelo predictivo o explicativo se obtiene con talla, peso y días de ingreso, obteniendo r cuadrado corregido de 0,527 con $p < 0,01$, perdiendo valor la edad. Los parámetros analíticos y otras variables cualitativas como sexo, etnia, lactancia materna o profilaxis con vitamina D en el primer año de vida no explican el déficit de vitamina D en la muestra estudiada. Figuras 6, 7 y 8.

Figuras 6-8. Variables predictoras en los estudios de regresión múltiple del déficit de 25 (OH) D.

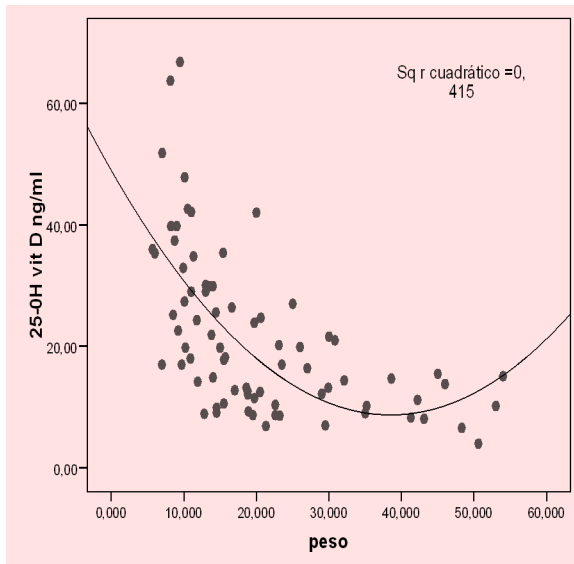
Figura 6.



β negativo.(-1,446) p 0,000.

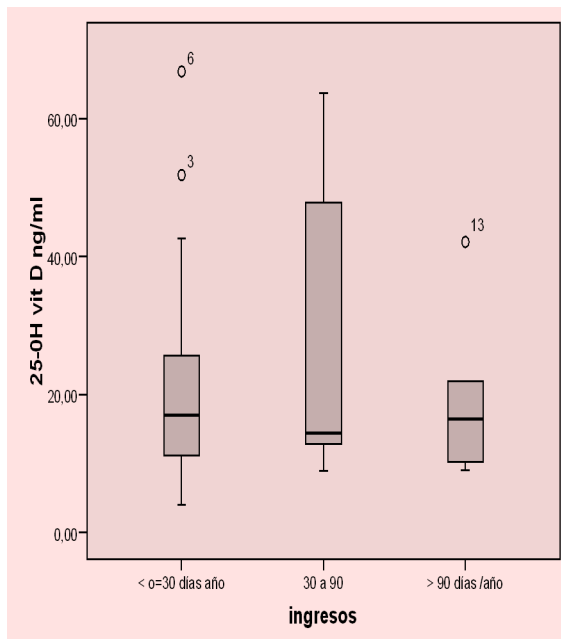
Resultados.

Figura 7.



P 0,07

Figura 8.



p 0,046

En las figuras 6 a 8 se muestran los diferentes gráficos de las variables independientes

Resultados.

que combinadas en el análisis de regresión múltiple con la variable dependiente (niveles de 25 (OH) D consigue el mejor modelo explicativo en este trabajo. 25 (OH) D es la variable dependiente y talla, peso y días de ingreso son las variables predictoras con las que se consigue el mejor modelo predictivo en este trabajo. La talla es la variable que mejor predice los niveles de 25 (OH) D (r cuadrado corregida de 0,453); talla y peso juntas, r cuadrado corregida de 0,495; y cuando se introduce talla, peso y días de ingreso, la r cuadrado corregida aumenta a 0,527. La edad pierde valor en los estudios de regresión múltiple, considerándose una variable de confusión.

iii. Comparación de medias mediante test de T- student.

Cuando se comparan los niveles medios de 25 (OH) D en función de variables como el sexo, tipo de hemoglobinas mayoritarias (HbSS, Hb SC), lactancia materna y tiempo de la misma (< 3 meses, ≥ 12 meses), etnia (africana, afroamericana), no se encuentran diferencias estadísticamente significativas, aunque la etnia africana tiene niveles medios de 25 (OH) D inferiores a la afroamericana. Etnia africana: (n = 53), $M \pm DS$ (20,19 \pm 11,71). Etnia afroamericana: (n = 22) $M \pm DS$ (25,80 \pm 16,01) $p = 0,095$.

La única diferencia estadísticamente significativa entre medias se encuentra cuando se compara el grupo que recibe profilaxis con vitamina D durante el primer año, respecto al que no la recibe, independientemente del tiempo de la misma (el tiempo medio en meses de profilaxis recogido por encuesta es de 8,70 \pm meses). El grupo que no recibe profilaxis tiene niveles de 25 (OH) vitamina D de 18,03 \pm 9,73 frente al que sí recibe, cuyos niveles son de 25,70 \pm 15,58 T- student significativo $p = 0,026$.

iv. Hiperparatiroidismo secundario.

La hormona paratiroidea es el único parámetro de reabsorción ósea alterado en nuestro estudio, encontrándose aumentada en un 25% de los niños (n = 76). Del resto de variables relacionadas con el metabolismo óseo que miden formación ósea, sólo la fosfatasa alcalina ósea se encuentra aumentada, encontrándose la osteocalcina y fosfatasa alcalina en rango de valores normal para la edad de los pacientes, por lo que no aportan información relevante en el seguimiento de nuestra población.

Los estudios de correlación lineal de Pearson se resumen en la tabla VI.

Tabla VI. Resumen de las variables que presentan correlación significativa con la hormona paratiroidea.

	PTHng/L	Correlación Pearson	p
Edad		,533	,000
Peso		,519	,000
Talla		,558	,000
25(OH)D		-,396	,000
Fósforo		-,251	,039

Resultados.

Encontramos correlación lineal de Pearson entre los niveles de PTH, la edad en el momento del estudio, el peso y la talla con un nivel de significación $< 0,01$.

Asimismo, se observa una correlación inversa entre los niveles de 25-OH vit D, PTH y el fósforo ($p < 0,05$); es decir, descensos en los niveles de 25 (OH) D y/o fósforo conllevan aumento de PTH.

Entre los estudios de regresión lineal simple entre la variable PTH y el resto de variables cuantitativas estudiadas, se debe reseñar la asociación inversa entre niveles de 25 (OH) D y valores alterados de PTH (superiores a 50 ng/L) Figura 9.

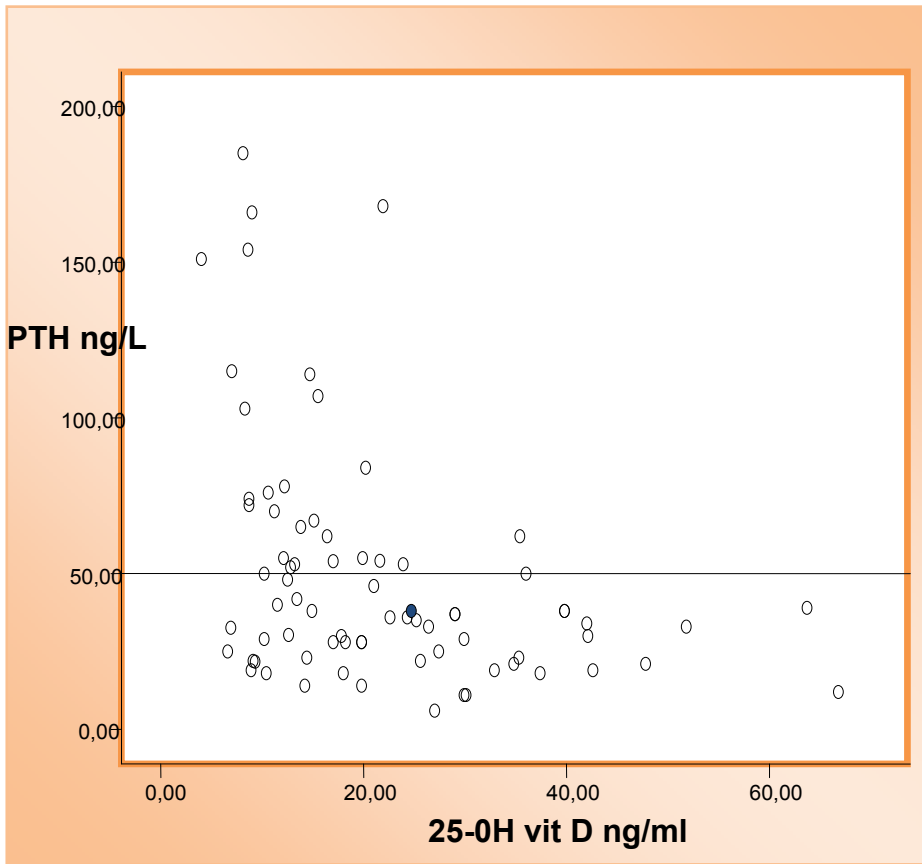
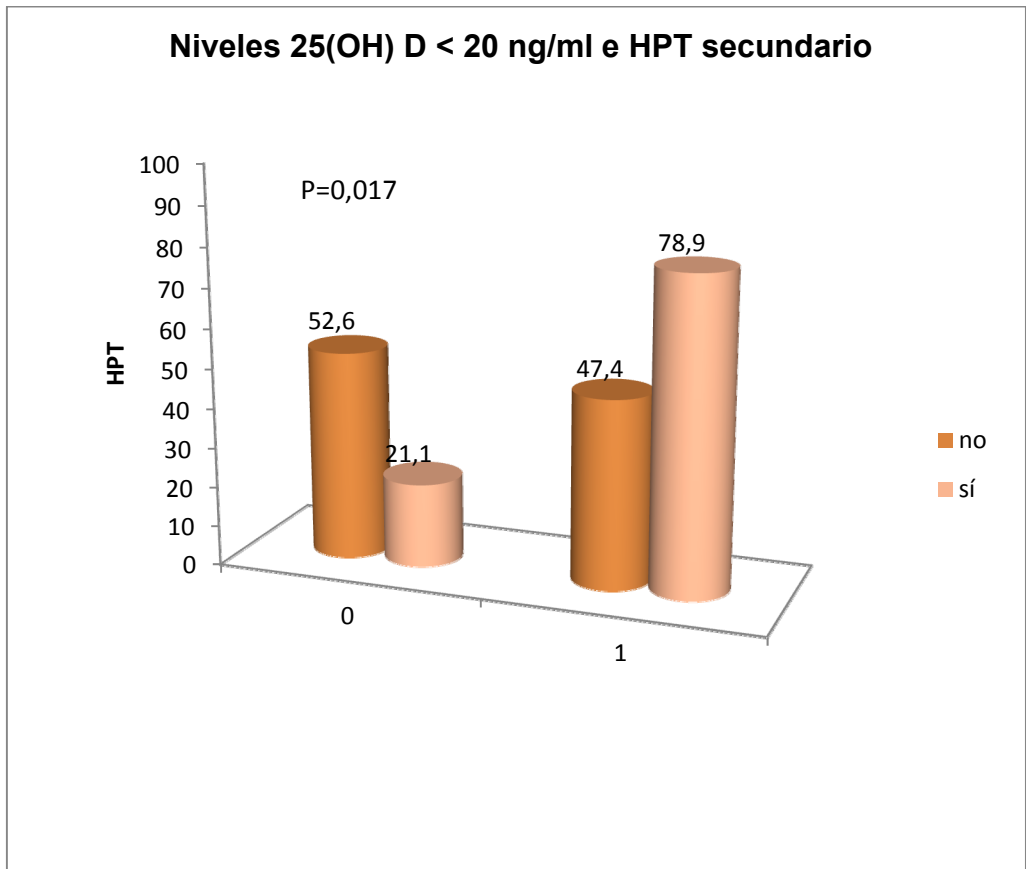
Figura 9. Regresión lineal entre los niveles de PTH y 25 (OH) D

Gráfico de dispersión simple entre dos variables cuantitativas (PTH y niveles de 25 (OH) D). Los niveles de PTH superiores a 50 ng/L, valor considerado en nuestro estudio como hiperparatiroidismo, se observan de forma predominante cuando los niveles de 25 (OH) D son inferiores a 20 ng/ml.

Este mismo hallazgo se confirma cuando se analizan tablas de contingencia con el test de chi- cuadrado, encontrando un porcentaje de hiperparatiroidismo del 78,9% cuando los niveles de 25 (OH) D son inferiores a 20 ng/ml, frente a un 21, 1% cuando dichos niveles son iguales o superiores a 20 ng/ml.

Resultados.

Figura 10. Resumen del porcentaje de niños con hiperparatiroidismo en función de los niveles de 25 (OH) D inferiores o no a 20 ng/ml.



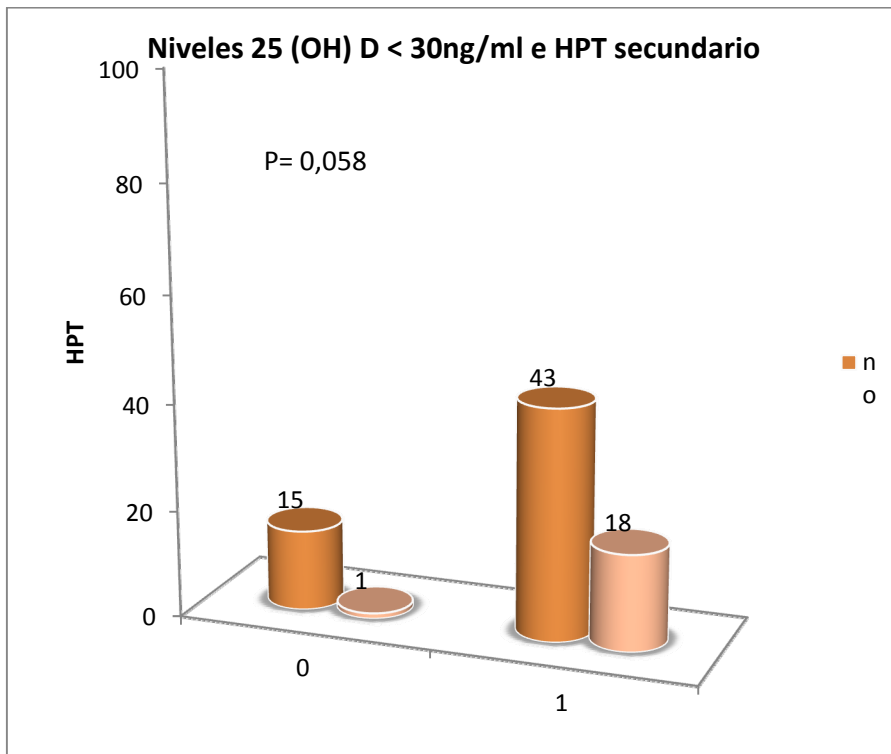
0= valores de 25 (OH) D \geq 20 ng/ml, 1= valores de 25 (OH) D < 20 ng/ml.

HPT: sí, no.

Quando se realizan los mismos estudios con niveles de 25 (OH) D <30 ng/ml. los resultados no son estadísticamente

significativos $p= 0, 099$ con la prueba exacta de Fisher. Sólo 18 pacientes tienen niveles 25 (OH) D inferiores a 30 ng/ml e HPT secundario.

Figura 11. Resumen del porcentaje de niños con hiperparatiroidismo en función de los niveles de 25 (OH) D inferiores o no a 30 ng/ml.



0= valores de 25 (OH) D ≥ 30 ng/ml, 1= valores de 25 (OH) D < 30 ng/ml.

HPT: sí, no.

Resultados.

b. Valoración de la densidad mineral ósea mediante densitometría en niños con ECF.

Los resultados estadísticos descriptivos en el grupo de pacientes en que se realiza DEXA para valorar la masa ósea se resumen en la tabla VII.

Se analizan datos de una muestra de cuarenta niños en los que se ha realizado la técnica descrita en el texto entre octubre de 2009 y septiembre de 2011.

La edad media en el momento del estudio fue de $7,97 \pm 3,95$ años; el valor medio de la DEXA expresado en Z-score es de $-0,91 \pm 1,46$ con un rango de valores mínimo de $-5,30$ y máximo de $2,30$. Los datos analíticos más próximos al momento del estudio radiológico muestran una Hb media de $8,74 \pm 1,36$, reticulocitos de $191.470,08 \pm 101.918,34$, valores de ferritina media, $261,21 \pm 317,28$; hierro, $93,05 \pm 41,61$, PTH $65,33 \pm 47,61$; niveles de 25 (OH) vitamina D, $16,89 \pm 8,28$, y FAO aumentada: $57,93 \pm 26,63$.

En cuanto a las variables cualitativas, el 35% son niñas y un 65% niños, la etnia predominante es la *africana* (62,5%), seguida de afro-americana (30%), el tipo de hemoglobina predominante es la Hb S homocigoto (85%), el estadio tanner es prepuberal en la mayoría (77,5%). En cuanto al tratamiento, un 37,5% recibe

tratamiento con hidroxurea oral y un 12,5% está en régimen transfusional por riesgo de accidente cerebro-vascular.

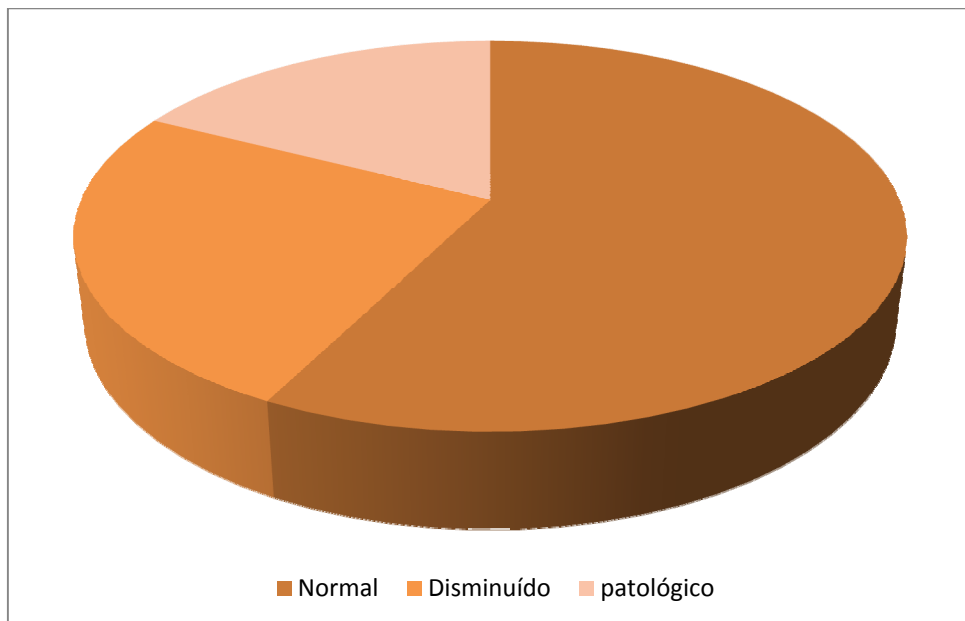
Tabla VII. Resumen de datos epidemiológicos, analíticos y Z-score del grupo de niños con ECF (n=40) en que se realiza DEXA para valorar la DMO.

	N (%)			
Sexo				
mujer	14 (35)			
varón	26 (65)			
Etnia				
Africana	25(62,5)			
Afro-americana	12(30)			
Tipo hemoglobinopatía				
HbSS	34(85)			
Estadio tanner				
Prepuberal	31(77,5)			
Puberal	9(29,5)			
Régimen transfusional	5(12,5)			
Tratamiento con hidroxurea	15 (37,5)			
	N	Rango	M±DS	Varianza
Meses de lactancia	40	0-9	4,50±3,00	9,02
Profilaxis con vit D (meses)	13	2-24	8,54±6,24	38,93
Ingresos (días/año)	37	0-2	0,24±0,64	0,41
Edad	40	4-16	7,97±3,95	15,66
Resultados DEXA				
Z-score	40	-5,30-2,30	-,91±1,46	2,15
Pruebas de laboratorio				
Hb g/dl	40	5-11,30	8,74±1,36	1,87
Reticulocitos	37	75-355600	119470±101919,34	10387553157,52
Calcio total mg/dl	38	7,40-10,30	9,39±0,52	0,27
Calcio iónico mmol/L	36	0,64- 1,30	1,07± 0,12	,016
Mg mg/dl	40	1,70-3,00	2,18±0,26	,068
P mg/dl	39	4-6,50	5,36±0,57	,326
PTH ng/L	39	6-185	65,33±47,61	2267,22
FA total U/L	36	64-461	199,75±79,40	6305,45
FAO mcg/L	30	19-115	57,93±26,63	712,06
Osteocalcina mcg/L	27	1-10	3,74±2,76	7,64
25 (OH) D ng/ml	40	4-44,50	16,89±8,28	68,58
PCR	30	0,10-2,60	0,44±16,89	0,29

Hb= Hemoglobina, Mg= magnesio, P= fósforo, FA= fosfatasa alcalina, FAO= fosfatasa alcalina ósea PCR = proteína C reactiva, DS= desviación estándar.

Resultados.

Figura 12. Resultados de la densitometría (DEXA)



El Z-score que mide la DMO es normal (> -1) en un 57,5% de los niños para su edad, etnia y talla, mientras que un 25% tienen DMO baja (entre -1 y -2) y un 17,5% presentan Z-score patológico con valores de osteoporosis ($Z\text{-score} < -2$).

TablaVIII. Resumen de los valores de Z- score.

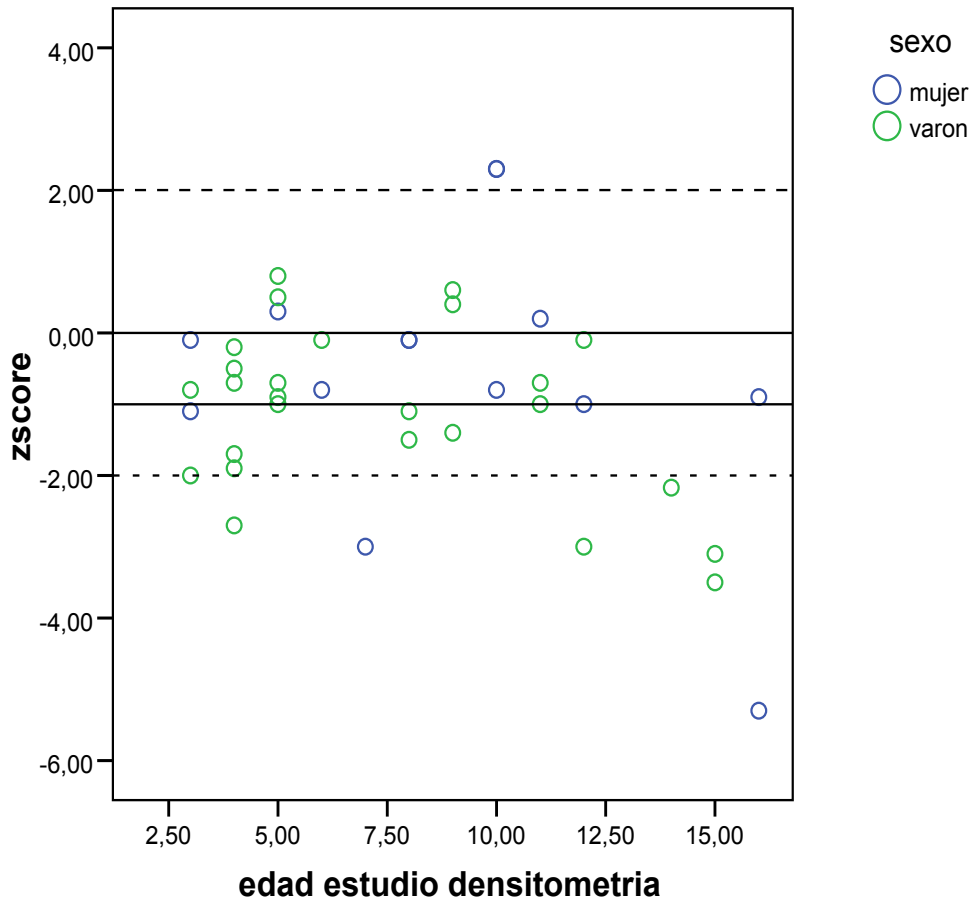
		n	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Z-score	,00	23	57,5	57,5	57,5
	1,00	10	25,0	25,0	82,5
	2,00	7	17,5	17,5	100,0
	Total	40	100,0	100,0	

0 = Z-score > -1, 1 = Z-score entre -1 y -2, 2 = Z-score < -2.

Cuando se explora la relación entre la edad en el momento del estudio DEXA y los valores de Z-score, como puede verse en el gráfico (figura 13), la mediana de edad está por debajo de los siete años y medio en los niños con DMO normal o disminuida (n=33), mientras que aquéllos con DMO patológica tienen su mediana de edad superior a los 12 años y medio (n= 7).

Resultados.

Figura 13.



La figura muestra la correlación entre edad y Z-score. Existe una correlación negativa entre el Z-score patológico (< -2) y la edad (Rho de Spearman $-0,138$) sin significación estadística ($p ,395$).

Los estudios de correlación, buscando asociación entre Z-score y otras variables cuantitativas, sólo encuentran una correlación lineal de Pearson significativa estadísticamente entre valor de Z-score y valor de Hb ($r = 0,368$, $p = 0,019$), es decir, aquellos niños con valores más altos de Hb tienen un valor de Z-score más alto.

Asimismo, existe correlación lineal entre Z-score y reticulocitos ($r = 0,365$, $p = 0,026$).

No se encuentra correlación con el resto de variables cuantitativas analizadas: calcio total, calcio iónico, magnesio, fósforo, fosfatasa alcalina, fosfatasa alcalina ósea, PTH, osteocalcina, niveles de 25 (OH) D, hierro, ferritina, edad en el momento del estudio, meses de lactancia, meses de profilaxis con vitamina D, días de ingreso / año.

Los diferentes estudios de regresión simple y múltiple no encuentran asociación lineal ni un modelo explicativo (causa-efecto) entre las diferentes variables cuantitativas y los valores de Z-score.

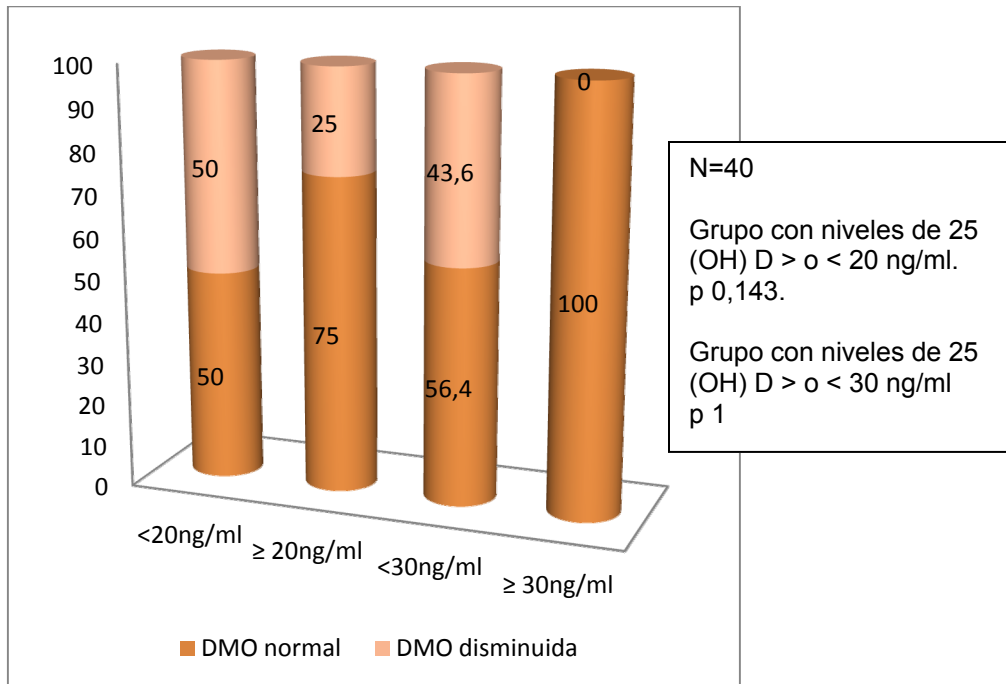
Cuando se compara el resultado de la densitometría, expresado como valor numérico Z-score, entre diferentes grupos de niños, clasificados por sexo mediante la prueba no paramétrica de

Resultados.

U Mann Whitney, la diferencia no es significativa ($p = 0,21$). Esta misma prueba tampoco obtiene diferencias en el Z -score entre el grupo que recibe profilaxis el primer año de vida y el que no ($p=0,65$), ni en aquellos que reciben hidroxiurea frente a los que no ($p = 0,467$). Tampoco hay diferencias significativas ($p = 0,45$) entre las diferentes etnias o los tipos de ECF ($p = 0,28$), utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

El análisis de variables categóricas mediante test de Chi-cuadrado y /o exacto de Fisher no encuentra resultados significativos cuando se compara Z-score patológico con niveles de 25 (OH) D inferiores a 20 y a 30, respectivamente.

Figura 14. Porcentaje de pacientes con DMO normal o alterada en función de los niveles de 25 (OH) D.



Se resume el porcentaje de pacientes con Z-score normal o bajo en función de los niveles de 25 (OH) D. Los resultados no son significativos estadísticamente con el test de Chi-cuadrado en el grupo con niveles de 25 (OH) D < y ≥ 20 ng/ml (p = 0,143). En el grupo con niveles de 25 (OH) D < y ≥ 30 ng/ml se aplica el test exacto de Fisher por tratarse de una muestra pequeña. El resultado es estadísticamente no significativo (p = 1,000). Sólo un niño del total de la muestra (n = 40) tiene niveles de 25 (OH) D ≥ 30 ng/ml en el momento de realizarse la densitometría.

Quando se realiza test de Chi-cuadrado para comparar los resultados del Z-score en el grupo que recibe hidroxiurea frente al que no, el 36% de niños que no reciben hidroxiurea tienen un Z-

Resultados.

score alterado. Este resultado aumenta al 53,3% en el grupo que recibe tratamiento, sin ser significativo ($p = 0,336$).

Tampoco hay diferencia estadística ($p = 0,531$) entre los niños con hiperparatiroidismo (39,1% vs 50%), ni cuando el análisis se realiza en los diferentes sexos (28,6% en mujeres vs 50% en varones) ($p = 0,191$). De los niños con régimen transfusional, el 80% tienen DEXA normal y el 20% alterada ($p = 0,373$). Todo ello podría explicarse por el tamaño muestral.

c. Grupo de niños que reciben tratamiento con calcio y vitamina D.

i. Descripción de los pacientes.

Un total de 30 niños con ECF y valores insuficientes de 25 (OH) D fueron enrolados en un estudio piloto, entre diciembre de 2009 y junio de 2010 para recibir tratamiento con calcio y vitamina D3. El tratamiento se mantuvo durante un periodo de 12 meses siguiendo el protocolo de actuación que se resume en el apartado de material y métodos.

Los pacientes fueron incluidos al azar, tras conocerse los resultados de los estudios de laboratorio, que confirmaban niveles de 25 (OH) D <30 ng/ml.

El rango de edad de los pacientes tratados fue de 3-16 años, predominando los varones (65%), frente a las mujeres (35%). La etnia africana representa el 82,4% de la muestra y el tipo de hemoglobina predominante fue la forma homocigoto SS (92%)

ii. Comparación de los valores de laboratorio de las diferentes variables analizadas a los 0, 3, 6, 9 y 12 meses de tratamiento.

Se comparan medidas repetidas de valores analíticos (calcio, magnesio, fósforo, PTH, niveles de 25 (OH) D) a los 3, 6, 9 y

Resultados.

12 meses de inicio de tratamiento con vitamina D3 oral a dosis de 800 UI, respecto a los valores basales que determinaron la decisión de iniciar el tratamiento en un grupo de niños con ECF, mediante la prueba de Wilcoxon (alternativa no paramétrica del T- Test de muestras apareadas). Los resultados obtenidos son el resumen de la comparación de rangos entre los dos grupos y el estadístico de Wilcoxon con su valor de p correspondiente.

Todos los resultados se recogen en la tabla IX.

Tabla IX. Resumen de la prueba de rangos con signos de Wilcoxon comparando los valores basales de Ca, Mg, PTH, P y 25 (OH) D con los valores en las determinaciones repetidas a los 3, 6 ,9 ,12 meses de tratamiento.

p	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Calcio mg/dl				
Sig bilateral	,326	,506	,109	,312
Magnesio mg/dl				
Sig bilateral	,004	,099	,258	,003
Fósforo mg/dl				
Sig bilateral	,047	,494	,553	,045
PTH ng/L				
Sig bilateral	,086	,185	,153	,291
25 (OH) D ng/ml				
Sig bilateral	,001	,000	,005	,006

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el valor de calcio previo al inicio de tratamiento respecto al encontrado a los 3, 6, 9 y 12 meses del mismo. En cuanto a los valores de magnesio, sí existe un aumento de los niveles del mismo significativos a los 3 y 12 meses de tratamiento. El fósforo disminuye significativamente a los 3 y 12 meses. No hay modificaciones significativas estadísticamente en los valores de PTH a lo largo del tratamiento.

Resultados.

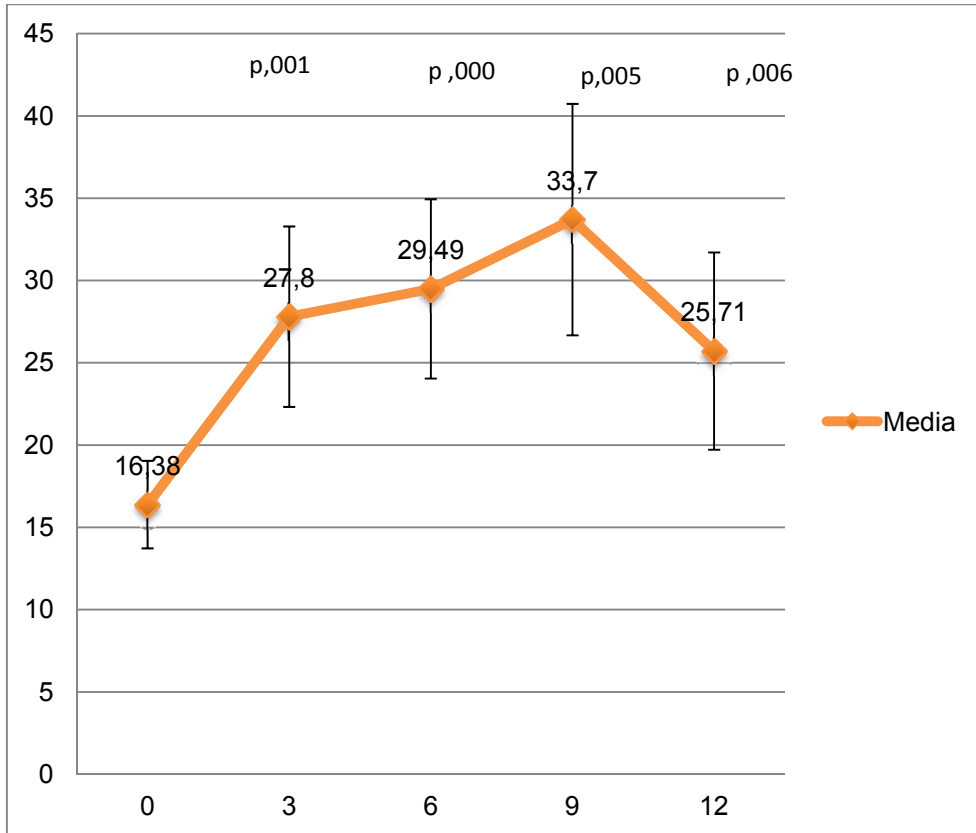
iii. Efectos del tratamiento sobre los niveles de 25 (OH) D.

El hallazgo de más relevancia es el aumento de los niveles de 25 (OH) D estadísticamente significativo en todos los controles realizados a lo largo del tratamiento (3, 6, 9 y 12 meses), respecto al valor basal, a pesar de la variabilidad en la adherencia al tratamiento, como se expresa más adelante.

Tabla X. Valores de 25 (OH) D en las determinaciones realizadas a lo largo de 12 meses de tratamiento.

	N	Media	DS	Rango
25(OH)D				
Meses				
0	30	16,38	7,28	4-29
3	24	27,80	13,43	3-53,60
6	20	29,49	12,18	13,30-56,40
9	10	33,70	11,12	13,70-50
12	22	25,71	14,06	3,80-64,60

Figura 15. Niveles medios de 25 (OH) D en las diferentes determinaciones realizadas durante los meses de tratamiento.



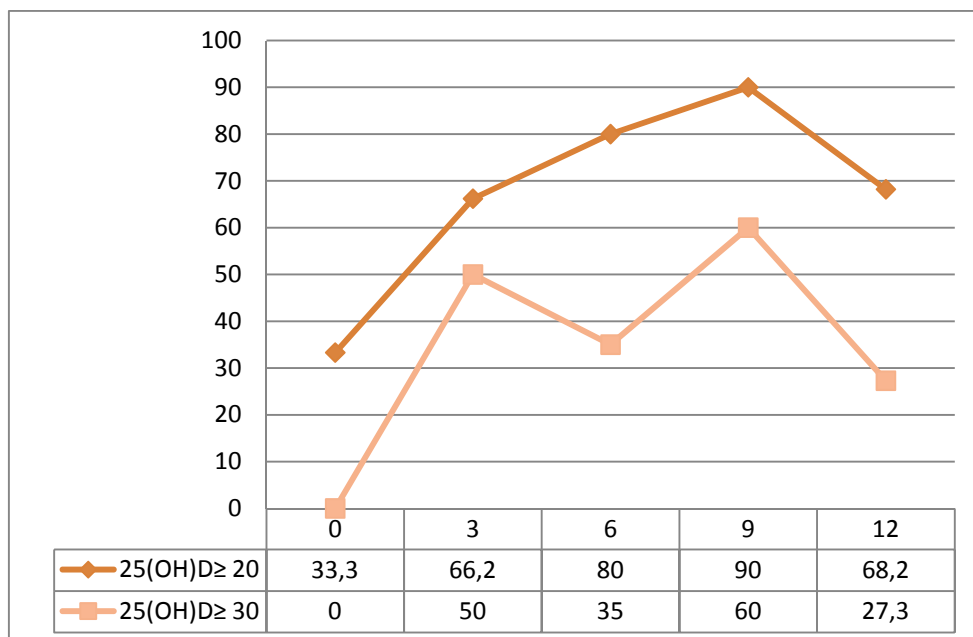
El valor de la n es de 30, 29, 20, 10 y 22 respectivamente a los 0, 3, 6, 9 y 12 meses.

Figura que muestra los valores medios de 25 (OH) D y el error estándar de la media, previos al inicio de tratamiento (mes 0) y posteriormente en los diferentes meses en que se realiza control de los niños tratados (3, 6, 9 y 12). Se observa mejoría de los niveles de 25 (OH) D en todos los meses analizados, respecto al nivel basal de partida, con significación estadística. Los valores se mantienen por encima de 25 ng/ml, si bien los valores deseados de ≥ 30 ng/ml sólo se consiguen en la muestra analizada al noveno mes, sin mantenerse posteriormente.

Resultados.

A continuación se resumen los porcentajes de pacientes que consiguen niveles de 25(OH) vitamina D ≥ 20 ng/ml en los diferentes meses analizados y aquéllos con niveles ≥ 30 ng/ml.

Figura 16. Porcentaje de pacientes con niveles de 25 (OH) D \geq 20 ng/ml y \geq 30 ng/ml.



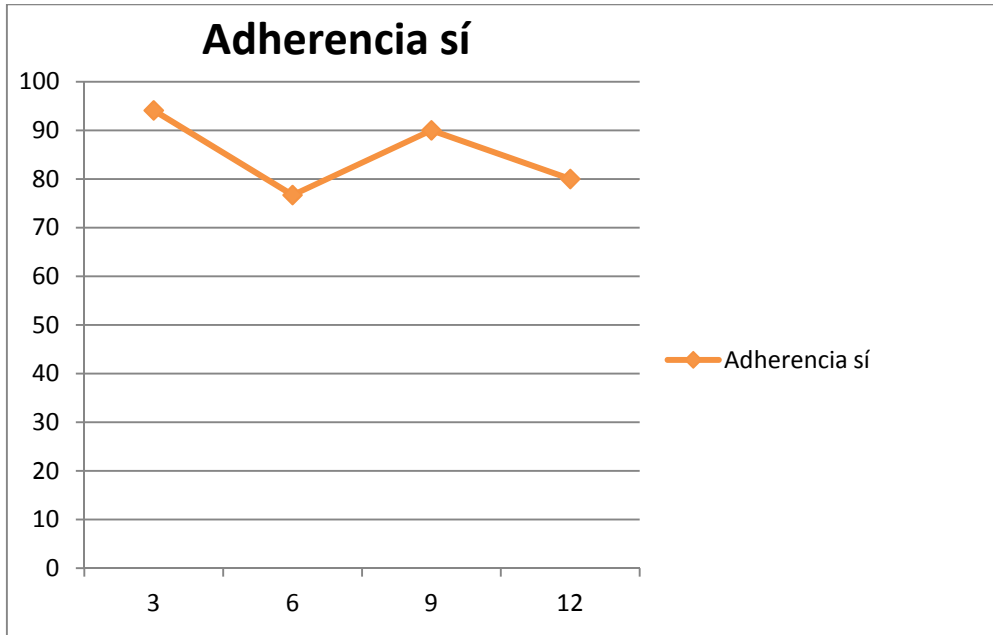
Como puede verse en el gráfico, el porcentaje de pacientes con niveles de 25 (OH) D \geq 20 ng /ml previo al inicio del tratamiento es de 33,3%. Dicho porcentaje aumenta en todas las determinaciones mensuales realizadas, llegando al 90% a los 9 meses. Las variaciones en los porcentajes parecen deberse a la variabilidad en la adherencia al tratamiento.

Cabe destacar que cuando se analiza el porcentaje de niños con niveles de 25 (OH) D \geq 30 ng/ml, partimos de un valor basal de 0, ya que se inicia tratamiento en pacientes con valores de 25 (OH) D inferiores a 30. Los porcentajes de niños que consiguen mejorar su nivel de 25 (OH) D por encima del valor esperado es inferior en todas las determinaciones a los que consiguen niveles \geq 20 ng/ml. El porcentaje más alto se consigue a los 9 meses de tratamiento y el más bajo a los 12 meses.

Resultados.

La prueba exacta de Fisher no es significativa cuando se comparan los grupos con niveles de vitamina D ≥ 20 ng/ml y ≥ 30 ng/ml. en los diferentes meses (3, 6, 9 y 12) con valores de p 0,193, p1, p 0,467, p 1, respectivamente.

Cabe resaltar que la adherencia al tratamiento fue variable a lo largo del estudio, como se resume en el gráfico adjunto, consiguiéndose una adherencia superior al 90% a los 3 meses de iniciado el tratamiento, con variabilidad posterior. La adherencia más baja se detecta a los 6 meses (75%) con recuperación posterior. El 80% del grupo inicial se realiza control clínico y analítico a los 12 meses y dice realizar el tratamiento con vitamina D3 a la dosis recomendada en la entrevista realizada por uno de los médicos de la Sección de Onco-Hematología Pediátrica que siguen de forma habitual a estos pacientes.

Figura 17. Adherencia al tratamiento.

En este gráfico se recogen los porcentajes de pacientes con buena y mala adherencia en las diferentes evaluaciones realizadas a lo largo de un periodo de seguimiento de 12 meses.

iv. Resumen de las tablas de contingencia analizando niveles de 25 (OH) D \geq 20 ng/ml o 30 ng/ml en función de la adherencia al tratamiento.

Los resultados obtenidos hasta el momento con este trabajo de tesis en el grupo de tratamiento demuestran una mejoría significativa de los niveles de 25 (OH) D a lo largo de los 12 meses del estudio, como se ha expuesto previamente. Del grupo de 30

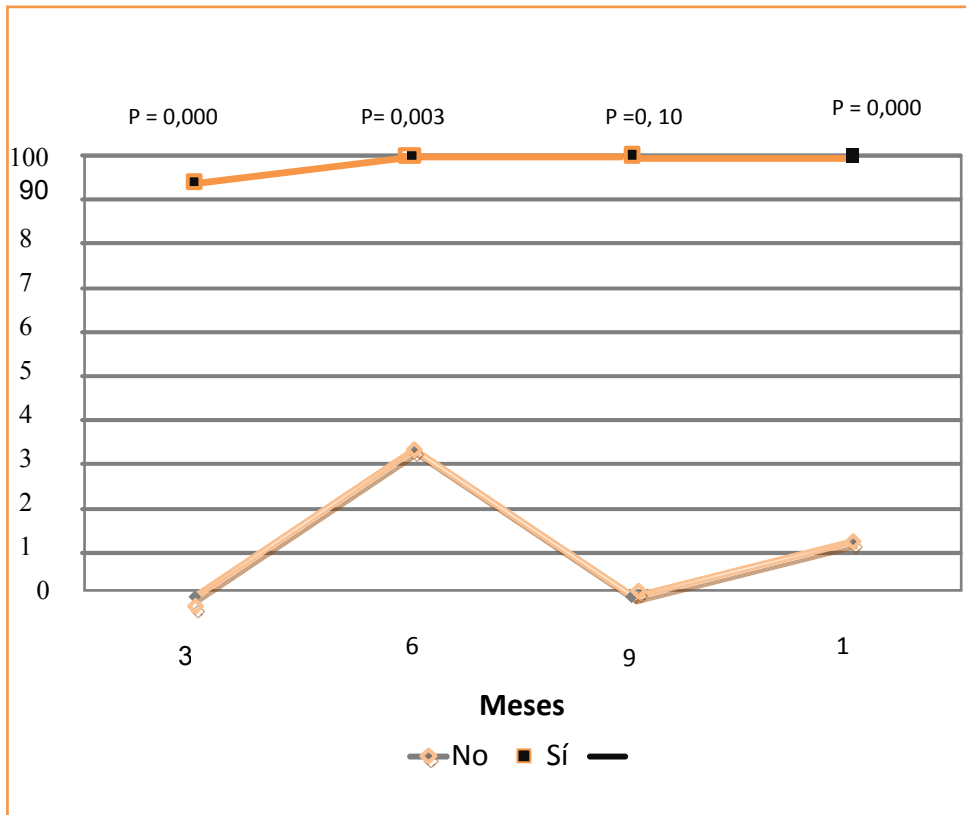
Resultados.

pacientes que inician tratamiento con vitamina D3 y calcio, 24 completan un seguimiento de 12 meses, el resto se pierden a lo largo de seguimiento, algunos pasan a una consulta de adultos por ser mayores de 16 años y otros cambian de residencia, siendo imposible en ambos casos completar el seguimiento. También se objetiva una variabilidad en la adherencia al tratamiento que, con la experiencia obtenida y las características de la población, nos parece que pueda ser un factor determinante en los resultados obtenidos en el estudio. La adherencia se mide como positiva si el paciente acude al control clínico y analítico en las fechas indicadas, conoce la medicación que toma y las dosis se comprueba que son las adecuadas, no olvida la medicación más de 2 veces por semana, y los resultados de medición de niveles de 25 (OH) D son acordes con los datos previamente reflejados. En caso contrario, la adherencia se mide como negativa.

Nos planteamos la siguiente hipótesis: los pacientes con buena adherencia en los diferentes puntos de corte (3, 6, 9 y 12 meses) tienen niveles de 25 (OH) D mayores que aquéllos con mala adherencia, y estas diferencias no son debidas al azar.

El análisis estadístico se realizó con la prueba exacta de Fisher (equivalente a la prueba de Chi-cuadrado para muestras pequeñas) y los resultados se resumen en los gráficos 18 y 19.

Figura 18. Resumen de los pacientes con niveles de 25 (OH) D \geq 20 ng/ml en función de la adherencia al tratamiento.



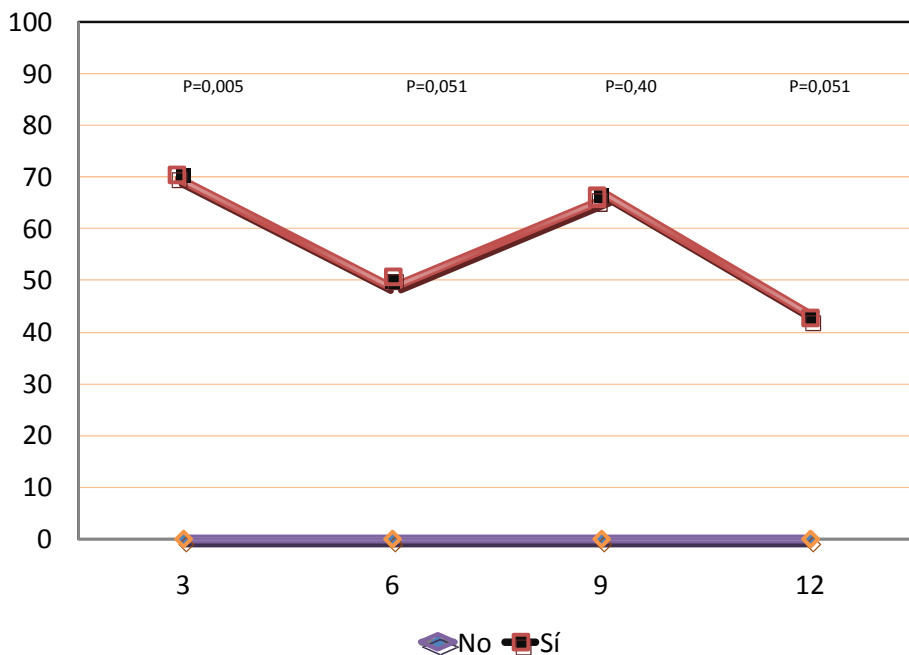
Como puede verse en el gráfico, los pacientes con adherencia adecuada consiguen niveles superiores a 20 ng/ml en un porcentaje superior al 90% a lo largo de los 12 meses del estudio, con $p < 0,01$ a los 3, 6 y 12 meses. El resultado no es significativo a los 9 meses ($p = 0,10$), a pesar de que el 100% de los niños seguidos en este momento son buenos adherentes y tienen niveles de 25 (OH) D \geq 20 ng/ml. Esto podría explicarse por el tamaño de la muestra ($n = 10$) en el control de seguimiento a los 9 meses, siendo ($n = 17$) a los 3 meses ($n = 22$) a los 6 meses y ($n = 24$) a los 12 meses.

Resultados.

Podemos concluir que la diferencia en los niveles de 25 (OH) D \geq 20 ng/ml no se explican en general por el azar.

Cuando se repite la prueba exacta de Fisher con la misma hipótesis de trabajo, pero para niveles de 25 (OH) D \geq 30 ng/ml, los resultados quedan recogidos en el siguiente gráfico.

Figura 19. Porcentaje de pacientes con niveles \geq 30 ng/ml en función de la adherencia al tratamiento.



En este caso, el porcentaje de pacientes que consigue niveles \geq 30 ng/ml a lo largo del seguimiento es inferior a aquéllos

que conseguían niveles ≥ 20 ng/ml, encontrándose el porcentaje más alto a los 3 meses (70%) con $p = 0,005$, y otro pico a los 9 meses con niveles ≥ 30 ng/ml en el (66,7%) de los casos, con $p = 0,40$ no significativa, probablemente como se explicó previamente por un tamaño de muestra pequeño ($n = 10$). Los porcentajes a los 6 y 9 meses de niños con niveles ≥ 30 ng/ml son entre el 40-50% con $p = 0,051$.

Por el contrario, ninguno de los niños sin buena adherencia al tratamiento consigue niveles de 25 (OH) D ≥ 30 ng/ml, en ninguno de los controles realizados a lo largo del año.

Resultados.

v. Cambios en la DMO.

Resultados estudio DEXA basal y tras 12 meses de tratamiento. En el grupo que recibe tratamiento, 17 niños tienen un estudio de densitometría basal realizada previamente al inicio del tratamiento y pudo realizarse un segundo estudio tras 12 meses de terapia con calcio y vitamina D.

En la tabla IX se recogen datos epidemiológicos y analíticos de este grupo de pacientes. Existe un predominio de varones sobre mujeres (12/5), que supone el 70,58 frente al 29,42%, respectivamente. Las etnias predominantes son africana y afro-americana, y un 88,23% están afectados de Hb SS. En el momento del estudio basal el rango de edad está entre 4 y 15 años, y a los 12 meses, entre 5 y 16 años. El informe del radiólogo que realiza el estudio y lo compara con el previo, define mejoría en la DMO en 10 de los 17 niños (59,30%), de los cuales 4 (44,44%) tienen un aumento de la DMO $\geq 20\%$, considerado como mejoría relevante. Un 23,52% (4/17) presenta un descenso de la DMO, y 3/17 (17,64%) no experimentan cambios, es decir, mantienen la DMO estable tras 12 meses de tratamiento. En cuanto a la adherencia al tratamiento, sólo 2 niños (11,76%) siguen correctamente todos los controles y cumplen adecuadamente el tratamiento, siendo en el resto variable o mala.

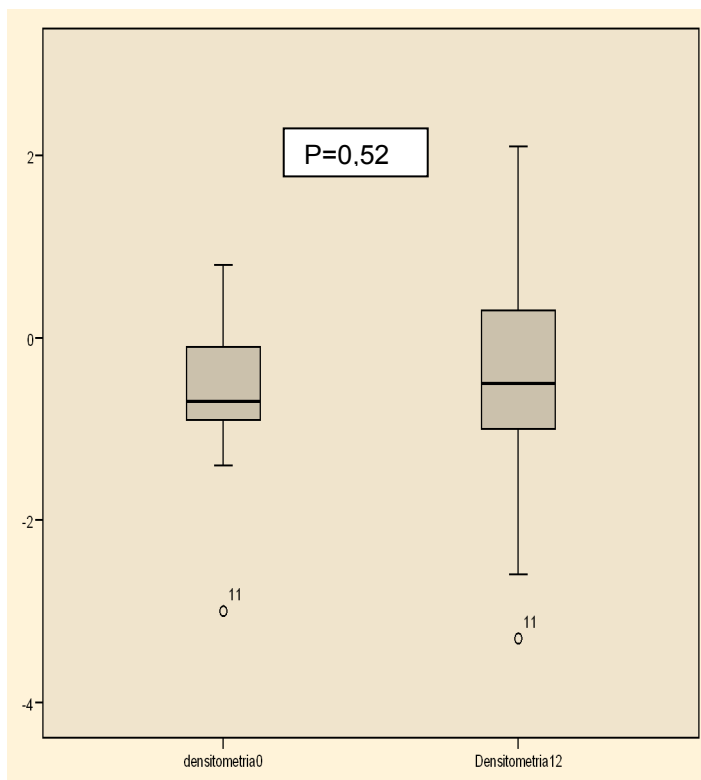
Resultados.

Tabla IX Datos de pacientes que realizan estudio DEXA basal y tras 12 meses de tratamiento.

	sexo	Hb	etnia	25(OH)D Basal ng/ml.	Zscore basal	Edad años	Adherencia Global	3	6	9	12	25(OH)D				Zscore tras 12m Tto.	Edad años	DMO
												3m	6m	9	12			
1	mujer	SS	Afro-americana	18,20	- 0,10	4	variable	sí	sí	sí	no	13,5	56,4	50	17,9	1	5	Mejoría 20%
2	varón	SS	Afro-americana	21,90	- 1,40	4	variable	sí	sí	no	sí	48	25,1		28	- 1,50	5	Descenso 1%
3	mujer	SS	Africana	14,90	- 1,10	4	variable	sí	sí	no	sí	44,5	27,6		35,8	-0,90	5	Mejoría 8%.
4	varón	SS	Africana	12,10	- 0,90	5	variable	no	sí	sí	sí		46	45	64,6	- 0,10	6	Mejoría
5	varón	SS	Africana	24,70	- 0,20	5	variable	no	sí	sí	sí		38	35	25,30	+ 0,10	7	Mejoría
6	varón	SS	Africana	12,10	- 0,90	5	variable	sí	sí	sí	no	30,01	46	46		-- 1	7	Mejoría
7	varón	SS	Africana	26,40	0,80	5	variable	sí	no	no	sí	33	15,3		39,60	1,30	6	Mejoría
8	mujer	SS	Afro-americana	11,50	0,30	5	variable	Sí	?	?	sí	48,30			37,3	2,10	7	Mejoría 32,4%
9	varón	SS	Africana	23,90	- 0,70	7	buena	sí	sí	sí	sí	31	27,4	34,1	39,1	0,30	8	Mejoría 26,4%
10	mujer	SB0	Africana	8,60	-0,10	8	mala	no	sí	?	?	?		35,10		-0,60	10	Descenso
11	varón	SS	Afro-americana	14,70	0,60	9	variable	sí	no	sí	?	24,80	13,4	44		0,80	10	Mejoría
12	mujer	SS	Hindú	17	-0,80	11	buena	sí	sí	sí	sí	34	30	29	28,10	-2,10	13	Sin cambios
13	varón	SS	Afro-americana	16,40	-0,70	11	mala	no	?	sí	no	16		25	8,90	0,10	13	Sin cambios
14	varón	SS	Africana	12,20	-1,30	11	variable	sí	no	?	sí	16,90	13,3		28	- 0,30	13	Mejoría 20,3%
15	varón	SC	Afro-americana	10,20	0,20	12	mala	?	?	?	no				3,80	-0,50	13	Descenso
16	varón	SS	Africana	8,30	-0,10	13	mala	sí	no	?	no	30,10	7,80		6,70	- 2,6	15	Sin cambios
17	varón	SS	Afro-americana	10,20	-3,00	15	variable	sí	sí	?	sí	29,40	25		20,40	- 3,30	16	Descenso

El valor medio del Z-score en la DEXA basal es de $-0,55 \pm 0,90$ y en la DEXA realizada a los 12 meses es $-0,47 \pm 1,41$, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p= 0,52$. Todo ello se refleja en el diagrama de cajas que se expone a continuación.

Figura 20. Diagrama de cajas resumen de los valores de Z-score basales y tras 12 meses de tratamiento.



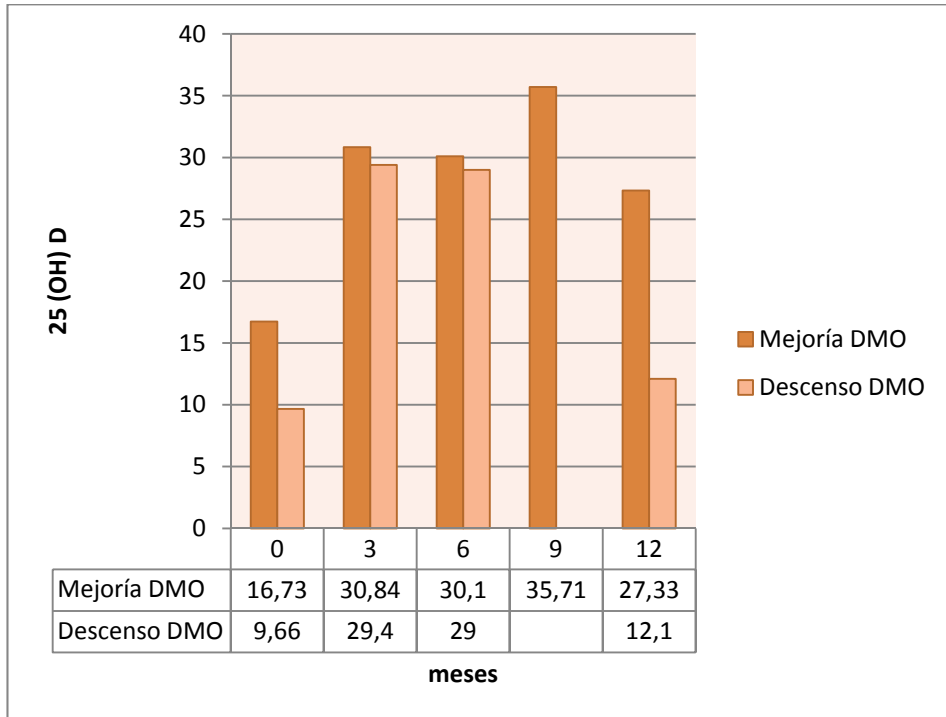
En el diagrama de cajas se observa un valor de Z-score en las densitometrías realizadas a los 0 y 12 meses, sin diferencias significativas ($p= 0,52$).

Resultados.

La prueba de rangos con signo de Wilcoxon no obtiene diferencias significativas entre los resultados de la densitometría basal y tras 12 meses de tratamiento.

Cuando se plantea la hipótesis de si aquellos pacientes con mejoría de su DMO tras 12 meses de tratamiento han mantenido niveles de 25 (OH) D mayores en las diferentes determinaciones a los 3, 6, 9 y 12 meses, respecto a los que no tienen mejoría, los resultados estadísticos de frecuencias se resumen en la Figura 21.

Figura 21. Valores medios de 25 (OH) D en el grupo de niños con mejoría en la DMO, frente a los que experimentan descenso de la DMO.



La figura muestra los valores medios de 25 (OH) D basales y en las diferentes determinaciones a los 3, 6, 9 y 12 meses entre el grupo con mejoría en la DMO y el que presenta descenso de DMO, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas con el test no paramétrico de U Mann- Whitney. (p 0,171, p 0,116, p 0,739, p 1,000, p 0,452).

Cuando se repite este mismo estudio utilizando un modelo lineal general multivariante entre las variables mejoría en la DMO y niveles de 25 (OH) D en los diferentes meses, no se encuentran diferencias significativas con la prueba de esfericidad de Mauchly (p= 0,060). La prueba de contraste intra-

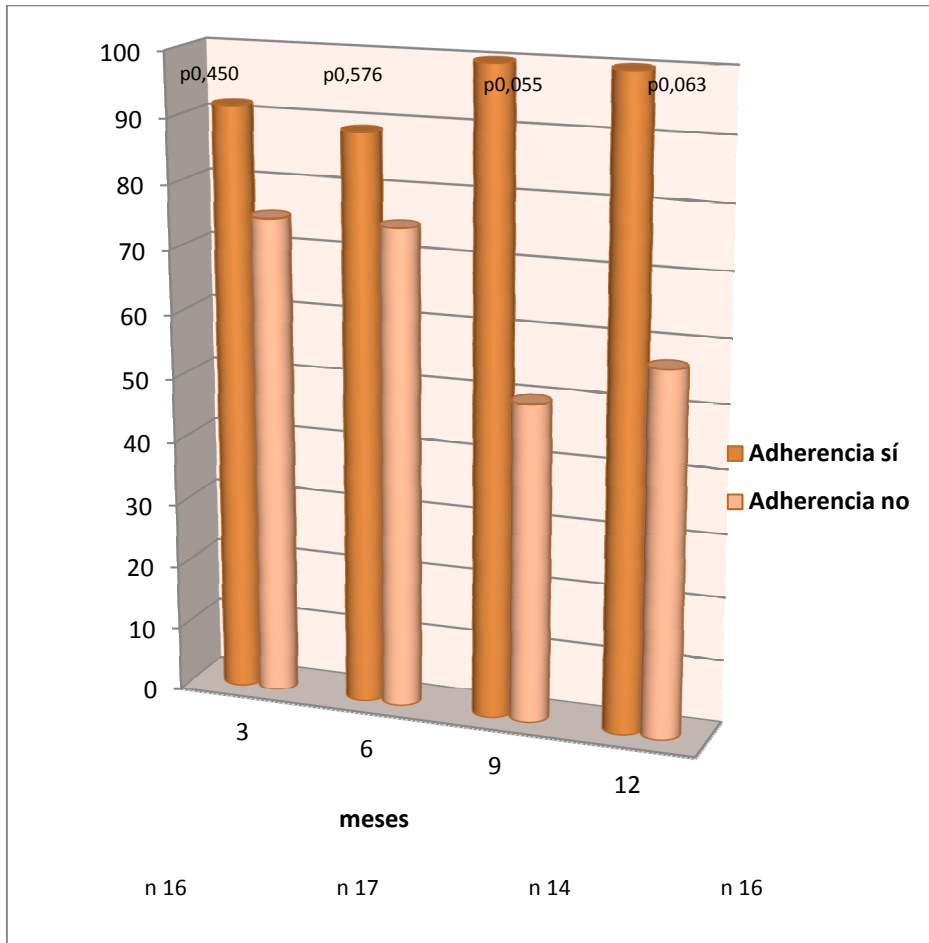
Resultados.

sujetos no muestra interacción significativa entre los grupos con o sin mejoría y los niveles medios de 25 (OH) D ($p = 0,463$).

Cuando se utiliza el modelo lineal general para valorar los niveles medios de 25 (OH) D en los diferentes meses: 1 = 3 meses, 2 = 6 meses, 3 = 9 meses y 4 = 12 meses y sus posibles diferencias en los pacientes con mejoría de la DMO, no se obtienen diferencias significativas ($p = 0,463$).

Asimismo, la prueba de U Mann-Whitney valorando la mejoría de la DMO en función de los niveles de 25 (OH) D, tampoco obtiene resultados estadísticos significativos ($p = 0,593$, $p = 1$, $p = 0,126$ a los 3, 6 y 12 meses), no pudiéndose realizar esta prueba estadística a los 9 meses debido al tamaño muestral.

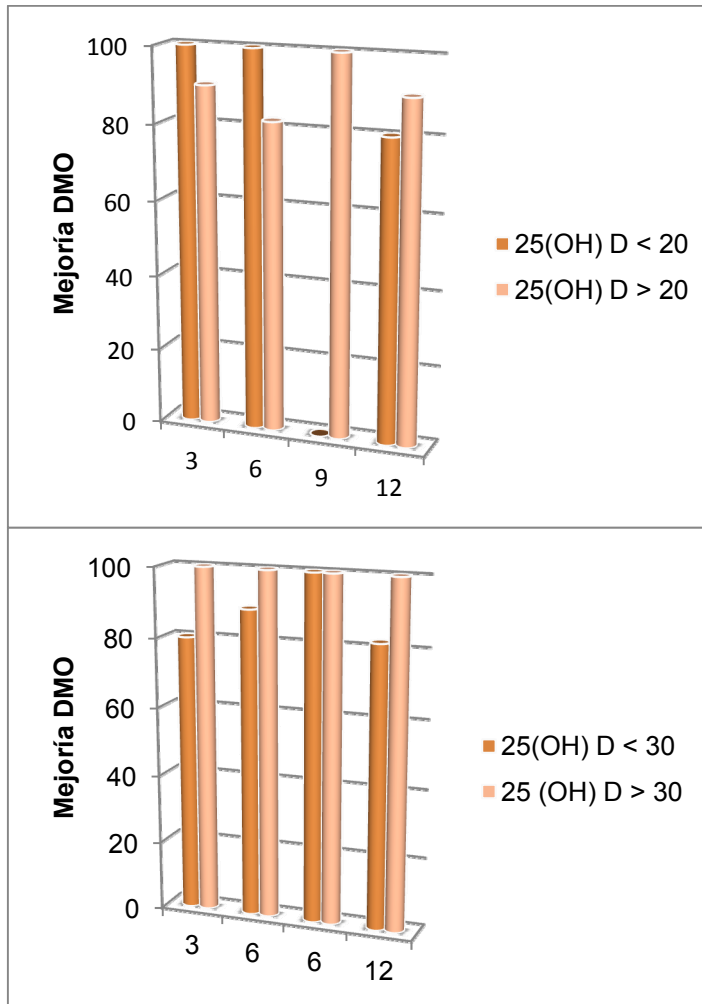
Figura 23. Aumento de la DMO en función de la adherencia al tratamiento.



Cuando se intenta valorar si la adherencia al tratamiento influye en conseguir una mejor respuesta en la DMO, el test exacto de Fisher no obtiene resultados significativos entre el grupo con buena y mala adherencia, como se resume en el gráfico, aunque a los 9 y 12 meses se observan las mayores diferencias entre grupos.

Resultados.

Figuras 24-25. Mejoría de la DMO en función de los niveles de 25 (OH) D.



En los gráficos se representa el porcentaje de mejoría en la DMO entre dos grupos, en función de los niveles de 25 (OH) D menores o mayores de 20 ng/ml. No se obtienen diferencias significativas con el test exacto de Fisher en ninguna de las determinaciones ($p > 0,05$). Se trata de una muestra pequeña con $n=13$ a los 3 y 6 meses, que desciende hasta 7 a los 9 meses y 15 a los 12 meses.

Cuando se realiza el mismo estudio entre los grupos con niveles de 25 (OH) D menores y mayores de 30 ng/ml, tampoco se obtienen diferencias significativas con el test exacto de Fisher $p > 0,05$. Pero en este caso el 100% del grupo que ha mantenido niveles de 25 (OH) D > 30ng/ml, en todas las determinaciones en los diferentes meses, obtiene mejoría de su DMO.

iv. Toxicidad del tratamiento.

Se evalúa como niveles de 25 (OH) D que se encuentran en rango considerado como intoxicación (150 ng/ml) y eliminación aumentada de calcio/creatinina en orina.

En el grupo de tratamiento ningún niño requirió suspender la terapia por mala tolerancia de vitamina D3 y calcio, administrados en forma combinada cuando la dosis se ajustaba a la presentación farmacéutica, o por separado.

En cuanto al índice de excreción de calcio/creatinina en orina, se mantuvo inferior a 0,20 en todas las determinaciones realizadas a lo largo de los 12 meses de administración del tratamiento, sin encontrarse diferencias significativas con el test de Wilcoxon entre los valores basales previos al inicio del tratamiento y los valores a los 3, 6 y 9 meses. Sí se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el valor basal y al final del tratamiento

(p 0,011), con valores más bajos tras los 12 meses de tratamiento.

VI. DISCUSIÓN.

El déficit de vitamina D vuelve a ser un tema de actualidad. En los últimos años, diversas publicaciones en la literatura médica internacional relacionan la vitamina D con la prevención de distintas enfermedades, que no sólo se limitan a la salud ósea(108, 174-181).

Si bien estos datos no tienen suficiente evidencia para algunos expertos, como el IOM, para ellos sí esta clara la importancia de la vitamina D en la salud ósea(114). Lo que también ratifica la Fundación Internacional de Osteoporosis (FIO) y otros expertos en la materia (182-186). Como se detalla en las diferentes secciones de este trabajo de tesis doctoral, el déficit de vitamina D y su implicación en la salud ósea de los niños con ECF es el punto de partida de los diferentes estudios realizados.

a. Déficit de vitamina D en pacientes con ECF.

En la Sección de Introducción se resumen los trabajos encontrados en el momento de elaboración de este trabajo sobre déficit de vitamina D en niños con ECF. Nuestro estudio, a diferencia de los anteriores,(66, 67, 69-71) analiza niños desde el primer año de vida (n =11), siendo la media de edad del grupo estudiado 4,8 años (mucho más baja que estudios precedentes),

Discusión.

encontrando déficit de vitamina D (definido como niveles de 25 (OH) D inferiores a 20 ng/ml) en el 56,4% de los casos, y niveles insuficientes (< 30 ng/ml) en un 79,5% de los casos. Es decir, sólo un 20,5% de la muestra estudiada tendría niveles óptimos de 25 (OH) D para la salud ósea (> 30 ng/ml, como consideran algunos autores) (36, 114, 182). Si bien se encuentran niveles anómalos desde el primer año de vida, el grupo con niveles óptimos se encuentra entre el rango de edad de 0 a 5 años; por encima de dicha edad ninguno de nuestros niños tienen niveles de 25 (OH) vitamina D > 30 ng/ml. Cuando se analiza el grupo de edad entre 0 y 4 años (un total de 46 niños), se encuentran niveles deficientes de 25 (OH) D en el 41,3% de este grupo (considerados así los niveles < 20 ng/ml), y el porcentaje aumenta a un 67,4% si los niveles insuficientes se consideran inferiores a 30 ng/ml. Estos resultados nos parecen alarmantes dado que se trata de un grupo de niños con media de edad baja, por lo que el resultado podría estar infraestimado ya que hay estudios que demuestran aumento de déficit en ECF a partir de 5 años de edad, con ingesta inadecuada de calcio y vitamina D (159). Por otra parte, el hecho de disponer de un cribado neonatal en nuestra Comunidad para detección de esta patología, nos ha permitido conocer la existencia de déficit de

vitamina D en niños con ECF a edades tempranas, y nos sitúa en situación ventajosa para iniciar alguna medida de intervención primaria y secundaria de forma precoz y poder valorar su eficacia en el futuro sobre la salud ósea de esta población(187). El porcentaje de niños con valores insuficientes en el rango de edad de 0 a 4 años corrobora la opinión de algunos estudios en niños con ECF, que sugieren que la intervención debe ser precoz para conseguir una buena densidad mineral ósea (69-71).

b. Variables predictivas del déficit de vitamina D en las hemoglobinopatías.

Los estudios de correlación entre variables numéricas muestran asociación entre niveles de 25 (OH) D y valor Z de la talla, no con otros valores antropométricos, si bien estos hallazgos pueden estar sesgados al no disponer de tablas de cálculo antropométrico específicas para esta población. Tras consultar varios organismos como la Sociedad americana de ECF, la OMS y centros con experiencia en el seguimiento de estos pacientes, en mi conocimiento no existen tablas antropométricas específicas para niños con esta patología. Siguiendo la opinión de algunos expertos de la OMS que apoyan el hecho de que estos niños cuando nacen en países

Discusión.

desarrollados y reciben cuidados y alimentación adecuada llegan a igualarse a la población del país adoptivo (188, 189), se han utilizado tablas de niños españoles actualizadas en el año 2008 por la Sociedad de Endocrinología Pediátrica.

Los análisis estadísticos multivariantes realizados en un intento de buscar factores predictores del déficit de vitamina D en el grupo de niños con ECF, seguidos y diagnosticados en su mayoría en nuestro centro, muestran como mejor modelo explicativo la talla, seguida del peso y de la gravedad de la enfermedad, estimada como los días de ingreso /año. Estas tres variables en los estudios de regresión múltiple explicarían el 52,7% ($p < 0,01$) de la disminución de los niveles de 25 (OH) D. Es el mejor modelo explicativo que encontramos en nuestro estudio con las variables cuantitativas analizadas. Otros estudios en niños africanos sanos encuentran también que la disminución en los niveles de 25 (OH) D con la edad se elimina al introducir otras variables como el peso y la talla. Es decir, el déficit de 25 (OH) vitamina D se acentúa en esta población con el crecimiento (62{Jones, 1999 #195, 110, 190) .

Cuando se analizan las posibles diferencias en los niveles de 25 (OH) D relacionadas con el sexo, tipo de ECF, lactancia materna o etnia, no se encuentran diferencias estadísticamente

significativas, aunque la etnia africana tiene en general niveles medios de 25 (OH) D más bajos. El único hallazgo significativo es que aquellos niños que reciben profilaxis a dosis de 400 UI, como se recomienda de forma habitual en la Comunidad de Madrid a todos los recién nacidos durante el primer año de vida, tienen niveles de 25 (OH) D significativamente mayores (t -student ,026), independientemente del tiempo de administración de la misma. La importancia de la profilaxis con vitamina D no ha sido analizada en los estudios publicados en niños con ECF y déficit de vitamina D hasta el momento, en mi conocimiento. En principio, este hallazgo apoyaría estudios que sí demuestran ingesta deficitaria de vitamina D y calcio en esta población, con imposibilidad de alcanzar aportes adecuados de vitamina D (66). Kawchak y col (159) realizan un estudio longitudinal sobre ingesta de nutrientes en niños africanos con ECF SS con cuatro medidas al año, comparando con niños africanos sin enfermedad de edades similares registrados en el estudio NHANES III. Encuentran una ingesta deficitaria de vitamina D, E, folatos, calcio y fibra.

La necesidad de proteínas en esta población se desconoce, pero su gasto energético es alto debido a la enfermedad, y su crecimiento es inadecuado.

Discusión.

En un estudio previo encuentran que el 65% de los niños y adolescentes con ECF tienen niveles bajos de 25 (OH) D comparando con afro-americanos sanos. Este estudio confirma la baja ingesta de vitamina D en esta población. También encuentran déficit de vitamina E, la cual reduce el daño oxidativo y la vaso-oclusión.

Más de la mitad de niños estudiados tienen déficit de folatos y los aportes suplementarios parecen subóptimos.

Cuando se tiene en cuenta la edad, se objetiva que los adolescentes tienen menor ingesta de proteínas, vitamina C, riboflavinas, vitamina B 12, magnesio y fósforo.

Muchos factores contribuyen a la pobre ingesta de este grupo. La recomendación de elevada ingesta de líquidos hace que aumenten a veces la ingesta de zumos y bebidas energéticas, que pueden disminuir el apetito. También la falta de organización familiar, picoteo, etc. podrían contribuir.

En resumen, la ingesta es inadecuada, sobre todo para niños por encima de los cuatro años. Este déficit puede contribuir al retraso de crecimiento y pubertad.

Sería importante una valoración nutricional en este grupo y un seguimiento con refuerzo familiar de la misma(191-193), y nos parece un dato interesante para plantear una intervención precoz

y primaria en esta población, reforzando la importancia de los nutrientes con calcio y vitamina D y de los aportes suplementarios de esta última de forma precoz y prolongada en el tiempo.

En general, nuestro estudio coincide con los previos en que la causa del déficit de vitamina D en esta población es multifactorial. No estudiamos variables claramente implicadas como la etnia ni la ingesta de calcio y vitamina D, ni otras como el ejercicio físico o la obesidad, también consideradas como etiológicas en algunos trabajos. No encontramos datos analíticos que expliquen el déficit de vitamina D, si bien algunos parámetros como el HDL que se correlaciona con la 25 (OH) D en un trabajo reciente y algunos otros, no han sido valorados en nuestro estudio (194).

Nos parece interesante resaltar que, al contrario de como se había postulado, el vivir en un país con abundante luz solar no es suficiente para mantener una salud ósea adecuada en esta población , como ha quedado demostrado en los estudios que muestran déficit similares en diferentes latitudes y también en nuestro trabajo (66, 67, 69).

En cuanto a la estación del año en que se realizan las mediciones, encontramos déficit en todas las épocas, sin diferencias estadísticamente significativas (p 0,58). De los

Discusión.

trabajos comentados previamente, sólo el publicado por Buisson y col. (67) describe diferencias estacionales con un nadir en los valores de 25 (OH) D en primavera. En general, cuando se comparan niveles de vitamina D en niños blancos y negros no enfermos, se encuentran diferencias estacionales sólo en la etnia blanca, siendo las variaciones poco importantes en etnia negra (60, 62). Todo ello concordaría con el hecho de que la melanina dificulta la absorción de vitamina D, precisando esta población una exposición solar mucho más prolongada que la etnia caucásica para conseguir igual absorción de vitamina D.

c. Evaluación de los marcadores del metabolismo óseo en la ECF.

Cuando se analizan los parámetros que miden *turnover* óseo en nuestro trabajo, los resultados son los siguientes: los marcadores de formación ósea como la osteocalcina, se encuentran en rango de valores normales. En cuanto a la fosfatasa alcalina ósea, si bien presenta valores medios elevados, éstos no se correlacionan con los niveles de 25 (OH) D, ni con los valores de Z-score, en aquellos niños en que se realiza DEXA, por lo que no parecen ser de utilidad en la valoración o seguimiento en niños con ECF. A este respecto un trabajo

interesante es el realizado por Fung E y col. (195), en el que evalúan marcadores del *turnover* óseo en niños con ECF y lo relacionan con la DMO en un estudio longitudinal prospectivo de 12 meses de duración. Marcadores de formación ósea como la fosfatasa alcalina ósea y osteocalcina, y de resorción como PTH y deoxipiridinolina en orina, no se correlacionan en este trabajo con la DMO evaluada con DEXA. Sí existe correlación entre FAO, velocidad de crecimiento y el estadio puberal. Igualmente, Lal A. (69) no encuentra relación entre DEXA y marcadores de salud ósea. Los marcadores del *turnover* óseo tienen un papel muy importante en el diagnóstico y seguimiento de osteoporosis en adultos. Su uso en pediatría con los datos actuales y más concretamente en niños con ECF parece limitado y más bien indicativo del desarrollo puberal y talla (90, 164, 196, 197).

En cuanto al marcador de resorción PTH, encontramos correlación de Pearson inversa ($r -0,388$, $p < 0,001$) entre 25 (OH) D y PTH. Es decir, se produce un aumento de PTH a medida que descienden los niveles de 25 (OH) vitamina D.

Los estudios en niños con ECF que valoran la aparición de hiperparatiroidismo secundario la cifran en un 38%(71). Otros estudios describen correlación inversa con los niveles de 25 (OH) D, sin encontrar casos de hiperparatiroidismo (198). La relación

Discusión.

entre 25 (OH) D y PTH no es curvilínea, y hay variaciones en los niveles de PTH cuando los niveles de 25 (OH) D se hallan entre 20 y 30 ng/ml. No se conocen con certeza los niveles de 25 (OH) D a partir de los cuales aumentan los valores de PTH; en general hay estudios que demuestran que el pico de absorción de calcio ocurre con niveles de 25 (OH) D entre 20 y 30 ng /ml, de ahí la importancia para algunos expertos de mantener niveles de 25 (OH) \geq 30 ng/ml. para conseguir una buena masa ósea (44, 199, 200).

Algunos estudios realizados en adultos no afectados de ECF encuentran que la relación inversa entre PTH y 25 (OH) D desaparece cuando se comparan individuos por etnias, manteniéndose en la etnia caucásica, mientras que en la africana no, o sólo con niveles de 25 (OH) D $<$ 20 ng/ml.

En este sentido nos parece interesante el estudio realizado por Gutiérrez OM. y col. (37), en el cual, al analizar datos de adultos participantes en el estudio NHANES, describen que la relación entre DMO, PTH y niveles de 25 (OH) D difieren en función de la etnia. En la muestra total, la PTH y los niveles de 25(OH) D tienen relación inversa. Sin embargo, esta asociación desaparece cuando se estratifica por etnia, persistiendo esta asociación en blancos y mejicanos, mientras

que en africanos la relación inversa se mantiene sólo con niveles de 25 (OH) D < 20 ng/ml. En esta misma línea de trabajo, Aloia y col. (201) encuentran que en mujeres africanas la PTH tiene su *plateau* con niveles de 25 (OH) D entre 16-20 ng/ml. Weaver CM. y col., en un estudio en adolescentes americanas blancas y negras, encuentran que la relación inversa descrita entre PTH y niveles de vitamina D sólo se observa en blancas (63).

En niños con ECF el estudio realizado en Philadelphia por Buisson y col. (198) observa igualmente un aumento de PTH, sin poder determinar a partir de qué concentración de 25 (OH) D se produce dicho incremento.

En nuestro estudio, el índice de hiperparatiroidismo secundario es de un 25%, similar al descrito por otros autores en niños, encontrando significación estadística (p 0,017) con el test de Chi-cuadrado cuando se relaciona aquellos pacientes con hiperparatiroidismo y niveles de 25 (OH) D inferiores a 20 ng/ml. Esta asociación significativa desaparece con los niveles por encima de 30 ng/ml (p 0,058). Es decir, como se describe en otros trabajos, la relación inversa aparecería con niveles inferiores a 20 y no de 30 ng/ml, aunque no podemos determinar un punto de corte a partir del cual aumentan los niveles de PTH.

Un estudio más reciente realizado por Wright y col.(202),

Discusión.

en adultos con osteoartritis, también encuentra diferencias entre etnia caucásica y africana cuando analiza los cambios en los valores de PTH en función de los niveles de 25 (OH) D. Observan que en caucásicos existe relación inversa PTH / 25 (OH) D hasta niveles de 25 (OH) D > 32 ng/ml. Sin embargo, en africanos residentes en EEUU está relación inversa sólo se mantiene cuando los niveles de 25 (OH) D son < 23 ng/ml.

En nuestro trabajo, a pesar de la limitación de ser un estudio transversal y no realizar comparaciones con otro grupo étnico, encontramos esta relación inversa sólo con niveles de 25 (OH) D < 20 ng/ml. La excreción de calcio es menor en africanos; también tienen niveles más altos de marcadores de formación ósea cuando se comparan con caucásicos, lo que hace plantear la hipótesis sobre una sensibilidad reducida frente a los efectos de la PTH en el esqueleto, y quizás precisan niveles inferiores a 30 ng/ml para mantener una buena salud ósea. Un estudio prospectivo prolongado en el tiempo sería de gran utilidad para conocer la respuesta en el grupo de pacientes con ECF.

d. Valoración de la DMO en niños con ECF mediante DEXA.

Al igual que el déficit de vitamina D, la densidad ósea en niños con ECF está poco estudiada. Se sabe que la enfermedad afecta a la salud ósea; como se describe anteriormente, esta población tiene afectación vertebral con platillos vertebrales bicóncavos y más blandos, lo que se atribuye a la actividad disminuida de los osteoblastos. Además, la dactilitis frecuente en lactantes con esta patología es consecuencia de necrosis en las epífisis, y resulta en un acortamiento permanente del carpo y metacarpo. Niños y adolescentes con esta patología tienen también un riesgo aumentado de necrosis de la cabeza femoral. Por otro lado, hay una hiperplasia de médula ósea con ensanchamiento del espacio medular en huesos largos, con adelgazamiento de la cortical que conlleva aumento de fragilidad ósea (158, 203).

Los estudios realizados en niños con ECF con DEXA para evaluar la masa ósea han sido realizados en grupos pequeños de pacientes, sin datos suficientes para evaluar la técnica en esta población. Lal A. y col. (69) estudian 25 niños entre 9-19 años con enfermedad grave (hospitalizaciones frecuentes, retraso del crecimiento y necesidad de transfusiones crónicas).

Discusión.

Un 64% de la muestra presenta Z-score patológico sin encontrar correlación con la edad, con los factores de gravedad de la enfermedad ni con los niveles de ferritina. Encuentran déficit en la ingesta de calcio en el 60% de la muestra, y niveles de 25 (OH) D < 20 ng/ml en el 74%. La falta de correlación entre Z-score y edad, y el hallazgo de Z-score patológico en 7 de 9 niños entre 10-12 años, les hace pensar en la importancia de realizar densitometría en niños con edad inferior y clínica menos grave. Concluyen que el déficit en la mineralización ósea probablemente comienza en edades más tempranas, y el impacto de corregir el déficit de calcio y vitamina D merecen más investigaciones. Chapelon y col.(70, 71) también realizan su estudio a partir de 9 años de edad (n= 53), encontrando descenso de la densidad ósea en los casos estudiados. Describen una densidad más baja en niñas prepúberes frente a varones, igualándose esta diferencia tras la pubertad. No encuentran relación con la gravedad de la enfermedad, el déficit de vitamina D, la ingesta de calcio, osteocalcina u otros marcadores de la resorción ósea.

El estudio más interesante es el realizado hasta el momento por Buisson AM. (198). Se trata de un estudio casos-control que incluye 90 niños con ECF (Hb SS), de edades entre

4-19 años, comparándolos con 198 niños sanos de similares características. Encuentran en el grupo de enfermos una disminución de la densidad ósea significativa evaluada mediante DEXA ($p < 0,0001$).

En relación con la edad, la mineralización ósea se ve más afectada en adolescentes de sexo masculino. Encuentran correlación entre Z-score, la hemoglobina y el hematocrito; no encuentran correlación entre niveles de 25 (OH) D y densidad ósea, lo cual se explicaría porque las determinaciones de 25 (OH) D son puntuales. Sin embargo, este déficit mantenido en el tiempo sí tiene repercusión importante sobre la masa ósea.

También otros factores nutricionales como déficit de zinc, magnesio y calcio afectan al hueso. Se necesitan investigaciones adicionales para conocer su papel en esta población. Hasta que se resuelvan las dudas actuales, parece apropiado desarrollar una estrategia para mejorar el pico de masa ósea y prevenir fracturas y osteoporosis.

Basándonos en lo expuesto en la Sección de Introducción sobre el estado actual de las recomendaciones y métodos para evaluar la salud ósea en niños, en nuestro trabajo se realiza un estudio observacional transversal, para conocer la salud ósea con realización de DEXA a partir de los tres años ($n=40$),

Discusión.

siguiendo las recomendaciones de la SIDC para su realización, con mediciones en columna postero-anterior.

En este trabajo de tesis en el que se analiza una muestra de 40 enfermos con un rango de edad entre 3-16 años, con ECF de ambos sexos, encontramos Z-score patológico ya en pacientes menores de 5 años, no pudiendo definir de forma significativa un punto de corte para la edad a partir del cual la densitometría se altere de forma significativa, aunque el grupo con Z-score patológico (< -2) que representa un 17,5% de la muestra, tiene una edad mayoritariamente por encima de los 10 años. Este resultado se ajustaría a la recomendación de la SIDC de iniciar controles de densitometría a partir de los 10 años considerado para otras hemoglobinopatias como la talasemia mayor, si bien la muestra es pequeña para responder a esta cuestión. Estudios actuales en niños entre 1-16 años con talasemia β mayor también encuentran DMO disminuida a edades tempranas y se plantean qué protocolos deberían seguirse en la vigilancia de estos pacientes(204).

Nuestro estudio sólo encuentra correlación lineal entre el Z-score y los niveles de hemoglobina, e inversa con los valores de reticulocitos. Esto se explicaría por una disminución de la eritropoyesis en aquellos niños que mantienen hemoglobinas

más altas y menor hemólisis, lo que evitaría la hiperplasia de médula ósea con el consecuente descenso de cortical. Este resultado es coincidente con el trabajo de Buisson realizado en niños y descrito previamente, y también este mismo hallazgo ha sido descrito en adultos brasileños con ECF (205). En este trabajo encuentran correlación entre aumento de eritropoyesis (mayor hemólisis medida como aumento de reticulocitos, descenso de Hb y aumento LDH) y DMO, más marcada en el grupo de pacientes con osteoporosis frente a aquéllos con osteopenia o DMO normal. Igualmente, Sarrai y col. (206) en un estudio retrospectivo en 103 adultos con ECF, encuentran una alta prevalencia de densidad ósea anormal (79.6%) medida mediante DEXA. No encuentran relación con la edad, sí con los niveles de hemoglobina, siendo la Hb baja un predictor de densidad ósea alterada. Esto se explica por el aumento de eritropoyesis que causa hiperplasia de médula y descenso de trabéculas óseas, con la consecuente osteopenia en casos de anemia crónica y anemia grave. Describen también diferencias entre la S β + talasemia y el resto de genotipos, presentando este grupo niveles de densidad ósea más elevados que el resto. Estos enfermos tienen niveles de Hb más altos, lo que explicaría estos hallazgos. Este estudio encuentra igualmente una fuerte

Discusión.

relacion entre el estado nutricional y la densidad ósea: a menor índice de masa corporal, menor masa ósea, lo cual había sido descrito previamente por Soliman y Miller (157, 207). El índice de masa corporal parece afectarse en pacientes con ECF desde la infancia por causas tales como malnutrición, retraso del crecimiento y del desarrollo puberal, déficit hormonales y de vitaminas. Para algunos autores el peso podría ser mas importante que la edad en esta población para la adquisición de masa ósea adecuada (90). En este estudio encuentran también correlación significativa entre los niveles altos de ferritina y la densidad ósea anormal; esta relación no se ha encontrado en niños con ECF. En nuestro trabajo, la falta de correlación podría deberse a que un porcentaje pequeño recibe transfusiones de forma crónica y los niveles de ferritina son normales en la mayoría de los niños estudiados. En pacientes talasémicos tanto adultos como niños, la importancia de la sobrecarga de hierro en los tejidos que a nivel hepático provocaría la falta de hidroxilación de vitamina D o de su absorción adecuada y provocaría hipogonadismo con sus consecuencias para la formación ósea, sí está bien estudiado. (77, 78, 204, 208).

Baldini M. y col. (208) realizan un estudio casos control entre adultos con β -talasemia mayor y afectación ósea y

aquéllos sin afectación ósea de características similares en edad, sexo, régimen transfusional, quelación y remplazamiento hormonal, con el objetivo de detectar factores de protección para la salud ósea. El grupo sin osteopatía presenta niveles de IGF-1 más altos, corroborando el importante papel de las alteraciones endocrinas en estos pacientes (209, 210).

Gupta R. (211), en un estudio casos-control que incluye 106 adultos y 51 niños (28 enfermos ECF) en Kuwait, encuentra diferencias significativas en adultos con ECF frente a controles en cuanto a la DMO tanto en columna como en cadera ($p=0,000$ y $p=0,008$ respectivamente). En niños no existe diferencia en Z-score en columna ($p > 0,05$) ni en cadera ($p > 0,05$) frente a controles. El porcentaje de enfermos adultos con baja densidad ósea es del 67,4%, similar al publicado en otros estudios (157). El hecho de que la osteopenia y osteoporosis sean poco comunes en niños con ECF en Kuwait lo explican porque esta población tiene una HB F alta con un curso clínico de la enfermedad más leve, cifras de Hb más altas y menos hemólisis, hallazgos que corroboran también nuestros resultados.

Otros elementos traza como el zinc, con un cierto papel en el metabolismo óseo, se han descrito como factor implicado en

Discusión.

una menor densidad ósea en enfermos de talasemia y ECF en estudios de los años 2004-2006 (157, 212) perdiendo posteriormente interés, motivo por el que no se han valorado en nuestro trabajo. Asimismo, aunque el hipogonadismo es una causa conocida de menor densidad ósea, nosotros no lo hemos valorado, porque nuestra muestra tiene una edad media baja y la gran mayoría de niños se encuentran en un estadio prepuberal. Alteraciones endocrinas como hipogonadismo, hipotiroidismo e hipoparatiroidismo sí están muy implicadas en niños con talasemia mayor y baja densidad mineral ósea(204, 213).

También algún trabajo aislado postula un potencial papel de la inflamación como mecanismo que incrementaría la actividad de los osteoclastos en adultos con ECF (214).

Igualmente, se ha postulado en algún estudio como hipótesis que el nivel de 25 (OH) D es un factor que influye en la DMO en pacientes con ECF. A este respecto, un estudio realizado en Arabia Saudí comparando enfermos con ECF y población sana de similares características, describe DMO significativamente inferior en el grupo de enfermos respecto al control ($< 0,001$ tanto en columna como en fémur). La prevalencia de osteoporosis en pacientes con ECF y déficit de vitamina D es de 73,8% (45/61) en varones y 92,4% (85/92) en mujeres; sin

embargo, en el grupo control la osteoporosis tiene prevalencia del 30% en varones y 63,6% en mujeres. Este estudio no evalúa otras causas de baja DMO, como hipogonadismo y alteraciones hormonales, y tampoco la sobrecarga de hierro. Se necesitan estudios con mayor número de pacientes para confirmar estos hallazgos (68).

Nuestro trabajo no encuentra correlación entre los niveles de 25 (OH) D y la DMO medida como Z-score, dato que coincide con los trabajos realizados en niños con ECF (71) y, como se expone anteriormente en el texto, podría deberse a que se ha realizado una determinación puntual de 25 (OH) D, y es el déficit de vitamina D mantenido el que tendría repercusión sobre la disminución de masa ósea. Se necesitarían estudios prospectivos con determinaciones repetidas de 25 (OH) D para intentar explicar este hallazgo.

El riesgo de osteoporosis y osteopenia en pacientes pediátricos con ECF no está bien establecido, y hoy en día se desconoce el valor de la densitometría alterada. En adultos sí hay estudios en los que se demuestra mayor riesgo de osteopenia y osteoporosis en esta población. Un estudio de 36 adultos realizado en Arabia Saudí encuentra que un 82% de varones y un 76% de mujeres tienen osteoporosis u osteopenia

Discusión.

(215). Posteriormente, amplían este estudio a 87 pacientes, encontrando que un 65% de hombres y un 65,2% de mujeres tienen osteopenia y/u osteoporosis (216). Algunos trabajos en adultos con talasemia mayor también consideran la densidad mineral ósea como un buen índice del estatus óseo y predictora del riesgo de fracturas(217, 218).

Se han realizado algunos estudios en adultos sanos sobre la asociación entre niveles de 25 (OH) D y salud ósea, con resultados dispares (184, 219). Muchos estudios observacionales en adultos se han planteado la cuestión sobre cuáles son los niveles críticos de 25 (OH) D a partir de los cuales el riesgo de fracturas aumenta. Algunos estudios sitúan esa cifra en niveles inferiores a 16 ng/ml., otros, en inferiores a 20 ng/ml.(44, 220-223). Un estudio prospectivo en chicas finlandesas de 9 a 15 años muestra un 4% menos de densidad ósea en aquéllas con niveles mas bajos de vitamina D (82).

La incidencia de fracturas está bien definida en población sana con una curva bimodal, con un pico antes de los 20 años y otro después de los 40 años. Existen muy pocas publicaciones sobre fracturas en ECF; la mayoría son casos clínicos aislados y una cohorte de niños con osteomielitis y ECF (224-226).

Los individuos de etnia negra no afectados de ECF, a pesar

de tener déficit de 25 (OH) D mayor que la etnia blanca de similares características, tienen paradójicamente menos riesgo de fracturas, debido a una mayor masa ósea (10-15% mayor que otras etnias). Este aumento de densidad ósea aparece a edades tempranas, aproximadamente a los 6 años, y se hace más patente en la adolescencia (227). La causa puede ser multifactorial: obesidad más prevalente en esta población que estimula la formación ósea, menor turnover (38, 40). En este mismo sentido, Schnitzler CM. (228), cuando compara niños y adultos blancos y negros en Sudáfrica, encuentran que tanto los niños como adultos de piel negra presentan en cresta ilíaca mayor grado de mineralización, formación ósea, menos porosidad y mayor tamaño de endocortical, lo que contribuiría a una menor fragilidad para sufrir fracturas.

Desconocemos sí los niños africanos afectados de ECF debido a las alteraciones óseas secundarias a su patología, pierden esta ventaja propia de su etnia. En este sentido, un trabajo interesante es el realizado por Fung y col. (195), quienes comparan el riesgo de fracturas en las dos hemoglobinopatías más frecuentes, β - talasemia y ECF. El porcentaje de fracturas es mayor en el grupo de los enfermos con talasemia y sobrecarga férrica alta (38.8%). En contraste, no encuentran

Discusión.

diferencias en el riesgo de fracturas en pacientes con ECF en régimen hipertransfusional y con sobrecarga férrica, frente a pacientes con la misma patología que no se transfunden. La edad de las fracturas es similar en ambos grupos y la localización más frecuente, extremidad superior. La etnia puede ser una causa de la diferencia potencial entre ambos grupos, ya que los enfermos con talasemia son en su mayoría blancos, y los enfermos con ECF, de piel negra. Parece también que este grupo tiene menor afectación de órganos endocrinos por la sobrecarga férrica, lo que protegería frente a fracturas.

Aunque siguen sin aclararse muchas dudas, recientemente en publicaciones del año 2011 y 2012 sobre adultos con ECF describen que el déficit de vitamina D se asocia a mayor riesgo de fracturas y dolor músculo- esquelético crónico. Este déficit es una etiología tratable. Goodman y col.(229) miden niveles de 25 (OH) D; su valor medio fue de 9 ng/ml. en 142 pacientes de la Virginia Medical School, y 12.8 ng/ml en la Universidad de Chicago. 139 de 142 (98%) tienen niveles subóptimos (< 30 ng/ml), y 85 de 142 (60%) presentan déficit grave (< 10ng/ml). En este estudio no encuentran relación entre los niveles de vitamina D y otras variables analizadas como la edad, sexo, tratamiento con hidroxiurea, tipo de enfermedad u otros datos de laboratorio.

Concluyen que se necesitan más estudios para conocer el efecto del déficit de vitamina D en la densidad ósea y el dolor crónico en adultos (229).

Osunkwo y col. demuestran relación entre el dolor óseo crónico y los niveles de 25 (OH) D. El dolor se localiza preferentemente a nivel de columna lumbar, pelvis y miembros inferiores, y existe un riesgo aumentado de baja densidad ósea. Los suplementos con vitamina D servirían para mejorar la salud ósea y disminuir el dolor. Algunos estudios han demostrado disminución del dolor al administrar vitamina D en sujetos con dolor crónico sin ECF (230-232).

Estos autores, entre enero de 2008 y enero de 2010, estudian 53 pacientes de los que 32% tienen dolor crónico definido como dolor presente en la mitad o más de los días del mes. El dolor se relaciona con niveles más bajos de vitamina D, mayor edad, media de edad de 15.8 frente a 10.3, y pérdida de masa ósea en la densitometría. Reconocen que su estudio puede estar sesgado por incluir pacientes con más manifestaciones clínicas y tratarse de una muestra pequeña(233).

Este mismo autor describe un caso con dolor crónico que se resuelve tras tratamiento con vitamina D3 a dosis altas (234).

Discusión.

En niños con ECF, JacksonTC y col. (235) describen asociación entre déficit de vitamina D y función pulmonar, sin encontrar relación con los episodios de dolor agudo.

Asimismo, el embarazo parece ser otro factor de riesgo en las mujeres con ECF, predisponiendo a mayor osteopenia y osteoporosis en este grupo (236).

En este apartado son necesarios estudios con mayor número de pacientes para una mejor comprensión del problema.

Recientemente la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica y la Fundación Internacional de Osteoporosis han valorado la utilidad de una herramienta de cálculo (FRAX) avalada por la OMS, la cual integra factores clínicos de riesgo, densidad mineral ósea en el cuello femoral, datos de fracturas y mortalidad en el país. Calcula la probabilidad de fracturas en los diez años siguientes como método de ayuda a profesionales, identificando pacientes que precisen tratamiento. Hasta la fecha sólo 31 países en el mundo disponen de esta herramienta, entre los que no se encuentra España (237).

e. Tratamiento con calcio y vitamina D3 en niños con enfermedad de células falciformes con niveles de 25 (OH) D inferiores a 30 ng/ml.

En cuanto al tratamiento o profilaxis con calcio y/o vitamina D, no existe hasta el momento de elaboración de este trabajo ninguna publicación sobre profilaxis o tratamiento con calcio y vitamina D en niños con ECF.

En el análisis realizado en el estudio transversal previo al inicio de la terapia, se observó una diferencia significativa cuando se compara el grupo que recibe profilaxis con vitamina D3 en el primer año de vida frente al que no. (Media \pm DS de los niveles de 25 (OH) D en el grupo sin profilaxis $18,03 \pm 9,73$, y en el grupo que sí recibe alguna profilaxis con vitamina D durante el primer año de vida $M = 25,70 \pm 15,58$, $p 0,026$).

Valorando estos resultados, y lo anteriormente expuesto en el apartado de introducción, en nuestra población de estudio sin osteoporosis establecida, en la que se pretende hacer una intervención de profilaxis de cara al futuro, se administró vitamina D3 oral a dosis de 800 UI y calcio siguiendo las recomendaciones de diferentes trabajos e instituciones relevantes (47, 112, 238). Aunque la evidencia continúa siendo confusa, cada vez hay más consenso en la opción del uso combinado de calcio y vitamina D,

Discusión.

ya que para reducir fracturas no vertebrales esta combinación es superior al uso de vitamina D aislada. El éxito del tratamiento se asocia al cumplimiento más prolongado y administrar dosis más altas de vitamina D en los casos con mayor déficit. Un metaanálisis en adultos encontró un descenso del riesgo de fractura de cadera del 26% en el grupo de pacientes que recibieron una dosis de 800 UI de vitamina D, frente al que recibió 400 UI (118). El resultado de un metaanálisis publicado en el 2007 (121), comparando el aporte de calcio frente a calcio y vitamina D a dosis de 800 UI, demuestra reducción en el número de fracturas y aumento de densidad ósea en adultos. Asimismo, en 2009 la librería Cochrane analiza los resultados de ocho trabajos en los que se administra calcio y vitamina D, frente a diez con administración exclusiva de vitamina D, sin encontrar una relación significativa cuando se administra exclusivamente vitamina D en la reducción de fracturas, mientras que cuando se asocia calcio, al igual que en el trabajo anterior, se reduce el riesgo de fracturas en personas ancianas de forma significativa (122). Se necesitan estudios para definir dosis, duración de terapia, vía de administración y, sobre todo, estudios en la edad pediátrica. (118, 119, 123).

En cuanto a la administración parenteral de vitamina D

(124), aunque existen estudios en niños comparando la vía oral frente a la parenteral sin aumento de efectos secundarios tras el uso de esta última, es una opción cada vez menos contemplada, prefiriéndose la opción de aumentar la dosis de suplemento oral y realizar un mejor control de adherencia al tratamiento (125).

Como ya se ha comentado, en el momento de elaborar este trabajo con la revisión efectuada no se ha encontrado la existencia de ningún estudio publicado sobre tratamiento o profilaxis con vitamina D en niños con ECF.

Winzenberg y col. (239) en un metaanálisis, valoran el impacto sobre la densidad mineral ósea de los suplementos con vitamina D en niños sanos. Demuestran que el uso de vitamina D de forma generalizada en población pediátrica no tiene un efecto significativo en la DMO corporal total, en caderas, (con un efecto leve en columna lumbar). Sin embargo, en niños con déficit de vitamina D (definidos como $< 35 \text{ nmol/L}$), los suplementos tienen un efecto significativo sobre la DMO total y también significativo sobre columna lumbar. . Algún estudio previo había demostrado un incremento en DMO en niñas peripuberales (82). Se precisan estudios para saber si estos cambios persisten en el tiempo. Una revisión de estudios con calcio en niños demuestra que el aumento en la DMO no se mantiene en el tiempo (240). Para

Discusión.

este autor, unos niveles adecuados de 25 (OH) D durante la infancia y adolescencias son necesarios.

Soliman A y col. (241) administran vitamina D3 a 40 adolescentes talasémicos con niveles de 25 (OH) D deficientes, a dosis de 10.000 UI/Kg (máx 600.000 UI); esta terapia resuelve el déficit , pero no se mantiene a los 6 meses.

El único estudio publicado en el momento de elaboración de este trabajo en el que se administra calcio y vitamina D a pacientes con ECF adultos se resume a continuación. Adewoye y col. (242) estudian 14 adultos con ECF residentes en Boston en los que evalúan niveles de 25 (OH) D, DEXA, marcadores de formación y resorción ósea antes y tras 12 meses de tratamiento con vitamina D2 50.000 UI oral semanal durante 8 semanas, y posteriormente cada 2 semanas durante 44 semanas, y 1.000 mg de calcio oral/día durante 52 semanas. Los niveles de 25 (OH) D pasan de 11.6 ± 4 a 34.6 ± 11 ($p < 0.001$), y mejora la densidad ósea con elevación del $3.6\% \pm 3.9\%$ a nivel de espina lumbar ($p = 0.009$), $4.6\% \pm 8.5\%$ en cabeza femoral ($p = 0.05$), y $6.5\% \pm 12.6\%$ en radio distal ($p = 0.09$); los marcadores de resorción ósea no experimentan variaciones. Como explicación postulan que la hipomagnesemia descrita en esta patología podría ser la causa de la falta de corrección del

hiperparatiroidismo (243, 244).

Nosotros observamos una mejoría de los niveles de 25 (OH) D en todas las determinaciones realizadas a lo largo de los 12 meses de seguimiento. Los niveles se mantienen por encima de 25 ng/ml, sin conseguir niveles mantenidos por encima de 30 ng/ml, que sería el objetivo principal para asegurar una buena salud ósea. Cuando se analiza por separado el grupo de pacientes que consigue niveles > 20 ng/ml y > 30 ng/ml, los mejores porcentajes se consiguen a los 9 meses de tratamiento (90 y 60%, respectivamente). Con los datos disponibles, no podemos definir si se precisan dosis de vitamina D3 mayores de 800 UI en población de etnias con piel oscura como la estudiada, para conseguir niveles de 25 (OH) D ≥ 30 ng/ml mantenidos, o si los resultados se deben a la variabilidad en la adherencia a lo largo del trabajo. Otra limitación es el tamaño muestral.

Del resto de parámetros analíticos observados, los niveles de calcio no varían de forma significativa a lo largo del tratamiento, y los niveles de PTH tampoco sufren modificaciones significativas, si bien con el test de Wilcoxon se registra un aumento significativo de los niveles de fósforo y magnesio a los 3 y 12 meses de tratamiento.

Aunque no hay referencias en la literatura respecto a la

Discusión.

relación entre magnesio y déficit de vitamina D en la población infantil, este dato podría ser interesante de cara al seguimiento y tratamiento, ya que el único estudio publicado de tratamiento con calcio y vitamina D en adultos con ECF describe un aumento de masa ósea y valores de vitamina D tras el tratamiento sin descenso de PTH, postulando como posible causa un déficit de magnesio asociado(242, 245). Con los resultados obtenidos no podemos concluir que la falta de variación de las cifras de PTH se deba a hipomagnesemia, ya que los pacientes tratados presentan cifras de magnesio superiores a 1,6 y en general superiores a 2, consideradas como normales.

En cuanto a la toxicidad del tratamiento éste fue bien tolerado; no se observaron niveles de 25 (OH) D en rango tóxico en ningún paciente, y las mediciones de calcio/creatinina en orina mostraron su disminución a los 12 meses respecto a los valores basales (p 0,011) con el test de Wilcoxon. No se encontraron diferencias en el resto de las mediciones.

f. Adherencia al tratamiento.

En general, a lo largo de todo el estudio el principal problema fue conseguir mentalizar a la población sujeto de estudio y tratamiento de la importancia del mismo para su salud

en el futuro. La adherencia al tratamiento es un problema importante al igual que en otros grupos con patologías crónicas que requieren tratamientos prolongados.

La adherencia al tratamiento recibe cada vez más importancia. Se comenzó a hablar de cumplimiento a finales de los años 70; posteriormente algunos autores prefirieron cambiar este término por cooperación, adherencia, alianza terapéutica, colaboración, concordancia (246, {Gritz, 1989 #207, 247-250). Adherencia es en la actualidad el término preferido (251).

Kyngas y col., en su definición de adherencia, identifican tres elementos comunes relacionados con el paciente (252): responsabilidad para su auto-cuidado, su papel en el tratamiento y el grado de colaboración con el equipo sanitario. El paciente o su cuidador deben tener motivación suficiente para participar de forma activa, responsable en el proceso de sus cuidados y en colaboración estrecha con el equipo médico. La definición de adherencia es importante para saber cómo medir y evaluar la misma. Los cuestionarios, diarios o entrevistas son técnicas populares para la evaluación de la adherencia, son métodos fáciles y baratos de administrar. Sin embargo, pueden ser poco fiables por falta de datos o porque el paciente, familiar etc. falseen los datos al percibir qué respuesta es la más aceptable.

Discusión.

Los estudios de no adherencia en adolescentes es comparable a los pacientes con cáncer y otros grupos con distintas patologías como asma, diabetes, enfermedad inflamatoria crónica o infección VIH (253).

En adolescentes, las variables que potencialmente influyen en la adherencia son: una relación positiva en la familia, con una comunicación abierta entre los miembros de la misma. Las investigaciones indican que es esencial para promover su adherencia e implicarles en todas las decisiones de tratamiento. Esto obliga al equipo a recabar un conocimiento adecuado del contexto social del paciente para trabajar de forma anticipada aquellos problemas que en el futuro puedan ser causa de no adherencia. En general, podemos afirmar que un apropiado soporte psicológico es de extrema importancia para una adherencia adecuada en los pacientes de este grupo de edad.

Se puede afirmar que los pacientes con ECF reúnen varios de los factores comentados en la Sección de Métodos del estudio piloto de tratamiento para que la adherencia al tratamiento no sea óptima. Suelen aceptar mal la enfermedad y, en ocasiones, ocultarla. Nuestra muestra tiene una media de edad baja, por lo que necesita la colaboración de un adulto para la administración del medicamento. Son medidas de profilaxis, los niños no tienen

problemas óseos en la actualidad, por lo que a los padres les cuesta dar un tratamiento diario y hacer un seguimiento.

En nuestro caso la adherencia se midió en función de los niveles de 25 (OH) D, la entrevista clínica y la estimación por la persona del equipo asistencial que evalúa al paciente en cada control. Se propuso al servicio de farmacia del hospital su colaboración para la administración de megadosis de vitamina D3 mensuales o bimensuales, facilitando el cumplimiento del paciente del tratamiento y valorando mejor su adherencia, pero fue desestimada (111).

Tras lo comentado previamente, la adherencia parece estar sobrestimada en nuestro estudio encontrándose por encima del 80% en todas las determinaciones, a excepción del 6º mes en que baja a un 60-70%.

El resultado más relevante es quizás el expuesto tras analizar los pacientes que consiguen niveles de 25 (OH) D > 20 y 30 ng/ml, respectivamente, en función de una buena o mala adherencia al tratamiento. En el grupo con niveles > 20 ng/ml existen pacientes que consiguen estos niveles tanto en el grupo de buena como mala adherencia. Sin embargo cuando se analiza los pacientes que consiguen niveles > 30 ng/ml, sólo consiguen superar con el tratamiento estos niveles los pacientes del grupo

Discusión.

de buena adherencia, lo que apoyaría que el tratamiento podría ser suficiente para conseguir su objetivo de mantener niveles de 25 (OH) D \geq 30 ng/ml si el cumplimiento por el paciente fuese el adecuado.

Cuando, dentro del grupo que recibe tratamiento con calcio y vitamina D3, analizamos los cambios en la densitometría basal y tras 12 meses de tratamiento en un grupo de 17 pacientes, a pesar de que el informe del radiólogo es positivo cuantificando mejoría o estabilidad en la DMO en 13 de ellos, los análisis estadísticos no encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el Z-score basal y a los 12 meses de tratamiento, lo que probablemente se deba al tamaño muestral y a otros factores como la variabilidad en la adherencia, con abandonos temporales del tratamiento. Se necesitarían estudios prospectivos con muestras mayores y más prolongados en el tiempo para conocer si el tratamiento con calcio y vitamina D en niños es adecuado para mejorar la DMO de forma significativa y mantener esta mejoría en el tiempo.

Los diferentes análisis para ver la influencia de una buena o mala adherencia en los cambios en la densitometría y las posibles diferencias entre pacientes con niveles mantenidos de 25 (OH) D más altos tampoco obtienen diferencias significativas

estadísticamente. Como ya se ha comentado, una limitación importante para dar respuesta a estas cuestiones quizá sea el tamaño muestral pues, a pesar de ser una muestra pequeña, sí se observa una tendencia a aumentar la DMO en los pacientes con mejor adherencia y en aquellos con niveles de 25 (OH) D más altos.

VII. CONCLUSIONES.

VII. Conclusiones.

Tras el estudio transversal para conocer el estatus de salud ósea de los niños con ECF seguidos en nuestro centro, y el posterior estudio longitudinal prospectivo para analizar los efectos del tratamiento con calcio y vitamina D3, hemos llegado a las siguientes conclusiones.

1. Confirmamos que tanto el déficit como los valores insuficientes de vitamina D son muy prevalentes en los niños con Enfermedad de Células Falciformes de nuestra población, y aparece en edades tempranas.
2. Los niveles de 25 (OH) D considerados para definir dicho déficit e insuficiencia se basan en la actualidad en estudios de adultos. Los datos obtenidos en este trabajo no son suficientes para definir si en la población pediátrica, y concretamente en niños con Enfermedad de Células Falciformes, deberían usarse otros valores de referencia.
3. Los factores de riesgo más implicados en el déficit de vitamina D en nuestro trabajo son: mayor talla, mayor peso y la gravedad de la enfermedad, medida como

Conclusiones.

días de ingreso / año.

4. No encontramos diferencias estacionales en las mediciones de 25 (OH) D; el hecho de habitar en una comunidad como la de Madrid, con abundante luz solar, no es suficiente para mantener unos niveles adecuados de 25 (OH) D en esta población.
5. De los marcadores de formación y resorción ósea analizados, sólo la PTH se correlaciona con los niveles de 25 (OH) D de forma significativa en nuestro estudio. Encontramos relación inversa PTH / 25 (OH) D en niños con Enfermedad de Células Falciformes únicamente cuando los niveles de 25 (OH) D son < 20 ng/ml. Este hallazgo plantea la hipótesis de si los valores considerados como óptimos para una buena salud ósea son aplicables a nuestra población.
6. Los estudios de densitometría, a pesar de sus limitaciones en pediatría, son adecuados para conocer la BMD en niños con ECF y valorar respuesta al tratamiento. El descenso de densidad mineral ósea se observa en menores de cinco años, si bien se acentúa con la edad, sobre todo en mayores de diez años. Asimismo, los niños con mayor hemólisis tienen una

DMO más afectada.

7. Los resultados obtenidos tras la administración de calcio y vitamina D3 a los niños con ECF y niveles de 25 (OH) D inferiores a 30 ng/ml., demuestran eficacia de la terapia para conseguir aumentar los niveles de 25 (OH) D de forma significativa y también un aumento en la DMO, si bien este último no es significativo probablemente debido al tamaño muestral. El tratamiento es bien tolerado, sin toxicidad. Queda por definir el tiempo y la dosis necesaria de vitamina D3 en esta población y la capacidad de mantener niveles de 25 (OH) D adecuados de forma prolongada.
8. El mayor problema encontrado en el grupo en el que se realiza tratamiento ha sido la variabilidad en la adherencia al mismo.
9. Una intervención precoz en esta población parece importante para conseguir una densidad mineral ósea adecuada en la edad pediátrica.

Comentarios.

1. Los médicos que se ocupan de estos pacientes deben tomar conciencia de la importancia del déficit de vitamina D en esta población, y realizar cribado a los mismos para garantizar una buena salud ósea y una transición a la edad adulta en las mejores condiciones posibles.

2. Los programas de cribado neonatal son una herramienta muy relevante que permite una detección más precoz de problemas y la posibilidad de intervenir de forma temprana.

3. Equipos multidisciplinares son fundamentales para conseguir una buena adherencia a los tratamientos y una mejor calidad de vida en niños con ECF.

VIII. ANEXOS.

Anexo1.

**FICHA DE TRATAMIENTO CON VITAMINA D Y CALCIO EN PACIENTES
CON ENFERMEDAD DE CÉLULAS FALCIFORMES.**

1) NOMBRE Y APELLIDOS (iniciales) DEL NIÑO:

2) N° DE HISTORIA:

3) FECHA DE NACIMIENTO:

4) SEXO:

5) DIAGNÓSTICO:

SS

$s\beta^0$

$s\beta^+$

SC

Otro: _____

6) CONSENTIMIENTO INFORMADO FIRMADO SÍ

NO

NIVELES 25 (OH) VITAMINA D PREVIA AL TTO:

DENSITOMETRÍA PREVIA A TRATAMIENTO SÍ NO

NORMAL

ALTERADA

7) FECHA INICIO:

8) DOSIS CALCIO
 VITAMINA D
 PRESENTACIÓN

Anexos.

9) MONITORIZACIÓN

	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
FECHA				
ESTUDIO				
Ca /Cr orina				
calcio				
magnesio				
fósforo				
25 (OH) D				
PTH				
Densitometría				

Anexo 2.**Resumen de las dosis de calcio y vitamina D recomendadas en niños y las presentaciones existentes en España.****CALCIO**

Dosis diaria fisiológica de calcio elemento:

Recién nacido	30-50 mg/kg/día
< 6 meses	210 mg/día
6-12 meses	270 mg/día
1-3 años	500 mg/día
4-8 años	800 mg/día
9-18 años	1300 mg/día

Dosis TTO: 30-70mg/kg/día.

Preparaciones de calcio:

	Concentración	Calcio elemental
Preparación i.v.		
Gluconato cálcico (9.4% es calcio elemental)	100 mg/ml	9.4 mg Ca elem/100 mg
Preparaciones orales		
Carbonato cálcico (40% es calcio elemental)	100 mg/ml	40 mg Ca elem/ml
Carbonato cálcico (40% es calcio elemental)	250 mg/ml	100 mg Ca elem/ml
Glubionato cálcico (6.4% es calcio elemental)	1800 mg/5 ml (360 mg/ml)	23 mg Ca elem/ml
Calcio 20 Emulsión®	104 mg/5 ml Fosfato cálcico	41.6 mg Ca elem/ 5 ml
Natecal 600® (comp masticables)	1500 mg carbonato cálcico	600 mg Ca elemental
Mastical® (comp masticables)	1250 mg Carbonato cálcico	500 mg Ca elemental
Calcium-Sandoz-Forte® (comp eferv)	300 mg Carbonato cálcico + 2940 mg lactato-gluconato cálcico	500 mg de Ca elemental

Anexos.

Asociaciones Vit D + Calcio:

Calcio 20 Complex emls oral (no financ)	Vit D3 498 U/15 ml	Fosfato y pantotenato cálcico → 100 mg de Ca elemental
Calcio 20 Fuerte Emulsión® (300 ml)	Vit D3 500U/15 ml	180 mg Ca elem/15 ml
Mastical D® (comp masticables)	Vit D3 400	Comp. Carbonato cálcico 1250 mg → 500 mg Ca elemental
Ideos® (comp masticables)	Vit D3 400 U	Comp. Carbonato cálcico 1250 mg → 500 mg Ca elemental
Natecal D Flash® (comp bucodisprsables)	Vit D3 400 U	Comp. Carbonato cálcico 1500 mg → 600 mg Ca elemental

FORMAS DE VITAMINA D

Colecalciferol: vitamina D3 (origen animal). Sin hidroxilar.

Ergocalciferol: vitamina D2 (origen vegetal). Sin hidroxilar.

Calcifediol (calcidiol): 25-OH vit D (precisa función renal conservada)

Alfacalcidol: 1-OH vit D (de elección pacientes patología renal, déficit PTH)

Calcitriol: 1,25-OH vit D (de elección pacientes patología renal y hepática, déficit PTH)

VITAMINA D	Forma	Equivalencia	Unidades	mcg
Vitamina D3 Berenguer® 2000 U/ml	Colecalciferol vitamina D3	1 gota (1 ml= 30 g)	67 (2000 U/ml)	1.7 (1mcg=40 U)
Hidroferol gotas® 0.1 mg/1 ml	Calcifediol 25-OH vit D	1 gota (1 ml= 25 g)	240 (6000 U/ml)	4 (1mcg=60 U)
Hidroferol amp® 0.266 mg	Calcifediol 25-OH vit D	1 ampolla vo	16.000 U	266 (1mcg=60 U)
Hidroferol choque® 3 mg	Calcifediol 25-OH vit D	1 ampolla vo	180.000	3000 (1mcg=60 U)
Protovit® (+ otras vit)	Ergocalciferol vitamina D2	1 gota (1 ml= 24 g)	37.5 U (900 U/ml)	

OTRAS FORMAS DE VITAMINA D (LAS QUE DEBEN EMPLEARSE CUANDO HAY ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN HEPÁTICO Y/O RENAL O SE PRECISA INICIO DE ACCIÓN RÁPIDO) *No se suelen utilizar en estados carenciales leves*

- ALFACALCIDOL = 1-OH VITAMINA D (1-hidroxicolecalciferol)

Etalpha® gotas 2 mcg/ml (1 ml = 40 gotas, 20 gotas = 1 mcg)

Dosis en prematuros y lactantes: 0.05-0.1 mcg/kg/día

Niños < 20 kg: 0.05 mcg/kg/día (1 gota/kg)

Niños > 20 kg: 0.25-1 mcg/día (ajustar según calcemia).

CALCITRIOL = 1,25- OH VITAMINA D (1,25-dihidroxicolecalciferol)

Rocaltrol[®] Cápsulas 0.25 y 0.5 mcg

Niños < 3 años: 0.01 – 0.015 mcg/kg/día

Niños > 3 años: 0.25 – 0.5 mcg/día (máximo adultos 2

mcg/día.

IX BILIOGRAFÍA.

IX. Bibliografía.

1. Brousseau DC, Panepinto JA, Nimmer M, Hoffmann RG. The number of people with sickle-cell disease in the United States: national and state estimates. *Am J Hematol* 2010; 85(1):77-8.
2. Hassell KL. Population estimates of sickle cell disease in the U.S. *Am J Prev Med* 2010; 38(4 Suppl):S512-21.
3. Cela de Julian E, Dulin Iniguez E, Guerrero Soler M, et al. [Evaluation of systematic neonatal screening for sickle cell diseases in Madrid three years after its introduction]. *An Pediatr (Barc)* 2007; 66(4):382-6.
4. Savitt TL, Goldberg MF. Herrick's 1910 case report of sickle cell anemia. The rest of the story. *Jama* 1989; 261(2):266-71.
5. Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin Lab Haematol* 2004; 26(3):159-76.
6. Bain B. Sickle cell haemoglobin and its interactions with other variant haemoglobins and with thalasseмииs. 2^a edition ed. Oxford: Blackwell Science Ltd; 2006. p. 113-53.
7. Ataulfo Gonzalez F, Blazquez C, Ropero P, et al. [Association of hemoglobinopathy and alpha thalasseμία. Study of 45 patients]. *Med Clin (Barc)* 2005; 124(19):726-9.
8. Hebbel RP. Pathobiology of sickle cell disease. 4^a ed. Philadelphia: churchill Livingstone; 2005. p. 591.
9. Sauntharajah Y. Sickle cell disease. 4^a edition ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005. p. 605-644.
10. Quinn CT, Rogers ZR, McCavit TL, Buchanan GR. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. *Blood* 2010; 115(17):3447-52.
11. Almeida AM, Henthorn JS, Davies SC. Neonatal screening for haemoglobinopathies: the results of a 10-year programme in an English Health Region. *Br J Haematol* 2001; 112(1):32-5.
12. Henthorn JS, Almeida AM, Davies SC. Neonatal screening for sickle cell disorders. *Br J Haematol* 2004; 124(3):259-63.

Bibliografia.

13. Garrick MD, Dembure P, Guthrie R. Sickle-cell anemia and other hemoglobinopathies. Procedures and strategy for screening employing spots of blood on filter paper as specimens. *N Engl J Med* 1973; 288(24):1265-8.
14. Benson JM, Therrell BL, Jr. History and current status of newborn screening for hemoglobinopathies. *Semin Perinatol* 2010; 34(2):134-44.
15. Gaston MH, Verter JI, Woods G, et al. Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. A randomized trial. *N Engl J Med* 1986; 314(25):1593-9.
16. Bjornson AB, Falletta JM, Verter JI, et al. Serotype-specific immunoglobulin G antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccine in children with sickle cell anemia: effects of continued penicillin prophylaxis. *J Pediatr* 1996; 129(6):828-35.
17. Verduzco LA, Nathan DG. Sickle cell disease and stroke. *Blood* 2009; 114(25):5117-25.
18. Wang WC, Ware RE, Miller ST, et al. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: a multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). *Lancet* 2011; 377(9778):1663-72.
19. Ohene-Frempong K. Indications for red cell transfusion in sickle cell disease. *Semin Hematol* 2001; 38(1 Suppl 1):5-13.
20. Pegelow CH, Adams RJ, McKie V, et al. Risk of recurrent stroke in patients with sickle cell disease treated with erythrocyte transfusions. *J Pediatr* 1995; 126(6):896-9.
21. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med* 1998; 339(1):5-11.
22. Fullerton HJ, Adams RJ, Zhao S, Johnston SC. Declining stroke rates in Californian children with sickle cell disease. *Blood* 2004; 104(2):336-9.
23. Adams RJ, Brambilla D. Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med* 2005; 353(26):2769-78.

24. Inati A. Recent advances in improving the management of sickle cell disease. *Blood Rev* 2009;23 Suppl 1:S9-13.
25. Bolanos-Meade J, Brodsky RA. Blood and marrow transplantation for sickle cell disease: overcoming barriers to success. *Curr Opin Oncol* 2009; 21(2):158-61.
26. Vermynen C, Cornu G, Ferster A, et al. Haematopoietic stem cell transplantation for sickle cell anaemia: the first 50 patients transplanted in Belgium. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22(1):1-6.
27. Walters MC, Storb R, Patience M, et al. Impact of bone marrow transplantation for symptomatic sickle cell disease: an interim report. Multicenter investigation of bone marrow transplantation for sickle cell disease. *Blood* 2000; 95(6):1918-24.
28. Freed J, Talano J, Small T, Ricci A, Cairo MS. Allogeneic cellular and autologous stem cell therapy for sickle cell disease: 'whom, when and how'. *Bone Marrow Transplant* 2011 Dec19 [Epub ahead of print].
29. Walters MC, Hardy K, Edwards S, et al. Pulmonary, gonadal, and central nervous system status after bone marrow transplantation for sickle cell disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16(2):263-72.
30. Bernaudin F, Socie G, Kuentz M, et al. Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. *Blood* 2007; 110(7):2749-56.
31. Locatelli F, Rocha V, Reed W, et al. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. *Blood* 2003;101(6):2137-43.
32. Adamkiewicz TV, Mehta PS, Boyer MW, et al. Transplantation of unrelated placental blood cells in children with high-risk sickle cell disease. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34(5):405-11.
33. Bhatia M, Walters MC. Hematopoietic cell transplantation for thalassemia and sickle cell disease: past, present and future. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41(2):109-17.
34. Rodriguez-Rodriguez E, Aparicio A, Lopez-Sobaler AM, Ortega RM. Vitamin D status in a group of Spanish schoolchildren. *Minerva Pediatr* 2011; 63(1):11-8.

Bibliografia.

35. **Vidailhet M, Mallet E, Bocquet A, et al. Vitamin D: Still a topical matter in children and adolescents. A position paper by the Committee on Nutrition of the French Society of Paediatrics. Arch Pediatr 2012; 19(3):316-28.**
36. **Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. Ann Epidemiol 2009; 19(2):73-8.**
37. **Gutierrez OM, Farwell WR, Kermah D, Taylor EN. Racial differences in the relationship between vitamin D, bone mineral density, and parathyroid hormone in the National Health and Nutrition Examination Survey. Osteoporos Int 2011; 22 (6): 1745-53. Epub 2010 sep17.**
38. **Bryant RJ, Wastney ME, Martin BR, et al. Racial differences in bone turnover and calcium metabolism in adolescent females. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88(3):1043-7.**
39. **Bell NH, Yergey AL, Vieira NE, Oexmann MJ, Shary JR. Demonstration of a difference in urinary calcium, not calcium absorption, in black and white adolescents. J Bone Miner Res 1993; 8(9):1111-5.**
40. **Aloia JF, Vaswani A, Yeh JK, Flaster E. Risk for osteoporosis in black women. Calcif Tissue Int 1996; 59(6):415-23.**
41. **Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. J Clin Invest 2006; 116(8):2062-72.**
42. **Specker BL, Ho ML, Oestreich A, et al. Prospective study of vitamin D supplementation and rickets in China. J Pediatr 1992; 120(5):733-9.**
43. **Saintonge S, Bang H, Gerber LM. Implications of a new definition of vitamin D deficiency in a multiracial us adolescent population: the National Health and Nutrition Examination Survey III. Pediatrics 2009; 123(3):797-803.**
44. **Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. N Engl J Med 2011; 364(3):248-54.**
45. **Gordon CM, Feldman HA, Sinclair L, et al. Prevalence of vitamin D deficiency among healthy infants and toddlers. Arch Pediatr Adolesc Med 2008; 162(6):505-12.**

46. Huh SY, Gordon CM. Vitamin D deficiency in children and adolescents: epidemiology, impact and treatment. *Rev Endocr Metab Disord* 2008; 9(2):161-70.
47. Holick MF. The D-lightful vitamin D for child health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2012; 36(1 Suppl):9S-19S.
48. Clarke NM, Page JE. Vitamin D deficiency: a paediatric orthopaedic perspective. *Curr Opin Pediatr* 2012; 24(1):46-9.
49. Holick MF. Deficiency of sunlight and vitamin D. *Bmj* 2008;336(7657):1318-9.
50. Lee JM, Smith JR, Philipp BL, Chen TC, Mathieu J, Holick MF. Vitamin D deficiency in a healthy group of mothers and newborn infants. *Clin Pediatr (Phila)* 2007; 46(1):42-4.
51. Ziegler EE, Hollis BW, Nelson SE, Jeter JM. Vitamin D deficiency in breastfed infants in Iowa. *Pediatrics* 2006; 118(2):603-10.
52. Gessner BD, Plotnik J, Muth PT. 25-hydroxyvitamin D levels among healthy children in Alaska. *J Pediatr* 2003; 143(4):434-7.
53. Guillemant J, Le HT, Maria A, Allemandou A, Peres G, Guillemant S. Wintertime vitamin D deficiency in male adolescents: effect on parathyroid function and response to vitamin D3 supplements. *Osteoporos Int* 2001; 12(10):875-9.
54. Rodriguez-Rodriguez E, Navia-Lomban B, Lopez-Sobaler AM, Ortega RM. Associations between abdominal fat and body mass index on vitamin D status in a group of Spanish schoolchildren. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64(5):461-7.
55. Du X, Greenfield H, Fraser DR, Ge K, Trube A, Wang Y. Vitamin D deficiency and associated factors in adolescent girls in Beijing. *Am J Clin Nutr* 2001; 74(4):494-500.
56. Lehtonen-Veromaa M, Mottonen T, Irjala K, et al. Vitamin D intake is low and hypovitaminosis D common in healthy 9- to 15-year-old Finnish girls. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53(9):746-51.
57. El-Hajj Fuleihan G, Nabulsi M, Choucair M, et al. Hypovitaminosis D in healthy schoolchildren. *Pediatrics* 2001; 107(4):E53.
58. Nicolaidou P, Hatzistamatiou Z, Papadopoulou A, et al. Low vitamin D status in mother-newborn pairs in Greece. *Calcif Tissue Int* 2006; 78(6):337-42.

Bibliografia.

59. Lips P. Worldwide status of vitamin D nutrition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121 (1-2):297-300.
60. Poopedi MA, Norris SA, Pettifor JM. Factors influencing the vitamin D status of 10-year-old urban South African children. *Public Health Nutr* 2010:1-6.
61. Dong Y, Stallmann-Jorgensen IS, Pollock NK, et al. A 16-Week Randomized Clinical Trial of 2000 International Units Daily Vitamin D3 Supplementation in Black Youth: 25-Hydroxyvitamin D, Adiposity, and Arterial Stiffness. *J Clin Endocrinol Metab* 2010.
62. Willis CM, Laing EM, Hall DB, Hausman DB, Lewis RD. A prospective analysis of plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations in white and black prepubertal females in the southeastern United States. *Am J Clin Nutr* 2007; 85(1):124-30.
63. Weaver CM, McCabe LD, McCabe GP, et al. Vitamin D status and calcium metabolism in adolescent black and white girls on a range of controlled calcium intakes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(10):3907-14.
64. Gordon CM, DePeter KC, Feldman HA, Grace E, Emans SJ. Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2004; 158(6):531-7.
65. Stein EM, Laing EM, Hall DB, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in girls aged 4-8 y living in the southeastern United States. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(1):75-81.
66. Rovner AJ, Stallings VA, Kawchak DA, Schall JI, Ohene-Frempong K, Zemel BS. High risk of vitamin D deficiency in children with sickle cell disease. *J Am Diet Assoc* 2008; 108(9):1512-6.
67. Buisson AM, Kawchak DA, Schall J, Ohene-Frempong K, Stallings VA, Zemel BS. Low vitamin D status in children with sickle cell disease. *J Pediatr* 2004;145(5):622-7.
68. Sadat-Ali M, Al-Elq A, Al-Turki H, Sultan O, Al-Ali A, Almulhim F. Vitamin D level among patients with sickle cell anemia and its influence on bone mass. *Am J Hematol* 2011; 86(6):506-7.
69. Lal A, Fung EB, Pakbaz Z, Hackney-Stephens E, Vichinsky EP. Bone mineral density in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47(7):901-6.

70. Chapelon E, Garabedian M, Brousse V, Souberbielle JC, Bresson JL, de Montalembert M. Osteopenia and vitamin D deficiency in children with sickle cell disease. *Eur J Haematol* 2009; 83(6):572-578.
71. Chapelon E, Garabedian M, Brousse V, Souberbielle JC, Bresson JL, de Montalembert M. [Osteopenia and vitamin D deficiency in children with sickle cell disease]. *Arch Pediatr* 2009; 16(6):619-21.
72. Toumba M, Skordis N. Osteoporosis syndrome in thalassaemia major: an overview. *J Osteoporos* 2010; 2010:537673.
73. Rioja L, Girot R, Garabedian M, Cournot-Witmer G. Bone disease in children with homozygous beta-thalassemia. *Bone Miner* 1990; 8(1):69-86.
74. De Virgiliis S, Congia M, Frau F, et al. Deferoxamine-induced growth retardation in patients with thalassemia major. *J Pediatr* 1988; 113(4):661-9.
75. de Vernejoul MC, Girot R, Gueris J, et al. Calcium phosphate metabolism and bone disease in patients with homozygous thalassemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54(2):276-81.
76. Voskaridou E, Kyrtsolis MC, Terpos E, et al. Bone resorption is increased in young adults with thalassaemia major. *Br J Haematol* 2001; 112(1):36-41.
77. Di Stefano M, Chiabotto P, Roggia C, et al. Bone mass and metabolism in thalassemic children and adolescents treated with different iron-chelating drugs. *J Bone Miner Metab* 2004; 22(1):53-7.
78. Dimitriadou M, Christoforidis A, Fidani L, et al. Fok-I gene polymorphism of vitamin D receptor in patients with beta-thalassemia major and its effect on vitamin D status. *Hematology* 2011; 16(1):54-8.
79. Bianchi ML. Osteoporosis in children and adolescents. *Bone* 2007;41(4):486-95.
80. Goulding A, Jones IE, Taylor RW, Williams SM, Manning PJ. Bone mineral density and body composition in boys with distal forearm fractures: a dual-energy x-ray absorptiometry study. *J Pediatr* 2001; 139(4):509-15.

Bibliografia.

81. **Goulding A, Rockell JE, Black RE, Grant AM, Jones IE, Williams SM. Children who avoid drinking cow's milk are at increased risk for prepubertal bone fractures. J Am Diet Assoc 2004; 104(2):250-3.**
82. **Lehtonen-Veromaa M, Mottonen T, Nuotio I, Irljala K, Viikari J. The effect of conventional vitamin D(2) supplementation on serum 25(OH)D concentration is weak among peripubertal Finnish girls: a 3-y prospective study. Eur J Clin Nutr 2002; 56(5):431-7.**
83. **Ryan LM, Brandoli C, Freishtat RJ, Wright JL, Tosi L, Chamberlain JM. Prevalence of vitamin D insufficiency in African American children with forearm fractures: a preliminary study. J Pediatr Orthop 2010; 30(2):106-9.**
84. **Baim S, Binkley N, Bilezikian JP, et al. Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry and executive summary of the 2007 ISCD Position Development Conference. J Clin Densitom 2008; 11(1):75-91.**
85. **Bianchi ML, Baim S, Bishop NJ, et al. Official positions of the International Society for Clinical Densitometry (ISCD) on DXA evaluation in children and adolescents. Pediatr Nephrol 2010; 25(1):37-47.**
86. **Rauch F, Plotkin H, DiMeglio L, et al. Fracture prediction and the definition of osteoporosis in children and adolescents: the ISCD 2007 Pediatric Official Positions. J Clin Densitom 2008; 11(1):22-8.**
87. **Baroncelli GI. Quantitative bone analysis in children: current methods and recommendations. J Pediatr 2006; 148(5):704; author reply**
88. **Baroncelli GI. Quantitative ultrasound methods to assess bone mineral status in children: technical characteristics, performance, and clinical application. Pediatr Res 2008; 63(3):220-8.**
89. **Mussa A, Bertorello N, Porta F, et al. Prospective bone ultrasound patterns during childhood acute lymphoblastic leukemia treatment. Bone 2010; 46(4):1016-20.**
90. **VanderJagt DJ, Bonnett C, Okolo SN, Glew RH. Assessment of the bone status of Nigerian children and adolescents with sickle cell**

- disease using calcaneal ultrasound and serum markers of bone metabolism. *Calcif Tissue Int* 2002; 71(2):133-40.
91. Christoforidis A, Perifanis V, Papadopoulou E, et al. Poor correlations between measurements of bone quality by quantitative ultrasound sonography and dual energy X-ray absorptiometry in patients with beta-thalassaemia major. *Eur J Haematol* 2009; 82(1):15-21.
 92. Sani FM, Sarji SA, Bilgen M. Quantitative ultrasound measurement of the calcaneus in Southeast Asian children with thalassemia: comparison with dual-energy X-ray absorptiometry. *J Ultrasound Med* 2011; 30(7):883-94.
 93. Thodberg HH, van Rijn RR, Tanaka T, Martin DD, Kreiborg S. A paediatric bone index derived by automated radiogrammetry. *Osteoporos Int* 2009; 21(8):1391-400.
 94. Gilsanz V, Perez FJ, Campbell PP, Dorey FJ, Lee DC, Wren TA. Quantitative CT reference values for vertebral trabecular bone density in children and young adults. *Radiology* 2009; 250(1):222-7.
 95. Bansal D, Venkateshwaran S, Khandelwal N, Marwaha RK. Quantitative computed tomography is unreliable for measurement of bone mineral density in inadequately chelated adolescent patients with beta-thalassemia major: a case-control study. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 56(3):409-12.
 96. Fung EB, Vichinsky EP, Kwiatkowski JL, et al. Characterization of low bone mass in young patients with thalassemia by DXA, pQCT and markers of bone turnover. *Bone* 2011; 48(6):1305-12.
 97. Boyce AM, Gafni RI. Approach to the child with fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(7):1943-52.
 98. van Kuijk C. Pediatric bone densitometry. *Radiol Clin North Am* 2010;48(3):623-7.
 99. Bishop N, Braillon P, Burnham J, et al. Dual-energy X-ray absorptiometry assessment in children and adolescents with diseases that may affect the skeleton: the 2007 ISCD Pediatric Official Positions. *J Clin Densitom* 2008; 11(1):29-42.

Bibliografia.

100. Bianchi ML, Baim S, Bishop NJ, et al. Official positions of the International Society for Clinical Densitometry (ISCD) on DXA evaluation in children and adolescents. *Pediatr Nephrol* 2010; 25(1):37-47.
101. Ferrari SL, Chevalley T, Bonjour JP, Rizzoli R. Childhood fractures are associated with decreased bone mass gain during puberty: an early marker of persistent bone fragility? *J Bone Miner Res* 2006; 21(4):501-7.
102. Yeh FJ, Grant AM, Williams SM, Goulding A. Children who experience their first fracture at a young age have high rates of fracture. *Osteoporos Int* 2006; 17(2):267-72.
103. Cooper C, Dennison EM, Leufkens HG, Bishop N, van Staa TP. Epidemiology of childhood fractures in Britain: a study using the general practice research database. *J Bone Miner Res* 2004; 19(12):1976-81.
104. Clark EM, Ness AR, Bishop NJ, Tobias JH. Association between bone mass and fractures in children: a prospective cohort study. *J Bone Miner Res* 2006; 21(9):1489-95.
105. Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Altern Med Rev* 2005; 10(2):94-111.
106. Holick MF, Biancuzzo RM, Chen TC, et al. Vitamin D2 is as effective as vitamin D3 in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(3):677-81.
107. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 2008; 87(4):1080S-6S.
108. Holick MF. Vitamin D: extraskeletal health. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39(2):381-400.
109. Wagner CL, Greer FR. Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children, and adolescents. *Pediatrics* 2008; 122(5):1142-52.
110. El-Hajj Fuleihan G, Nabulsi M, Tamim H, et al. Effect of vitamin D replacement on musculoskeletal parameters in school children: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(2):405-12.

111. Pietras SM, Obayan BK, Cai MH, Holick MF. Vitamin D2 treatment for vitamin D deficiency and insufficiency for up to 6 years. *Arch Intern Med* 2009; 169(19):1806-8.
112. Mansbach JM, Ginde AA, Camargo CA, Jr. Serum 25-hydroxyvitamin D levels among US children aged 1 to 11 years: do children need more vitamin D? *Pediatrics* 2009; 124(5):1404-10.
113. Mitka M. More evidence on low vitamin D levels fuels push to revise recommended intake. *Jama* 2009; 302(23):2527-8.
114. Slomski A. IOM endorses vitamin D, calcium only for bone health, dispels deficiency claims. *Jama* 2011; 305(5):453-4, 6.
115. Jacobus CH, Holick MF, Shao Q, et al. Hypervitaminosis D associated with drinking milk. *N Engl J Med* 1992; 326(18):1173-7.
116. Koutkia P, Chen TC, Holick MF. Vitamin D intoxication associated with an over-the-counter supplement. *N Engl J Med* 2001; 345(1):66-7.
117. Armas LA, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(11):5387-91.
118. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, et al. Prevention of nonvertebral fractures with oral vitamin D and dose dependency: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2009; 169(6):551-61.
119. DIPART (vitamin D Individual Patient Analysis of Randomized Trials) Group. Patient level pooled analysis of 68.500 patients from seven mayor vitamin D fracture trials in US and Europe. *BMJ* 2009; 339:b5463.
120. Casey CF, Slawson DC, Neal LR. Vitamin D supplementation in infants, children, and adolescents. *Am Fam Physician*; 81(6):745-8.
121. Tang BM, Eslick GD, Nowson C, Smith C, Bensoussan A. Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis. *Lancet* 2007; 370(9588):657-66.

Bibliografia.

122. Avenell A, Gillespie WJ, Gillespie LD, O'Connell D. Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures associated with involutional and post-menopausal osteoporosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2009(2):CD000227.
123. Sahota O. Reducing the risk of fractures with calcium and vitamin D. *Bmj* 2010; 340:b5492.
124. Billoo AG, Murtaza G, Memon MA, Khaskheli SA, Iqbal K, Rao MH. Comparison of oral versus injectable vitamin-D for the treatment of nutritional vitamin-D deficiency rickets. *J Coll Physicians Surg Pak* 2009; 19(7):428-31.
125. Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(2):471-8.
126. Ward L, Tricco AC, Phuong P, et al. Bisphosphonate therapy for children and adolescents with secondary osteoporosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007(4):CD005324.
127. Klein GL, Bachrach LK, Holm IA. Effects of pharmacologic agents on bone in childhood: an editorial overview. *Pediatrics* 2007; 119 Suppl 2:S125-30.
128. Rauch F, Plotkin H, Zeitlin L, Glorieux FH. Bone mass, size, and density in children and adolescents with osteogenesis imperfecta: effect of intravenous pamidronate therapy. *J Bone Miner Res* 2003; 18(4):610-4.
129. Rauch F, Glorieux FH. Bisphosphonate treatment in osteogenesis imperfecta: which drug, for whom, for how long? *Ann Med* 2005; 37(4):295-302.
130. Marini JC. Bone: Use of bisphosphonates in children-proceed with caution. *Nat Rev Endocrinol* 2009; 5(5):241-3.
131. Poyrazoglu S, Gunoz H, Darendeliler F, et al. Successful results of pamidronate treatment in children with osteogenesis imperfecta with emphasis on the interpretation of bone mineral density for local standards. *J Pediatr Orthop* 2008; 28(4):483-7.
132. Bachrach LK, Ward LM. Clinical review 1: Bisphosphonate use in childhood osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(2):400-9.

133. Letocha AD, Cintas HL, Troendle JF, et al. Controlled trial of pamidronate in children with types III and IV osteogenesis imperfecta confirms vertebral gains but not short-term functional improvement. *J Bone Miner Res* 2005; 20(6):977-86.
134. Marini JC. Should children with osteogenesis imperfecta be treated with bisphosphonates? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2(1):14-5.
135. Papapoulos SE, Cremers SC. Prolonged bisphosphonate release after treatment in children. *N Engl J Med* 2007; 356(10):1075-6.
136. Gandon-Laloum S. [Biphosphonates and osteogenesis imperfecta in children]. *Arch Pediatr* 2009;16(7):1085-9.
137. Vescovi P, Campisi G, Fusco V, et al. Surgery-triggered and non surgery-triggered Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaws (BRONJ): A retrospective analysis of 567 cases in an Italian multicenter study. *Oral Oncol* 2011; 47(3):191-4.
138. Vescovi P, Nammour S. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ) therapy. A critical review. *Minerva Stomatol* 2010; 59(4):181-203, 4-13.
139. Vescovi P, Merigo E, Meleti M, Manfredi M, Guidotti R, Nammour S. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws: a concise review of the literature and a report of single-centre experience with 151 patients. *J Oral Pathol Med.* 2012; 41 (3):214-21.
140. Leung TF, Chu Y, Lee V, et al. Long-term effects of pamidronate in thalassemic patients with severe bone mineral density deficits. *Hemoglobin* 2009; 33(5):361-9.
141. Otrrock ZK, Azar ST, Shamseddeen WA, et al. Intravenous zoledronic acid treatment in thalassemia-induced osteoporosis: results of a phase II clinical trial. *Ann Hematol* 2006; 85(9):605-9.
142. Perifanis V, Vyzantiadis T, Vakalopoulou S, et al. Treatment of beta-thalassaemia-associated osteoporosis with zoledronic acid. *Br J Haematol* 2004;125(1):91-2; author reply 3-4.
143. Mamtani M, Kulkarni H. Bone recovery after zoledronate therapy in thalassemia-induced osteoporosis: a meta-analysis and systematic review. *Osteoporos Int* 2010; 21(1):183-7.

Bibliografia.

144. Gilfillan CP, Strauss BJ, Rodda CP, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intravenous zoledronic acid in the treatment of thalassemia-associated osteopenia. *Calcif Tissue Int* 2006; 79(3):138-44.
145. Voskaridou E, Anagnostopoulos A, Konstantopoulos K, et al. Zoledronic acid for the treatment of osteoporosis in patients with beta-thalassemia: results from a single-center, randomized, placebo-controlled trial. *Haematologica* 2006;91(9):1193-202.
146. Voskaridou E, Christoulas D, Antoniadou L, Terpos E. Continuous increase in erythropoietic activity despite the improvement in bone mineral density by zoledronic acid in patients with thalassemia intermedia-induced osteoporosis. *Acta Haematol* 2008; 119(1):40-4.
147. Voskaridou E, Christoulas D, Konstantinidou M, Tsiftsakis E, Alexakos P, Terpos E. Continuous improvement of bone mineral density two years post zoledronic acid discontinuation in patients with thalassemia-induced osteoporosis: long-term follow-up of a randomized, placebo-controlled trial. *Haematologica* 2008; 93(10):1588-90.
148. Terpos E, Voskaridou E. Treatment options for thalassemia patients with osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1202:237-43.
149. Lindsay R. Prevention and treatment of osteoporosis. *Lancet* 1993; 341(8848):801-5.
150. Voskaridou E, Terpos E. New insights into the pathophysiology and management of osteoporosis in patients with beta thalassaemia. *Br J Haematol* 2004; 127(2):127-39.
151. Voskaridou E, Terpos E. Pathogenesis and management of osteoporosis in thalassemia. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008; 6 Suppl 1:86-93.
152. Olivieri NF. The beta-thalassemyias. *N Engl J Med* 1999;341(2):99-109.
153. Carmel AS, Shieh A, Bang H, Bockman RS. The 25(OH)D level needed to maintain a favorable bisphosphonate response is ≥ 33 ng/ml. *Osteoporos Int* 2012; 23(10):2479-87.

154. Diez-Perez A, Olmos J, Nogues X, et al. Risk factors for prediction of inadequate response to antiresorptives. *J Bone Miner Res* 2012;27(4):817-24.
155. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 1994; 330(23):1639-44.
156. Brinker MR, Thomas KA, Meyers SJ, et al. Bone mineral density of the lumbar spine and proximal femur is decreased in children with sickle cell anemia. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 1998; 27(1):43-9.
157. Miller RG, Segal JB, Ashar BH, et al. High prevalence and correlates of low bone mineral density in young adults with sickle cell disease. *Am J Hematol* 2006;81(4):236-41.
158. Serarslan Y, Kalaci A, Ozkan C, Dogramaci Y, Cokluk C, Yanat AN. Morphometry of the thoracolumbar vertebrae in sickle cell disease. *J Clin Neurosci* 2010; 17(2):182-6.
159. Kawchak DA, Schall JI, Zemel BS, Ohene-Frempong K, Stallings VA. Adequacy of dietary intake declines with age in children with sickle cell disease. *J Am Diet Assoc* 2007; 107(5):843-8.
160. Moore CE, Murphy MM, Holick MF. Vitamin D intakes by children and adults in the United States differ among ethnic groups. *J Nutr* 2005;135(10):2478-85.
161. Byers KG, Savaiano DA. The myth of increased lactose intolerance in African-Americans. *J Am Coll Nutr* 2005; 24(6 Suppl):569S-73S.
162. Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet* 1982;1(8263):74-6.
163. Plotnikoff GA, Quigley JM. Prevalence of severe hypovitaminosis D in patients with persistent, nonspecific musculoskeletal pain. *Mayo Clin Proc* 2003; 78(12):1463-70.
164. Buchowski MS, Townsend KM, Williams R, Chen KY. Patterns and energy expenditure of free-living physical activity in adolescents with sickle cell anemia. *J Pediatr* 2002; 140(1):86-92.

Bibliografia.

165. **Woitge HW, Friedmann B, Suttner S, et al. Changes in bone turnover induced by aerobic and anaerobic exercise in young males. J Bone Miner Res 1998; 13(12):1797-804.**
166. **Eliakim A, Raisz LG, Brasel JA, Cooper DM. Evidence for increased bone formation following a brief endurance-type training intervention in adolescent males. J Bone Miner Res 1997;12(10):1708-13.**
167. **Franck H, Beuker F, Gurk S. The effect of physical activity on bone turnover in young adults. Exp Clin Endocrinol 1991; 98(1):42-6.**
168. **Eliakim A, Brasel JA, Mohan S, Barstow TJ, Berman N, Cooper DM. Physical fitness, endurance training, and the growth hormone-insulin-like growth factor I system in adolescent females. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81(11):3986-92.**
169. **Fujimura R, Ashizawa N, Watanabe M, et al. Effect of resistance exercise training on bone formation and resorption in young male subjects assessed by biomarkers of bone metabolism. J Bone Miner Res 1997; 12(4):656-62.**
170. **Tajima O, Ashizawa N, Ishii T, et al. Interaction of the effects between vitamin D receptor polymorphism and exercise training on bone metabolism. J Appl Physiol 2000; 88(4):1271-6.**
171. **Maimoun L, Sultan C. Effects of physical activity on bone remodeling. Metabolism 2011; 60 (3).373-88. Epub 2010 Mar 31.**
172. **Parikh SJ, Edelman M, Uwaifo GI, et al. The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89(3):1196-9.**
173. **Martin S, Elliott-DeSorbo DK, Wolters PL, et al. Patient, caregiver and regimen characteristics associated with adherence to highly active antiretroviral therapy among HIV-infected children and adolescents. Pediatr Infect Dis J 2007; 26(1):61-7.**
174. **Cigolini M, Iagulli MP, Miconi V, Galiotto M, Lombardi S, Targher G. Serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and prevalence of cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. Diabetes Care 2006; 29(3):722-4.**

175. Dogan M, Erol M, Cesur Y, Yuca SA, Dogan Z. The effect of 25-hydroxyvitamin D3 on the immune system. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2009; 22(10):929-35.
176. Garland CF, Garland FC, Gorham ED, et al. The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health* 2006; 96(2):252-61.
177. Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001; 358(9292):1500-3.
178. Schwartz GG, Whitlatch LW, Chen TC, Lokeshwar BL, Holick MF. Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D3 from 25-hydroxyvitamin D3. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7(5):391-5.
179. Reis JP, von Muhlen D, Miller ER, 3rd, Michos ED, Appel LJ. Vitamin D Status and Cardiometabolic Risk Factors in the United States Adolescent Population. *Pediatrics* 2009; 124(3): 371-9. Epub 2009 Aug 3.
180. Kilpinen-Loisa P, Nenonen H, Pihko H, Makitie O. High-dose vitamin D supplementation in children with cerebral palsy or neuromuscular disorder. *Neuropediatrics* 2007; 38(4):167-72.
181. Holick MF. Vitamin D: Evolutionary, Physiological and Health Perspectives. *Curr Drug Targets* 2011; 12 (1): 4-18.
182. Bischoff-Ferrari H, Stahelin HB, Walter P. Vitamin D effects on bone and muscle. *Int J Vitam Nutr Res* 2011; 81(4):264-72.
183. Brawley OW, Cornelius LJ, Edwards LR, et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: hydroxyurea treatment for sickle cell disease. *Ann Intern Med* 2008; 148(12):932-8.
184. Cranney A, Horsley T, O'Donnell S, et al. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* 2007(158):1-235.
185. Brannon PM, Yetley EA, Bailey RL, Picciano MF. Overview of the conference "Vitamin D and Health in the 21st Century: an Update". *Am J Clin Nutr* 2008; 88(2):483S-90S.
186. Shaw N. Vitamin D and bone health in children. *Bmj* 2011; 342:d192.

Bibliografía.

187. Garrido C, Cela E, Belendez C, Mata C, Huerta J. Status of vitamin D in children with sickle cell disease living in Madrid, Spain. *Eur J Pediatr* 2012 Sep 5 [Epub ahead of print].
188. de Onis M, Garza C, Victora CG, Onyango AW, Frongillo EA, Martines J. The WHO Multicentre Growth Reference Study: planning, study design, and methodology. *Food Nutr Bull* 2004; 25(1 Suppl):S15-26.
189. Deaton A. Height, health, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(33):13232-7.
190. Jones G, Blizzard C, Riley MD, Parameswaran V, Greenaway TM, Dwyer T. Vitamin D levels in prepubertal children in Southern Tasmania: prevalence and determinants. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53(10):824-9.
191. Claster S, Wood JC, Noetzli L, et al. Nutritional deficiencies in iron overloaded patients with hemoglobinopathies. *Am J Hematol* 2009; 84(6):344-8.
192. Gray NT, Bartlett JM, Kolasa KM, Marcuard SP, Holbrook CT, Horner RD. Nutritional status and dietary intake of children with sickle cell anemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1992; 14(1):57-61.
193. Hyacinth HI, Gee BE, Hibbert JM. The Role of Nutrition in Sickle Cell Disease. *Nutr Metab Insights* 2010; 3:57-67.
194. Rajakumar K, de Las Heras J, Chen TC, Lee S, Holick MF, Arslanian SA. Vitamin D Status, Adiposity, and Lipids in Black American and Caucasian Children. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(5):1560-7. Epub 2011 Mar 2.
195. Fung EB, Harmatz PR, Milet M, et al. Fracture prevalence and relationship to endocrinopathy in iron overloaded patients with sickle cell disease and thalassemia. *Bone* 2008; 43(1):162-8.
196. Buchowski MS, de la Fuente FA, Flakoll PJ, Chen KY, Turner EA. Increased bone turnover is associated with protein and energy metabolism in adolescents with sickle cell anemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280(3):E518-27.
197. Bolarin DM. Bone-specific alkaline phosphatase protein, total alkaline phosphatase activity and lactate dehydrogenase in sera

- of patients with sickle cell disease. *Haematologia (Budap)* 2001; 31(1):51-6.
198. Buisson AM, Kawchak DA, Schall JI, et al. Bone area and bone mineral content deficits in children with sickle cell disease. *Pediatrics* 2005; 116(4):943-9.
 199. Heaney RP. The Vitamin D requirement in health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97(1-2):13-9.
 200. Steingrimsdottir L, Gunnarsson O, Indridason OS, Franzson L, Sigurdsson G. Relationship between serum parathyroid hormone levels, vitamin D sufficiency, and calcium intake. *Jama* 2005; 294(18):2336-41.
 201. Aloia JF, Talwar SA, Pollack S, Feuerman M, Yeh JK. Optimal vitamin D status and serum parathyroid hormone concentrations in African American women. *Am J Clin Nutr* 2006; 84(3):602-9.
 202. Wright NC, Chen L, Niu J, et al. Defining physiologically "normal" vitamin D in African Americans. *Osteoporos Int* 2012; 23 (9): 2283-91. Epub 2011 Dec 22.
 203. Ganguly A, Boswell W, Aniq H. Musculoskeletal manifestations of sickle cell anaemia: a pictorial review. *Anemia* 2011; 2011:794283.
 204. Pirinccioglu AG, Akpolat V, Koksak O, Haspolat K, Soker M. Bone mineral density in children with beta-thalassemia major in Diyarbakir. *Bone* 2011; 49(4):819-23.
 205. Baldanzi G, Traina F, Marques Neto JF, Santos AO, Ramos CD, Saad ST. Low bone mass density is associated with hemolysis in brazilian patients with sickle cell disease. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66(5):801-5.
 206. Sarrai M, Duroseau H, D'Augustine J, Moktan S, Bellevue R. Bone mass density in adults with sickle cell disease. *Br J Haematol* 2007; 136(4):666-72.
 207. Soliman AT, Bererhi H, Darwish A, Alzalabani MM, Wali Y, Ansari B. Decreased bone mineral density in prepubertal children with sickle cell disease: correlation with growth parameters, degree of siderosis and secretion of growth factors. *J Trop Pediatr* 1998;44(4):194-8.

Bibliografia.

208. Baldini M, Forti S, Orsatti A, et al. Bone disease in adult patients with beta-thalassaemia major: a case-control study. *Intern Emerg Med* 2011. Dec 17. [Epub ahead of print].
209. Skordis N, Efstathiou E, Kyriakou A, Toumba M. Hormonal dysregulation and bones in thalassaemia--an overview. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008; 6 Suppl 1:107-15.
210. Scacchi M, Danesi L, Cattaneo A, et al. Bone demineralization in adult thalassaemic patients: contribution of GH and IGF-I at different skeletal sites. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 69(2):202-7.
211. Gupta R, Marouf R, Adekile A. Pattern of bone mineral density in sickle cell disease patients with the high-Hb F phenotype. *Acta Haematol* 2010; 123(1):64-70.
212. Bekheirnia MR, Shamsirsaz AA, Kamgar M, et al. Serum zinc and its relation to bone mineral density in beta-thalassemic adolescents. *Biol Trace Elem Res* 2004; 97(3):215-24.
213. Jensen CE, Tuck SM, Agnew JE, et al. High incidence of osteoporosis in thalassaemia major. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1998; 11 Suppl 3:975-7.
214. Nourai M, Cheng K, Niu X, et al. Predictors of osteoclast activity in patients with sickle cell disease. *Haematologica* 2011; 96(8):1092-8.
215. Sadat-Ali M, Al Elq AH. Sickle cell anaemia: is it a cause for secondary osteoporosis? *West Afr J Med* 2007; 26(2):134-7.
216. Sadat-Ali M, Al-Elq AH, Sultan O, Al-Turki H, Bukhari R, Al-Mulhim E. Low bone mass due to sickle cell anemia: is it becoming a real issue? *West Afr J Med* 2008; 27(4):218-23.
217. Morabito N, Lasco A, Gaudio A, et al. Bisphosphonates in the treatment of thalassaemia-induced osteoporosis. *Osteoporos Int* 2002; 13(8):644-9.
218. Molyvda-Athanasopoulou E, Sioundas A, Karatzas N, Aggellaki M, Pazaitou K, Vainas I. Bone mineral density of patients with thalassaemia major: four-year follow-up. *Calcif Tissue Int* 1999; 64(6):481-4.

219. Chung M, Balk EM, Brendel M, et al. Vitamin D and calcium: a systematic review of health outcomes. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* 2009(183):1-420.
220. Melhus H, Snellman G, Gedeberg R, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and fracture risk in a community-based cohort of elderly men in Sweden. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(6):2637-45.
221. Ensrud KE, Taylor BC, Paudel ML, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and rate of hip bone loss in older men. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(8):2773-80.
222. Cauley JA, Parimi N, Ensrud KE, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and the risk of hip and nonspine fractures in older men. *J Bone Miner Res* 2010; 25(3):545-53.
223. Bolland MJ, Bacon CJ, Horne AM, et al. Vitamin D insufficiency and health outcomes over 5 y in older women. *Am J Clin Nutr* 2010; 91(1):82-9.
224. Jaiyesimi F, Pandey R, Bux D, Sreekrishna Y, Zaki F, Krishnamoorthy N. Sickle cell morbidity profile in Omani children. *Ann Trop Paediatr* 2002; 22(1):45-52.
225. Bahebeck J, Ngowe Ngowe M, Monny Lobe M, Sosso M, Hoffmeyer P. [Stress fracture of the femur: a rare complication of sickle cell disease]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 2002; 88(8):816-8.
226. Ebong WW. Pathological fracture complicating long bone osteomyelitis in patients with sickle cell disease. *J Pediatr Orthop* 1986; 6(2):177-81.
227. Kalkwarf HJ, Zemel BS, Gilsanz V, et al. The bone mineral density in childhood study: bone mineral content and density according to age, sex, and race. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(6):2087-99.
228. Schnitzler CM, Mesquita JM, Pettifor JM. Cortical bone development in black and white South African children: iliac crest histomorphometry. *Bone* 2009; 44(4):603-11.
229. Goodman BM, 3rd, Artz N, Radford B, Chen IA. Prevalence of vitamin D deficiency in adults with sickle cell disease. *J Natl Med Assoc* 2010; 102(4):332-5.

Bibliografia.

230. Straube S, Andrew Moore R, Derry S, McQuay HJ. Vitamin D and chronic pain. *Pain* 2009; 141(1-2):10-3.
231. Straube S, Moore RA, Derry S, Hallier E, McQuay HJ. Vitamin d and chronic pain in immigrant and ethnic minority patients- investigation of the relationship and comparison with native Western populations. *Int J Endocrinol*; 2010:753075.
232. Arya SC, Agarwal N. Apropos "complete resolution of sickle cell chronic pain with high-dose vitamin D therapy: a case report and review of the literature". *J Pediatr Hematol Oncol* 2012; 34(4):e172-3.
233. Osunkwo I, Hodgman EI, Cherry K, et al. Vitamin D deficiency and chronic pain in sickle cell disease. *Br J Haematol* 2011; 153(4):538-40.
234. Osunkwo I. Complete resolution of sickle cell chronic pain with high dose vitamin D therapy: a case report and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011; 33(7):549-51.
235. Jackson TC, Krauss MJ, Debaun MR, Strunk RC, Arbelaez AM. Vitamin D deficiency and comorbidities in children with sickle cell anemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2012; 29(3):261-6.
236. Al-Turki H. Influence of pregnancy on bone mass in sickle cell anemia. *West Afr J Med* 2009; 28(3):169-72.
237. Cauley JA, El-Hajj Fuleihan G, Arabi A, et al. Official Positions for FRAX(R) clinical regarding international differences from Joint Official Positions Development Conference of the International Society for Clinical Densitometry and International Osteoporosis Foundation on FRAX(R). *J Clin Densitom* 2011; 14(3):240-62.
238. Dawson-Hughes B, Mithal A, Bonjour JP, et al. IOF position statement: vitamin D recommendations for older adults. *Osteoporos Int* 2010; 21 (7): 1151-54.
239. Winzenberg T, Powell S, Shaw KA, Jones G. Effects of vitamin D supplementation on bone density in healthy children: systematic review and meta-analysis. *Bmj* 2011; 342:c7254.
240. Winzenberg T, Shaw K, Fryer J, Jones G. Effects of calcium supplementation on bone density in healthy children: meta-analysis of randomised controlled trials. *Bmj* 2006; 333(7572):775.

241. Soliman A, Adel A, Wagdy M, Al Ali M, ElMulla N. Calcium homeostasis in 40 adolescents with beta-thalassemia major: a case-control study of the effects of intramuscular injection of a megadose of cholecalciferol. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008; 6 Suppl 1:149-54.
242. Adewoye AH, Chen TC, Ma Q, et al. Sick cell bone disease: response to vitamin D and calcium. *Am J Hematol* 2008; 83(4):271-4.
243. Olukoga AO, Adewoye HO, Erasmus RT, Adedoyin MA. Urinary magnesium excretion in steady-state sickle cell anaemia. *Acta Haematol* 1993; 90(3):136-8.
244. Olukoga AO, Adewoye HO, Erasmus RT, Adedoyin MA. Erythrocyte and plasma magnesium in sickle-cell anaemia. *East Afr Med J* 1990; 67(5):348-54.
245. Sahota O, Munday MK, San P, Godber IM, Hosking DJ. Vitamin D insufficiency and the blunted PTH response in established osteoporosis: the role of magnesium deficiency. *Osteoporos Int* 2006; 17(7):1013-21.
246. Jamison RN, Lewis S, Burish TG. Cooperation with treatment in adolescent cancer patients. *J Adolesc Health Care* 1986; 7(3):162-7.
247. Gritz ER, DiMatteo MR, Hays RD. Methodological issues in adherence to cancer control regimens. *Prev Med* 1989;18(5):711-20.
248. Madden BP. The hybrid model for concept development: its value for the study of therapeutic alliance. *ANS Adv Nurs Sci* 1990;12(3):75-87.
249. Henneman EA, Lee JL, Cohen JI. Collaboration: a concept analysis. *J Adv Nurs* 1995; 21(1):103-9.
250. Henson RH. Analysis of the concept of mutuality. *Image J Nurs Sch* 1997; 29(1):77-81.
251. Carpenter R. Perceived threat in compliance and adherence research. *Nurs Inq* 2005; 12(3):192-9.
252. Kyngas H, Duffy ME, Kroll T. Conceptual analysis of compliance. *J Clin Nurs* 2000; 9(1):5-12.

Bibliografia.

- 253. Butow P, Palmer S, Pai A, Goodenough B, Lockett T, King M. Review of adherence-related issues in adolescents and young adults with cancer. J Clin Oncol 2010; 28(32):4800-9.**