



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, PEDIATRÍA Y
RADIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

NIVELES SÉRICOS DE OSTEOPROTEGERINA Y SU
RELACIÓN CON LA ULTRASONOGRAFÍA ÓSEA Y
LOS MARCADORES DE REMODELAMIENTO ÓSEO
EN RECIÉN NACIDOS

AUTORA: María José Carbonero Celis
DIRECTOR : Prof. Dr. D. José González-Hachero

Sevilla, Febrero 2008

José González Hachero, Catedrático de Pediatría de la Facultad de Medicina de Sevilla y Jefe del Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada, “ NIVELES SÉRICOS DE OSTEOPROTEGERINA Y SU RELACIÓN CON LA ULTRASONOGRAFÍA Y LOS MARCADORES DE REMODELAMIENTO ÓSEO EN RECIÉN NACIDOS”, que María José Carbonero Celis presenta para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo la dirección del Prof. Dr. González- Hachero, reuniendo las condiciones necesarias para ser defendida.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Sevilla, a veinticinco de Febrero del año dos mil ocho.

Fdo. Prof. Dr. D. José González-Hachero

María José Carbonero Celis, licenciada en Medicina y Cirugía por la Facultad de Medicina y Especialista en Pediatría y sus Áreas Específicas

CERTIFICA:

Que es autora de la Tesis Doctoral titulada “NIVELES SÉRICOS DE OSTEOPROTEGERINA Y SU RELACIÓN CON LA ULTRASONOGRAFÍA ÓSEA Y LOS MARCADORES DE REMODELAMIENTO ÓSEO EN RECIÉN NACIDOS”. Este trabajo ha sido dirigido por el Prof. Dr. D. José González-Hachero, Catedrático de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla y Jefe del Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla

Firmado en Sevilla, a veinticinco de Febrero del año dos mil ocho

Fdo María José Carbonero Celis

A Jesús

A mis padres

A mis hijos Jesús, Sara y Ángela

Agradecimientos

En primer lugar, tengo que expresar mi más profundo agradecimiento al profesor José González- Hachero, por sus indicaciones y consejos desde mis inicios en estos estudios. Gracias a sus enseñanzas y a su apoyo constante he podido concluir este trabajo.

Al profesor Juan Miguel Guerrero Montávez y al Dr Antonio Barco Sánchez del Departamento de Bioquímica del Hospital Universitario Virgen Macarena por su asesoría científica y su colaboración desinteresada en este proyecto.

A mi esposo Jesús y a mis hijos que han sabido soportar con paciencia mi dedicación a esta tarea, animándome a seguir en todo momento.

Al personal técnico del Departamento de Bioquímica del Hospital Virgen Macarena por su paciencia y su colaboración en este proyecto.

Al personal sanitario del Servicio de Obstetricia y del Servicio de Neonatología del Hospital Virgen Macarena.

A Jesús Roldán Grueso por su ayuda a lo largo de todo el estudio.

A la memoria del Dr Antonio González-Meneses por su apoyo personal y entusiasmo en el impulso de la Unidad de Neonatología del Hospital Virgen Macarena.

A todos los que de una manera u otra, me han ayudado a llegar a este punto. Mi agradecimiento a todos.

Indice

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 FISILOGIA ÓSEA.....	1
1.2 FACTORES REGULADORES DEL REMODELADO ÓSEO.....	5
1.3 MARCADORES BIOQUÍMICOS DEL REMODELADO ÓSEO.....	14
1.4 METABOLISMO FOSFOCÁLCICO MATERNO-FETAL Y NEONATAL: MINERALIZACIÓN DEL ESQUELETO ÓSEO DEL RECIÉN NACIDO.....	19
1.5 MEDICIÓN DE LA DENSIDAD ÓSEA.....	24
Capítulo 2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS.....	31
2.1 PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.....	31
2.2 OBJETIVOS.....	32
Capítulo 3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	35
3.2 PROTOCOLO DE ESTUDIO.....	38
3.3 ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	48
Capítulo 4. RESULTADOS.....	51
Capítulo 5. DISCUSIÓN.....	93
Capítulo 6. CONCLUSIONES.....	121
BIBLIOGRAFÍA.....	125

Capítulo 1 ---

INTRODUCCIÓN

“La osteoporosis de la vida adulta es una enfermedad pediátrica”
CE Dent (1973) y RE Kreipe (1992)

1.1 FISIOLÓGÍA ÓSEA

El tejido óseo constituye uno de los sistemas mayores del organismo, constituido por una matriz mineralizada y una fracción celular muy activa. Entre sus funciones destacan: servir de sustento y protección a las partes blandas, ser anclaje muscular y base de los movimientos, así como constituir un gran reservorio de iones como el calcio, que se liberarán de forma controlada, acorde a las necesidades de cada momento, y por último, no por ello menos importante, servir de almacenaje activo de la médula ósea, interaccionando con las células precursoras de la hematopoyesis (1,2).

El mantenimiento de la función de soporte requiere una correcta integración de dos aspectos esenciales en fisiopatología ósea: la densidad ósea y la calidad del hueso, entendida como arquitectura, recambio, y mineralización correctas. El desequilibrio de estos factores va a condicionar un aumento de la fragilidad ósea e incremento del riesgo de fracturas, con sus importantes costes sanitarios y sociales. Es bien conocido que una masa ósea deficiente adquirida entre la infancia y la adolescencia comportará osteopenia, osteoporosis, deterioro de la integridad del esqueleto y aumento de riesgo de fracturas en la edad adulta y en la vejez (2).

El tejido óseo está presente desde la octava semana de desarrollo intrauterino, iniciándose a partir de moldes cartilagosos de dos modos diferentes: la osificación endocondral y la osificación intramembranosa. La primera se caracteriza por la neoformación ósea a partir de cartílago de crecimiento: una única célula, el condrocito, presenta diversas fases madurativas y sintetiza una matriz que posteriormente se mineralizará dando lugar a la formación de hueso nuevo y al crecimiento en longitud de los huesos largos del organismo; el crecimiento en grosor se realiza a partir de la capa de osteoblastos del periostio del hueso ya formado. La osificación intramembranosa se caracteriza por la formación de hueso a partir de una estructura mesenquimal como ocurre en los huesos de la calota craneana (2).

Microscópicamente, se distinguen dos tipos de hueso: el hueso cortical, más compacto y resistente situado en la periferia del hueso y el hueso trabecular dispuesto en láminas, menos compacto, pero metabólicamente más activo, que se localiza en el interior de los huesos en contacto con la médula ósea. Un 85 % del esqueleto óseo es hueso cortical y 15 % hueso trabecular, siendo este último más sensible a los cambios hormonales. Todo ello hace que el tejido trabecular sea metabólicamente más activo que el hueso cortical. La valoración de este componente del esqueleto ofrece una información más precoz de los cambios esqueléticos, que las mediciones sobre hueso cortical (1,2).

Las células principales del hueso son los **osteoblastos** (OB) y los **osteoclastos** (OC), aunque también están presentes otras como las de la médula ósea, las de los vasos sanguíneos que lo nutren, etc. Es evidente que, dada su proximidad espacial, los cambios en la actividad de un determinado tipo celular pueden modificar las condiciones del microambiente óseo e influir en la función de las demás células (2).

Los **OB** derivan de células mesenquimales del estroma, que han sufrido un proceso de diferenciación mediante la interacción de factores locales y sistémicos, con gran adaptabilidad en los precursores que pueden madurar hacia OB o adipocitos, según el estímulo al que se vean sometidos. Los OB maduros expresan fosfatasa alcalina y otros marcadores específicos que indican su madurez. Sintetizan moléculas de colágeno y diversos mediadores que modulan la actividad de otras células óseas hematopoyéticas. Entre un 50-70 % de los OB desaparecen cuando finalizan la síntesis de osteoide por

un fenómeno de apoptosis (3), algunos sin embargo quedan atrapados por la matriz ósea, y se transforman en osteocitos y células de revestimiento. Los osteocitos representan un 90 % del total de las células óseas. Estas células tapizan las superficies óseas y a través de la producción de Interleucina-6 y 11, desempeñan un papel importante en el remodelado óseo y en el intercambio de calcio entre el hueso y el líquido intersticial (4, 5). Los OB maduros no se dividen, producen el osteoide que está constituido en un 90% por fibras de colágena tipo I y el 10 % de proteoglicanos y otras proteínas no colágenas, de las cuales algunas como la osteocalcina están también sintetizadas por los osteoblastos. Otras son proteínas séricas que absorbe la matriz quedando atrapadas en ésta (2).

Además producen factores de crecimiento, citoquinas, y proteínas morfogénicas óseas (BMP). Entre los factores de crecimiento el factor de crecimiento insulín-like 2 (IGF-2) es el más abundante y el factor de crecimiento insulín-like 1 (IGF-1) es uno de los más potentes inductores de la función osteoblástica.

Los osteocitos entre sí están unidos por *gap junctions* y con los OB de la superficie activa del hueso por prolongaciones protoplasmáticas. Estos OB a su vez se comunican con las células de la médula ósea y éstas con las células endoteliales del sistema vascular que trae los mensajes hormonales, resultando todo un sistema o unidad interconectado. La membrana del OB tiene receptores para multitud de moduladores como la hormona paratiroidea (PTH) y su péptido relacionado (PTHrP), la hormona tiroidea (T_4), la hormona de crecimiento (GH), insulina, progesterona, β -adrenérgicos, prolactina etc. En el núcleo del OB hay receptores para estrógenos, andrógenos, vitamina D, retinoides y otros como factores de crecimiento, interleuquinas e integrinas. Poseen 1α hidroxilasa por lo que pueden sintetizar calcitriol y facilitan el depósito de fosfato tricálcico en el osteoide, siempre que el producto calcio- fósforo sea normal (2).

Los OC provienen de células precursoras de estirpe hematopoyética. La célula pluripotencial primitiva puede diferenciarse en granulocitos bajo la influencia del factor transformante β (TGF- β) o en precursores de los OC por acción del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). A partir de éstos últimos precursores, se diferencian otros por estímulo del calcitriol, interleuquinas 1 y

6, del factor de crecimiento transformante α (TGF- α) y, por un efecto indirecto de la PTH y PTHrP, los precursores mononucleares se fusionan en la gran célula multinucleada que es el OC. Éstos son los encargados de la resorción del hueso, mediante la producción de proteasas entre la que se encuentra la catepsina K, los activadores del plasminógeno tipo tisular (tPA) y tipo uroquinasa (uPA). Los OB también sintetizan diversas proteasas y una colagenasa intersticial, bajo la influencia de la parathormona (PTH) y otros factores estimuladores de la resorción ósea. La colagenasa degradaría la fina capa de osteoide no mineralizado, facilitando la unión de los OC al hueso (2, 5).

La **matriz ósea** está formada por un **componente orgánico u osteoide** y un **componente inorgánico**. El osteoide que es sintetizado por los OB como ya hemos referido anteriormente. El componente inorgánico o matriz extracelular está formado por cristales de hidroxapatita, carbonato, magnesio, sodio y potasio. Aproximadamente el 99 % del calcio, 85% del fósforo y entre el 40- 60 % de sodio y magnesio del organismo están depositados en la matriz extracelular del hueso.

El componente orgánico representa un 25 % del peso óseo, el componente inorgánico un 70 % y el 5 % restante corresponde a agua.

El conjunto de acciones celulares y metabólicas por la que el hueso renueva su estructura y la adapta a las necesidades dinámicas de cada momento se denomina “modelado óseo”. Se trata de una combinación secuencial de resorción y formación ósea que afecta continuamente al 10 % del hueso. Cuando finaliza el crecimiento continuamente hay zonas de hueso que son destruidas para ser sustituidas por tejido óseo recién formado. A este proceso se le llama “remodelado óseo” y se lleva a cabo por “unidades de remodelado” o unidad multicelular básica (BMU) constituidas por grupos de OC y OB, una rama capilar, una rama nerviosa y tejido conectivo asociado. El remodelado afecta tanto al hueso cortical como al trabecular, pero la intensidad del proceso es mayor a nivel del hueso trabecular. El tiempo de supervivencia de los osteoclastos es de 2 semanas y el de los osteoblastos es de 3 meses (6).

1.2 FACTORES REGULADORES DEL REMODELADO ÓSEO

Entre los **factores que regulan el remodelado óseo** los más importantes son los **genéticos** responsables del 50-80 % de la variabilidad de la masa ósea (7). Se acepta que la regulación de la masa ósea es un proceso poligénico ya que son múltiples los genes que intervienen en la síntesis de hormonas y factores de crecimiento relacionados con la misma (8,9).

De los distintos genes, los más estudiados han sido el gen receptor de la vitamina D y el gen del receptor de los estrógenos, considerándose que polimorfismos de estos genes podrían relacionarse con distintas tasas de absorción de calcio en el intestino o con alteraciones en el mecanismo de actuación de los estrógenos respectivamente (10)

Otros genes estudiados han sido el del colágeno alfa-1, el de la interleuquina 6 (IL-6), el del factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) y el de la glicoproteína 2Hsa. En cualquier caso ningún estudio en este sentido es aún definitivo, ni concluyente (11).

También se han señalado diferencias de masa ósea ligadas a la raza que en definitiva están relacionadas igualmente con el factor genético. Se conoce al respecto que los individuos de raza negra tienen valores de masa ósea superiores a los caucásicos y éstos mayores que los asiáticos (12).

Los factores nutricionales también son importantes. La malnutrición calórico-proteica, el déficit de calcio y de vitamina D tienen claros efectos negativos sobre el hueso. También intervienen de una manera indirecta regulando la síntesis de IGF-1 y de esteroides gonadales, cuyo papel es esencial para un adecuado crecimiento y mineralización del hueso. El aporte proteico-energético adecuado es indispensable para el crecimiento y mineralización ósea y para la síntesis proteica de la matriz extracelular, de forma que en situaciones de malnutrición disminuyen los marcadores de aposición ósea como la fosfatasa alcalina y aumentan los de resorción como el telopéptido carboxiterminal del procolágeno I (CTX) (13,14).

La vitamina K es un cofactor indispensable para la síntesis de osteocalcina (15, 16,17).

Entre **los factores físicos** los mejores conocidos son los mecánicos que provocan un aumento en la formación de hueso. **Los estímulos eléctricos** ejercen un efecto mitógeno sobre los OB y aumentan la producción de colágena y factor de crecimiento transformante beta (18).

Los **factores químicos** reguladores del remodelado son los mejores estudiados. Entre ellos se encuentran tanto los de tipo **hormonal** y de acción sistémica, como los factores **paracrinós y autocrinos**, que actúan localmente. A pesar que todo el esqueleto está sometido a iguales concentraciones de hormonas, el remodelado se lleva a cabo sólo en focos concretos, por lo que los factores de acción local deben desempeñar un papel importante en la regulación hormonal.

Las “**hormonas calciotropas**” fueron los primeros factores humorales que se identificaron como moduladores del remodelado óseo. Su secreción depende de la concentración extracelular de calcio:

Parathormona (PTH)

La PTH se forma en las glándulas paratiroides desde donde se incorpora a la circulación sanguínea. La PTH intacta está compuesta de una única cadena de polipéptidos con 84 aminoácidos y tiene un PM de aproximadamente de 9500 daltons.

El fragmento biológicamente activo N-terminal tiene una vida media de pocos minutos. La medición selectiva de la hormona intacta permite determinar directamente la actividad secretora de la glándula paratiroides (19).

La PTH junto con la vitamina D produce la movilización del calcio y el fosfato desde el sistema esquelético. Aumenta la resorción del hueso, por un estímulo de la actividad osteoclástica, disminuye la excreción renal de calcio y estimula la síntesis renal de calcitriol, que favorece la absorción intestinal de calcio (19).

La PTH también ejerce su acción sobre los OB, incrementando la masa ósea, administrada de forma intermitente, tanto en animales de experimentación como en humanos, por lo que se ha introducido como tratamiento de la osteoporosis (20, 21).

La interacción de la PTH y la calcitonina garantizan un nivel sanguíneo de calcio constante.

Calcitonina

Es sintetizada por las células parafoliculares del tiroides, produciendo una inhibición de la resorción ósea, por acción directa con receptores específicos presentes en los OC. Sin embargo tras una tiroidectomía total no hay cambios de la masa ósea evidentes, por lo que no se sabe realmente su papel exacto. Su secreción se estimula por varios factores entre ellos la elevación de la calcemia. Sus efectos predominantes son el descenso de la resorción ósea y de la resorción tubular renal de calcio (2).

1,25(OH)₂ D (Calcitriol)

Se sintetiza por la acción de la luz solar sobre el 7-dehidrocolesterol que se encuentra en la piel; pero debe transformarse en 1,25(OH)₂ D, para ejercer actividad biológica. Se hidroxila en el hígado en la posición 25, formándose la 25 hidroxivitamina D. Este metabolito es hidroxilado en el riñón en la posición 1, originándose el 1,25 dihidroxivitamina D que es el metabolito más activo y responsable de la mayoría de las acciones atribuidas a la vitamina D. Produce un aumento en la absorción intestinal de calcio. El calcitriol es necesario para mantener los niveles de calcio y fósforo que se requieren para la mineralización del osteoide. Pero además ejerce acciones directas sobre los osteoblastos, promoviendo su diferenciación e incrementando la síntesis de proteínas como la osteocalcina y la fosfatasa alcalina. *In vitro* aumenta la resorción ósea, pues favorece la diferenciación y fusión de los precursores de los OC. Estos efectos parecen no deberse a una acción directa sobre los OC, sino que están mediados por los OB o las células del estroma (2, 22,23)

Otras hormonas:

Otras hormonas actúan sobre el metabolismo del calcio y del hueso, como los esteroides gonadales y suprarrenales, la tiroxina, la insulina y la hormona del crecimiento, aunque a diferencia de las hormonas calciotropas, su secreción no depende principalmente de la concentración extracelular de calcio.

Los **estrógenos** desempeñan un importante papel en la homeostasis esquelética. Tanto los OB como los OC expresan receptores para los estrógenos (24). Además de una influencia directa sobre los OC, los estrógenos modulan la secreción de citocinas estimuladoras de la resorción ósea por los OB (la IL-1, la IL-6 o el factor de necrosis tumoral) y las células del estroma. Los estrógenos podrían ejercer un efecto favorecedor de la formación ósea, estimulando la síntesis de factores de crecimiento, como el IGF o el factor de crecimiento transformante beta (TGF β) por los OB, y estos factores ejercen efectos mitogénicos autocrinos y paracrinos (11,23). También pueden modular el remodelado mediante cambios en el calcitriol o la PTH de forma indirecta (24,25).

La **hormona del crecimiento (GH)** y su mediador, el **factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I)** son factores estimulantes de la proliferación condrocítica necesaria para el crecimiento longitudinal y formación ósea. Tienen reconocida importancia no sólo durante el periodo de crecimiento, sino sobre el proceso de remodelado en la edad adulta. In vivo induce un aumento de la velocidad de recambio con un patrón bifásico en el que primero predominan los fenómenos de resorción y después los de formación. A la IGF 1 se le ha atribuído un papel central en el desarrollo de osteoporosis, ya que sus niveles disminuyen con la edad. Dada la compleja regulación del transporte de IGFs y sus proteínas transportadoras-receptores (IGFBPs), a diferentes IGFBPs se les han atribuído papeles contrapuestos de estímulo (IGFBP-5) o inhibición (IGFBP-4), de la actividad osteoclástica. (26,27). Una alimentación hipoproteica limita la producción de IGF-1 con el riesgo adyacente de osteoporosis.

Las **hormonas tiroideas** aceleran la velocidad de recambio. Tanto OC como OB expresan receptores para estas hormonas, favoreciendo la osteoclastogénesis y estimulan la síntesis por parte de los OB de IGF-1, IL-6 e IL-8 (28).

La concentración de las hormonas que regulan el metabolismo del calcio determina la dirección del recambio óseo, pero los factores locales modulan el efecto final y, a su vez, modifican la concentración de las hormonas y la respuesta biológica a nivel de los osteoblastos.

Regulación paracrina del remodelado óseo:

- **Interleucinas (2,3,4,5,18,22):**

Son muy numerosos los factores humorales de acción local que ejercen algún efecto sobre las células óseas. Las citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-11, CSF-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF) tienen un papel muy importante en la remodelación ósea al modular una o varias fases de formación y activación osteoclásticas. Sus efectos parecen depender del receptor activador del factor nuclear κ -B y de su ligando de unión al receptor activador del factor nuclear κ -B (RANK/RANKL), que veremos más adelante. La IL-1 parece responsable de la hipercalcemia tumoral y de la resorción ósea de algunos modelos de osteoporosis. La IL-6 es producida por múltiples células y su producción es estimulada por la IL-1. Los estrógenos disminuyen la producción de IL-1 y 6. Parecen tener ambas un papel en la osteoporosis postmenopáusicas, debido a que aumenta su producción por disminuir los niveles estrogénicos. Sin embargo la IL-4, y la IL-10 ejercen un efecto inhibitorio de la resorción ósea. La IL-4 tiene efecto antiinflamatorio, pues disminuye la síntesis de citocinas como la IL-1, IL-6 y TNF.

La IL-11 estimula la formación de OB y la formación ósea, y parece prevenir la pérdida ósea asociada a la edad avanzada.

El CSF-1 se expresa en las células del estroma y en los OB, y es esencial para la formación de los OC, pues estimula la proliferación de precursores hematopoyéticos.

El TNF estimula la resorción ósea a través del aumento de RANKL, y se considera importante en el desarrollo de múltiples alteraciones óseas.

Los efectos observados dependen de los modelos, *in vivo* o *in vitro*, y de las condiciones experimentales; de ahí que sea difícil establecer cuál es el papel fisiológico real de estos factores y cuál es su participación en la génesis de las enfermedades óseas.

- **Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs)**

Las BMPs son miembros de la superfamilia TGF- β , sintetizadas por los OB y quedan incluidas en la matriz ósea. Promueven la diferenciación de las células mesenquimales hacia condrocitos y OB, de forma que inducen la formación de cartílago y su

transformación posterior en hueso. Unos miembros de esta familia pueden promover la formación de OB y otras ejercen quimiotaxis sobre los monocitos y los diferencian en OC y prolongan su supervivencia (29, 30).

- **SISTEMA DE LA OPG, RANKL, Y RANK**

El descubrimiento del **sistema RANK/RANKL/OPG** representa una tríada de nuevas citoquinas con efectos sobre el metabolismo óseo, el sistema inmune, con funciones endocrinas y con acción en la biología del OC, que ha abierto un nuevo camino en el estudio y conocimiento de la patogénesis y el tratamiento de las enfermedades metabólicas óseas.

El descubrimiento de **la osteoprotegerina (OPG: *to protect bone*)**, también conocida como factor de inhibición de la osteoclastogénesis (OCIF) es un nuevo miembro de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), que tras su síntesis por los OB, como proteína transmembrana es secretada a la corriente sanguínea. Se sintetiza inicialmente como un propéptido de 401 aminoácidos, y tras la pérdida de un fragmento de 21 aminoácidos, queda como una proteína madura con 380 aminoácidos. Es codificada por un gen situado en el cromosoma 8q23-24.

En 1997 fue descubierta simultáneamente por dos grupos de investigación, uno de ellos Amgen Inc. Group de USA, mientras estudiaban cDNAs en intestino de rata (31), y otro el Snow Brand Milk Group de Japón, mientras buscaban factores de inhibición y/o estimulación de los osteoclastos (32). Ya Rodan y Martín en 1981 (33) planteaban la importancia del papel de los precursores de los OB, en el control de la osteoclastogénesis y en la resorción ósea.

El RNAm de la OPG se expresa en numerosos tejidos humanos (pulmón, corazón, riñones, hígado, intestino, estómago, cerebro, glándula tiroides y médula espinal) además de en el hueso, en el cual su principal función parece ser la inhibición de la maduración de los osteoclastos y de su activación (32, 34). Recientemente se ha aislado en la leche humana en concentraciones 1000 veces superiores que en suero (35).

En segundo lugar apareció **el ligando de la OPG (OPG-L o RANKL)** (36, 37) también conocido como factor de diferenciación de los osteoclastos (ODF) y que es

idéntico a dos miembros de la familia de los ligandos de TNF: el TRANCE (*TNF-related activation induced cytokine*), inducido por activación de receptores de células T, y el RANKL (*ligando de unión al receptor activador de NF- κ B*), un polipéptido de 317 aminoácidos que se sabía estimulaba a las células dendríticas.

El OPG-L está codificada por un gen situado en el cromosoma 13q14 (38, 39), aparece bien anclado a la membrana de los OB, de las células del estroma, de las células inmaduras mesenquimales del borde del cartílago y de los condrocitos, o bien es liberado a la corriente sanguínea.

Su RNAm se expresa no sólo en tejido óseo, sino en médula ósea y tejidos linfáticos (36, 38, 39). Su principal papel en el hueso es la estimulación de la diferenciación de los osteoclastos, su activación y la inhibición de la apoptosis. Junto al factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) son los dos factores necesarios para completar todo el ciclo de maduración de los osteoclastos a partir de sus precursores inmaduros (36, 37).

El **Receptor del Activador del Factor Nuclear Kappa-B (RANK)** fue el tercero en aparecer. Es un receptor de membrana, constituido por 616 aminoácidos, que está presente en los OC y sus precursores y otras células (células de la estirpe monocítica-macrófaga, células dendríticas, linfocitos T y B y fibroblastos).

El gen del RANK está situado en el cromosoma 18. Su activación conlleva no sólo una reorganización del citoesqueleto del OC y cambios fundamentales para su activación, movilidad y establecimiento en la superficie ósea a resorber, sino que desencadena una señal de supervivencia en el osteoclasto maduro (39-45).

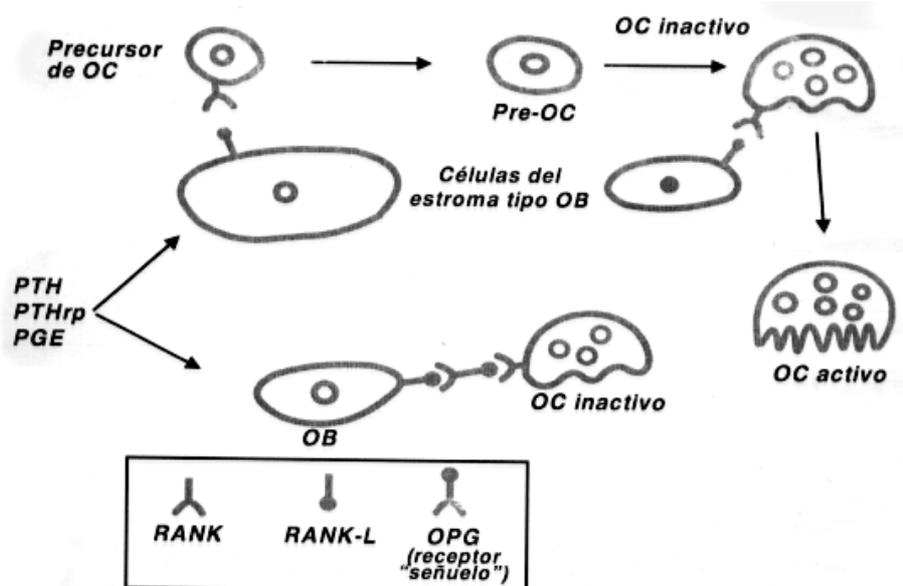


Figura 1.1. Interrelación entre los OB y OC mediante el sistema OPG

La unión del RANK con su ligando (RANKL) induce la activación de una cascada de eventos intracelulares que llevan a la diferenciación y activación de los OC.

La OPG actúa como receptor señuelo uniéndose al RANKL y neutralizándolo, ocupa e impide su unión con el RANK. Inhibe la diferenciación, supervivencia y fusión de los precursores de los OC, bloquea la activación de los OC maduros e induce su apoptosis. Además la OPG puede reducir la capacidad de los OC para adherirse a la superficie del hueso, paso clave en el inicio de la resorción (Figura 1.1).

En el hueso, RANK-L y OPG se producen principalmente en los osteoblastos, mientras que el RANK se expresa en los osteoclastos. El coeficiente RANK-L/OPG es mayor en las células preosteoblásticas indiferenciadas y decrece con la diferenciación.

En resumen, para diferenciarse y madurar las células de estirpe osteoclástica deben tener contacto directo con los osteoblastos, interrelación que ocurre mediante la unión de un receptor a su ligando presentes en las respectivas membranas. Si hay suficiente OPG en el medio se unirá al RANKL de los osteoblastos impidiendo su interacción con el RANK de los precursores osteoclásticos lo que frenará el funcionamiento de los OC.

Como se mencionó anteriormente, el RANK-L activa al RANK, y el sistema de 2° mensajero activa la osteoclastogénesis. Si el RANK-L se une a la OPG no se producirá la activación de esta cascada.

Como el coeficiente RANK-L/OPG es el determinante de la resorción ósea, es importante reconocer los agentes que modulan estas dos citocinas (42):

Entre las sustancias que **incrementan la producción de RANK-L** las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-11, IL-6, TNF- α y PGE2, así como las hormonas esteroideas, dexametasona, 1,25 (OH) $_2$ D, y la PTH.

La producción de RANKL es inhibida por el TGF- β , reduciendo la pérdida ósea e incrementando la apoptosis de los osteoclastos.

El TGF- β y el péptido intestinal vasoactivo **inhiben el RANKL**.

Las hormonas que estimulan la resorción ósea no actúan generalmente sobre los precursores de células osteoclásticas, sino sobre las células del estroma-osteoblásticas.

La producción de OPG es estimulada por la IL-1 α , la IL-1 β , el TNF- α , el TNF- β , el TGF- β y, y la BMP2 y 7. También la estimulan el 17 β estradiol, el 1,25 (OH) $_2$ D, péptido intestinal vasoactivo, y el calcio.

La PGE2, la PTH, el 1,25 (OH) $_2$ D, IL-4, IL-11 y la dexametasona son **inhibidores de la producción de OPG**.

La producción de estas citocinas (OPG y RANKL) es variable y regulada por distintas sustancias, pero la expresión del RANK permanece estable.

El gen promotor de RANKL contiene elementos que responden a glucocorticoides, a la vitamina D, y al factor esencial de transcripción osteoblástica (cbfa-1).

En experimentos *in vitro* el RANKL demostró estimular la diferenciación, supervivencia y fusión de células precursoras osteoclásticas para activar osteoclastos maduros y para prolongar su vida por inhibición de la apoptosis, de esta manera aumenta el pool de osteoclastos capaces de formar lagunas de resorción.

Otros factores como el TGF- β y la PGE2 pueden cooperar con la acción del RANKL (36).

Muchas de las hormonas reguladoras del calcio y citoquinas, incluyendo **1,25(OH)₂ D₃**, **PTH**, **PGE2** e **IL-1** actúan estimulando la osteoclastogénesis a través de la doble acción de inhibir la producción de osteoprotegerina y estimulando la producción de RANKL, al igual que los glucocorticoides (42, 45).

En el otro extremo están los **estrógenos** que actúan **inhibiendo la producción de RANKL** y **estimulan la producción de OPG** de forma indirecta, incrementando la producción de TGF- β tanto por los OB como por los OC (42- 45) y directamente por acción sobre los OB maduros.

Si bien RANKL y OPG están regulados por varios factores, la expresión de RANK sobre células osteoclásticas se basa en ser estable con una pequeña regulación por agentes osteotrópicos.

Es del conocimiento general que la deficiencia estrogénica provoca osteoporosis en mujeres postmenopausicas. Los estrógenos además de inhibir la secreción de varias citocinas que promueven la resorción ósea, como IL-1, IL-6 y TNF- α , como hemos visto anteriormente, también aumentan la secreción de OPG. La disminución de estrógenos disminuye la expresión de OPG, mientras que la terapia estrogénica previene esta disminución, por lo que es muy posible que la OPG desempeñe un papel preponderante en la acción antirresortiva de los estrógenos.

Las hormonas sistémicas, que estimulan la resorción ósea, generalmente, no actúan directamente sobre los precursores de las células osteoclásticas, sino sobre las células del estroma-osteoblásticas. Tanto la **PTH**, **el 1,25 (OH)₂D** y **las hormonas tiroideas (HT)**, incrementan la expresión de RANKL en este tipo celular, así como, en algunos casos, inhiben la síntesis de OPG con un efecto neto de incremento de la resorción ósea. La otra hormona que influye sobre la resorción ósea, la calcitonina, inhibe directamente la actividad osteoclástica, si bien de forma transitoria, por un fenómeno rápido de regulación de sus receptores, expresados sobre los OC.

- **Factor de crecimiento transformante β (TGF β):**

Entre los múltiples factores reguladores se encuentra el TGF β muy abundante en el hueso y las plaquetas. Modula tanto la maduración de los OC, como de las células del estroma precursoras de los OB. Estimula la síntesis de OPG, considerándose una señal crucial en el enlace entre las células que mantienen el remodelado óseo. Desempeña un papel importante en el proceso de reparación de fracturas. El TGF β es sintetizado por varios tumores y participa en la osteólisis asociada a neoplasias (4,11).

1.3 MARCADORES BIOQUÍMICOS DEL REMODELADO ÓSEO

El recambio óseo en el niño es mayor que en el adulto, aproximadamente 10 veces mayor en un neonato y 6 veces mayor en el escolar. Por este motivo un niño puede perder y recuperar masa ósea. Son muchos los marcadores bioquímicos estudiados en plasma, suero, y orina, que nos explican como van los procesos de resorción y de formación ósea. En años recientes se han caracterizado componentes celulares y extracelulares del tejido óseo que reflejan específicamente, tanto la resorción como la formación óseas, que son no invasivos, relativamente baratos e interpretados correctamente, son herramientas muy útiles para el estudio de la enfermedad ósea metabólica. Clásicamente se han subdividido en marcadores de la formación y de la resorción, si bien algunos de estos marcadores pueden reflejar ambos procesos.

Los marcadores bioquímicos óseos en pediatría reflejarían cambios fisiológicos del crecimiento óseo y acumulación de mineral en el hueso. Si bien son una herramienta útil, su uso en pediatría es reducido por falta de valores de referencia para cada grupo de edad y tipo de muestra utilizada (sangre u orina).

Varios marcadores bioquímicos séricos han sido usados para la detección precoz de osteopenia de la prematuridad como el calcio, fósforo, fosfatasa alcalina y osteocalcina (48, 49,50). La calcemia no es útil como test de screening pues el cuerpo mantendrá un nivel de calcemia a expensas de pérdida de calcio óseo. Puede estar también elevada en casos de depleción de fósforo con hipofosfatemia . En contraste la fosforemia es un

buen marcador de suficiencia de fósforo (50). Niveles de fosforemia persistentemente bajos reflejan un aporte de fósforo inadecuado y puede indicar un riesgo de desarrollar osteopenia. El hueso es un tejido dinámico con constante resorción osteoclástica y formación osteoblástica. Se han utilizado marcadores bioquímicos que reflejan una u otra de las fases del remodelamiento óseo.

Los marcadores relacionados con los osteoblastos y que reflejan la actividad osteoblástica se denominan **marcadores de formación** y se determinan en sangre.

Los principales son:

La **fosfatasa alcalina (FA)** es una glucoproteína que se asocia a la actividad osteoblástica, es de estructura tetramérica localizada en la membrana del OB y pasa a la circulación como un dímero tras su división. Es la más difundida; un 80% de la actividad se origina en el hueso. Se determina en suero.

Está descrito que la actividad de la fosfatasa alcalina, y principalmente la fracción ósea, aumenta durante el período postnatal, cambios que se corresponden con los del metabolismo fosfocálcico, ya que dicha actividad es uno de los indicadores bioquímicos de formación ósea, y la medida de la isoenzima ósea es un índice aún más preciso de actividad osteoblástica.

Las diferencias observadas en la actividad de la fosfatasa alcalina ósea en relación con la edad gestacional, posiblemente represente una respuesta de los osteoblastos a la necesidad de una rápida mineralización fuera del útero, una respuesta a la falta de sustrato (calcio, fósforo), o inadecuada función o ingesta de vitamina D. Dichas diferencias persisten a lo largo del primer año de vida en correspondencia a las diferencias también observadas con la mineralización ósea y el metabolismo fosfocálcico que ocurre en este período de la vida (49,51).

La FA elevada se ha asociado a osteopenia severa y puede preceder a la evidencia radiológica de raquitismo en prematuros. Estudios recientes han demostrado una falta de correlación con el grado de hipomineralización. Ha mostrado su utilidad como marcador para la monitorización de la respuesta al tratamiento en pacientes con enfermedades del metabolismo óseo, pero no en la osteomalacia severa en la que puede

ser normal por la supresión de la expresión celular de la enzima por la depleción de la vitamina D (48-52).

La **osteocalcina (OTC)** es la proteína no colágena más abundante de la matriz ósea, secretada por los OB, se correlaciona estrechamente con la actividad osteoblástica. Es una proteína específica ósea dependiente de la vitamina K (formación de residuos de ácido γ -carboxiglutámico) y está estimulada por la vitamina D₃. Al ser liberada por los OB, la osteocalcina se incorpora a la matriz ósea, teniendo gran afinidad por los cristales de hidroxapatita y se secreta al flujo sanguíneo. Como consecuencia de ello, el nivel sérico de la osteocalcina se encuentra relacionado con la velocidad de recambio óseo. Por esta razón, la osteocalcina se considera un marcador de la velocidad de recambio óseo y su determinación permite el control de la eficiencia de tratamientos de inhibición en pacientes con osteoporosis u otra patología ósea. En la sangre se encuentran tanto la osteocalcina intacta (aminoácidos 1-49) así como el fragmento N-MID (aminoácidos 1-43), de gran tamaño. La osteocalcina intacta es inestable debido al desdoblamiento proteásico entre los aminoácidos 43 y 44, mientras que el fragmento N-MID resultante del desdoblamiento es mucho más estable. Se considera un marcador sensible y específico de la actividad osteoblástica, si bien en parte puede derivar de la resorción ósea. Sus niveles siguen un ritmo circadiano, con los valores más elevados por la mañana y no se influyen por la dieta (2).

El aumento de las concentraciones séricas de osteocalcina en neonatos se corresponde con el aumento de las concentraciones de 1,25(OH)₂ D séricas en la primera semana de vida (53).

Péptidos de Procolágeno: Son fragmentos procedentes de la ruptura del colágeno tipo I recién formado por endoproteinasas. Se considera que reflejan la fase colágena de la formación ósea, si bien pueden proceder de otros tejidos (piel, tendones, cartílago, válvulas cardíacas, grandes vasos, etc). Siguen un ritmo circadiano y no están influidos por la dieta.

El colágeno tipo I es el componente más abundante de la matriz ósea. Durante la síntesis de la colágena, se liberan fragmentos péptidos amino y carboxiterminales de una molécula precursora (pro-colágeno) y son liberados a la circulación. Los productos

fraccionados de este proceso son el propéptido carboxiterminal del procolágeno I (**PICP**) y el propéptido aminoterminal del procolágeno I (**PINP**). Estos pueden ser detectados por radioinmunoanálisis e inmunoensayo donde se reconoce la terminación carboxilo de los péptidos liberados y reflejan la cantidad de matriz ósea sintetizada. No se han establecido correlaciones definitivas entre fragmentos de procolágeno y formación ósea (54).

A los marcadores relacionados con los osteoclastos se les denomina **marcadores de resorción** los principales son:

Los **telopéptidos C-terminales del procolágeno tipo I (CTX)** son de especial relevancia dentro de los fragmentos de colágeno tipo I. Con el envejecimiento de los huesos el ácido α -aspártico, α -crosslaps (α -CTX), se transforma en β -aspártico, β -crosslaps (**β -CTX**). Estos telopéptidos isomerizados son específicos de la degradación del colágeno tipo I propio de los huesos. Se han observado altos niveles séricos de telopéptidos isomerizados C-terminales del colágeno en paciente con una reabsorción ósea elevada. El nivel sérico se normaliza con un tratamiento inhibitorio de la reabsorción (55-58).

La concentración de β -crosslaps en el suero está sometida a un ritmo circadiano por lo que se recomienda recoger las muestras por la mañana y en ayunas, pues se ven muy influenciados por la dieta, desventaja que no presentan los α -CTX (56,57).

El α y el β crosslaps son útiles marcadores de la resorción ósea y que es posible hacerlo en suero con una sensibilidad y especificidad mayor. Su aplicación en niños se ha visto dificultada por la falta de datos apropiados de referencia. Christgau et al (57) han demostrado que la medida sérica del crosslaps puede ser usada para predecir mujeres que tienen elevado riesgo de desarrollar osteoporosis y para monitorizar la respuesta al tratamiento. Recientemente Crofton et al (60) han realizado tablas de referencia desde el nacimiento a los 19 años relacionado con el sexo y la edad. Han encontrado valores más altos en neonatos, en los que no hubo diferencia entre ambos sexos. Durante la infancia disminuyen los niveles séricos que se incrementan nuevamente durante el comienzo de la adolescencia, volviendo a disminuir posteriormente al finalizar la adolescencia, igualándose a los niveles del adulto.

La **excreción urinaria de deoxipiridinolina y piridinolina** tienen limitaciones en pediatría por tener que hacer correcciones con la excreción de creatinina, que se modifica por la masa muscular, la función renal y otros factores.

Una vez depositado en el hueso, las fibras de colágena forman enlaces estabilizadores. Los aminoácidos modificados que forman los enlaces son característicos de la colágena y de los módulos de elastina. La piridinolina y la deoxipiridinolina son los dos principales tipos de aminoácidos encontrados en estos enlaces, los cuales aumentan la fuerza y estabilidad de las cadenas de colágena. La piridinolina se encuentra principalmente en el cartílago y se encuentra en niveles bajos en la colágena del hueso. En contraste, la deoxipiridinolina se encuentra casi exclusivamente en la dentina y en el colágeno tipo I del hueso, siendo de esta manera un marcador excelente de pérdida ósea (61).

La piridinolina y la deoxipiridinolina son liberadas de la matriz de las estructuras helicoidales del colágeno cuando la matriz ósea se degrada por acción de los osteoclastos y no son reutilizados para la síntesis de nuevas cadenas de colágena.

Estas dos moléculas están presentes en la orina en dos formas: una forma libre (aproximadamente 40%) y una forma ligada a péptidos (aproximadamente 60%). La medición de estas moléculas se realiza actualmente en muestra de orina en su forma libre por técnicas inmunoenzimáticas. Se ha logrado reducir la variabilidad de esta prueba midiendo estas moléculas en sangre.

La excreción urinaria de piridinolina y deoxipiridinolina aumenta con la edad y en los pacientes con ciertos estados patológicos. Los niveles disminuyen con los tratamientos antirresortivos confirmando su utilidad como marcador de pérdida ósea (62).

Hidroxiprolina en orina : la hidroxiprolina es una forma hidroxilada del aminoácido prolina y se encuentra principalmente en el colágeno donde representa 13% de volumen del aminoácido. La hidroxiprolina libre excretada en la orina puede servir como un marcador de pérdida ósea. El aumento en el remodelado óseo puede elevar los niveles hidroxiprolina urinaria. En la actualidad la medición de hidroxiprolina urinaria es el menos empleado de los marcadores por varias razones. Los niveles de hidroxiprolina

varían significativamente de día a día. La hidroxiprolina presente en las comidas puede alterar las mediciones. Para evitar los resultados inexactos debido a las fuentes dietéticas, sólo deben realizarse las mediciones en pacientes que han restringido su ingesta de colágena en las comidas a alimentos ricos en gelatina (ej. carnes, aderezos, helados) o después de ayuno la noche anterior, la prueba es difícil y requiere de una gran precisión y experiencia del laboratorio.

Fosfatasa ácido tartrato resistente

Los osteoclastos contienen una fosfatasa ácida que puede ser distinguida de otras isoenzimas de fosfatasa ácida, pero es resistente a la inhibición por ácido tártrico. Esta fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) juega un papel importante en la resorción ósea. Los niveles plasmáticos de TRAP están elevados en pacientes con enfermedades óseas metabólicas que cursan con un aumento en la velocidad del remodelado óseo. Es el único de los marcadores de remodelado que evalúa la actividad directa del osteoclasto ya que el resto de los marcadores de resorción son indicadores del grado de destrucción de la matriz ósea. La medición de los niveles de TRAP es técnicamente difícil por lo que su utilidad en la práctica clínica ha sido limitada.

1.4 METABOLISMO FOSFOCÁLCICO MATERNO-FETAL Y NEONATAL: MINERALIZACIÓN DEL ESQUELETO ÓSEO DEL RECIÉN NACIDO

Existe un interés creciente en el estudio del proceso de mineralización ósea en el recién nacido. El desarrollo esquelético comienza precozmente en la vida embrionaria, pero la mineralización ósea ocurre principalmente durante el tercer trimestre del embarazo. Calcio, fósforo, magnesio y cinc son los minerales formadores de hueso. El hueso al nacimiento contiene aproximadamente 20-30 g de calcio, 16 g de fósforo, 750 mg de magnesio y 50 mg de cinc, de los cuales aproximadamente un 98 %, 80 %, 60 % y 30 % respectivamente están en el esqueleto. La acreción de calcio aumenta de 50 mg por día en la semana 20 de gestación hasta 330 mg por día en la semana 35 con un promedio en el tercer trimestre de gestación de 200 mg por día (1, 11, 63).

El crecimiento esquelético fetal y la acreción mineral ósea son dependientes de energía, proteína y aporte mineral maternos y son directamente afectados por la transferencia neta de calcio y otros minerales desde la madre al feto. Desde el 2º trimestre en adelante, las concentraciones séricas de calcio y fósforo son alrededor de 20 % más altas en el feto que los niveles correspondientes maternos, sugiriendo un transporte transplacentario activo de minerales. En el tercer trimestre del embarazo ocurre por tanto, la mayor transferencia de calcio a través de la placenta (63, 64, 65).

La gestación produce en la madre importantes variaciones en la homeostasis del calcio y de sus elementos reguladores, con el fin de facilitar su transferencia hacia el feto y favorecer su mineralización ósea. Esto supone, en particular para la madre, un aceleración en el proceso de remodelamiento óseo con importantes variaciones de las hormonas y de las proteínas relacionadas, respecto a la situación existente fuera de la gestación. El crecimiento esquelético fetal y la acreción mineral ósea son dependientes de energía, proteínas y aporte mineral maternos y son directamente afectados por la transferencia neta de calcio y otros minerales desde la madre al feto. El aumento de la demanda mineral en la madre es parcialmente compensada por una absorción intestinal aumentada de calcio y posiblemente por la movilización aumentada de minerales desde el esqueleto materno (66).

Son muchos los factores que tienen impacto sobre el contenido óseo mineral (BMC) y el desarrollo óseo fetal. Se ha publicado una inadecuada mineralización ósea fetal en madres con extrema restricción dietética o con déficit de vitamina D o relacionada con la estación de nacimiento, el consumo materno de alcohol o tabaco, la prematuridad o la diabetes mellitus tipo 1 en las madres, sobre todo, en aquellas con un pobre control glucémico (62- 76).

Por tanto la osteopenia en recién nacidos es multifactorial. Entre los factores de riesgo la prematuridad es el más importante. Hay un estímulo de crecimiento cortical por los ejercicios de resistencia que realiza el feto contra la pared uterina. Hay autores que han publicado en los niños con muy bajo peso al nacer una reducción fisiológica en la fuerza muscular en las primeras 8 semanas de vida por la falta de estímulo mecánico, que junto con un inadecuado aporte mineral contribuye en el desarrollo de la

osteopenia (16,17). La falta de estímulo mecánico aumenta la resorción ósea, aumenta la pérdida de calcio urinario y disminuye la masa ósea.

Además en los prematuros existe también una demanda adicional de minerales para el rápido crecimiento óseo tras el nacimiento, que junto con unos aportes deficitarios los hace más propensos a la osteopenia. El aporte de calcio y fósforo por vía enteral puede ser inadecuado debido a intolerancia alimentaria y contenido mineral inadecuado en la leche humana. El requerimiento de nutrición parenteral prolongada es también un factor de riesgo ya que la solubilidad del calcio y del fósforo en la nutrición parenteral limita la cantidad de minerales con la que puede ser suplementada (77, 78, 79).

La utilización de medicación como diuréticos, metilxantinas y corticosteroides, se han implicado también como causa de osteopenia en pretérminos. Los diuréticos y metilxantinas (77) pueden aumentar la pérdida de calcio urinario y las altas dosis de corticoides sistémicos suprimen la función del osteoblasto y la síntesis de DNA in vitro. Se ha publicado una disminución de la fosfatasa alcalina ósea específica y de la osteocalcina tras 3 semanas de tratamiento con corticosteroides (81).

La osteopenia es reconocida como causa de fracturas patológicas en el recién nacido pretérmino (RNPT). Se correlaciona inversamente con el peso y la edad gestacional. Se han publicado series en que la mineralización ósea inadecuada afecta a un 30 % de los recién nacidos de bajo peso extremo al nacimiento (<1000g) (82,83). Los estrógenos estimulan la producción de OPG de forma indirecta, incrementando la producción de TGF- β tanto por los osteoblastos como por los osteoclastos, y directamente por acción sobre los osteoblastos maduros.

Se ha sugerido que la terapia de reemplazo postnatal de estradiol y progesterona pudiera prevenir la osteopenia en prematuros. Esto se basa en una observación de que el feto está expuesto a altos niveles hormonales de procedencia materna. El parto prematuro equivale al cese de exposición a estas hormonas a una edad de desarrollo más precoz. Lo cierto es que el tratamiento de la osteopenia y de la osteoporosis en el niño es de escasa utilidad, y los esfuerzos deben ir orientados a la prevención (83)

Han sido publicados diversos trabajos en los que se encuentran una masa ósea disminuía en niños y adultos con diabetes tipo 1, que podría estar relacionado con el déficit de insulina. La hipocalcemia neonatal ocurre en el 50 % de los hijos de madre con diabetes insulino dependientes. La incidencia y severidad de la hipocalcemia está directamente relacionado con la severidad y el deficiente control glucémico de la diabetes materna (84).

La hipomagnesemia materna es debida a la pérdida urinaria de magnesio, y es causa de hipomagnesemia fetal, que puede ocasionar hipoparatiroidismo funcional e hipocalcemia (85, 86,87). En hijos de madre diabética se ha visto un aumento del 1-25 (OH)₂ D, que tiene una actividad resorptiva sobre el hueso, lo que podría estar en relación con una disminución del contenido mineral en hijos de madre diabética (88). También se ha relacionado con una menor movilidad intrauterina relacionado con un mayor peso y un pobre control glucémico (89, 90).

La diabetes gestacional es relativamente común y a pesar del tratamiento enérgico y el control glucémico, la morbilidad fetal y neonatal es frecuente. Sólo unos pocos estudios han examinado la mineralización ósea en hijos de madre diabética, con resultados discordantes (73,74, 75).

Siddharth y cols han descrito un sistema de transporte activo de calcio en las microvellosidades del sincitiotrofoblasto que podría explicar el hecho que durante el tercer trimestre de la gestación la sangre del cordón umbilical sea más rica en calcio que la materna. La placenta es capaz de conseguir un transporte altamente eficiente a través de ella, con tasas de 150 mg /kg /día para el calcio y la mitad de esta cantidad para el fósforo. Este paso transplacentario superior a las necesidades fetales, le protegería de posibles cambios en la calcemia materna (91, 92).

Este paso de calcio no parece estar regulado por la vitamina D (93).

El principal metabolito que atraviesa la placenta es el 25 OH D y éste es convertido en 1, 25(OH)₂ D en el riñón fetal. Sin embargo el papel de la 1,25(OH)₂ D en la mineralización esquelética fetal y en la homeostasis mineral aún es incierto.

Verhaeghe y cols han demostrado un descenso de osteocalcina en los hijos de madre diabética (HDM) y en los neonatos con retraso del crecimiento intrauterino (CIR), lo que confirma una disminución de la formación ósea en estos recién nacidos (94).

Otros autores proponen como mecanismos por el cual los HMD tienen menor mineralización ósea, una disminución del transporte de calcio a través de la placenta con una reducción en la acreción de calcio, un déficit de insulina, o pérdidas maternas urinarias de magnesio. Otros autores han sugerido que la reducción del contenido mineral, pudiera deberse a un pobre control de la glucemia, encontrándose una correlación inversamente proporcional con el peso (72, 73, 95)

Se ha comprobado asimismo la importancia creciente de los factores mecánicos sobre el desarrollo del esqueleto. Los OB aumentan su actividad en respuesta a la carga mecánica *in vitro*, mientras que la ausencia de estimulación se ha demostrado que aumenta la resorción ósea, aumenta la pérdida de calcio urinario y disminuye la masa ósea. Habría un compromiso del crecimiento óseo debido a la falta de interacción músculo-hueso como está descrito en neonatos con enfermedades musculares hipotónicas congénitas. La falta de actividad física y contracción muscular en contra de resistencia tanto en hijos de madre con diabetes como en prematuros, aumentará la resorción ósea y la desmineralización y causará osteopenia (16, 73).

Se han encontrado notables diferencias estacionales en el contenido mineral óseo, tanto en nacidos a término como en pequeños para la edad de gestación. El contenido mineral óseo es significativamente más bajo en los nacidos en verano, posiblemente debido a la no ingesta de suplementos de vitamina D en el primer trimestre de la gestación, y a la alteración del metabolismo de la vitamina D por deprivación de la luz solar en esta etapa del embarazo (68,69, 96).

La patogenia de la osteopenia en el prematuro es generalmente multifactorial y puede implicar factores prenatales y postnatales como falta de la transferencia mineral transplacentaria, aporte mineral inadecuado y pérdida excesiva neonatal. La disminución de la mineralización ósea se encuentra según algunos estudios en el 30 % de los recién nacidos con un peso inferior a 1000 g. La osteopenia se asocia con diversos estados patológicos como la enfermedad pulmonar crónica, enterocolitis

necrotizante, nutrición parenteral prolongada y retraso en alcanzar la nutrición enteral completa. Por el mismo mecanismo, la alteración de la transferencia placentaria de minerales, actuaría en el crecimiento intrauterino retardado. Estos neonatos con bajo peso al nacimiento, presentan disminución de la mineralización ósea y de la velocidad de formación del hueso, aumento de hormona paratiroidea y disminución de osteocalcina y vitamina D (97,98).

1.5 MEDICIÓN DE LA DENSIDAD ÓSEA

La osteoporosis se define como la pérdida de masa ósea y de la integridad de la microarquitectura del esqueleto, que produce fragilidad e incremento del riesgo de fractura (47). La densidad mineral ósea (DMO) se ha demostrado que es con mucho el factor predictivo más fuerte de riesgo de fractura y puesto que su medición se hace en base a la determinación densitométrica, resulta imprescindible disponer de instrumentos fiables y precisos que puedan medir la masa ósea y compararla con las poblaciones de referencia.

La técnica adecuada para la valoración de la maduración del esqueleto en la infancia y la adolescencia debe permitir la cuantificación exacta y reproducible del grado de mineralización, de la manera más incruenta posible. Debe generar una escasa o nula dosis de radiación y debe disponer de una capacidad para detectar pequeños cambios de contenido mineral lo que será útil para valorar los efectos del tratamiento.

En el esqueleto como hemos ido viendo existe un 20 % de hueso trabecular muy activo metabólicamente y un 80 % de hueso cortical. Parece ser que no sólo el hueso cortical y trabecular presentan diferencias ante un estímulo físico u hormonal sino que algunos huesos o regiones óseas de un mismo hueso tienen una respuesta distinta. Por eso es tan complicado valorar el método a utilizar, y quizás haya que utilizar varios, para determinar el estado mineral óseo.

En el neonato el diagnóstico de osteoporosis o de osteopenia se complica por el pequeño tamaño de los huesos, y la proporción de tejidos blandos circundantes (grasa fundamentalmente).

Existen métodos que pueden efectuar mediciones de la densidad mineral ósea en el cuerpo entero y que reciben el nombre de **densitometría central** y los que miden la masa ósea en una única región, también llamados de **densitometría periférica**.

Los distintos métodos densitométricos se basan en el principio de la atenuación que sufren los rayos X o los fotones de rayos gamma al atravesar los tejidos. Dicha atenuación se relaciona con el grosor y la composición de los tejidos que atraviesa, fundamentalmente del grosor del mineral óseo. Los valores de atenuación pueden ser expresados en equivalentes a grosor mineral, para a continuación compararlos con unas curvas basadas en la población normal. El resultado se expresa en desviaciones estándar respecto a estas curvas de normalidad. No obstante, el valor obtenido es una medición combinada de tejido óseo, médula ósea y otros tejidos circundantes. La verdadera medida de la masa ósea requeriría un densitómetro tridimensional que excluyera la médula ósea y los tejidos blandos que rodean el hueso. El único densitómetro volumétrico que existe en la actualidad, la tomografía computarizada cuantitativa, incluye la médula ósea en su medición.

A excepción del densitómetro por ultrasonidos, el resto de las técnicas son radiológicas.

La **absorciometría dual de rayos X (DEXA)** es el método más extendido en la actualidad, por su baja radiación, su precisión y capacidad de medir tanto el esqueleto axial como el apendicular.

Con esta técnica, dos haces son emitidos de una fuente de rayos X en lugar de una fuente radioactiva, consiguiendo una mayor precisión que con la absorciometría fotónica de doble energía (DPA). Al utilizar dos haces de distinta energía puede corregir la atenuación producida por los tejidos blandos, al igual que la DPA (99).

Los densitómetros DXA, habitualmente llamados DEXA, exploran la cadera, la columna lumbar, el antebrazo y en muchos casos el esqueleto total. El aparato proporciona los valores de densidad mineral en gramos/cm² (BMD), contenido mineral

óseo en gramos (BMC), área (cm²), altura (cm) y grosor (cm) del área explorada. Sin embargo no tiene en cuenta el grosor de los huesos no corrigiendo los resultados en volumen.

Estos densitómetros tienen una alta precisión (0,5-2%) y reproductibilidad y han demostrado que pueden tener utilidad en la prevención de fracturas. Son ampliamente usados. Tienen la desventaja del alto coste y gran tamaño, requieren espacio y necesitan personal especializado para su manejo (100,101).

El uso de DEXA que inicialmente se desarrolló para el seguimiento de la osteoporosis degenerativa, también se emplea en neonatos. Su uso está restringido por la necesidad de sedación, el traslado del recién nacido que en ocasiones se encuentra hospitalizado en cuidados intensivos, el coste y la exposición a radiaciones ionizantes.

La técnica suele realizarse tras una toma de alimentos, pero cualquier movimiento ocasiona artefactos que obliga a reiniciar la medición. Si estos son continuos es necesario abandonar la medida. Es posible que se produzca un cierto número de casos en los cuales las mediciones se completen de forma no óptima por un número variable de artefactos por movimientos.

Rawlings et al concluyen que las adquisiciones DEXA para neonatos son generalmente adaptables a movimientos aislados ocasionales, particularmente aquellos de desplazamiento mínimo. Sin embargo, los de tipo continuo, especialmente de amplia amplitud y velocidad, afectan a las magnitudes DEXA. La precisión de la técnica DEXA en la determinación de los parámetros óseos y de tejido blando en neonatos de edad corregida aproximada de 3 meses es apropiada, estando en el rango de 2-5 %, excepto para la masa de tejido graso que manifiesta un valor mucho más alto (hasta un 20 %) (102).

Antes de que aparecieran los primeros densitómetros DEXA ya aparecieron algunos aparatos de escáner para medir la masa ósea y fueron llamados **tomografía computarizada cuantitativa** (QTC) para diferenciarlos del resto de tomografía computerizada. Es la única técnica tridimensional, volumétrica, para medir densidad mineral ósea de que disponemos. Dado que es una medida volumétrica, los valores que

proporciona son en g/cm³. Con esta técnica hay disponibles aparatos que miden la masa ósea de columna y cadera y otros en antebrazo, aunque podría hacerse en cualquier otra localización. Los QTC son los únicos densitómetros capaces de diferenciar hueso cortical del trabecular. Se ha demostrado que la diferencia de la densidad mineral ósea con la edad y entre sujetos sanos y osteoporóticos es mayor medida con QTC que con DXA (103). Desgraciadamente están desaconsejados en el seguimiento del niño en riesgo de osteoporosis por la exposición a dosis acumulativas de radiaciones.

Desde el 1992 se utiliza **la ultrasonografía** en el diagnóstico de osteopenia y osteoporosis en niños y adultos. La osteosonografía es un método que se basa en conocer la densidad ósea, midiendo la velocidad de conducción de los ultrasonidos a través del hueso, por tanto carente de radiación y más barato.

El modelo DBM 1200 SONIC, está diseñado para realizar no sólo un análisis cuantitativo del estado mineral del hueso (OSTEOSONOMETRÍA) sino también, un análisis cualitativo de la homogeneidad de la arquitectura y de la elasticidad del tejido óseo (OSTEOSONOGRAMA), utilizando ultrasonidos.

En la frecuencia en la que trabaja este aparato 1,25 Mhz, los ultrasonidos se propagan de acuerdo a la óptica geométrica y las leyes que la describen.

Los parámetros característicos son la velocidad de transmisión (tiempo de vuelo), la atenuación, la reflexión y la dispersión.

La densidad, la arquitectura, la homogeneidad y la elasticidad influyen en la velocidad de manera diversa.

La velocidad de los US está en función no lineal de la densidad y de la organización estructural del medio que atraviesa. Mientras mayor es la densidad mayor es la velocidad.

Esto significa que este sistema permite evaluar no sólo el componente mineral óseo, sino también su resistencia, homogeneidad y elasticidad, que son los parámetros

indispensables para determinar con seguridad la resistencia a la fractura de los materiales.

Esta técnica tiene la ventaja de no irradiar, ser una técnica rápida, que lleva menos de un minuto por exploración, y ser de bajo coste; el equipo es de pequeño tamaño, no requiere personal especializado y ha demostrado tener el mismo valor predictivo de fracturas vertebrales que DEXA (104-108).

PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

2.1 PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Recientes estudios sugieren que el riesgo de osteoporosis en la vida adulta puede influenciarse por el microambiente uterino o circunstancias de la vida postnatal precoz. Es por esto que es necesario definir con la mayor precisión, a qué llamamos un recién nacido normal, desde el punto de vista del metabolismo mineral.

Actualmente existe según hemos visto mucha información sobre la fisiología de la remodelación ósea y de los factores locales y sistémicos que regulan este complicado proceso. Aún no hay muchos datos sobre lo que ocurre a nivel molecular, por lo que los nuevos avances en biología molecular están permitiendo descubrir los mecanismos que se desarrollan a nivel celular en el microambiente óseo.

Investigaciones recientes durante los últimos años muestran que los OB juegan un papel importante en la función y el desarrollo de los OC. Numerosas citoquinas, hormonas y factores de crecimiento controlan la homeostasis del calcio y la mayoría de los receptores para éstos se encuentran en los OB independiente de si su activación desencadena procesos de formación o resorción.

La búsqueda de nuevos marcadores bioquímicos de la formación y resorción ósea, así como de pruebas de medida de la densidad ósea, ha sido constante. Recientemente se

han caracterizado componentes celulares y extracelulares del tejido óseo que reflejan específicamente tanto la formación como la resorción óseas, los métodos para su determinación no son invasivos, son relativamente baratos e interpretados correctamente, son herramientas muy útiles para el estudio de la enfermedad ósea metabólica. La utilidad de los marcadores bioquímicos en la práctica clínica se ha cuestionado durante mucho tiempo por la variabilidad analítica y biológica que presentaban. Lamentablemente muchos de estos nuevos marcadores no tienen valores de referencia en recién nacidos.

La osteopenia en recién nacidos (RN) se descubre comúnmente como un hallazgo accidental de radiografía presentándose como hipomineralización o fracturas cicatrizadas. Sin embargo, las radiografías convencionales no pueden detectar precozmente hipomineralización ósea hasta que hay una sustancial pérdida en torno al 30-40 % del contenido mineral óseo (CMO) y hemos visto las dificultades técnicas con las que contamos para realizar DEXA en esta edad.

2.2 OBJETIVOS

Por todo lo referido anteriormente nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. -Determinar la medida de la velocidad del US dependiente de la amplitud (AdSOS) en RN a término, hijos de madres con diabetes gestacional (HMDG) , pretérminos, y sus respectivas madres y establecer si existe relación de la misma con la edad gestacional, datos antropométricos del RN, hormonas reguladoras del calcio y marcadores del remodelamiento óseo, incluida la OPG, en el momento del parto.
2. -Establecer los valores de normalidad de AdSOS en RN a término, pretérminos e HMDG.
- 3.- Establecer los valores de normalidad en nuestras tres poblaciones para la OPG, betacrosslaps (β CTX), osteocalcina, 25- hidroxivitamina D, y PTH.

4.- Determinar si es buen método de screening la AdSOS, así como ver la utilidad de la medida de OPG y otros marcadores óseos en sangre de cordón, en el diagnóstico de osteopenia.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó desde Octubre de 2004 a Junio de 2005 en la Unidad de Neonatología del Servicio de Pediatría y el Servicio de Obstetricia del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. Se realizó un estudio transversal en el que participaron 99 recién nacidos a término (grupo control), 64 recién nacidos de madres con diabetes gestacional (HMDG) y 57 recién nacidos pretérminos (PT) y sus respectivas madres.

3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Grupo control:

- De los recién nacidos:
 - 1.- Ser un recién nacido a término entre 37 y 42 semanas de edad gestacional.
 - 2.- Tener un peso adecuado para la edad gestacional determinada según la fecha de la última regla y por ecografía durante el embarazo.
 - 3.- Nacer sin malformaciones congénitas, ni signos de infección aparente, anomalías del sistema nervioso central, ni sospecha de enfermedad muscular, ósea, u otras anomalías genéticas.

- De las madres:

- 1.- Tener una edad comprendida entre 21 y 40 años.
- 2.- No tener antecedentes personales de osteoporosis, o de cualquier otra enfermedad metabólica, ni encontrarse en tratamiento con fármacos, ni consumir tabaco, alcohol u otros tóxicos que interfieran con la mineralización ósea.

Grupo HMDG:

- De los recién nacidos:

- 1.- Ser un recién nacido a término con edad gestacional entre 37 y 42 semanas de edad gestacional.
- 2.- Tener un peso adecuado para su edad gestacional determinada según la fecha de la última regla y por ecografía durante el embarazo.
- 3.- Nacer sin malformaciones congénitas, ni signos de infección aparente, anomalías del sistema nervioso central, ni sospecha de enfermedad muscular , ósea, u otras anomalías genéticas.

- De las madres:

- 1.- Tener una edad comprendida entre 21 y 40 años.
- 2.- No tener antecedentes personales de osteoporosis, o de cualquier otra enfermedad metabólica, ni encontrarse en tratamiento con fármacos, ni consumir tabaco, alcohol u otros tóxicos que interfieran con la mineralización ósea.
3. Haber sido diagnosticada de diabetes gestacional y haber realizado seguimiento por una Unidad de Obstetricia. Se define como tal, a toda diabetes diagnosticada por primera vez durante el embarazo, independientemente de la necesidad de tratamiento insulínico, del grado de trastorno metabólico o su persistencia una vez finalizada la gestación. En nuestra población se recomienda el cribado universal entre la 24 y la 28 semana de gestación mediante el test de O'Sullivan que se considera positivo, cuando

presenta la embarazada una glucemia ≥ 140 mg/dl a la hora de tomar por vía oral 50 gramos de glucosa. Todas las embarazadas con el test de O'Sullivan positivo se someten al test diagnóstico que consiste en realizar una sobrecarga oral con 100 gramos de glucosa, y dos o más valores deben ser iguales o superiores a los siguientes:

Glucemia	Sangre venosa
	(mg/dl)
Ayunas	105
1 hora	190
2 horas	165
3 horas	145

Tabla 3.1. Criterios diagnósticos de Diabetes Gestacional (Guía Asistencial 2003; Grupo Español para el Estudio de la Diabetes y el Embarazo (GEDE))

Grupo de pretérminos

- De los recién nacidos:

1.-Ser un recién nacido con edad gestacional menor de 37 semanas.

2.-Tener un peso adecuado para su edad gestacional (según la fecha de la última regla y por ecografía durante el embarazo).

3.-Nacer sin malformaciones congénitas, ni signos de infección aparente, anomalías del sistema nervioso central, ni sospecha de enfermedad muscular, ósea, u otras anomalías genéticas.

- De las madres:

1.- Edad comprendida entre 21 y 40 años.

2.- No tener antecedentes personales de osteoporosis, o de cualquier otra enfermedad metabólica, ni encontrarse en tratamiento con fármacos, ni consumir tabaco, alcohol u otros tóxicos que interfieran con la mineralización ósea.

3.2 PROTOCOLO DE ESTUDIO

Todas las madres aceptaron por consentimiento informado participar en el estudio. El estudio fue aceptado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla.

En todos los recién nacidos se recogieron las siguientes variables: edad gestacional, sexo, longitud, peso, perímetros craneal y torácico, y test de APGAR. En las madres se recogieron: edad, paridad, grupo sanguíneo, los antecedentes menstruales y obstétricos, tipo de parto, antecedentes familiares y personales de enfermedad metabólica, hábitos tóxicos, origen urbano o rural, la toma de fármacos o suplementos vitamínicos, e incidencias durante el embarazo.

En el grupo de madres con diabetes gestacional se recogió el tipo de tratamiento realizado (dieta con o sin insulina), así como el control de la glucemia durante el embarazo. El diagnóstico se realizó según la Guía Asistencial del 2003 editada por el Grupo Español para el Estudio de la Diabetes y el Embarazo (tabla 3.1).

Las glucemias del recién nacido se realizaron a las dos horas del nacimiento, y si eran normales cada 8 horas, en controles sucesivos. Quedó reflejada en el estudio la necesidad de ingreso en la Unidad de Neonatología.

El grupo de recién nacidos de madre con diabetes gestacional (HMDG) se dividió en dos subgrupos: HMDG 1 cuyas madres fueron tratadas sólo con dieta, y HMDG 2 que fueron tratadas además con insulina por ser la dieta insuficiente, para controlar las glucemias. Ninguno de los HMDG presentaba otra patología.

En el grupo de pretérminos se consideraron dos subgrupos, aquéllos situados entre 32-36 semanas de gestación y aquéllos de menos de 32 semanas de gestación.

Exploración ósea por ultrasonidos:

Las mediciones de la velocidad del ultrasonido mediada por la amplitud (**Ad-SOS**) a través del hueso en los recién nacido y sus madres se realizó en las primeras 48 horas tras el nacimiento.

La **Ad-SOS** se midió con un **DBM Sonic 1200(IGEA, Carpi, Italia)** que es un aparato electrónico que permite realizar un análisis estructural y densitométrico del tejido óseo mediante ultrasonidos. Tiene una frecuencia de emisión de 1.2 MHz, 22w de potencia y sondas emisoras y receptoras de cuarzo. La propagación del ultrasonido a través del hueso se transmite con una velocidad que varía en función de la densidad y de cómo esté organizado estructuralmente el tejido óseo.

El DBM Sonic 1200 consta de:

- Una Unidad Central de Medición (UCM) (Figura 1) compuesta por una caja metálica, de dimensiones 278 x 153 x 292 mm, que contiene los circuitos electrónicos para la generación y elaboración de ultrasonidos que se utilizan en las mediciones. En el panel frontal se encuentran los dispositivos de control y de señalización del sistema y una pantalla donde se visualiza la gráfica. Figura 3.1.



Figura 3.1. DBM SONIC 1200 (UCM)

- Un aparato de medición que se denomina “Calibre” (Figura 3.2), que consiste en una estructura metálica en aluminio que hace de soporte a una pareja de sondas, o transductores ultrasónicos, que se presentan entre ellos a una distancia regulable desde cero (superficie de las sondas en contacto), hasta un máximo de 42 mm, que permite posicionar las sondas sobre el lugar exacto de medición, para el análisis del tejido óseo. Está formado por dos cuerpos tubulares puestos en posición coaxial, que se deslizan sobre el mismo eje, conteniendo cada uno una sonda de US.



Figura 3.2. Calibre del DBM SONIC 1200

El calibre tiene además un dispositivo manual de regulación de la distancia entre las sondas, que está situado en la parte superior de la estructura metálica.

El calibre tiene un transductor de posición que se encuentra en el interior de los cuerpos tubulares, que permiten a la UCM conocer con gran precisión la distancia entre las sondas de medida.

La estructura metálica tiene un tercer tubo de un diámetro inferior a los precedentes, paralelo al eje, que contiene los cables de conexión entre la UCM y los transductores incorporados al calibre; además hace de soporte de una tecla que se utiliza durante el proceso de medición para “congelar” la imagen gráfica en la pantalla.

- Fantoma: Es un pequeño bloque de plexiglás de 20x30x40 mm que tiene en dos de sus extremos dos hendiduras circulares denominadas A y B a una distancia entre sí de 20 mm, y dos hendiduras C y D distantes entre sí 40 mm, que se utilizan para la calibración previa al inicio de la medida. La velocidad de referencia medida con el fantoma es de 2760 ± 15 m/sg.

En las madres se realizó la determinación del 2º al 5º dedo de la mano no dominante, por triplicado. En el recién nacido se realizó por quintuplicado en la epífisis distal de ambos húmeros. En las madres se eligieron estos lugares de medida por:

- Ser una zona que comprende hueso cortical y trabecular.
- Tener un menor coeficiente de variación (mayor precisión), debido a la facilidad de reposicionamiento de la sonda.

En el RN se eligió la epífisis distal del húmero por ser una zona estructuralmente parecida al tercio distal de las falanges y por las dificultades técnicas, al no poderse acceder por el tamaño de la sonda, a los dedos de un recién nacido. También aquí el cóndilo distal proporciona un referente anatómico para dirigir la posición de las sondas.

Antes de iniciar una medida:

- Se espera que el equipo y la sonda estén “calientes” para efectuar la primera medida del día.
- Se realiza la calibración utilizando un fantoma de plexiglás que tiene una velocidad de referencia de 2760 ± 15 m/sg.
- Se desliza suavemente hasta los cóndilos y entonces se rota suavemente sobre el plano ortogonal a la falange encontrando el punto de máxima transmisión, el cual coincide con la perpendicularidad de la transmisión respecto a la interfase ósea.
- No se debe presionar las dos sondas del calibre y se debe permitir que la presión sea la del muelle de retroceso, para evitar subjetividad en las medidas.

- Prestar atención a las zonas con medidas inferiores a 12 mm o superiores de 20 mm. En el primer caso para que no sobresalga demasiado del lugar de medida, y en el segundo caso para dar abundante gel de transmisión y esperar que se forme un pequeño edema antes de efectuar la medida.

Posteriormente se sigue con el siguiente **procedimiento de medida**:

1. Posicionamiento del calibre y las sondas (Figuras 3 y 4):
 - Se aplica abundante gel de transmisión en la superficie de ambas sondas.
 - Se posiciona el dedo o el húmero en cada caso entre las sondas, de forma que queden bien centradas.
 - Se desliza el calibre hasta topar con los cóndilos y posteriormente esperar 10 segundos para que el tejido blando quede comprimido por el resorte del calibre.
 - Se optimiza la amplitud, crecimiento y número de picos del gráfico de transmisión del ultrasonido (OSTEOSONOGRAMA), manteniendo la barra umbral si es posible sobre el primer pico.
 - Cuando se obtuvo la óptima transmisión, se congeló la imagen y posteriormente se confirmó el dato.
 - Se realizó por lo menos una medición del tejido blando, entre los dedos pulgar e índice, y se confirmó el dato apareciendo un gráfico en la pantalla.
2. Verificación final de las medidas:
 - Es normal que las velocidades de AdSOS tomadas en la metáfisis distal de las primeras falanges de los dedos 2º al 5º de las madres del estudio, sean distintas. Éstas son directamente proporcionales a la longitud de los dedos.
3. Valoración final de la medida:

- La valoración final de la medida se realizó teniendo en cuenta principalmente el valor de la osteosonometría o velocidad del ultrasonido a través del hueso dependiente de la amplitud (Ad-SOS) y valorando el osteosonograma según amplitud, forma y número de los picos.



Figuras 3.3 y 3.4. Procedimiento de medida

Todas las mediciones fueron realizadas por el mismo observador. El coeficiente de variación (CV%) fue calculado de acuerdo con Gluer y colaboradores (1996) realizando 5 medidas en 10 recién nacidos con reposicionamiento de la sonda. Cada día se calibró el aparato con el fantoma de poliuretano facilitado por el fabricante.

Estudio antropométrico:

El peso se midió con una báscula BASIC SP (máximo 6 Kg y mínimo 40 g; error: 2 g) g. La longitud con un neonatómetro tipo HOLTAIN con precisión de 0.1cm y los perímetros craneal y torácico con una cinta métrica inextensible de fibra de vidrio.

Estudio bioquímico:

En todos los recién nacidos y sus madres se determinó en suero las siguientes variables: Calcio, fósforo, calcio corregido con las proteínas, fosfatasa alcalina, proteínas totales, osteocalcina, parathormona, β -crosslaps, osteoprotegerina, y 25(OH)D.

La extracción de sangre en el RN se hizo del cordón umbilical en el momento del parto y en las madres de una vena periférica, en ayunas y a primera hora de la mañana, durante el parto o en las primeras 12 horas tras el parto.

El suero fue separado inmediatamente por centrifugado a 3500 rpm durante 15 minutos a 4° C y congelado a -20° C hasta su procesamiento.

Las determinaciones se realizaron en el Laboratorio del Departamento de Bioquímica del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla .

El calcio corregido con las proteínas, el **fósforo**, las **proteínas totales** y la **fosfatasa alcalina total**, se midieron según el método clínico de Bayer ® para el ADVIA 2400 Chemistry System Healthcare LLC.

Osteocalcina:

En la sangre se encuentran tanto la osteocalcina intacta (aminoácidos 1-49) así como el fragmento N-MID (aminoácidos 1-43), de gran tamaño. La osteocalcina intacta es inestable debido al desdoblamiento proteásico entre los aminoácidos 43 y 44, mientras que el fragmento N-MID resultante del desdoblamiento es mucho más estable. Nosotros determinamos el fragmento N-MID de la osteocalcina, para ello utilizamos el test Elecsys N-MID osteocalcin que es un inmunoensayo por quimioluminiscencia “ECLIA” utilizando el módulo Elecsys MODULAR ANALYTICS E170 (Roche Diagnostics ®). Este test emplea dos anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente a los epítopes del fragmento N-MID y del fragmento N-terminal, detectando tanto el fragmento N-MID estable como la osteocalcina aún intacta.. El test no depende del inestable fragmento C-terminal (aminoácidos 43-49) de la molécula de osteocalcina, garantizando unos resultados de medición constantes.

El principio del test es una técnica sándwich con una duración total de 18 minutos.

En una 1ª incubación se toman 20 µl de muestra, un anticuerpo biotinilado monoclonal específico anti-osteocalcina N-MID y anticuerpo específico monoclonal anti-osteocalcina N-MID marcado con quelato de rutenio formando un sándwich.

En una 2ª incubación: Después de la incorporación de micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por la interacción entre biotina y estreptavidina.

La mezcla de la reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Al aplicar una

corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente en un fotomultiplicador .

Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración a dos puntos y una curva principal incluida en el código de barras del reactivo. El intervalo de medición está entre 0,500 y 300 ng/ml, definido como el límite de detección y el máximo de la curva principal.

Los valores de normalidad para las mujeres en nuestro laboratorio están por debajo 0,60 ng/ml. No están establecidos para la mujer embarazada, ni para los recién nacidos.

La precisión intraensayo tiene un CV de 0,7 % y una precisión total con un CV de 1,6%.

Hormona paratiroidea intacta (PTH i): se midió por inmunoensayo de electroquimioluminiscencia “ECLIA” utilizando el módulo Elecsys MODULAR ANALYTICS E170 (Roche Diagnostics ®). La PTH i está compuesta por una única cadena de polipéptidos con 84 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 9500 daltons. El fragmento biológicamente activo N-terminal tiene una vida media de pocos minutos. La medición selectiva de la hormona mayormente intacta permite determinar directamente la actividad secretora de la glándula paratiroide. El test Elecsys para determinar la PTH i utiliza el principio de ensayo sándwich, en el que el anticuerpo monoclonal biotinilado reacciona con el fragmento N-terminal (1-37) y el anticuerpo monoclonal marcado con quelato de rutenio con el fragmento C-terminal (38-84). Los epitopos reconocidos corresponden a los aminoácidos 26-32 y 55-64.

La técnica sandwich tiene una duración total de 18 minutos.

La 1ª incubación: 50 µl de muestra, un anticuerpo monoclonal biotinilado específico anti-PTH y un anticuerpo monoclonal específico anti-PTH marcado con un quelato de rutenio reaccionan para formar un complejo sándwich.

La 2ª incubación: Después de la incorporación de micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por la interacción entre biotina y estreptavidina.

La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.

Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración realizada en el sistema a partir de una calibración a dos puntos y una curva principal.

El test no se ve afectado por ictericia, hemólisis, ni lipemia. Los valores se expresan en pg/ml. Los valores de normalidad para < 40 años están entre 15 y 80 pg/ml, no estando establecidos para las mujeres embarazadas, ni los recién nacidos.

El intervalo de medición está entre 1.20 y 500 pg/ml, definido por el límite de detección y el máximo de la curva principal.

25- hidroxivitamina D: Se determinó por quimioluminiscencia Nichols Advantage®. Nichols Institute Diagnostics utiliza la quimioluminiscencia con ésteres de acridina como marcador en su sistema de quimioluminiscencia para técnicas especiales. Cuando los ésteres de acridina se tratan con peróxido de hidrógeno y una solución alcalina, emiten luz. Los valores se expresan en ng/ml.

El rango de medida se encuentra entre 7.0 ng/ml y 120 ng/ml. que puede registrarse sin dilución es el valor del punto máximo de la Curva Maestra. La Curva Maestra abarca todo el intervalo de medidas del ensayo, siendo su punto superior el valor máximo que puede registrarse en el ensayo.

La precisión interensayo está cercana a un CV del 20 % (sensibilidad funcional).

Los valores de referencia de normalidad de nuestro laboratorio se encuentra entre 10 y 70 ng/ml .

El **βcrosslaps** en el suero se analizó en el MODULAR ANALYTICS E 170 (Roche Diagnostics®) mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) con el test Elecsys β-crossLaps /serum destinado específicamente para determinar los fragmentos reticulados isomerizados de colágeno tipo I. La especificidad del test está garantizada por la aplicación de dos anticuerpos monoclonales que reconocen los

octapéptidos lineares β -8AA. El test por tanto cuantifica todos los fragmentos de la degradación del colágeno tipo I según una técnica sándwich con una duración total de 18 minutos:

1ª incubación: Se incuban 50 microlitros de la muestra y un anticuerpo biotinilado monoclonal anti- β -CrossLaps , liberándose de los componentes séricos el antígeno de la muestra.

2ª incubación: Tras añadir un anticuerpo específico monoclonal anti- β -CrossLaps la mezcla de la reacción se traslada a la célula de lectura donde, por magnetismo, se fijan a la superficie del electrodo. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz es medida con un fotomultiplicador.

El intervalo de medición se encuentra entre 0.010-6.00 ng/ml, definido por el límite de detección y el máximo de la curva principal.

La variabilidad intraindividual presentó un CV de 17,9 %.

Los valores séricos de **osteoprotegerina (OPG)** se midieron mediante la técnica ELISA con un kit comercial HUMAN OSTEOPROTEGERINA ELISA (IMMUN DIAGNOSTIK®) medido en TRITURUS (Grifols®) . En este ensayo se utilizan dos anticuerpos altamente específicos contra la OPG. El principio del test es una técnica sándwich.

En un primer paso se incuba las muestras con un anticuerpo biotinilado contra OPG que reacciona simultáneamente con un anticuerpo de la placa de microtiter. Se forma un complejo sándwich sobre la placa. Se incuba toda la noche a 4°C. Posteriormente se realiza un lavado para eliminar sustancias inespecíficas no unidas al complejo.

En un segundo paso se añaden estreptavidina – peroxidasa que reacciona con el complejo. Se incuba una hora a temperatura ambiente (18-26 °C). Se realiza otro lavado y posteriormente se añade a la fase sólida el sustrato TMB y se incuba durante 15-20 minutos a temperatura ambiente, reservado de la luz, cambiando el color azul a amarillo. La intensidad del color amarillo es directamente proporcional a la

concentración de OPG en la muestra. Se determina la lectura por absorciometría a 450 nm .

La precisión intraensayo es de un CV del 10% e interensayo <10 %.

Las concentraciones séricas de OPG fueron dadas en UI/L y sus valores obtenidos en base a una curva realizada con muestras estándares determinadas por el fabricante.

No existen en la actualidad valores de normalidad para la mujer embarazada, ni los recién nacidos.

3.3 ESTUDIO ESTADÍSTICO

El análisis estadístico ha constado de los siguientes apartados:

- a) Estadística Descriptiva: se han calculado medias y desviaciones típicas para las variables numéricas y porcentajes para las variables cualitativas.
- b) El estudio de la relación entre las variables numéricas se realizó mediante el cálculo de los coeficientes de correlación con su significación estadística y también de la regresión lineal acompañada de su coeficiente de determinación (R cuadrado).
- c) Las comparaciones de las variables cuantitativas entre los diferentes grupos de RN se realizó mediante el ANOVA (Análisis de la Varianza) y en caso de obtener diferencias significativas se realizó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.
- d) Para la comparación de las variables cuantitativas de los niños con sus madres se utilizó el test de la t de Student para datos apareados.

Todos los cálculos se han realizado con el Programa SPSS versión 14.0 para Windows. El nivel de significación seleccionado fue del 95 % ($p < 0.05$).

RESULTADOS

La edad media de las madres estudiadas fue de $31,02 \pm 5,41$ años. El rango de edad de las madres estuvo comprendido entre 21 y 40 años.

Se estudiaron 220 madres y sus respectivos recién nacidos, de los cuales 99 correspondieron al grupo control (C), 64 al grupo de hijos de madres con diabetes gestacional (HMDG) y 57 al grupo de RN pretérminos (RNPT).

En la tabla 4.1 figuran las medias y desviaciones estándar (DE) de la edad gestacional, peso, longitud, perímetro craneal y perímetro torácico al nacimiento de las 3 poblaciones estudiadas.

	Controles		HMDG		Pretérminos	
	<i>n</i> = 99		<i>n</i> = 64		<i>n</i> = 57	
	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>
<i>Edad gestacional (semanas)</i>	39,72	1,44	39,47	1,25	33,07	2,92
<i>Peso (gramos)</i>	3.307,15	424,33	3.311,91	453,36	1.893,02	598,56
<i>Longitud (cm)</i>	49,65	1,98	49,82	1,86	42,82	4,39
<i>Perímetro craneal (cm)</i>	34,42	1,26	34,44	1,21	29,87	2,72
<i>Perímetro torácico (cm)</i>	32,18	1,92	32,50	1,41	26,57	3,20

Tabla 4.1. Media y desviaciones estándar (DE) de la edad gestacional, peso, longitud, perímetro craneal y perímetro torácico al nacimiento de las tres poblaciones consideradas

La velocidad del ultrasonido dependiente de la amplitud (Ad-SOS) fue medida en todos los recién nacidos. El coeficiente de variación intraensayo calculado previamente al estudio fue de 0,48 % y el error estándar de la media (EEM) de 2,20 m/sg.

En la tabla 4.2 se muestran los valores de Ad-SOS (media \pm DE) de las madres y RN de los 3 grupos considerados.

La Ad-SOS medida en los 99 recién nacidos del grupo control fue de $1781 \pm 14,5$ m/sg. Los 57 pretérminos y los 64 recién nacidos de madres con diabetes gestacional presentaron unos valores de $1722,6 \pm 24,5$ m/sg y $1753,7 \pm 19,9$ m/sg respectivamente.

Encontramos unos valores de Ad-SOS inferiores en el grupo de los pretérminos y de los recién nacidos de madres con diabetes gestacional, a los del grupo de recién nacidos a término, que fueron estadísticamente significativos ($p < 0,01$) (tabla 4.2).

	Ad-SOS			
	madres		RN	
	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>
<i>Controles</i>	2.073,99	45,59	1.781,41	14,51
<i>HMDG</i>	2.071,41	47,25	1.753,71	19,94*
<i>Pretérminos</i>	2.106,30	52,98	1.722,61	24,50*

* $p < 0,01$

Tabla 4.2 Valores de Ad-SOS (Media+ DE) en las madres y RN de las 3 poblaciones estudiadas

En la tabla 4.3 se muestran los valores de Ad-SOS y los distintos parámetros bioquímicos estudiados del grupo control distribuidos por sexo.

	SEXO	N	Media	DE
Ad-SOS (m/s)	M	46	1776,93	16,12*
	V	53	1785,30	11,77
Ca (mg/dl)	M	46	11,25	0,65
	V	53	11,11	0,83
P (mg/dl)	M	46	5,87	0,94
	V	53	6,03	0,89
FA (U/l)	M	46	372,58	114,82
	V	53	330,20	106,34
OPG (UI/l)	M	46	6,07	1,62**
	V	53	5,18	2,14
OTC (ng/ml)	M	46	44,12	23,80
	V	53	43,21	23,42
25(OH)D(ng/ml)	M	46	34,54	15,73
	V	53	29,07	12,80
β CTX (ng/ml)	M	46	0,67	0,19
	V	53	0,72	0,15
PTH (pg/ml)	M	46	2,90	2,09
	V	53	3,13	2,63

* $p = 0,004$; ** $p = 0,048$; V= varones; M= mujeres

Tabla 4.3 Diferencia entre sexos para los valores de Ad-SOS, Ca, P, FA, OPG, OTC, 25 (OH) D, β CTX, y PTH en el grupo control .

La Ad-SOS medida en el grupo control mostró valores más elevados en niños que en niñas, estadísticamente significativos ($p= 0,004$). Entre los parámetros bioquímicos la OPG en suero presentó valores más elevados en niñas que en niños con significación estadística ($p= 0,048$) Tabla 4.3.

En los RN de madres con diabetes gestacional no se observaron diferencias por sexo para ninguno de los parámetros estudiados. (Tabla 4.4).

	SEXO	N	Media	DE
Ad-SOS (m/s)	M	35	1751,54	19,57
	V	29	1756,32	20,40
Ca (mg/dl)	M	32	11,07	0,72
	V	29	11,02	0,71
P (mg/dl)	M	35	5,67	1,07
	V	29	6,36	1,74
FA (U/l)	M	35	415,07	319,32
	V	29	354,28	154,14
OPG (UI/l)	M	35	5,31	1,92
	V	29	5,41	1,55
OTC (ng/ml)	M	35	40,58	23,01
	V	29	36,59	23,03
25(OH)D(ng/ml)	M	35	34,24	12,20
	V	29	30,12	12,97
β CTX (ng/ml)	M	35	0,67	0,14
	V	29	0,65	0,16
PTH (pg/ml)	M	35	2,83	1,95
	V	29	2,93	1,89

Tabla 4.4 Diferencia entre sexos para los valores de Ad-SOS, calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, osteoprotegerina, osteocalcina, 25-hidroxivitamina D, β CTX, y parathormona en los RN de madres con diabetes gestacional.

La tabla 4.5 representa los valores de Ad-SOS y los parámetros bioquímicos medidos en el grupo de pretérminos. Los valores de Ad-SOS en este grupo fueron superiores en niños que en niñas, de forma no significativa. No hubo diferencias entre sexos para ninguna de las variables medidas.

	SEXO	N	Media	DE
AdSOS (m/s)	M	32	1719,72	27,84
	V	25	1724,88	20,85
Ca (mg/dl)	M	32	10,97	1,02
	V	25	10,73	0,82
P (mg/dl)	M	32	5,95	1,40
	V	25	6,41	1,22
FA (U/l)	M	32	406,68	215,59
	V	25	428,35	127,73
OPG (UI/l)	M	32	6,76	1,71
	V	25	6,78	2,35
OTC (ng/ml)	M	32	41,74	24,96
	V	25	36,65	25,90
25OHD (ng/ml)	M	32	24,47	10,89
	V	25	26,51	9,33
β CTX (ng/ml)	M	32	0,58	0,25
	V	25	0,52	0,18
PTH (pg/ml)	M	32	12,89	20,08
	V	25	13,13	12,08

M= mujeres

V= varones

Tabla 4.5 Diferencia entre sexos para los valores de Ad-SOS, calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, osteoprotegerina, osteocalcina, 25-hidroxivitamina D, β CTX, y parathormona en el grupo de pretérminos

Todos los recién nacidos y sus madres presentaron cifras de calcio y fósforo normales. (Tabla 4.6).

Los valores de la calcemia fueron más elevados en los recién nacidos que en sus madres: $11,18 \pm 0,74$ mg/dl vs $9,56 \pm 0,47$ para RN del grupo control y sus respectivas madres, $11,04 \pm 0,70$ mg/dl vs $9,50 \pm 0,38$ mg/dl para los HMDG y sus madres, y $10,87 \pm 0,95$ mg/dl vs $9,31 \pm 0,73$ mg/dl para el grupo de los pretérminos y sus respectivas madres. Esta diferencia entre madres y RN para la calcemia fue estadísticamente significativa ($p < 0,005$). Los niveles séricos de calcio fueron inferiores en el grupo de RN pretérminos con respecto al grupo grupo control, pero no hubo diferencias entre las 3 poblaciones de RN consideradas en nuestro estudio.

La fosforemia en las madres y los recién nacidos fueron: $3,55 \pm 0,57$ mg/dl y $6,07 \pm 1,68$ mg/dl para el grupo control, $3,51 \pm 0,58$ mg/dl y $5,98 \pm 1,47$ mg /dl para el grupo con diabetes gestacional y $3,54 \pm 0,88$ mg/ dl y $6,15 \pm 1,36$ mg/dl para el grupo de los pretérminos. Estos valores fueron superiores en los RN de forma estadísticamente significativa ($p < 0,005$) con respecto a sus madres. Las fosforemias en el grupo de RN pretérminos fueron superiores a las del grupo control, pero no se encontraron diferencias significativas entre las 3 poblaciones de RN de nuestro estudio.

	<i>Control</i>				<i>HMDG</i>				<i>Pretérminos</i>			
	<i>n = 99</i>				<i>n = 64</i>				<i>n = 57</i>			
	<i>madres</i>		<i>RN</i>		<i>madres</i>		<i>RN</i>		<i>madres</i>		<i>RN</i>	
	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>
Ca (mg/dl)	9,56	0,47	11,18	0,74	9,50	0,38	11,04	0,70	9,31	0,73	10,87	0,95
P (mg/dl)	3,55	0,57	6,07	1,68	3,51	0,58	5,98	1,47	3,54	0,88	6,15	1,36
FA (U/l)	349,90	112,40	393,76	119,84	336,34	104,06	387,53	266,51	296,89	116,16	416,19	182,66
OPG (UI/l)	9,87	4,98	5,59	1,95	8,85	4,53	5,36	1,74	10,44	7,05	6,77	2,01
OTC (ng/ml)	16,36	8,63	43,63	23,36	16,46	8,79	38,77	23,29	12,21	11,51	39,58	25,95
25(OH)D (ng/ml)	19,28	9,06	31,61	14,35	18,37	8,19	32,37	12,53	17,55	7,79	25,36	10,29
β CTX (ng/ml)	0,50	0,25	0,70	0,17	0,44	0,22	0,66	0,15	0,52	0,24	0,55	0,22
PTH (pg/ml)	25,97	12,82	3,03	2,38	23,84	14,50	2,87	1,94	27,56	21,82	12,98	17,35

Tabla 4.6 Valores de calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, osteoprotegerina, osteocalcina, 25- hidroxivitamina D , β CTX y parathormona medidos en las madres y RN de los 3 grupos estudiados.

Encontramos una correlación positiva entre los valores de calcio ($R = 0,23$, $p = 0,002$) y fósforo ($R=0,29$, $p=0$) de las madres y sus recién nacidos (figuras 4.1 y 4.2).

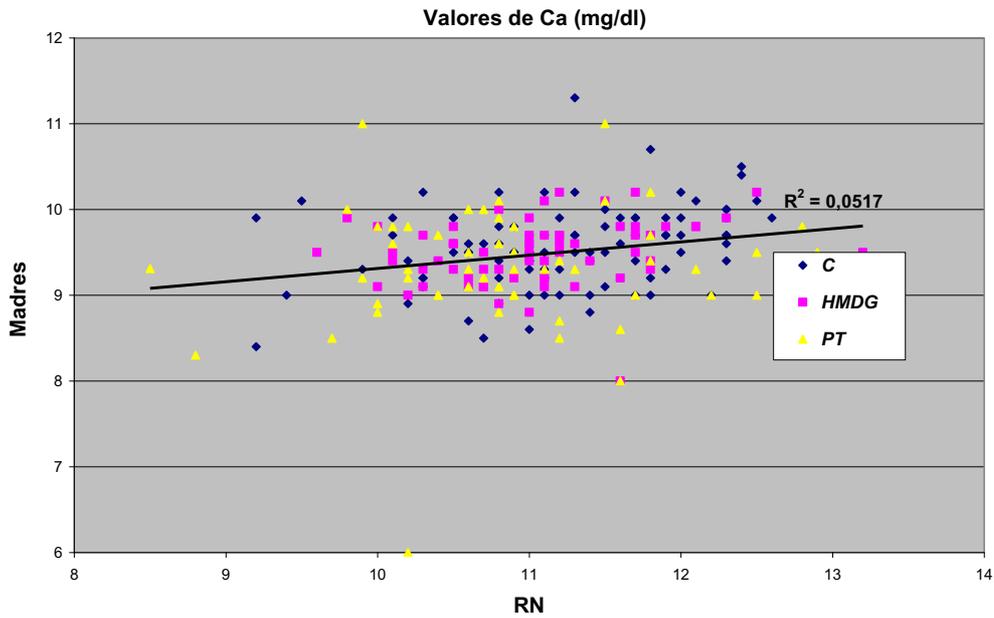


Figura 4.1 Correlación entre madres y RN para los valores de calcio en sangre, de los 3 grupos estudiados

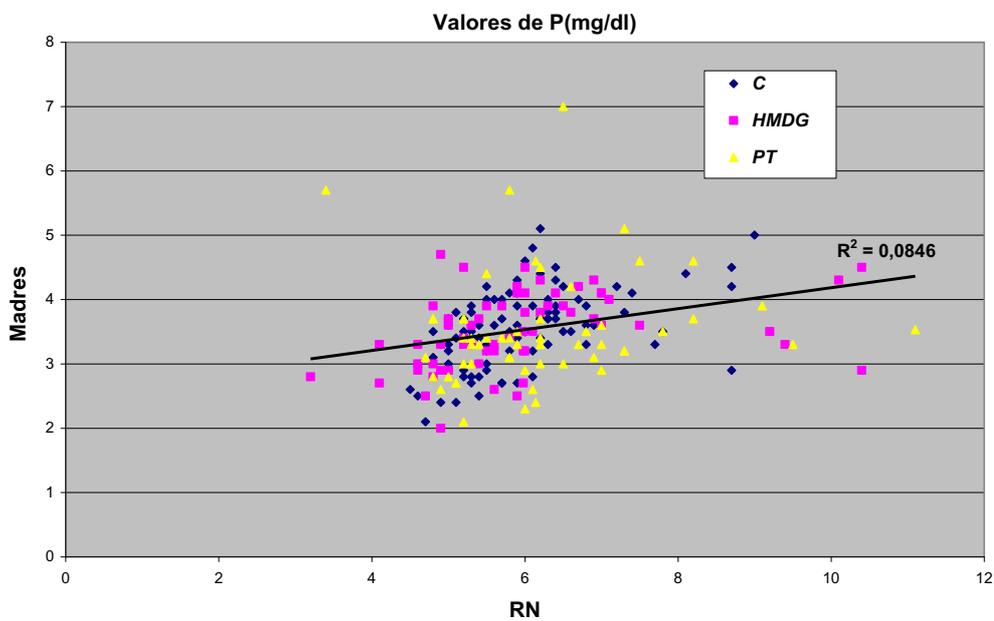


Figura 4.2 Correlación entre madres y RN para la fosforemia de los 3 grupos estudiados

Los valores de FA en las madres y sus RN fueron: $349,90 \pm 112,40$ y $393,76 \pm 119,84$ para el grupo control, $336,34 \pm 104,06$ y $387,53 \pm 266,51$ para el grupo de madres con diabetes gestacional y $296,89 \pm 116,16$ y $416,19 \pm 182,66$ para el grupo de pretérminos. No hubo diferencias significativas entre los valores de madres y sus RN ($p = 0,078$).

Los valores de FA medida en los RN pretérminos fue superior a la de los RN del grupo control y los HMDG, pero sólo presentó significación estadística ($p = 0,039$) para el grupo control.

No encontramos correlación entre las madres y los RN para la FA ($R = 0,048$, $p = 0,48$). Figura 4.3.

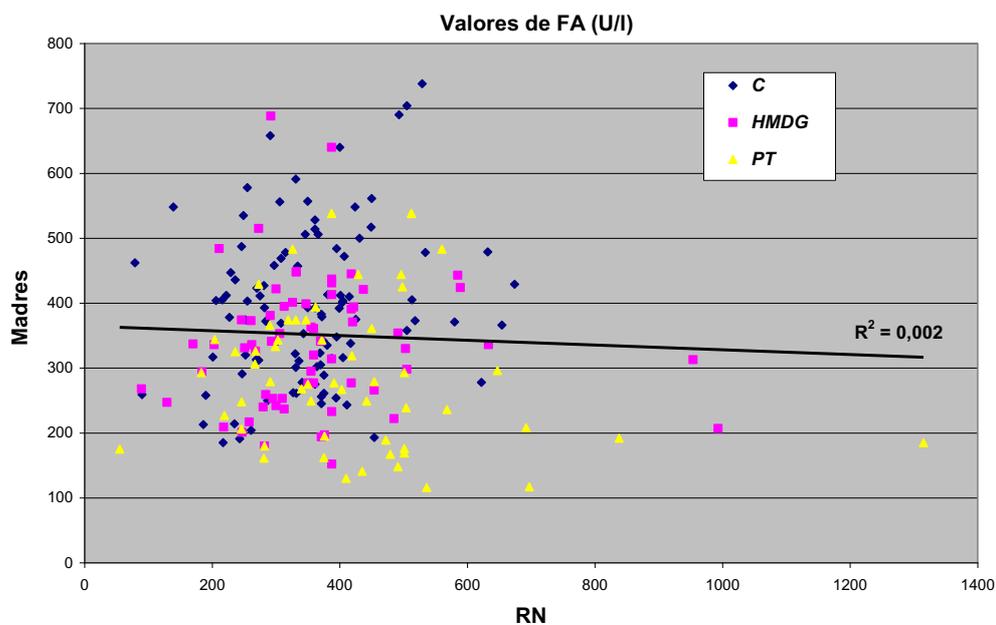


Figura 4.3 Correlación de los valores de fosfatasa alcalina entre madres y RN de los 3 grupos estudiados

Los valores de OPG en las madres fueron más elevados que en sus recién nacidos (grupo control: $9,87 \pm 4,98$ U/L y $5,59 \pm 1,95$ U/l; grupo de madres con diabetes gestacional y sus RN: $8,85 \pm 4,53$ U/l y $5,36 \pm 1,74$ U/l; grupo de madres de

pretérminos y sus RN: $10,44 \pm 7,05$ U/l y $6,77 \pm 2,01$ U/l respectivamente). Figura 4.4.

Las cifras de OPG sérica en RN pretérminos fueron más elevadas que en los RN del grupo control, con significación estadística ($p = 0,004$).

Existieron diferencias significativas entre los valores de OPG de madres y RN para los tres grupos estudiados.

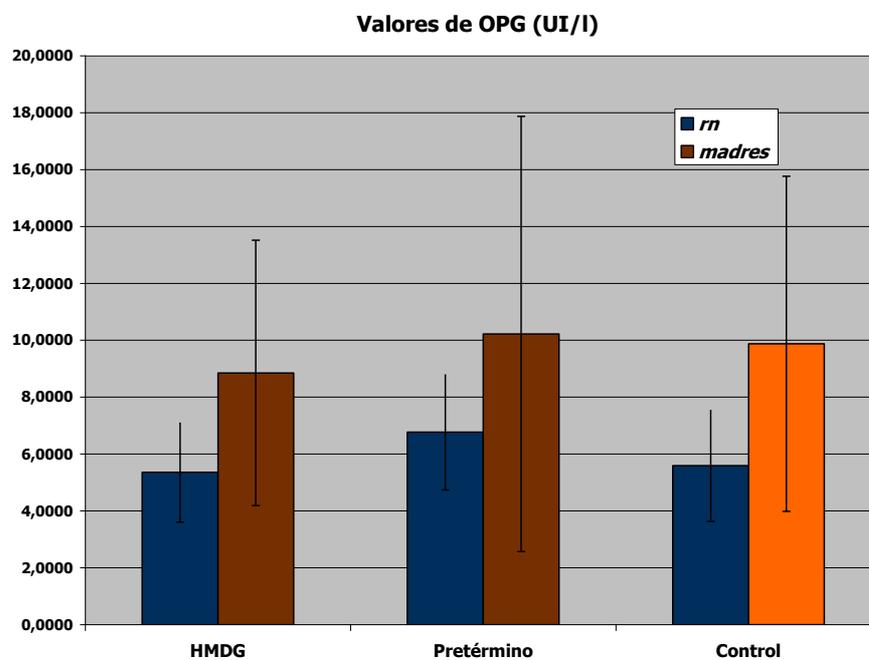


Figura 4.4 Niveles séricos de OPG (UI/l) de los RN y sus madres

Existió una correlación positiva entre madres y recién nacidos para los valores de osteoprotegerina ($R = 0,28$, $p = 0$). Figura 4.5.

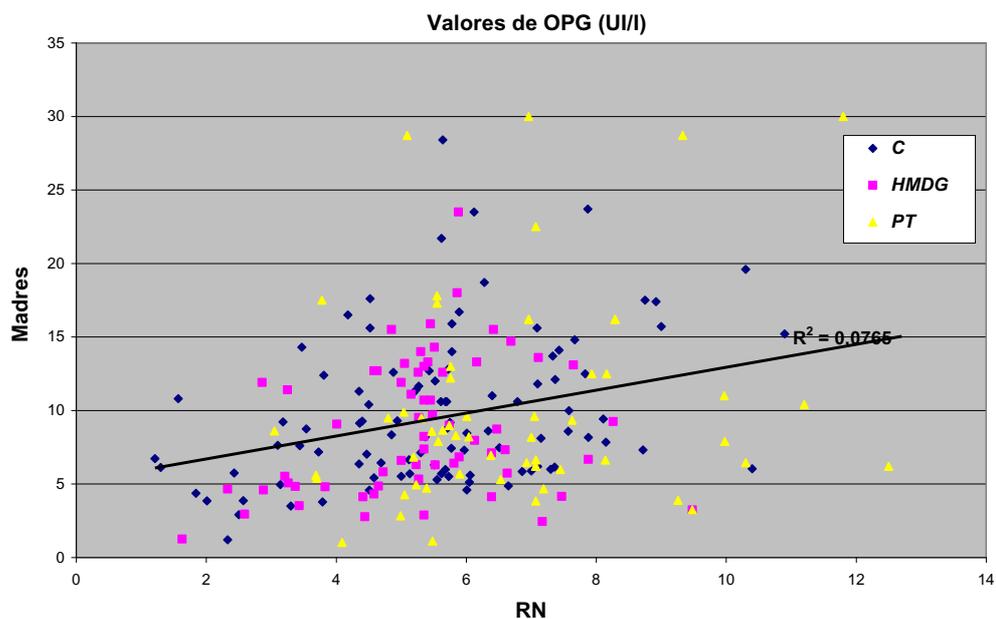


Figura 4.5 Correlación entre los valores séricos de OPG de madres y RN de los tres grupos estudiados

Todos los recién nacidos presentaron cifras más elevadas que sus madres de osteocalcina que fueron estadísticamente significativas ($p = 0$). Las madres y RN presentaron los siguientes valores de OTC: grupo control: $16,36 \pm 8,63$ y $43,63 \pm 23,36$ ng/ml; grupo de madres con diabetes gestacional y sus RN: $16,46 \pm 8,79$ y $38,77 \pm 23,29$ ng/ml; grupo de madres de pretérminos y sus RN: $12,21 \pm 11,51$ y $39,58 \pm 25,95$ ng/ml. Al estudiar los valores séricos de osteocalcina en los recién nacidos del grupo control se hallaron valores más elevados ($43,63 \pm 23,36$ ng/ml) que en los pretérminos ($39,58 \pm 25,95$ ng/ml) y que en los HMDG ($38,77 \pm 23,29$ ng/ml), que no fueron estadísticamente significativos ($p= 0,472$ y $p= 0,167$ respectivamente)).

Existió una correlación positiva de la osteocalcina medida en las madres y en los recién nacidos ($R= 0,17$, $p = 0,021$). Figura 4.6.

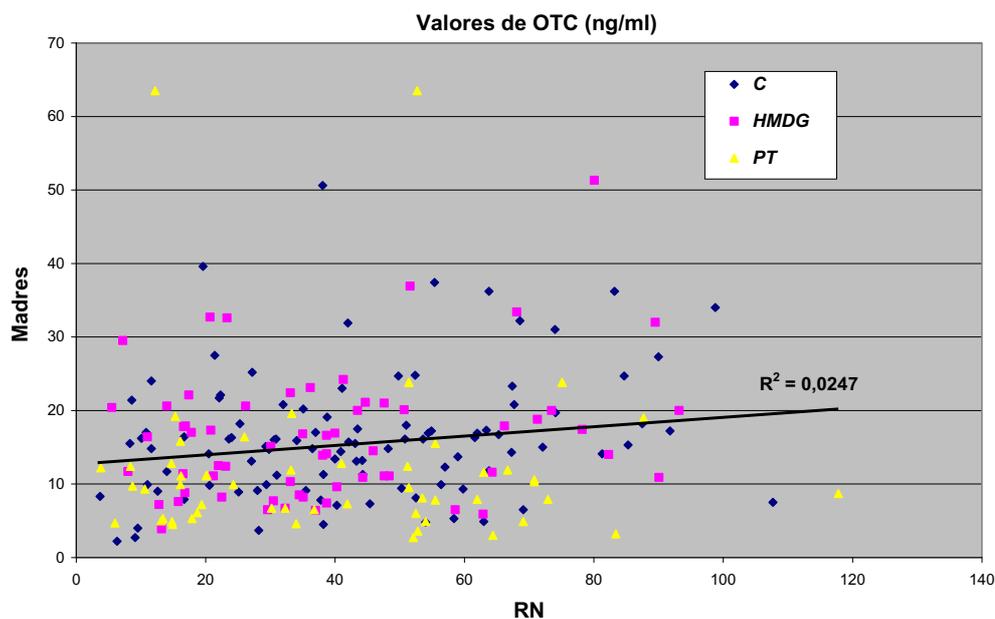


Figura 4.6 Correlación de los valores de OTC entre madres y RN

Las madres del grupo control mostraron unos valores de 25(OH)D de $19,28 \pm 9,06$ ng/ml inferiores de forma significativa ($p=0$), respecto a sus neonatos que presentaron una media de $31,61 \pm 14,35$ ng/dl. Trece de las madres (13,13 %), presentaron una deficiencia de vitamina D, con valores por debajo de 10 ng/ml, pero sólo 2 recién nacidos de estas mujeres presentaron cifras por debajo de 10 ng/ml (2,02 %). Los once recién nacidos restantes presentaron unos valores de 25(OH)D entre 11,9 y 30,6 ng/ml. Ninguno de estos recién nacidos presentaron alteración en los otros parámetros bioquímicos o antropométricos estudiados. Tampoco presentaron cifras inferiores de Ad-SOS.

Las madres con diabetes gestacional presentaron unos valores de 25(OH)D de $18,37 \pm 8,19$ ng/ml y sus recién nacidos de $32,37 \pm 12,53$ ng/ml, que mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0$). Diez de las madres (15,38 %) presentaron cifras de 25(OH)D inferiores a 10 ng/ml, pero sólo un recién nacido (1,54 %) mostró valores de 25(OH)D patológico, el resto presentaron un rango de 11,3 a

38,4 ng/ml. Este recién nacido no mostró diferencias significativas en los parámetros bioquímicos, ni antropométricos estudiados, ni alteración en la Ad-SOS.

Los niveles séricos de 25(OH)D en las madres de los pretérminos y sus recién nacidos fueron $17,55 \pm 7,79$ ng/ml y $25,36 \pm 10,29$ ng/ml respectivamente, que también presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0$). Cinco de las madres (8,77 %) presentaron valores por debajo de 10 ng/ml, pero un solo recién nacido (1,75 %) presentó un valor por debajo de la normalidad.

Los valores de 25(OH)D en RN pretérminos fueron inferiores de forma significativa a los niveles encontrados en los RN del grupo control y a los RN de madres con diabetes gestacional ($p = 0,012$ y $p = 0,010$).

Encontramos una fuerte correlación positiva en la cifras de 25(OH)D entre madres y recién nacidos ($R = 0,70$, $p = 0$) (Figura 4.7).

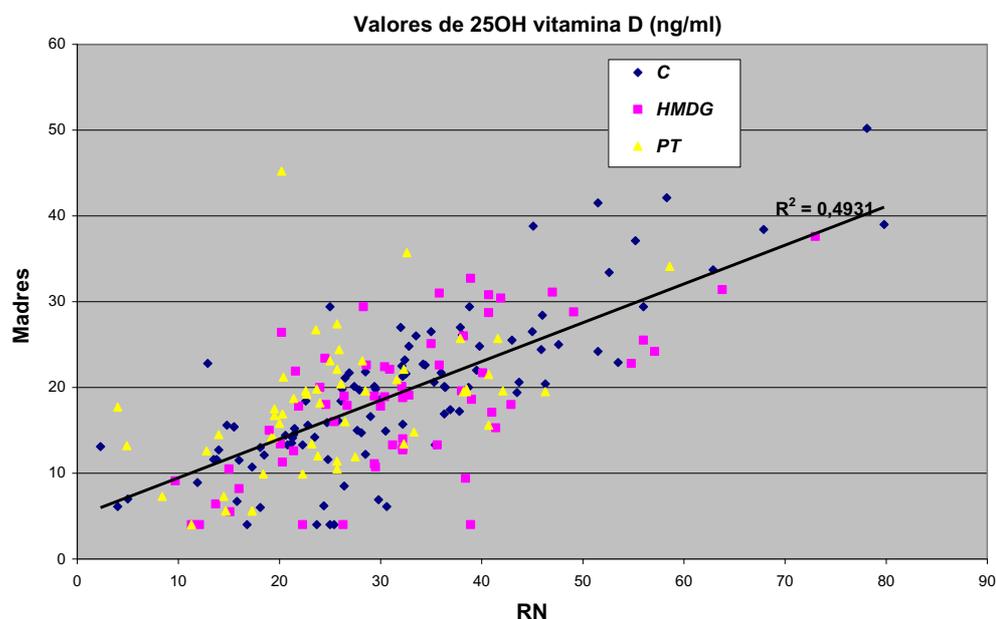


Figura 4.7 Correlación entre los valores séricos de 25(OH)D de madres y RN

Los valores de β CTX en las madres y sus RN presentaron los siguientes resultados: grupo control $0,50 \pm 0,25$ ng/ml y $0,70 \pm 0,17$ ng/ml; grupo de madres con diabetes gestacional $0,44 \pm 0,22$ ng/ml y $0,66 \pm 0,15$ ng/ml; y el grupo de madres de pretérminos y sus RN $0,52 \pm 0,24$ ng/ml y $0,55 \pm 0,22$ ng/ml respectivamente. Figura 4.8.

El grupo de RN pretérminos presentaron valores inferiores a los RN del grupo control y a los RN de madres con diabetes gestacional que fueron estadísticamente significativos ($p = 0$ y $p = 0,003$ respectivamente). No hubo diferencias significativas en los valores de β CTX entre los RN del grupo control y los HMDG.

No encontramos correlación entre los valores de β CTX de madres y sus RN ($R = 0,10$, $p = 0,141$). Figura 4.9. Existieron diferencias significativas entre los RN del grupo control y los HMDG con sus respectivas madres, pero no entre los RN pretérminos y sus madres.

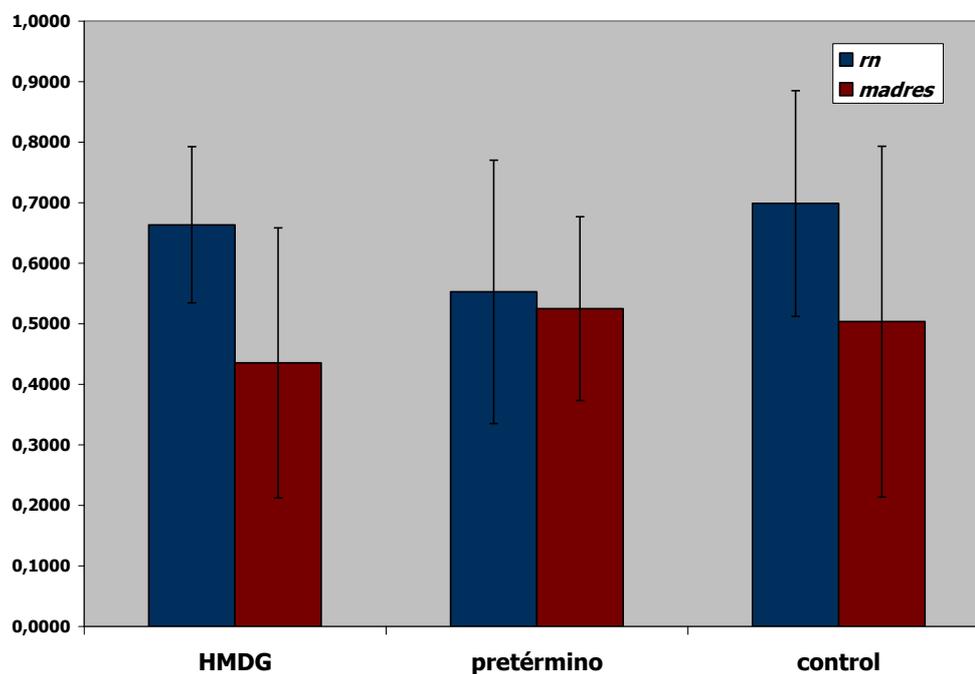


Figura 4.8 Niveles séricos de β CTX (ng/ml) en las madres y sus RN

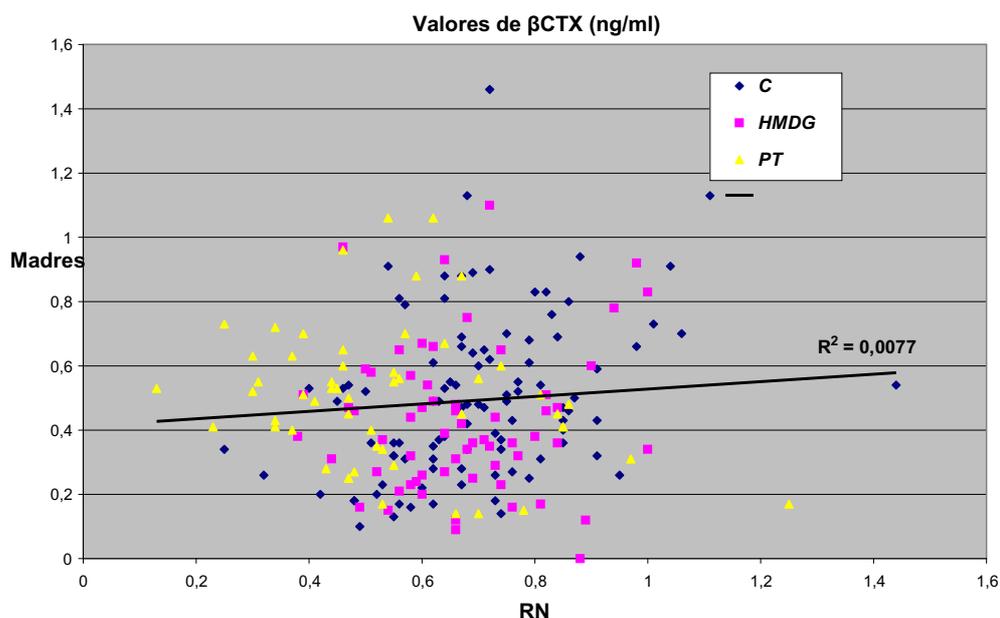


Figura 4.9 Correlación entre los valores séricos de βCTX de madres y recién nacidos

Los valores de PTH en las madres y sus RN presentaron los siguientes resultados: grupo control $25,97 \pm 12,82$ pg/ml y $3,03 \pm 2,38$ pg/ml; grupo de madres con diabetes gestacional y sus RN $23,84 \pm 14,50$ pg/ml y $2,87 \pm 1,94$ pg/ml; y el grupo de madres de pretérminos y sus RN $27,56 \pm 21,82$ pg/ml y $12,98 \pm 17,35$ pg/ml respectivamente. Figura 4.10.

Los valores de PTH fueron superiores en las madres que en los RN para los 3 grupos estudiados presentando significación estadística ($p < 0,001$).

Encontramos diferencias significativas entre los RN pretérminos con los del grupo control y los HMDG ($p = 0$), pero no entre el grupo control y los HMDG ($p = 1$).

No existió correlación entre madres y RN para los valores de PTH ($R = 0,002$, $p = 0,971$).

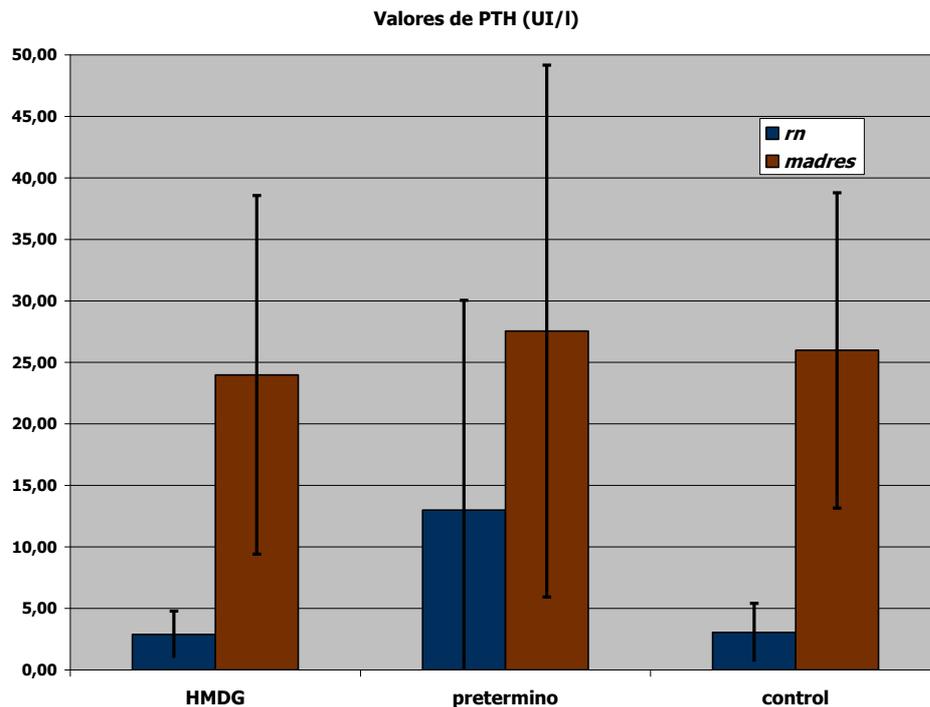


Figura 4.10 Valores de PTH en madres y RN

Resumiendo:

- Al comparar los valores obtenidos en los RN y sus madres para el calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, OPG, OTC, 25(OH)D, β CTX y PTH, encontramos que todos los recién nacidos presentaron valores séricos superiores al de sus madres de calcio, fósforo, osteocalcina, y 25(OH)D, que resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Las madres presentaron valores de PTH sérica superiores a sus RN que también fueron estadísticamente significativos. Encontramos que la fosfatasa alcalina está más elevada en RN de madres con diabetes gestacional y en RN pretérminos, aunque solo hubo diferencia significativa en éstos últimos, con respecto al grupo control.
- Hubo correlación significativa entre madres y RN para los valores de OPG, el 25(OH)D, la OTC, el calcio y el fósforo, pero no para el β CTX, la PTH, ni la fosfatasa alcalina.

- Los RN pretérminos presentaron cifras inferiores de 25(OH)D y de β CTX y cifras superiores de OPG y PTH que el grupo control y que el grupo HMDG, con significación estadística.

Al comparar la Ad-SOS con la edad gestacional, el peso, el perímetro craneal y la longitud observamos una correlación positiva con significación estadística, entre la Ad-SOS y la edad gestacional ($R = 0,74$; $p = 0$), el peso ($R = 0,58$; $p = 0$), el perímetro craneal ($R = 0,61$; $p = 0$) y la longitud, ($R = 0,59$; $p = 0$) para los RN estudiados (Fig 4.11 – 4.14). La mayor influencia sobre la Ad-SOS la ejerció la edad gestacional ($R = 0,74$).

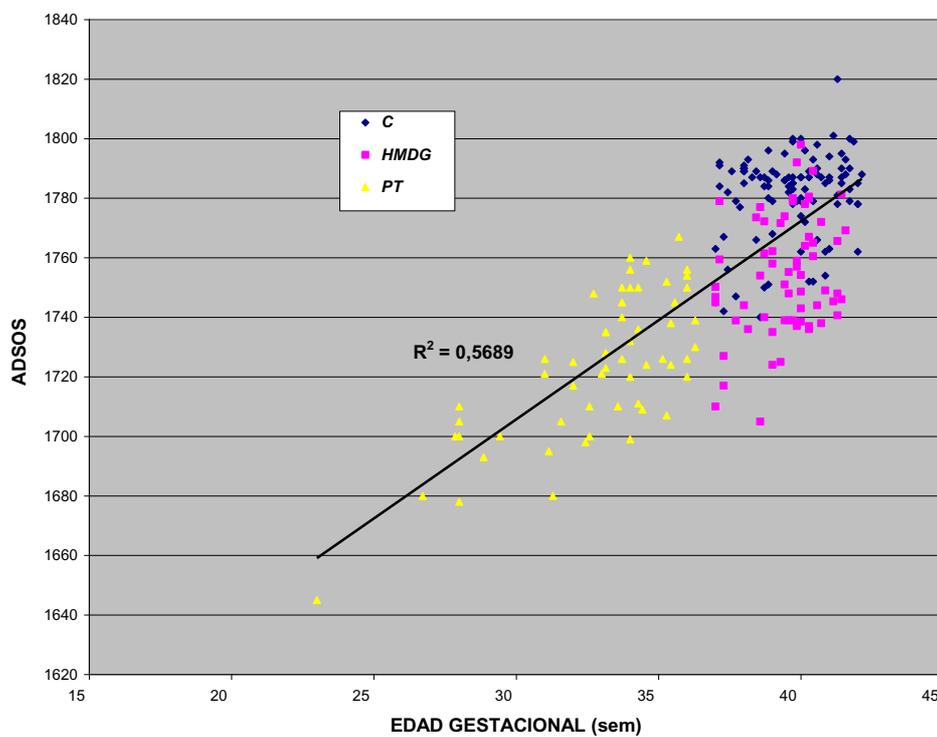


Figura 4.11 Correlación entre la Ad-SOS (m/sg) y la edad gestacional de los RN estudiados

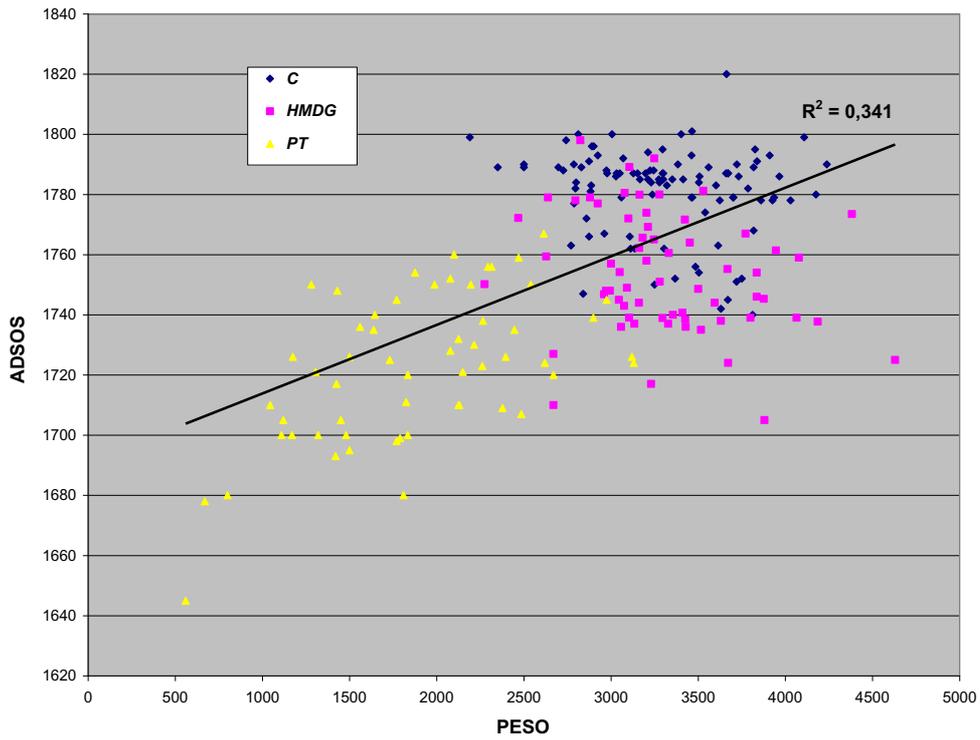


Figura 4.12 Correlación entre la Ad-SOS (m/sg) y el peso de los RN estudiados

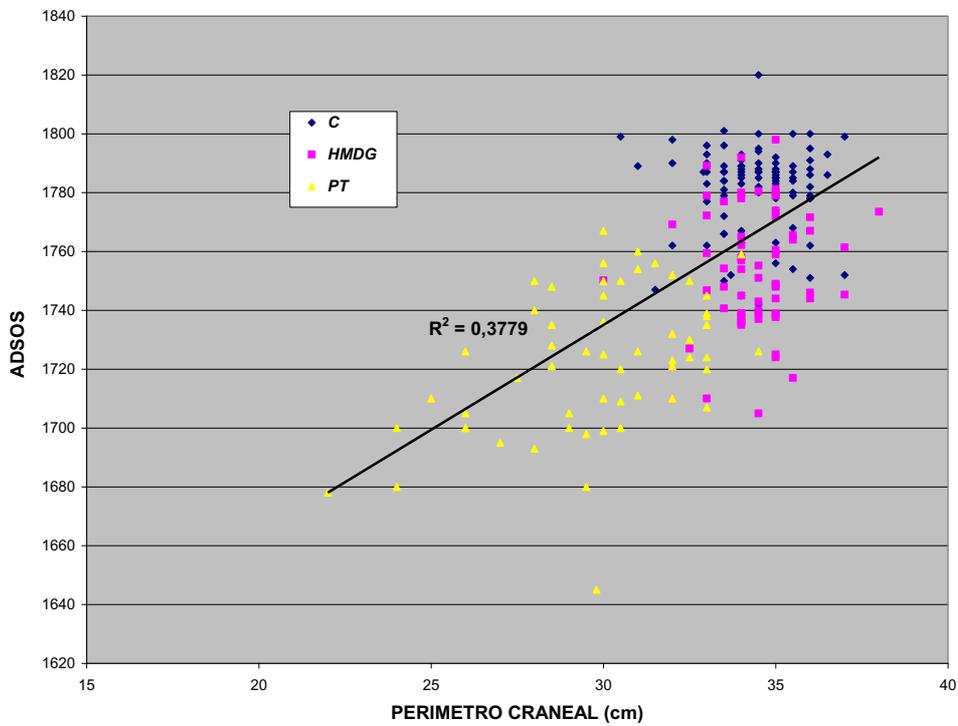


Figura 4.13 Correlación entre la Ad-SOS (m/sg) y el perímetro craneal de los RN estudiados

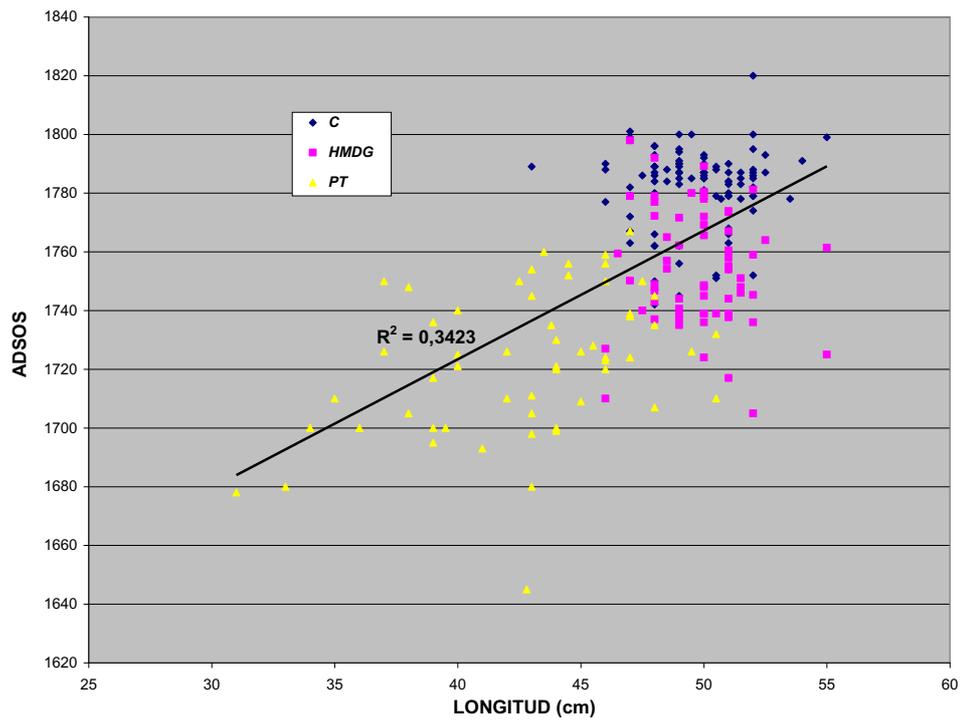


Figura 4.14 Correlación entre la Ad-SOS (m/sg) y la longitud de los RN en los RN estudiados

Posteriormente se investigó la existencia de correlación con la OPG y se observó una correlación negativa entre Ad-SOS y OPG ($R = -0,22$; $p = 0,001$). (Figura 4.15)

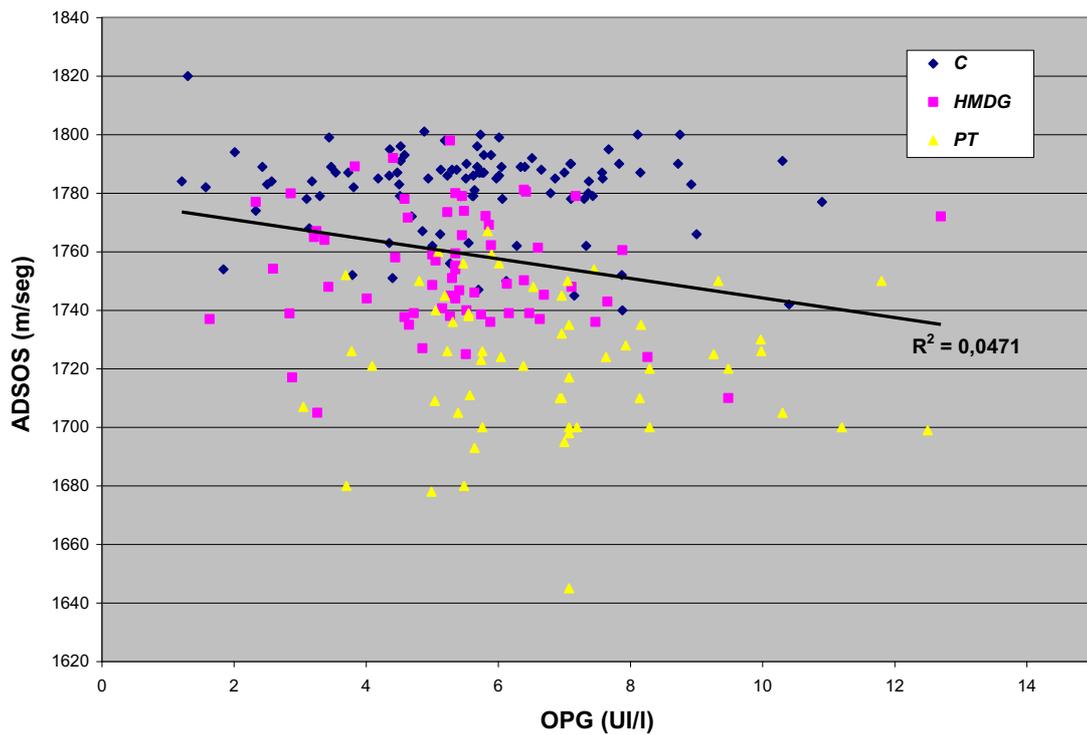


Figura 4.15 Correlación entre Ad-SOS y OPG para los 3 grupos de RN

No encontramos correlación entre la Ad-SOS y los marcadores de formación ósea, fosfatasa alcalina ($R = 0,16$; NS) y osteocalcina ($R = 0,04$, $p = 0,53$). (Figuras 4.16 y 4.17).

Sí hemos encontrado una correlación positiva entre la Ad-SOS y el marcador de resorción ósea β CTX ($R = 0,28$; $p = 0$). (Figura 4.18).

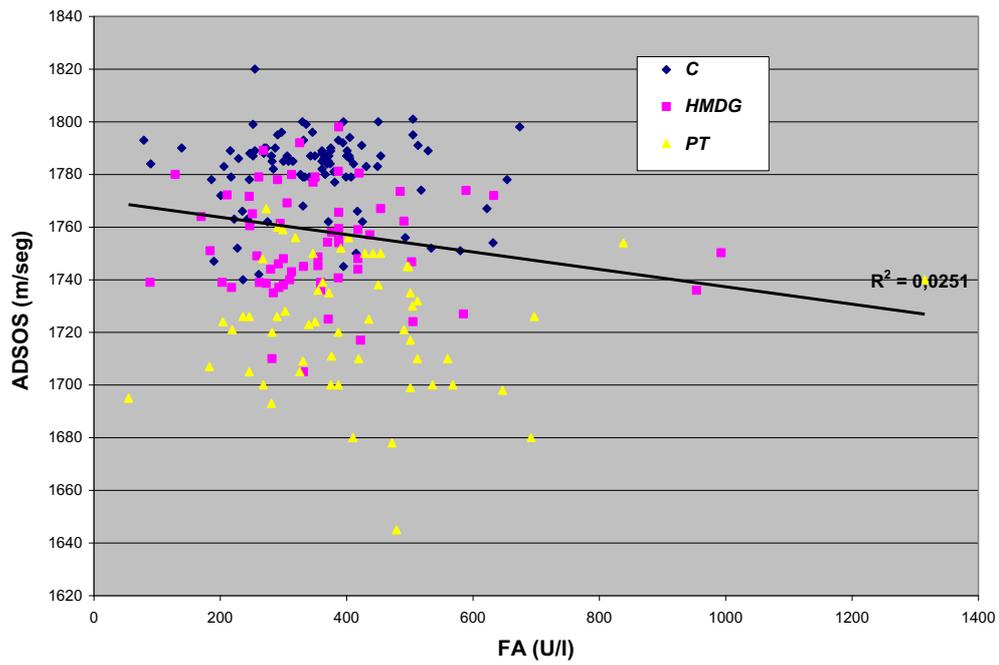


Figura 4.16 Correlación entre Ad-SOS y la fosfatasa alcalina de los RN estudiados

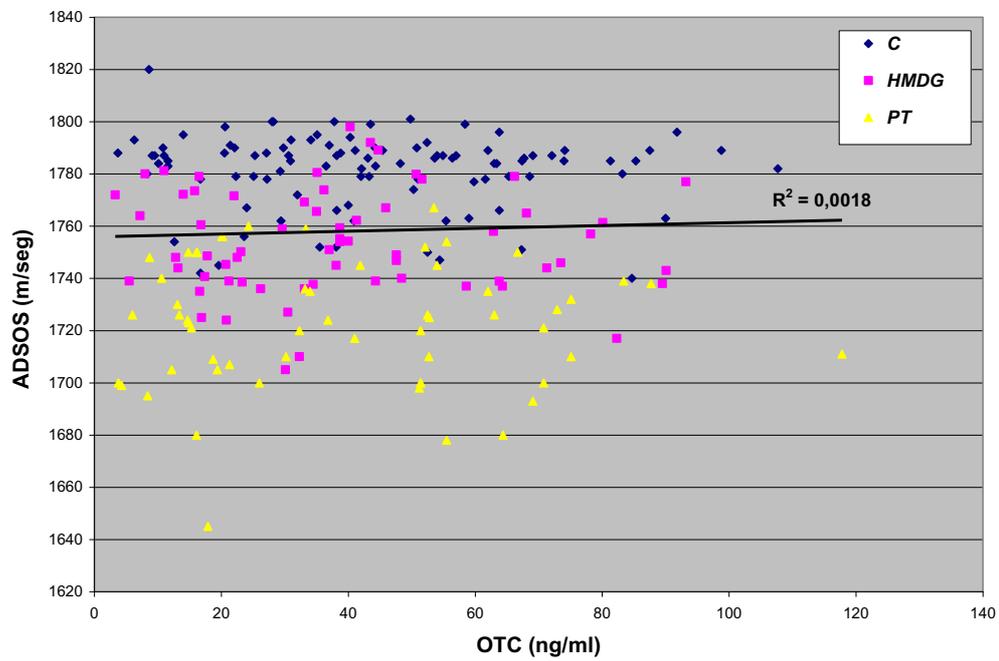


Figura 4.17 Correlación entre Ad-SOS y OTC de los RN estudiados

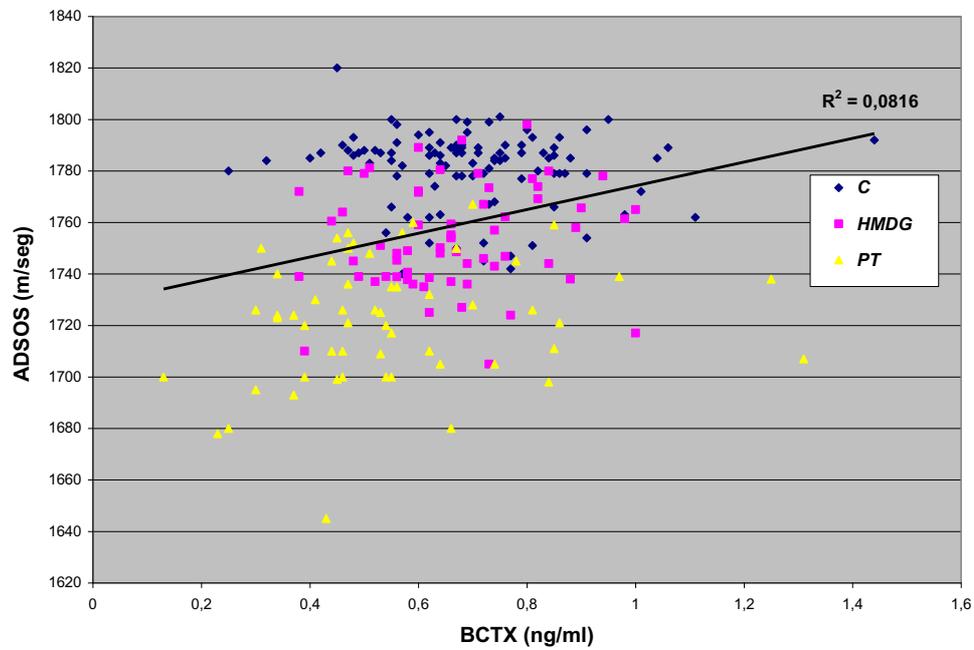


Figura 4.18 Correlación entre Ad-SOS y β CTX de los RN estudiados

No encontramos correlación entre la Ad-SOS con la fosforemia para los RN estudiados ($R=0,07$; $p=0,32$), pero sí una débil correlación no significativa con la calcemia ($R=0,10$; $p=0,110$). Figuras 4.19 y 4.20.

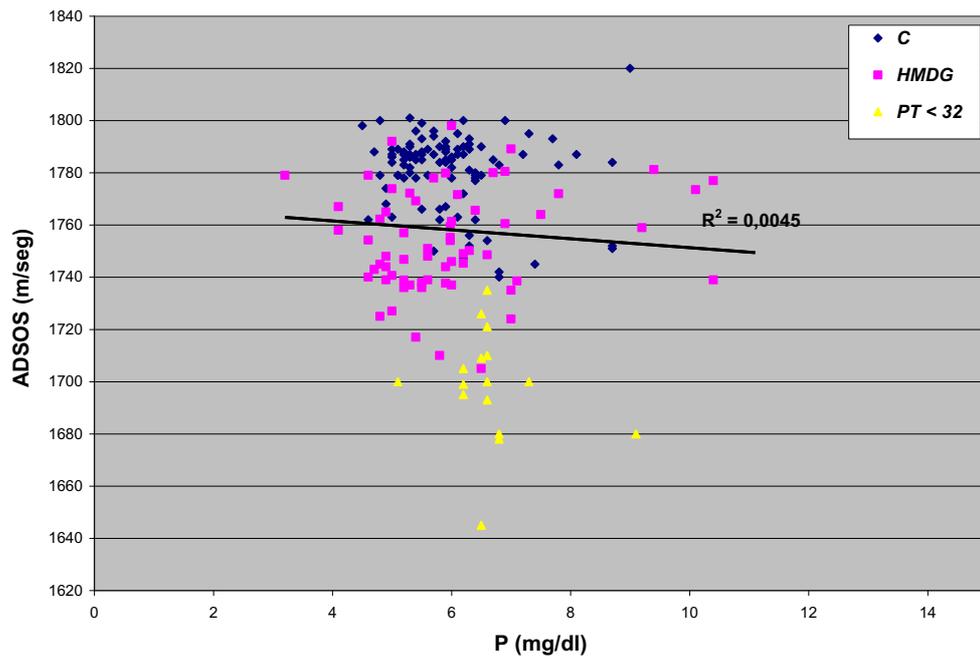


Figura 4.19 Correlación entre Ad-SOS y fosforemia de los RN estudiados

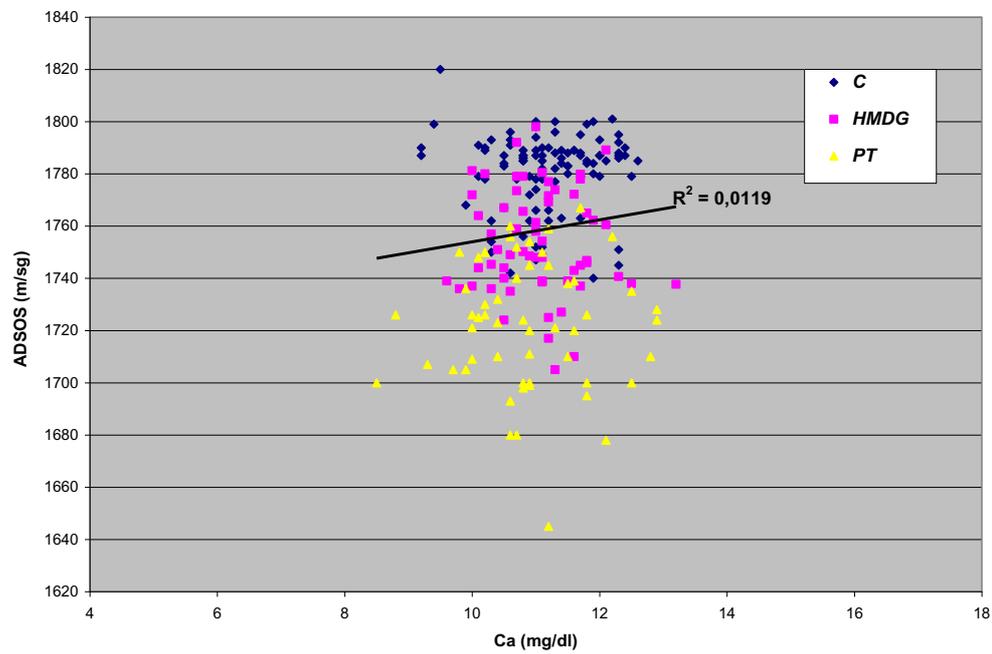


Figura 4.20 Correlación entre Ad-SOS y calcemia de los RN estudiados

Encontramos una débil correlación negativa entre los valores de fosfatasa alcalina con el peso ($R = -0,21$; $p = 0,023$), con la edad gestacional ($R = -0,20$; $p = 0,037$). No encontramos correlación entre la fosfatasa alcalina, con la calcemia ($R = -0,10$; NS), ni con la fosforemia ($R = 0,15$; NS). Observamos una correlación positiva con la PTH ($R = 0,37$; $p = 0$) Figuras 4.21- 25.

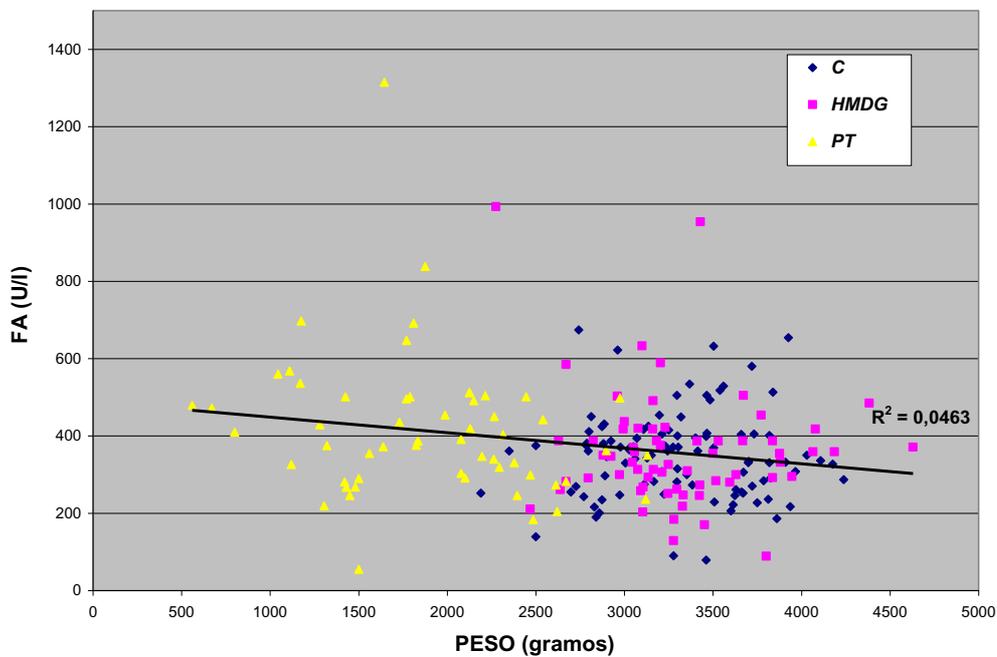


Figura 4.21 Correlación entre los valores de FA y el peso de los RN

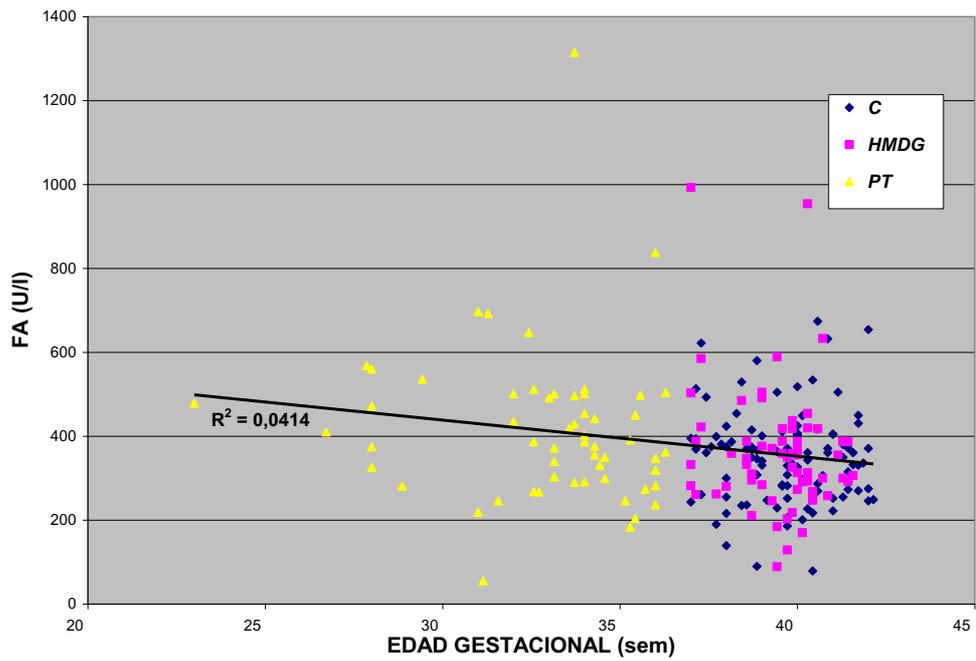


Figura 4.22 Correlación entre los valores de FA y la edad gestacional

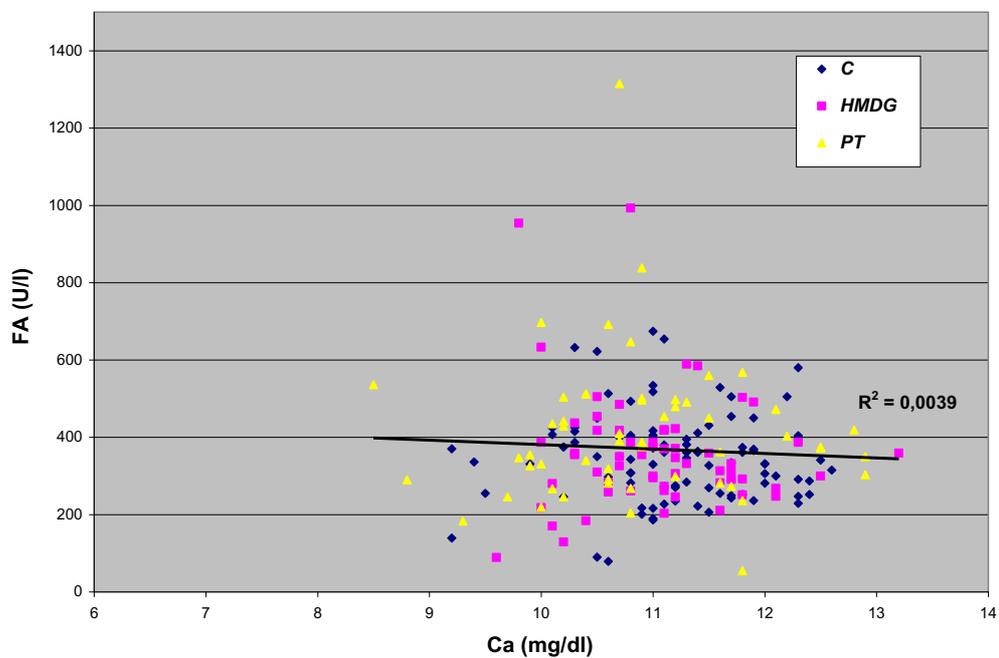


Figura 4.23 Correlación entre la fosfatasa alcalina y la calcemia de los RN

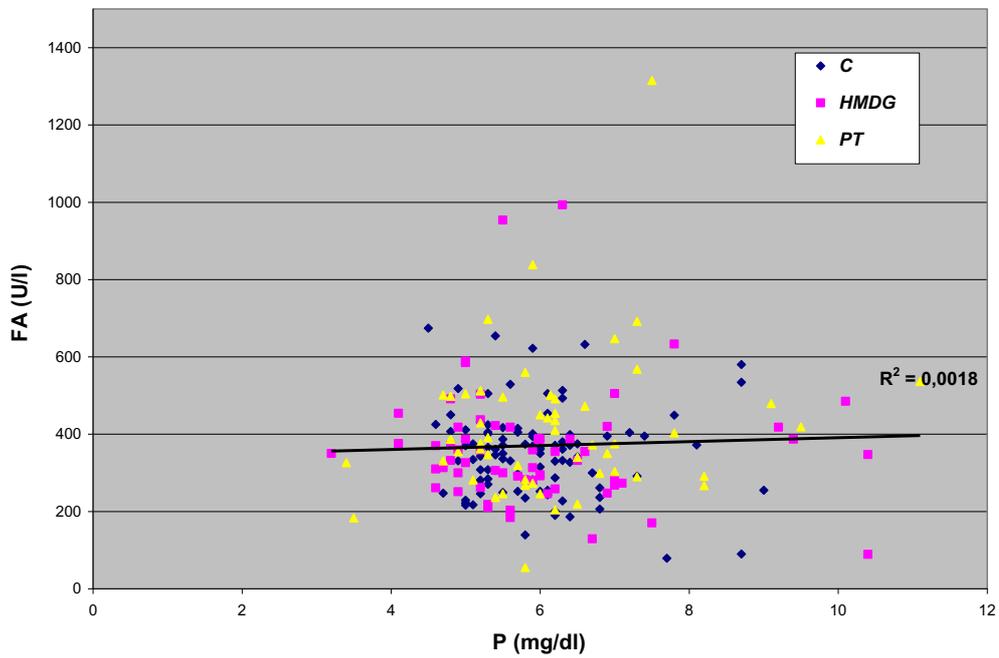


Figura 4.24 Correlación entre la fosfatasa alcalina y la fosforemia de los RN estudiados

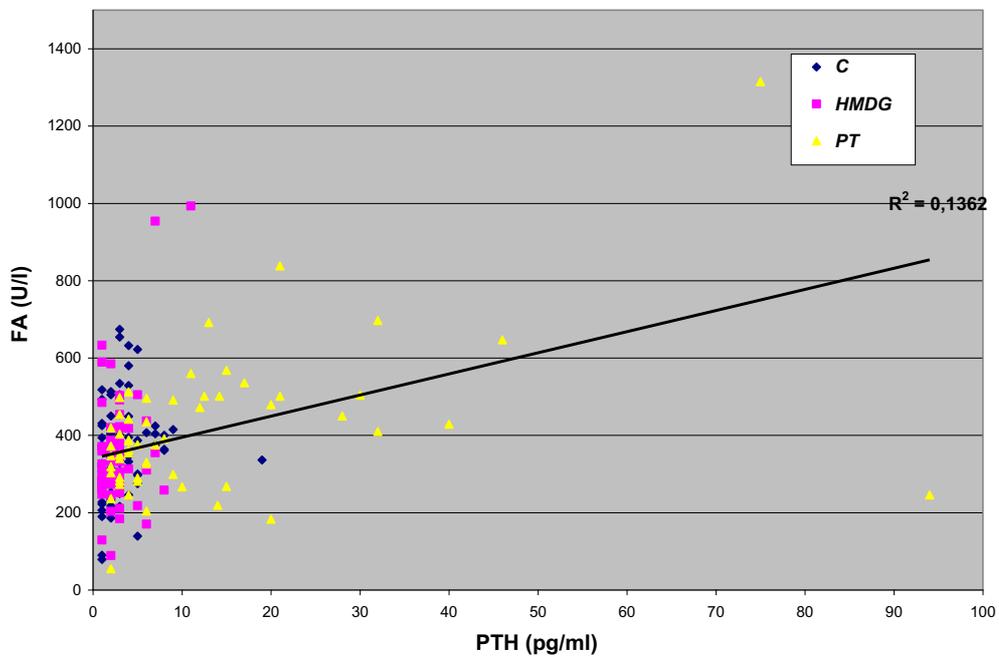


Figura 4.25 Correlación entre los valores de FA y PTH en los RN estudiados

A continuación comparamos los niveles de OPG con la edad gestacional y el peso, encontrando una correlación negativa entre los valores de OPG y la edad gestacional ($R = -0,24$; $p = 0,001$) y el peso ($R = -0,27$; $p = 0$). Figura 4.26 y 4.27.

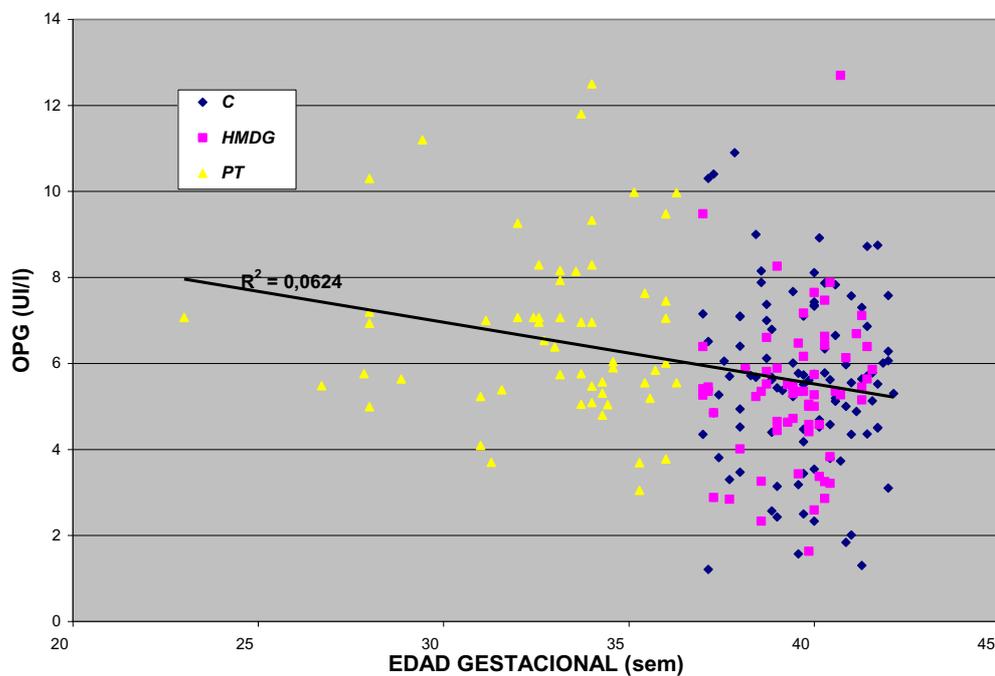


Figura 4.26 Correlación entre OPG y la edad gestacional de los RN estudiados

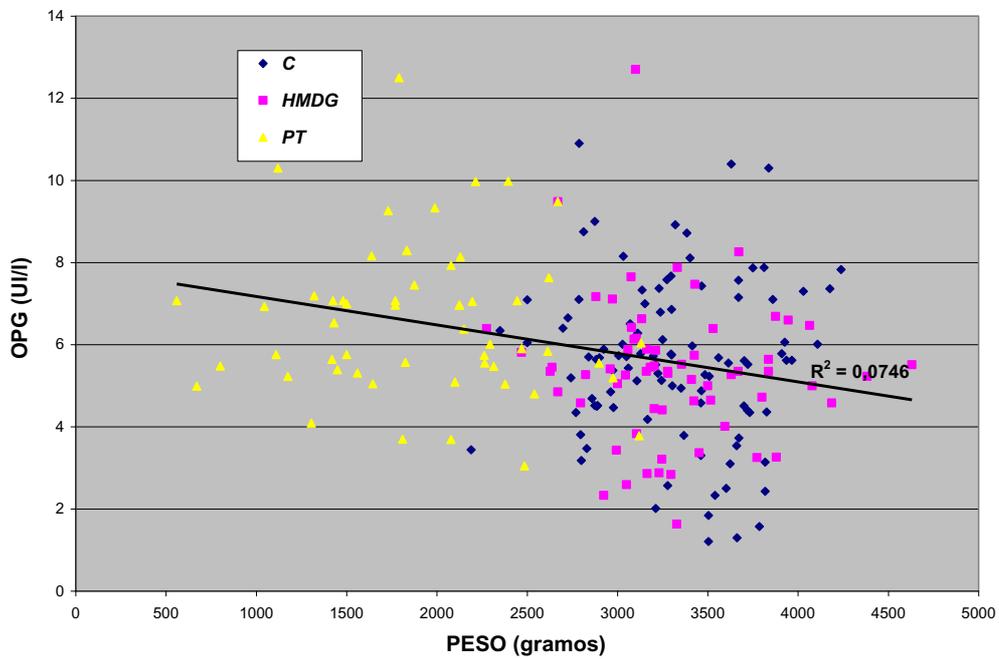


Figura 4.27 Correlación entre OPG y el peso al nacimiento de los RN estudiados

Se realizó posteriormente la correlación entre los valores séricos de OPG y los marcadores de formación y resorción estudiados.

Existió una correlación negativa entre los valores de OPG y los de OTC en los RN estudiados ($R = -0,22$; $p = 0,001$). Figura 4.28.

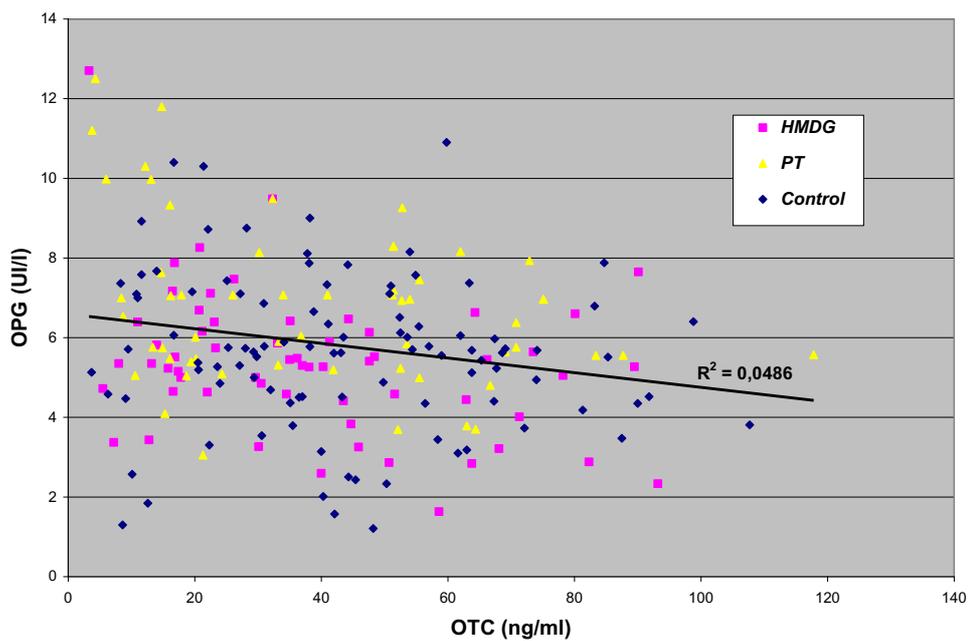


Figura 4.28 Correlación entre OPG (UI/l) y la OTC (ng/ml)

No existió correlación entre la OPG y la FA ($R=0,11$; $p=0,09$), ni con la 25(OH)D ($R=0,03$; $p=0,658$). Figuras 4.29 y 4.30

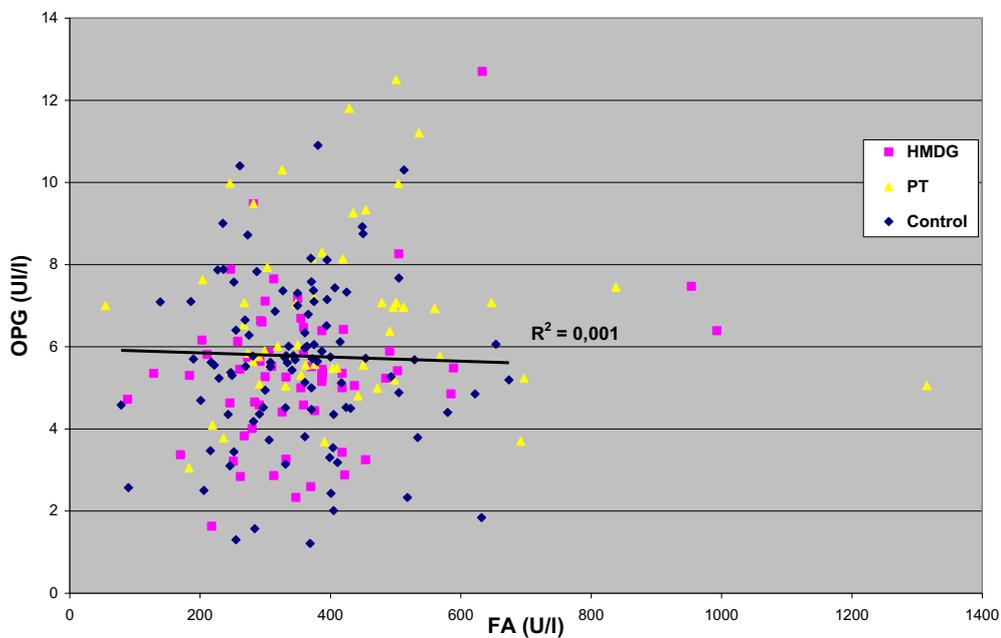


Figura 4.29 Correlación entre OPG y FA en los RN estudiados

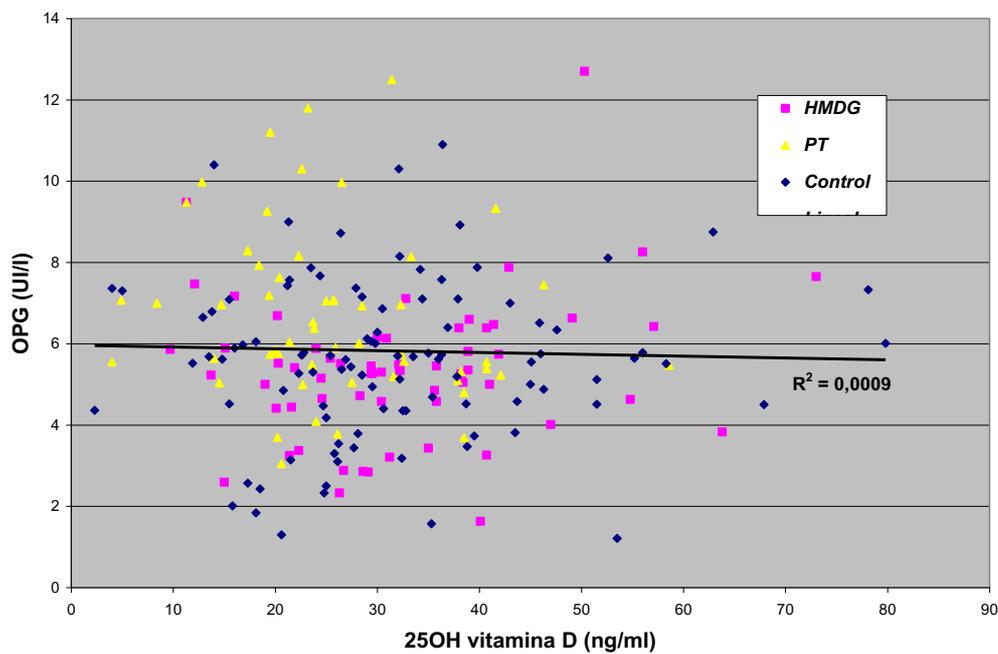


Figura 4.30 Correlación entre OPG y la 25(OH)D en los RN estudiados

Encontramos una correlación negativa estadísticamente significativa entre los niveles de osteoprotegerina y el parámetro de resorción ósea β CTX ($R = -0,248$; $p = 0$). Figura 4.31.

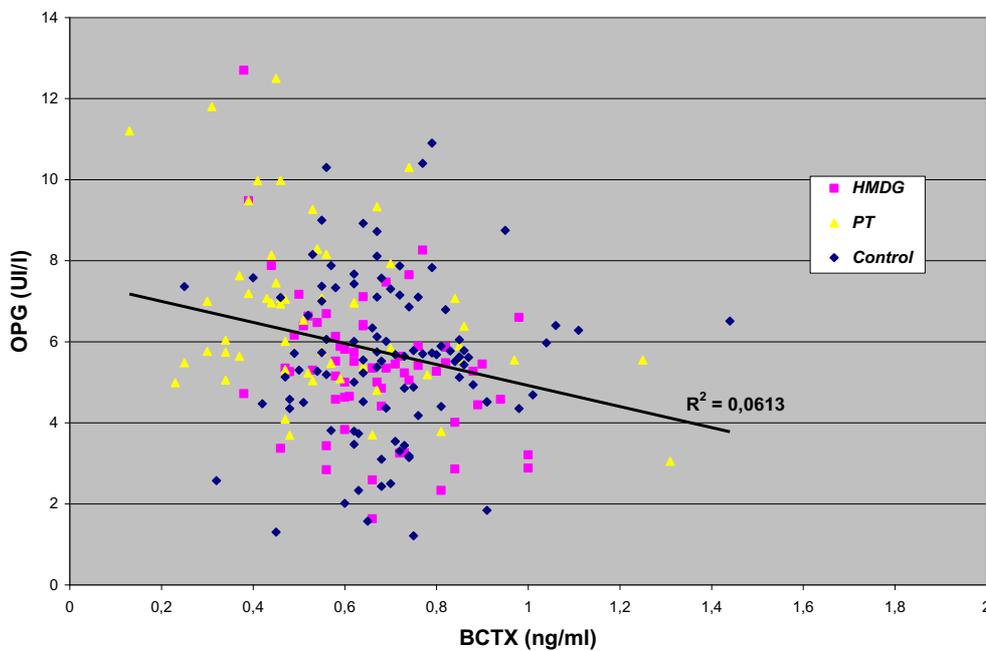


Figura 4.31 Correlación entre la OPG y β CTX en las tres poblaciones estudiadas

Al comparar el marcador de resorción ósea β CTX con los distintos marcadores óseos nos encontramos con los siguientes resultados:

Encontramos correlación positiva estadísticamente significativa entre β CTX y OTC ($R = 0,45$; $p = 0$). Figura 4. 32

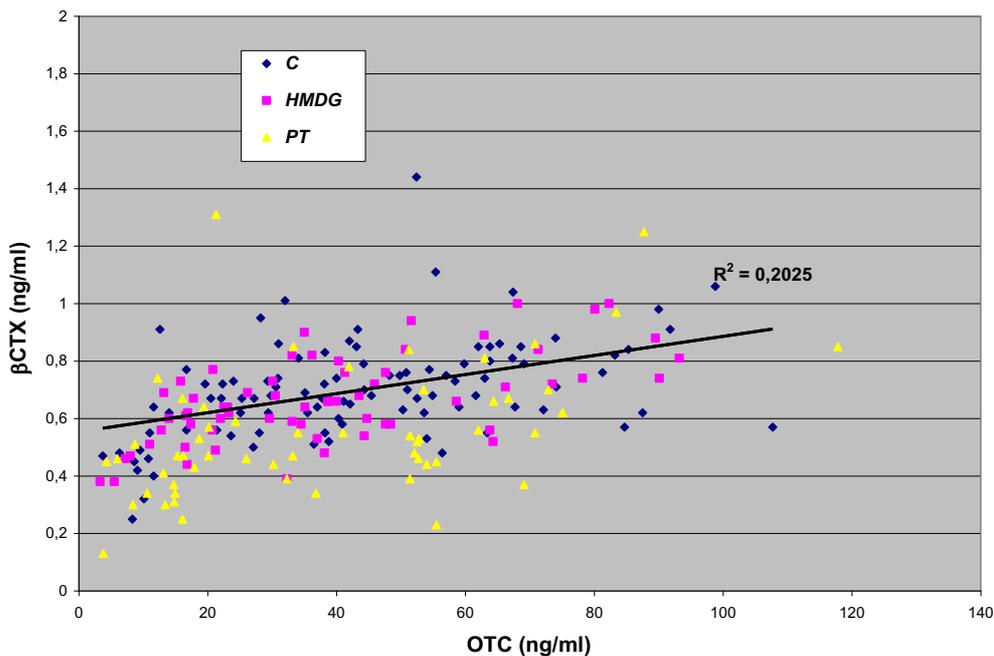


Figura 4.32 Correlación entre β CTX y OTC en las tres poblaciones estudiadas

En las figuras 4.33 y 4.34 se muestra la correlación positiva entre β CTX con la edad gestacional y el peso al nacimiento ($R = 0,31$, $p = 0$; $R = 0,32$, $p = 0$ respectivamente).

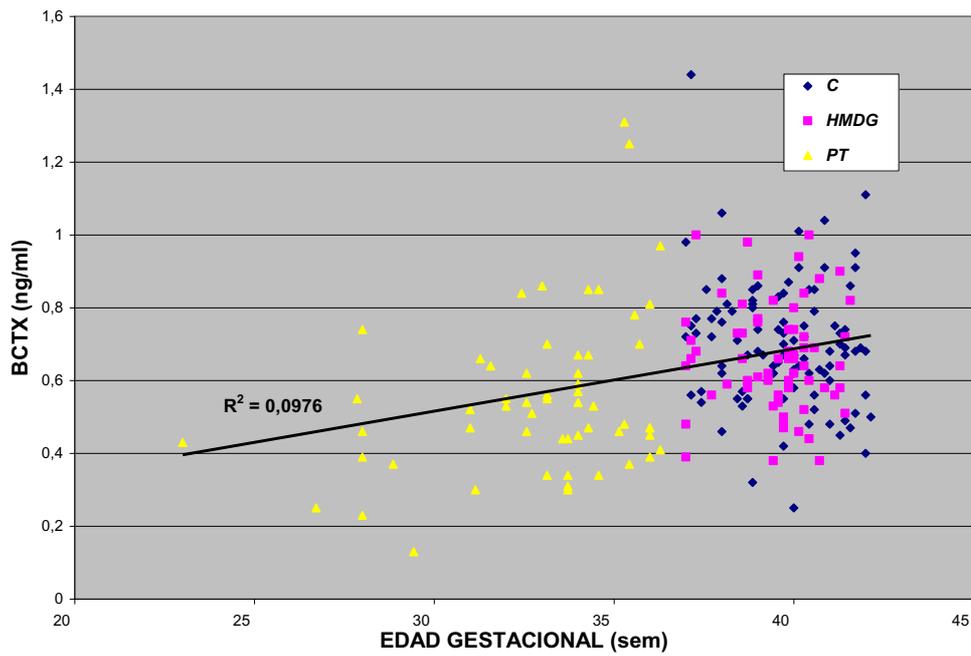


Figura 4.33 Correlación entre β CTX y la edad gestacional de los RN estudiados

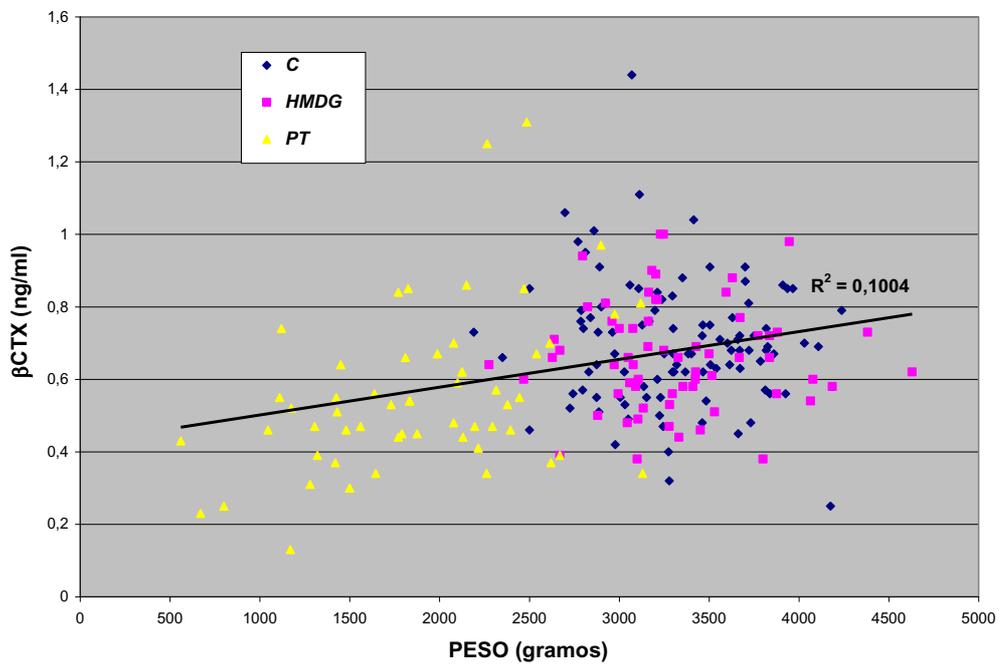


Figura 4.34 Correlación entre β CTX y el peso al nacimiento de los RN estudiados

Existió una correlación positiva entre el β CTX y la calcemia ($R = 0,223$; $p = 0,001$).
Figura 4.35.

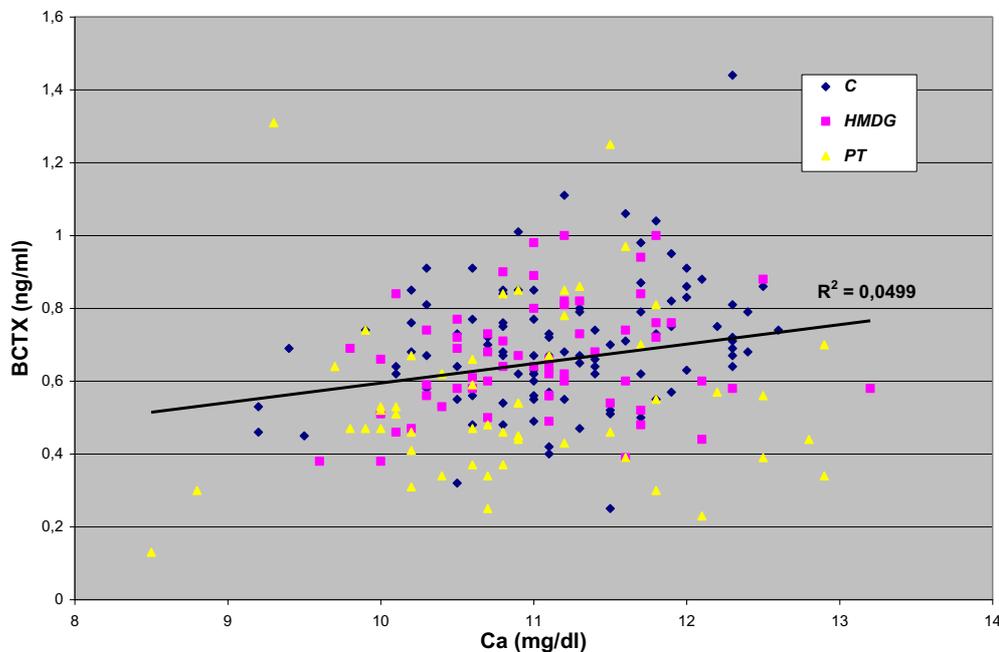


Figura 4.35 Correlación entre β CTX y Ca para las tres poblaciones de RN estudiadas

Por último correlacionamos los valores de OTC, 25(OH)D y PTH con la edad gestacional y los datos antropométricos.

La OTC no se correlaciona con la edad gestacional, ni con el peso en los RN estudiados ($R = 0,014$, $p = 0,22$; y $R = 0,010$, $p = 0,88$). Figuras 4.36 y 4.37.

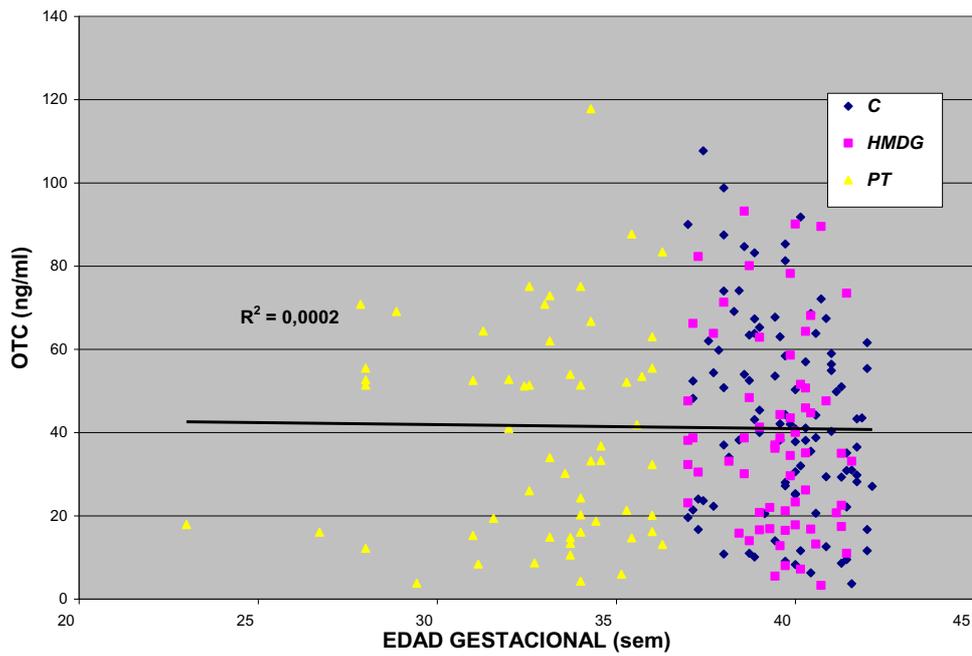


Figura 4.36 Correlación entre OTC y la edad gestacional de los RN estudiados

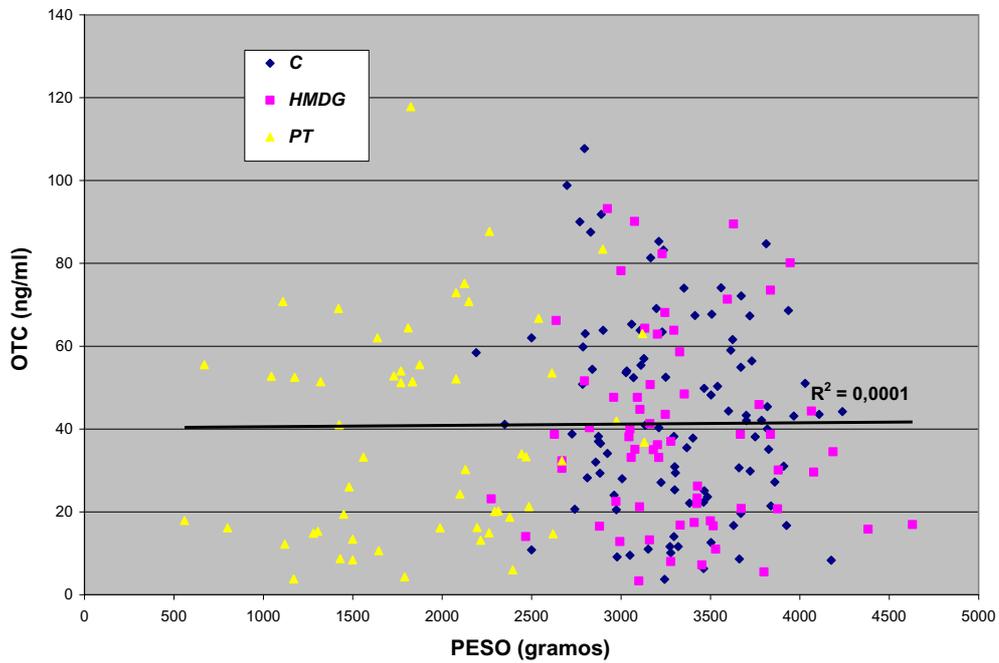


Figura 4.37 Correlación entre OTC y el peso de los RN estudiados

Encontramos valores más bajos de 25(OH)D estadísticamente significativos en pretérminos al compararlos con los RN del grupo control ($p = 0,012$). Existe una correlación positiva entre los valores de 25(OH)D y la edad gestacional ($R = 0,25$, $p = 0,001$) Figura 4.38.

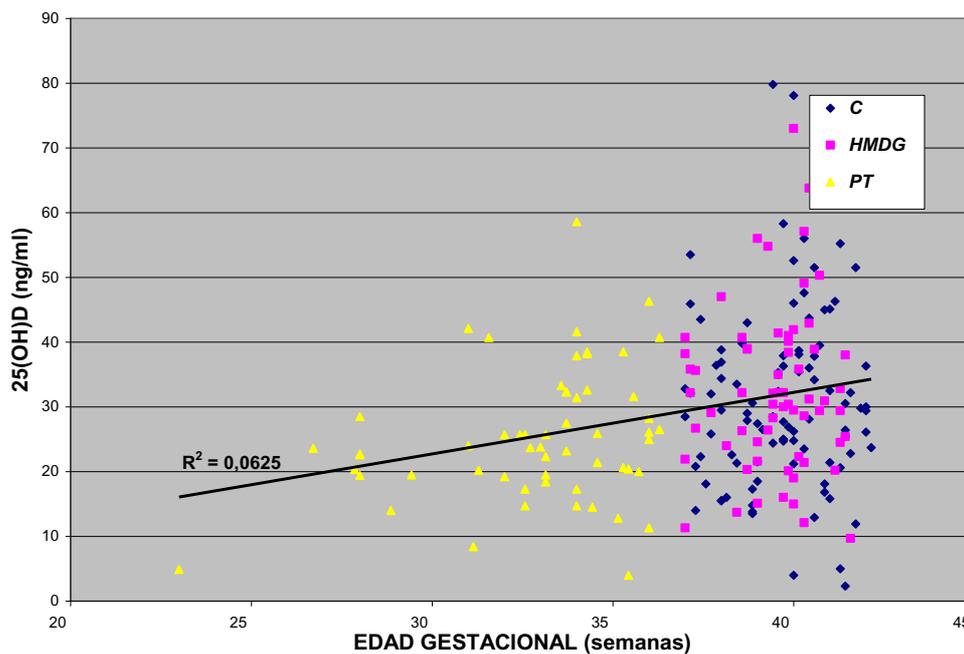


Figura 4.38 Correlación entre 25(OH)D y edad gestacional de los RN

Observamos una correlación positiva entre los niveles de 25(OH)D en los recién nacidos con el peso y la longitud ($R = 0,11$, $p = 0,087$ y $R = 0,14$, $p = 0,034$ respectivamente). Figuras 4.39 y 4.40.

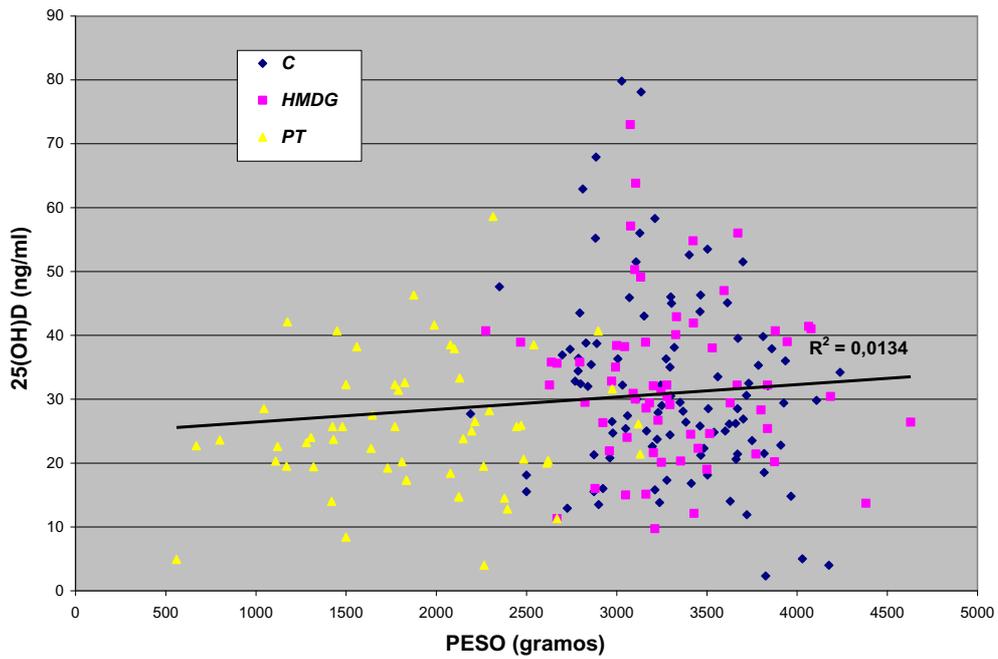


Figura 4.39 Correlación entre 25 (OH) D y el peso de los RN

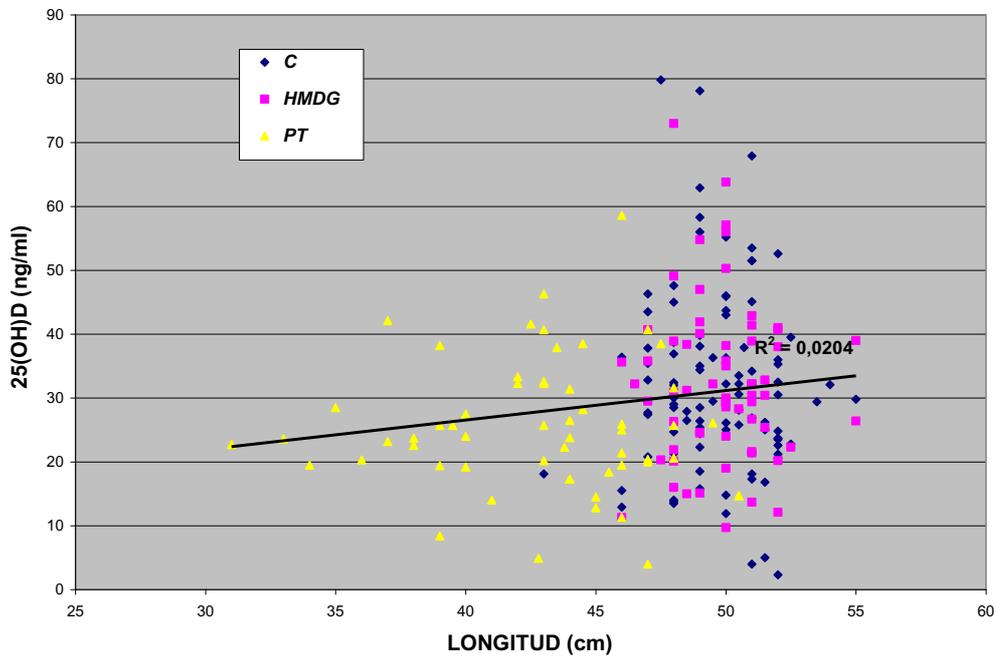


Figura 4.40 Correlación entre 25 (OH)D y la longitud de los RN estudiados

Al valorar los resultados de los niveles séricos de PTH hubo una correlación negativa entre la PTH con el peso ($R = -0,47$, $p = 0$) y con la edad gestacional ($R = -0,43$, $p = 0$). Figuras 4.41 y 4.42.

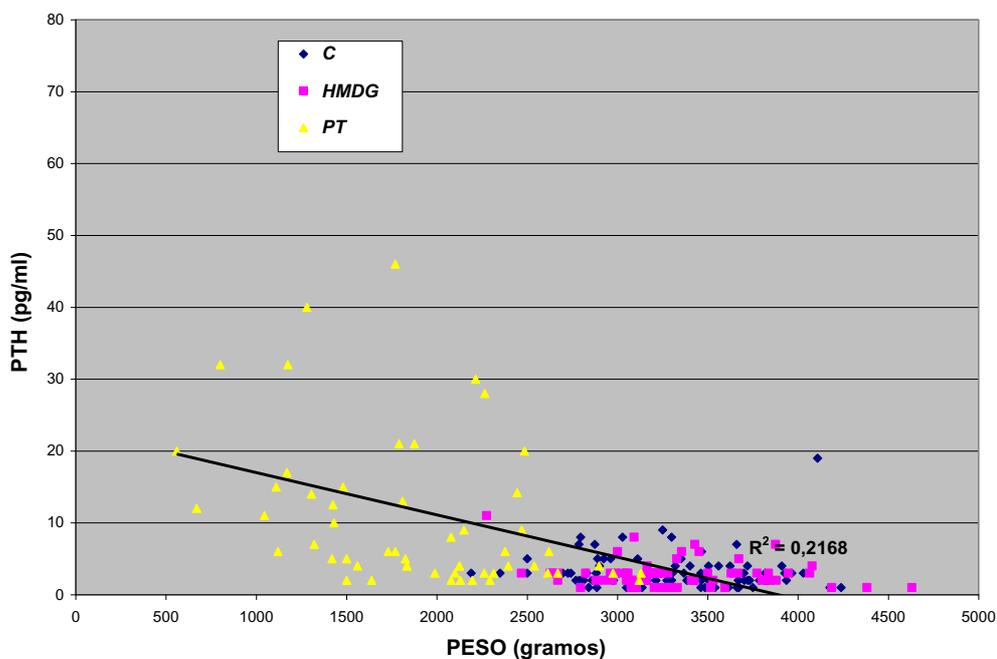


Figura 4.41 Correlación de los niveles de PTH con el peso al nacimiento

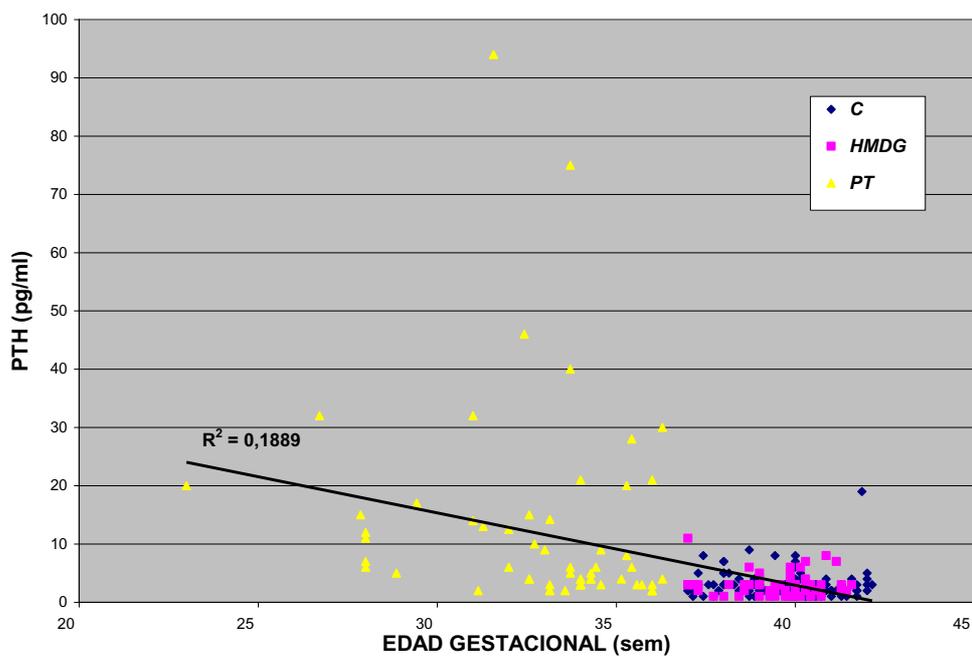


Figura 4.42 Correlación de los niveles de PTH con la edad gestacional

En la tabla 4.7 figuran el peso al nacimiento y los valores de Ad-SOS de los 2 subgrupos considerados en el grupo de HMDG. Del total de las 64 madres estudiadas, veintitrés precisaron dieta e insulina para el control de su diabetes gestacional y cuarenta y una sólo precisaron dieta. No encontramos entre ambos grupos de RN diferencias significativas en cuanto a los valores de Ad-SOS o peso al nacimiento.

	<i>HMDG1</i>		<i>HMDG2</i>		<i>HMDG</i>	
	<i>Dieta</i>		<i>Insulina</i>		<i>Total HMDG</i>	
	<i>n = 41</i>		<i>n = 23</i>		<i>n = 64</i>	
	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>
<i>Peso (gramos)</i>	3219	406	3497	497	3307	422
<i>ADSOS (m / seg)</i>	1758	17	1747	24	1781	14

Tabla 4.7 Peso al nacimiento y Ad-SOS de los dos grupos de RN de madres con diabetes gestacional (HMDG₁=Madres tratadas con dieta; HMDG₂= Madres tratadas con dieta e insulina)

De todos los HMDG precisaron ingreso en la Unidad de Neonatología, 9 recién nacidos de los cuales 8, ingresaron por hipoglucemia (7 del grupo HMDG₂ y 1 del grupo HMDG₁). El noveno ingreso fue por rechazo de las tomas, sin relación con la patología materna.

Globalmente todos los HMDG presentaron valores de osteocalcina inferiores a los del grupo control ($38,77 \pm 23,29$ ng/ml vs $43,63 \pm 23,36$ ng/ml), pero no fueron estadísticamente significativos ($p = 0,65$). No hubo diferencias significativas en los valores de Ca, P, FA, OPG, OTC, 25(OH) D₃, β CTX y PTH medidos en ambos subgrupos de HMDG, ni tampoco cuando se relacionó con los valores de los RN del grupo control. (Tabla 4.8).

Resultados

La osteocalcina de los hijos de de madres con diabetes gestacional que se trataron con dieta e insulina presentaron valores más bajos ($37,22 \pm 22,88$ ng/ml) que los recién nacidos del grupo control ($43,63 \pm 23,36$ ng/ml), pero tampoco presentaron diferencias significativas ($p = 0,56$).

	<i>HMDG1</i>		<i>HMDG2</i>		<i>HMDG</i>		<i>Controles</i>	
	<i>Dieta</i>		<i>Dieta+Insulina</i>		<i>Total</i>		<i>Total</i>	
	<i>n = 41</i>		<i>n = 23</i>		<i>n = 64</i>		<i>n = 99</i>	
	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>
Ca (mg/dl)	11,13	0,64	10,92	0,81	11,04	0,70	11,18	0,74
P (mg/dl)	5,93	1,47	6,10	1,54	5,98	1,47	6,07	1,68
FA (U/l)	393,16	313,11	378,95	181,33	387,53	266,51	349,90	112,40
OPG (U/l)	5,18	1,44	5,65	2,26	5,36	1,74	5,59	1,95
OTC (ng/ml)	39,76	24,34	37,22	22,88	38,77	23,29	43,63	23,36
25(OH)D (ng/ml)	32,90	13,70	31,81	12,18	32,37	12,53	31,61	14,35
β CTX (ng/ml)	0,67	0,13	0,66	0,19	0,66	0,15	0,70	0,17
PTH (pg/ml)	2,97	2,08	2,67	1,77	2,87	1,94	3,03	2,38

Tabla 4.8 Valores de calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, osteoprotegerina, osteocalcina, 25(OH)D, β CTX y PTH medidos en los subgrupos de madres con diabetes gestacional y de los RN del grupo control

Los valores de calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, osteoprotegerina, osteocalcina, 25-hidroxivitamina D, β CTX y PTH de los 2 grupos de pretérminos considerados quedan reflejados en la tabla 4.9.

El grupo de pretérminos menores de 32 semanas presentaron unos valores de 25(OH)D de $21,36 \pm 8,82$ ng/ml y de β CTX de $0,44 \pm 0,16$ ng/ml que fueron significativamente menores que los del grupo de recién nacidos pretérminos >32 semanas ($p=0,012$ y $p=0$ respectivamente).

El grupo de pretérminos menores de 32 semanas presentaron osteocalcina de $34,19 \pm 24,57$ ng/ml vs $43,63 \pm 23,36$ ng/ml en el grupo control, pero esta diferencia no tuvo significación estadística ($p=0,14$).

Ambos grupos de pretérminos presentaron valores séricos de PTH ($12,98 \pm 8,79$ pg/ml) y de OPG ($6,82 \pm 2,51$ UI/L más elevados que el grupo control ($3,03 \pm 2,38$ pg/ml y $5,59 \pm 1,95$ UI/L respectivamente) que fueron estadísticamente significativos ($p=0,001$).

	Pretérminos						Controles	
	≥ 32 semanas		< 32 semanas		Total		Total	
	n = 41		n = 16		n = 57		n = 99	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Ca (mg/dl)	10,89	0,93	10,81	1,05	10,87	0,95	11,18	0,74
P (mg/dl)	6,06	1,15	6,39	1,89	6,15	1,36	6,07	1,68
FA (U/l)	407,80	191,03	437,68	169,66	416,19	182,66	349,90	112,40
OPG (UI/l)	6,74	1,85	6,82	2,51	6,77	2,01	5,59	1,95
OTC (ng/ml)	41,58	26,16	34,19	24,57	39,51	25,50	43,63	23,36
25(OH)D (ng/ml)	26,93	10,62	21,36	8,82	25,36	10,29	31,61	14,35
β CTX (ng/ml)	0,60	0,23	0,44	0,16	0,55	0,22	0,70	0,17
PTH (pg/ml)	12,52	19,60	14,20	8,79	12,99	17,04	3,03	2,38

Tabla 4.9 Valores de calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, osteoprotegerina, osteocalcina, 25(OH)D, β CTX y PTH obtenidos en los dos grupos considerados de RNPT (≥ 32 semanas y < 32 semanas) y en los RN del grupo control

En la tabla 4.10 figuran los valores de Ad-SOS y el peso en ambos subgrupos de pretérminos. Existió diferencias significativas para la Ad-SOS entre ambos grupos de pretérminos y de éstos con el grupo control ($p=0,002$; $p=0,01$).

	<i>Pretérminos</i>					
	≥ 32 semanas		< 32 semanas		Total	
	<i>n</i> = 41		<i>n</i> = 16		<i>n</i> = 57	
	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>
<i>Peso (gramos)</i>	2104,49	479,18	1351,13	538,32	1893,02	593,28
<i>Ad-SOS (m/s)</i>	1732,02	18,59	1698,50	21,44	1722,61	24,30

Tabla 4.10 Peso y Ad-SOS en ambos subgrupos de RN pretérminos

DISCUSIÓN

La osteoporosis es un estado patológico que se caracteriza por una masa ósea insuficiente y un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, que supone en conjunto una fragilidad ósea patológica, con riesgo de fractura.

Durante el embarazo el feto recibe de la madre de 30 a 35 gramos de calcio, que atraviesan la placenta por transporte activo. Aproximadamente el 80 % del mismo se acumula en el esqueleto fetal durante el tercer trimestre, periodo en el que se mineraliza rápidamente. Si bien la mayor demanda fetal ocurre tardíamente, las adaptaciones en el organismo materno comienzan desde el inicio del embarazo. La homeostasis del calcio en la madre se mantiene por el aumento en su absorción intestinal, y la pérdida del mismo por parte del esqueleto materno (13, 63-67).

Tiene un gran interés en los últimos años, la medida de las propiedades del hueso y la mineralización ósea del RN, para poder detectar precozmente aquellos niños con riesgo de padecer osteopenia.

El bajo peso o baja longitud al nacimiento se ha relacionado con una mayor probabilidad en la vida adulta de presentar enfermedades como la hipertensión, resistencia insulínica, enfermedad coronaria o bien reducción de la masa ósea o muscular. La masa ósea y especialmente el contenido mineral óseo están altamente asociados con el peso al nacimiento. También se ha propuesto una teoría que se refiere a que la masa ósea del adulto está programada desde la vida fetal (109-112).

Son muchos los factores que tienen impacto sobre el contenido mineral óseo (CMO) y el desarrollo óseo fetal. Existe una inadecuada mineralización ósea fetal en madres con una extrema restricción dietética o con déficit de vitamina D. También influye sobre el CMO la estación de nacimiento, el consumo materno de alcohol o tabaco, la prematuridad o la diabetes mellitus tipo 1 en las madres, sobre todo, en aquellas con un pobre control glucémico (68-76).

Por tanto, la etiología de la osteopenia en recién nacidos es multifactorial. Parece que durante el periodo fetal la adecuada mineralización ósea depende más de los niveles maternos de vitamina D que de los de calcio, y tras el nacimiento juega un mayor papel los aportes de calcio que los de vitamina D.

Entre los factores de riesgo para la osteopenia, la prematuridad es el más importante. Hay un estímulo de crecimiento cortical por los ejercicios de resistencia que realiza el feto contra la pared uterina. Hay autores que han publicado en los niños con muy bajo peso al nacer, una reducción fisiológica en la fuerza muscular en las primeras 8 semanas de vida. La falta de estímulo mecánico aumenta la resorción ósea y la pérdida de calcio urinario que contribuye al desarrollo de la osteopenia del prematuro (16).

En el RN pretérmino existe una demanda adicional de minerales para el rápido crecimiento óseo tras el nacimiento, esto junto con unos aportes deficitarios los hace más propensos a la osteopenia. El aporte de calcio y fósforo por vía enteral tras el nacimiento puede ser inadecuado debido a intolerancia de la alimentación enteral. El requerimiento de nutrición parenteral prolongada que precisa un RN pretérmino es también un factor de riesgo ya que la solubilidad del calcio y del fósforo en la

nutrición parenteral limita la cantidad de minerales que puede ser suplementada (77-79).

La utilización de medicación como diuréticos, metilxantinas y corticosteroides, como tratamiento habitual en pretérminos se han implicado también como causa de osteopenia. Los diuréticos y metilxantinas (80) pueden aumentar la pérdida de calcio urinario y las altas dosis de corticoides sistémicos suprimen la función del osteoblasto y la síntesis de DNA in vitro. Se ha publicado una disminución de la fosfatasa alcalina ósea específica y de la osteocalcina tras 3 semanas de tratamiento con corticosteroides (81).

La osteopenia es reconocida como causa de fracturas patológicas en el recién nacido pretérmino. Se correlaciona inversamente con el peso y la edad gestacional. Se han publicado series en que la mineralización ósea inadecuada afecta hasta un 30 % de los recién nacidos de bajo peso extremo al nacimiento (<1000g) (82, 83).

Podemos considerar que los recién nacidos a término poseen un mayor grado de mineralización ósea que los pretérminos y esto se ha podido comprobar tanto con ultrasonidos como con DEXA (113-123).

Por esto el primer objetivo de nuestro trabajo fue establecer valores de normalidad de la densidad mineral ósea de los RN en nuestro medio, que se realizó mediante la medición de la Ad-SOS. La Ad-SOS aunque no es un parámetro que mida directamente la mineralización ósea, está relacionada con la densidad ósea y con algunos aspectos de la resistencia ósea, y nos puede ayudar a distinguir los recién nacidos normales de los patológicos.

La Ad-SOS en un medio depende de su densidad y características estructurales, por lo que en el hueso está determinada por una gran cantidad de variables como la densidad del propio tejido óseo, la estructura y disposición del tejido esponjoso, el contenido mineral, los fluidos orgánicos y el tejido circundante.

Son muchas las publicaciones que refieren que los ultrasonidos miden las propiedades cualitativas, como la mineralización ósea, y las propiedades

cuantitativas como el grosor cortical, la elasticidad y la microarquitectura, que dan una información más completa sobre la resistencia ósea que la DEXA (121- 125).

Al utilizar este método como cribado lo importante no son las velocidades absolutas, sino que se puedan establecer diferencias entre un recién nacido normal y patológico.

La técnica es tanto más exacta cuanto más se agrupen los resultados de un grupo de población en nuestro caso los recién nacidos, y el grado de precisión se expresa como el coeficiente de variación intraensayo, que en nuestro análisis previo fue de 0,48 % y el EEM de 2,20 m/sg que es inferior al descrito en otros trabajos (113-115, 119-123)

Al no utilizar radiaciones y ser de fácil manejo, puede ser una herramienta útil en el seguimiento de niños en riesgo, y ayudarnos a individualizar en qué niños utilizaremos otras técnicas radiológicas.

Hemos observado una diferencia significativa entre la Ad-SOS en los recién nacidos a término y los pretérminos y los hijos de madre con diabetes gestacional, con valores más elevados en el grupo control, así como una correlación positiva estadísticamente significativa con la edad gestacional, y con los parámetros antropométricos como en otros trabajos publicados (113,118,122, 123).

La correlación en nuestro estudio ha sido mayor con la edad gestacional que con la longitud, el peso o el perímetro craneal. En el grupo de los pretérminos esto estaría relacionado con la falta de acreción de minerales por el feto, que es mayor durante las últimas semanas de la gestación y con la menor resistencia contra la pared uterina como hemos relatado anteriormente.

En el grupo control hemos observado cifras mayores de Ad-SOS en niños que en niñas, con significación estadística. En los otros grupos los niños presentaron cifras mayores de Ad-SOS que las niñas, pero sin significación estadística. Pensamos que esto sea por tener el grupo control un mayor tamaño muestral, que los otros grupos estudiados.

Aunque en otros estudios la Ad-SOS fue mayor en varones, no se han publicado diferencias estadísticamente significativas de la velocidad de los US entre ambos sexos en RN, pero sí en otras etapas de la vida. Existen publicaciones como las de Gimeno y cols que realizó el estudio sobre niños y niñas de 6 a 14 años de edad, encontrando valores superiores de Ad-SOS en niñas desde los 10 a los 14 años de edad o las de Baroncelli que estudió niños de 3 a 21 años encontrando valores superiores de Ad-SOS en niñas desde los 9 a los 14 años (125,124).

Son pocos los trabajos publicados sobre el efecto de la diabetes materna sobre la mineralización ósea.

La insulina no cruza la placenta, por lo que el feto está expuesto a la hiperglucemia materna, a la que responde a partir de la 11-12 semanas con una secreción de insulina exagerada que promueve el crecimiento fetal y la consiguiente macrosomía.

Han sido publicados diversos trabajos en los que encuentran una masa ósea disminuída en niños y adultos con diabetes tipo 1, que podría estar relacionada con el déficit de insulina. La hipocalcemia neonatal durante el primer día de vida tiene lugar más a menudo en hijos de madres diabéticas que en RN normales, pero los mecanismos por lo que esto ocurre no han sido del todo dilucidados (84).

Esta hipocalcemia sucede según algunos autores en el 30 % de los hijos de madre con diabetes insulino dependiente. La incidencia y severidad de la hipocalcemia está directamente relacionada con la severidad y el control glucémico de la diabetes materna. Una explicación sería que la diabetes en la madre produce hipomagnesemia debida a la pérdida urinaria de magnesio, y esto causaría hipomagnesemia fetal, que a su vez ocasionaría hipoparatiroidismo funcional e hipocalcemia (72, 84-88).

En hijos de madre diabética se ha visto un aumento del $1-25(\text{OH})_2\text{D}_3$, que tiene una actividad resorptiva sobre el hueso, lo que podría estar en relación con una disminución del contenido mineral (88).

También se ha relacionado la menor masa ósea con una menor movilidad intrauterina por el mayor peso de estos niños debido, sobre todo, a un pobre control glucémico (75,89, 90).

La mayoría de los estudios han sido realizados sobre mujeres con diabetes tipo 1 y sus RN, pero son pocos los realizados sobre los RN de madres con diabetes gestacional.

Según los datos recogidos por el Grupo Español de Diabetes y Embarazo (GEDE) en 1995, entre el 3 y el 18% de las embarazadas españolas valoradas presentaban una diabetes gestacional. Los hijos de madres con diabetes gestacional además de tener mayores riesgos de macrosomía, de nacimientos distócicos, y de mayor probabilidad de desarrollar al nacimiento hipoglucemia, hipocalcemia, hiperbilirrubinemia, distres respiratorio y policitemia, también presentan mayor riesgo de obesidad y de diabetes en la edad adulta. Algunos trabajos publicados apuntan que también pudiera afectar la mineralización ósea (75).

Nosotros hemos encontrado que los hijos de madre con diabetes gestacional presentan valores más bajos de Ad-SOS, en los dos subgrupos estudiados, que fueron controlados con dieta (HMDG₁) o con dieta e insulina (HMDG₂).

Sólo hemos encontrado un estudio realizado en hijos de madre con diabetes gestacional que ha sido publicado recientemente por Regev y cols (75). Estudiaron 18 recién nacidos de mujeres con diabetes gestacional y 18 recién nacidos sin patología, que utilizaron como grupo control. Utilizando ultrasonidos (US) para la medición de la mineralización ósea, publicaron valores inferiores de la velocidad del US en los hijos de madres con diabetes gestacional al compararlas con los valores de los RN del grupo control y menores aún en los niños de mayor peso, que fueron los hijos de madres tratadas sólo con dieta, pero no encontraron diferencias significativas en cuanto al peso de los RN. Estas diferencias en la velocidad del US fueron estadísticamente significativas en el subgrupo de 12 diabéticas gestacionales tratadas sólo con dieta. Una de las razones por la que explican estos resultados es porque los niños de mayor peso tienen una menor movilidad intraútero, pues según hemos ido comentando el ejercicio físico estimula la producción de hueso y su mineralización (16). Sin embargo en el subgrupo de RN de 7 madres que precisaron dieta e insulina para su control glucémico, presentaron una velocidad de US similar a los RN del grupo control. Globalmente concluyen que el grupo

estudiado de 19 recién nacidos hijos de madres con diabetes gestacional presentaron valores significativamente menores de Ad-SOS, que el grupo control.

Encontraron una correlación inversa entre el peso al nacimiento y los valores de Ad-SOS de los recién nacidos. Esto no coincide con lo encontrado en nuestro trabajo, en el que los RN de mayor peso fueron los hijos de madres tratadas con insulina y dieta, aunque no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos. En nuestro estudio como en los otros grupos estudiados los valores de Ad-SOS en los HMDG presentaron una correlación positiva con el peso al nacimiento.

Mimouni y cols (72) publicaron en 1988 una disminución del contenido mineral óseo medido por SPA en recién nacidos de madres con diabetes tipo 1, que fue correlacionado con un pobre control glucémico.

Sólo hemos encontrado un estudio realizado por Lapillone y cols (74) publicado en 1997 en el que encontraron que la diabetes materna no altera la densidad mineral ósea en los recién nacidos. La medida del contenido mineral óseo fue realizada mediante DEXA. Esta fue una investigación realizada sobre 40 mujeres y sus RN que fueron distribuidas en 4 grupos según la primitiva clasificación de White, que incluye diabéticas pregestacionales y gestacionales. Encontraron mayor masa ósea y contenido graso en los hijos de madre diabética que en los controles. Esto lo explican porque la insulina incrementa la producción de IGF-1 en el hígado que aumenta a su vez la síntesis de la matriz y el colágeno óseos, así como estimula la replicación de las células osteoblásticas. Concluyen que el contenido mineral óseo no está correlacionado con la edad gestacional, aunque sí con el peso y también con el porcentaje de grasa corporal. Sobre estos datos no influyó el tipo de diabetes de las madres.

Podemos concluir a la luz de nuestros resultados que la diabetes gestacional afecta a la mineralización ósea del recién nacido, a pesar del correcto diagnóstico y tratamiento de la misma aunque en nuestra opinión habrá que profundizar en los mecanismos fisiopatológicos que nos expliquen este hecho.

Por tanto, la medida de la Ad-SOS en nuestro estudio, ha demostrado ser un buen método de evaluación, rápido, no invasivo, reproducible y fiable para evaluar

recién nacidos tanto normales como con riesgo de presentar osteopenia al nacimiento, como ocurre en los RN pretérminos y los RN de madres con diabetes gestacional, coincidiendo con lo que ha sido ya publicado por otros autores (72, 75,113-117,119-123). Fruto de nuestro trabajo hemos obtenido unas tablas de normalidad que podemos aplicar en futuras investigaciones.

- El sistema RANK/RANKL/OPG

El sistema RANK/RANKL/OPG representa una tríada de nuevas citoquinas con efectos sobre el metabolismo óseo, el sistema inmune y el sistema endocrino. Su acción en la biología del osteoclasto ha abierto un nuevo camino en el estudio y conocimiento de la patogénesis y el tratamiento de las enfermedades metabólicas óseas. La OPG es un factor inhibidor de la osteoclastogénesis, y es una molécula básica para la morfogénesis y el remodelamiento del hueso. Un gran número de estudios ha confirmado su importancia sobre el sistema esquelético, sobre todo cuando ocurren cambios hormonales como en el embarazo. (32, 34, 126-129).

Este sistema está implicado en muchas enfermedades óseas y autoinmunes caracterizadas por aumento de la resorción ósea y pérdida de masa ósea, como por ejemplo la osteoporosis (postmenopáusica, inducida por glucocorticoides, anorexia nerviosa o la osteoporosis senil), las metástasis óseas, la enfermedad periodontal, y la artritis reumatoide (43, 44).

Un aumento de los niveles séricos de OPG se han demostrado en varias enfermedades como artritis, osteoporosis de la menopausia o la inducida por esteroides, mieloma, diabetes mellitus tipo 1 o anorexia nerviosa (130-133).

Una relativa deficiencia de OPG ha sido asociada también con osteoporosis en varios modelos animales y la administración parenteral de OPG a 52 mujeres postmenopáusicas (3mg/Kg por vía subcutánea) en un estudio randomizado, doble ciego, y controlado por placebo causó un rápido beneficio. La administración de OPG redujo los marcadores de resorción ósea en un 80 % y los de formación ósea en un 20 %, indicando una potencial supresión prolongada de la remodelación ósea (45).

Esto demuestra la importancia del sistema RANKL/OPG que ayuda a comprender la patogénesis de las enfermedades metabólicas óseas y otorga a la administración de OPG una prometedora opción terapéutica en la prevención y en el tratamiento de determinadas enfermedades óseas.

Son muchos los trabajos que proliferaron desde su descubrimiento, pero la mayoría de ellos se han realizado en adultos, y en enfermedades en las cuales se suponía estaba implicado el sistema de la OPG. Hay varios estudios que ha intentado evaluar la relevancia clínica y la aplicación potencial de la medida de la OPG en el suero de humanos

Yano y cols (131) fueron los primeros en evaluar sistemáticamente los niveles de OPG sérica en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis y observaron una correlación positiva entre los niveles séricos de OPG y los marcadores de formación ósea (OTC, fosfatasa alcalina ósea y desoxipiridinolina). Encontraron una correlación negativa entre los niveles de OPG con la densidad mineral ósea medida por DEXA en diferentes lugares del cuerpo (espina lumbar, cuello del fémur). En vista de estos sorprendentes resultados adjudicaron a la OPG un efecto protector de la pérdida ósea.

Szulc y cols (134) estudiaron la OPG sérica en una cohorte de varones estratificados por edad y observaron una correlación positiva entre los niveles séricos de OPG y los de estrógenos y testosterona libre, y negativa con los niveles de PTH y los de deoxipiridinolina urinaria. No hubo correlación sin embargo con los marcadores de formación ósea, el 25(OH)D, ni con el contenido mineral óseo, medido por DEXA en distintos puntos del esqueleto. Sí observaron una correlación positiva con la edad, sobre todo en mayores de 40 años cuando se llega al pico de masa ósea, y comienza la pérdida de hueso dependiente de la edad.

Rogers et al (127) observaron en mujeres postmenopáusicas una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles séricos de OPG y los de estrógenos, así como con el contenido mineral óseo medido por DEXA. Concluyen que la OPG podría ser un mediador de la acción estrogénica sobre el hueso.

La regulación hormonal de la OPG ha sido descrita *in vitro*, lo que ha conducido a la hipótesis que la mayoría de las hormonas y citoquinas que regulan la resorción ósea lo

hacen a través de su acción sobre RANKL, OPG o ambas. Otros estudios evidencian que los niveles séricos de OPG se incrementan con la edad, sobre todo en mujeres postmenopáusicas que son quienes tienen una mayor pérdida de masa ósea, sugiriendo que se trata de una respuesta compensatoria al incremento de resorción ósea en estas edades (127).

Pero existe controversia si los niveles de OPG están aumentados o disminuidos en la osteoporosis postmenopáusica.

Vázquez y cols (135) estudiaron 80 mujeres estratificadas por edad, presencia o ausencia de menopausia, densidad mineral ósea y existencia de fracturas. Encontraron unos niveles séricos de OPG aumentados en relación directa con la edad. Sin embargo encontraron unos niveles séricos de OPG significativamente inferiores en mujeres con osteoporosis postmenopáusica respecto a mujeres sanas de la misma edad. Dado que uno de los mecanismos responsables de la osteoporosis en la postmenopausia es una mayor actividad del remodelado óseo, estos hallazgos podrían indicar que las mujeres que llegan a padecer osteoporosis tienen una mayor tasa de resorción ósea, que no es compensada suficientemente por los niveles de OPG, y la medición en suero de la misma ayudaría a predecir el grupo de mujeres postmenopáusicas con riesgo de padecer la enfermedad.

Por otro lado encontraron en las mujeres osteoporóticas con fracturas que estudiaron, unos niveles séricos de OPG superiores a los de las mujeres osteoporóticas que no presentaban fracturas. Esto lo explican como un mecanismo homeostático para evitar la pérdida ósea. Señalan que posiblemente el riesgo de fractura sea porque estas mujeres presentan una alta actividad de remodelado óseo, y por esta razón la OPG aumenta, para proteger al hueso de una mayor pérdida ósea. Estos niveles de OPG se correlacionan de forma débil con una baja masa ósea (135).

Ueland y cols (136) estudiaron los niveles séricos de OPG en pacientes con enfermedades endocrinas e inmunes como el síndrome de Cushing, acromegalia, déficit de GH, infección VIH e inmunodeficiencia variable común y observaron como éstos estaban elevados. En los grupos de enfermedad inmune se encontró una correlación positiva con los niveles de $TNF\alpha$, que es un estimulante de la producción

de OPG. La interpretación de este aumento de OPG en los pacientes con síndrome de Cushing, es que el aumento de OPG ejerce un efecto protector sobre el hueso, como hemos visto coinciden el resto de las publicaciones analizadas. Observaron también como la OPG resultaba inhibida tras la administración de PTH o glucocorticoides.

De todas las investigaciones publicadas se desprende que habrá que realizar estudios en todas las edades de la vida y estandarizar valores de normalidad según la edad, sexo o raza. Es por todo esto que encontramos necesaria el diseño de estudios en RN con riesgo de osteopenia u de osteoporosis, si como hemos visto es tan importante la consecución de un pico adecuado de masa ósea, con vista a prevenir la osteoporosis del adulto.

En niños nos encontramos el trabajo de Gajewska y cols (137) que han publicado recientemente los niveles séricos de OPG en niños desde los 6 a los 24 años. Observaron que los niveles plasmáticos de OPG eran mayores en los niños en la etapa prepuberal. Con la edad los valores iban disminuyendo equiparándose a los adultos. También encontraron una significativa correlación positiva con los niveles séricos de β CTX.

Vázquez et cols (96) estudiaron la OPG y el RANKL en 57 niños y 62 niñas con edades comprendidas entre 4.3-13.9 años, y no observaron diferencias por edad o sexo de los niveles séricos de OPG. Encontraron valores de OPG superiores en invierno en relación a los medidos en verano, y una correlación negativa estadísticamente significativa entre el cociente OPG/RANKL y el 25(OH)D durante el invierno.

Buzzi y cols (138) estudiaron niños sanos de 1 a 14 años, niños con artritis reumatoide y niñas con el síndrome de Turner, y publicaron valores séricos de OPG más elevados en niños de 1 a 4 años que en niños de 4 a 14 años, siendo los valores a estas edades similares a los publicados en adultos jóvenes. No observaron diferencias entre ambos sexos.

En niños con artritis reumatoide se encontraron niveles superiores a los controles; sin embargo en niñas con el síndrome de Turner los niveles séricos de OPG fueron inferiores a los niños sin patología (138).

Sólo hemos encontrado 3 grupos de trabajo que hayan realizado mediciones de la OPG a lo largo del embarazo, y en dos de ellos se realizaron mediciones a los recién nacidos.

El embarazo está asociado a grandes cambios del metabolismo del calcio, teniendo la mujer embarazada, que proveer al esqueleto fetal de aproximadamente 30 gramos de calcio, que son mayoritariamente depositados en el último trimestre. Esto junto al descubrimiento de la OPG como factor esencial en el remodelamiento óseo, los llevaron a investigar si existían cambios en los niveles séricos de la OPG a lo largo del embarazo y compararon los valores encontrados con los valores en suero de mujeres no embarazadas.

En primer lugar Uemura y cols (139) estudiaron los niveles séricos de OPG en 40 mujeres durante el embarazo (a las 8-11 semanas, a las 22-30 semanas, a las 35-36 semanas e inmediatamente antes del parto) y la lactancia (a los 4 días y al mes del parto). Observaron que los niveles de OPG en las madres aumentaban con la edad gestacional, y disminuían nuevamente tras el parto. No encontraron correlación entre la OPG y los marcadores de resorción (β CTX), o los de formación (fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina), ni con la calcemia, fosforemia, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, o los niveles séricos de PTHi. Los niveles séricos de osteocalcina y los de β CTX fueron inferiores a los de las mujeres no embarazadas. Esto lo explican porque pudiera existir una destrucción de ambos por un mecanismo placentario, pues después del parto experimentan una elevación. Es por lo que piensan que no son buenos marcadores óseos durante el embarazo, que como hemos comentado es una etapa de turnover óseo muy elevado. Sin embargo sí encontraron un aumento proporcional a la edad gestacional de los niveles séricos de la fosfatasa alcalina ósea. La PTHi permanece invariable durante todo el embarazo.

Intentaron explicar que el descenso de OPG tras el parto pudiera estar relacionado con el aumento de resorción ósea, como indica la elevación del β CTX tras el mismo (139).

Naylor y cols (128), realizó un estudio en 17 mujeres que planeaban quedarse embarazadas realizando medidas de la OPG en suero antes del embarazo, y a las 16,

26, 36 semanas de gestación y durante el parto. También midieron los niveles de OPG en sangre de cordón de 22 neonatos prematuros (32 ± 2 semanas de gestación), observando valores mucho más bajos, que en el suero de sus respectivas madres, y ligeramente inferiores a los de las mujeres no embarazadas, resultado que coincide con el obtenido en nuestra investigación. Demostraron una elevación progresiva de los niveles séricos de OPG a lo largo del embarazo, de los marcadores de formación ósea como la fosfatasa alcalina ósea, y una elevación del β CTX, que fue el parámetro de resorción ósea estudiado. La OPG medida en las madres, no presentó correlación con los marcadores del turnover óseo, ni con la densidad mineral ósea medida por DEXA que fue medida antes del embarazo y 2 semanas postparto, no sabiendo explicar la importancia de la elevación fisiológica de la OPG en el suero durante el embarazo. En este trabajo no se estudiaron marcadores óseos, ni la densidad mineral ósea en los RN, y sólo se obtuvieron muestras de sangre de cordón en 22 RN pretérminos por lo que los resultados del estudio de los recién nacidos no son de utilidad para comparar con nuestro trabajo.

Recientemente Hong y cols (129) hicieron un estudio transversal en el que participaron 433 mujeres, 40 mujeres en edad reproductiva pero no embarazadas, y 393 mujeres que fueron distribuidas según su edad gestacional en 4 grupos: grupo 1: 11-14 semanas (n= 100); grupo 2: 15-18 semanas (n= 99); grupo 3: 27-30 semanas (n= 100); y grupo 4: 37-42 semanas (n= 94). Encontraron valores mayores en el tercer trimestre del embarazo que en el primero, lo que les hizo concluir que la OPG está envuelta en la regulación del turnover óseo durante el embarazo y que pudiera tener un papel protector sobre el esqueleto materno de la excesiva pérdida ósea.

Los valores séricos de OPG más elevados en la sangre materna, podrían explicarse porque existiera una fuente placentaria. La placenta es generalmente impermeable a las proteínas, y la mayoría de las proteínas sintetizadas o sustancias derivadas de proteína como la OPG, la fosfatasa alcalina placentaria o la gonadotropina coriónica humana, pasan a los compartimentos maternos, pero no a los del feto.

No hemos encontrado ninguna publicación que compare los niveles de OPG entre RN normales y patológicos, ni tampoco que correlacione los niveles de OPG en suero con otros marcadores óseos de formación o de resorción.

En nuestro estudio, los RN pretérminos muestran valores séricos más elevados de OPG respecto a las otras dos poblaciones de recién nacidos estudiadas. Hemos encontrado una correlación negativa de los niveles séricos de la OPG con la edad gestacional y con el peso que fueron estadísticamente significativos, lo que significa que cuanto menor es la edad gestacional y el peso, mayores son los niveles séricos de OPG y que este aumento se pudiera relacionar con un mayor grado de osteopenia, que hemos demostrado por la medida de la Ad-SOS.

Al comparar los niveles séricos de OPG con los de osteocalcina como marcador de la formación ósea, hemos hallado una correlación negativa entre ambas. También hemos visto una correlación negativa con los niveles séricos de β CTX, considerado como un buen marcador de resorción ósea. En ambos casos hubo significación estadística.

Partiendo de la base que la OTC es un buen marcador de la formación ósea y que el β CTX lo es de la resorción ósea, pensamos que en las situaciones que el remodelamiento óseo esté enlentecido, como suponemos puede ocurrir en el pretérmino, en el que hemos visto que hay una disminución de los niveles séricos tanto de β CTX como de osteocalcina (al compararlos con el grupo control), la existencia de un aumento de la OPG sea un intento de proteger un hueso que presenta una mineralización insuficiente.

Cuando correlacionamos los niveles séricos de OPG con los de Ad-SOS, encontramos también una correlación negativa que fue estadísticamente significativa.

Los RN pretérminos son los que presentan valores más bajos de OTC, de β CTX y de Ad-SOS es por lo que pensamos que la medición de la OPG puede orientarnos a seleccionar los RN en riesgo de padecer osteopenia. Precisaríamos estudios longitudinales más amplios para valorar la evolución de estos valores de OPG en los primeros meses de la vida y ver si sufren alguna modificación con el tratamiento de la osteoporosis del RN pretérmino, igual que ocurre en pacientes adultos.

Al encontrarse niveles mucho más elevados en leche materna hasta 200 veces más que en suero, según lo publicado por Naylor y cols (128) podríamos pensar que no

está lejano el día que esta sustancia que se encuentra de forma natural en la leche materna, pueda utilizarse en un futuro como tratamiento en la osteopenia del prematuro o de otras enfermedades del hueso en la que está demostrada por diversos estudios la implicación de la OPG.

En resumen nuestros resultados muestran unos niveles de OPG que están aumentados en los RNPT, que son los que presentan menor resorción y formación ósea, como queda reflejado por una disminución de β CTX y de osteocalcina si se compara con los RN a término. Estos RNPT presentan valores de Ad-SOS inferiores a los RN del grupo control, lo que demuestra una resistencia y mineralización ósea menor, posiblemente por no haberse completado el paso placentario del calcio. Estos niveles séricos de OPG se correlacionan negativamente de forma estadísticamente significativa con los niveles de OTC, β CTX y Ad-SOS.

De cualquier forma los niveles de OPG medidos son en suero y no reflejan la actividad de esta proteína dentro del microambiente óseo. Además la OPG que medimos en suero, es la suma de la que sintetizan el hueso y otros tejidos, y es regulada por un gran número de sustancias, citocinas y hormonas, por lo que aún no podemos explicar completamente el significado de la elevación de OPG en el pretérmino.

- β CTX

El β CTX es uno de los marcadores de la resorción ósea que se libera a la circulación sanguínea como resultado de la degradación del colágeno tipo I por los osteoclastos. Se encuentra aumentado en personas con osteoporosis, ya sea en relación con la edad, con el tratamiento con corticosteroides o con enfermedades que afectan el metabolismo óseo, y se ha visto su utilidad en la monitorización del tratamiento, presentando una disminución de los niveles séricos de β CTX a valores normales tras el mismo.

La mayoría de las enfermedades metabólicas óseas del niño y del adulto se caracterizan por disturbios en la resorción ósea, por lo que los marcadores bioquímicos que conciernen a este proceso son de especial interés. Sin embargo la mayoría de los marcadores de resorción ósea se miden en orina, lo que en niños y

especialmente en recién nacidos es de gran complejidad por varias razones. La recogida de orina es dificultosa en los niños y hay una gran variación intraindividual, bien por presentar el marcador un ritmo circadiano, o por la necesidad de expresarse en relación con la creatinina que sufre cambios con edad, o con el incremento de masa muscular. Es por esto que la medida de β CTX en suero es un prometedor marcador óseo que ya ha demostrado su utilidad en adultos (140).

Su aplicación clínica en niños se ve dificultada por no haber información suficiente sobre los valores de referencia en relación con la edad, la raza o el sexo. Son pocos los estudios realizados en recién nacidos y no hemos encontrado trabajos publicados en hijos de madres con diabetes gestacional o en pretérminos.

Crofton y cols en 1999 (60) fueron los primeros en publicar valores séricos de β CTX de referencia por sexos, desde 0 a 19 años. Los neonatos menores de un mes ($n = 19$) presentaron los valores más elevados y no se observaron diferencias entre ambos sexos. Posteriormente los niveles de β CTX van disminuyendo hasta la pubertad en la que vuelve a haber otro pico que es más temprano en las niñas (11-13 años) que en los niños (14-17 años).

Gajewska et al (137) han estudiado recientemente 102 niños y adolescentes distribuidos en tres grupos: prepuberal, puberal y postpuberal, encontrando una disminución de β CTX en el suero de los niños con respecto al adulto, excepto en el periodo puberal. En todos los grupos se observó una correlación positiva con los valores séricos de OPG.

La β CTX ha resultado útil como parámetro para el diagnóstico de osteopenia y seguimiento del tratamiento en niños severamente desnutridos (14).

Sólo existe un trabajo realizado por Yamaga y cols (141) que compara los marcadores del metabolismo óseo de madres y recién nacidos a término ($n=41$), concluyendo que el metabolismo mineral del RN está más acelerado que el materno y que es independiente del mismo. Estudiaron los niveles de osteocalcina y de fosfatasa alcalina ósea como marcadores de formación ósea y β CTX como marcador de resorción ósea, tanto en sangre de cordón como en sangre materna en el momento del parto. Encontraron que tanto los marcadores de formación como los de

resorción ósea, tenían valores más elevados en sangre de cordón que en la sangre de la mujer en el parto. No encontraron correlación significativa entre los valores maternos y los del RN.

Nosotros coincidimos al encontrar en RN a término cifras más elevadas de β CTX en sangre de cordón que en sangre materna ($p=0$). Sin embargo en el grupo de los pretérminos no encontramos diferencias significativas entre los valores medidos en las madres y sus RN. Los niveles de β CTX en pretérminos fueron inferiores de forma estadísticamente significativa con respecto al grupo control. Encontramos más correlación del β crosslaps con el peso que con la edad gestacional, no encontrando correlación entre los valores de madres y recién nacidos, aunque sí una significativa correlación positiva con la Ad-SOS. En nuestro trabajo existe una fuerte correlación positiva de β CTX con la osteocalcina y con el calcio. Podemos pensar que el turnover óseo en el RN a término está más acelerado que en el pretérmino y esto repercute en una deficiente mineralización ósea como hemos medido por ultrasonidos, en este último grupo.

- Calcio, fósforo y fosfatasa alcalina

El metabolismo del calcio en la mujer embarazada y su RN, representa un complejo proceso, en el que están envueltos cambios en los marcadores óseos y en las hormonas calciotrópicas. El valor de la calcemia del RN es superior a la de la madre en el parto, tanto en los RN normales como en los hijos de madre con diabetes gestacional y en pretérminos. Nuestros resultados en relación con la calcemia son similares a los publicados recientemente por Casanova y cols y Del Toro y cols (64,65). Esto confirma que existe un gradiente transplacentario fetomaterno. Siddhart et al (91) describieron un sistema de transporte activo de calcio en las microvellosidades del sincitiotrofoblasto. En este mecanismo algunos autores como Care (92) y Pike (142) han asignado a la vitamina D un importante papel como mediadora del transporte del calcio a través de la placenta.

Hemos encontrado cifras significativamente más altas de fósforo, en todos los recién nacidos, con respecto a sus madres y más aún en los de menor edad gestacional. El fósforo, igual que el calcio, parece que posee también un transporte activo. En

experimentación animal se ha comprobado que altas concentraciones de fosfato se relacionan con aceleración de la formación ósea, observándose que el fosfato estimula la producción de hueso y de matriz ósea y limita la resorción ósea.

Encontramos menores niveles de calcio y mayores de fósforo en RN pretérminos que en el grupo control, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, al contrario de lo publicado por otros autores (51). Tal vez la normalidad de las calcemias en nuestro trabajo, sean debidas a que están corregidas con las proteínas.

Al estudiar las calcemias de los HMDG no encontramos ningún RN que presentara hipocalcemia al nacimiento resultado que coincide con las investigaciones realizadas por Regev y cols en RN de mujeres con diabetes gestacional (75). Sin embargo Mimouni y cols encontraron hipocalcemia hasta en un 30 % de los RN de madres con diabetes tipo 1 (72).

Varios marcadores bioquímicos séricos, incluyendo calcio, fósforo, fosfatasa alcalina y osteocalcina han sido usados para la detección precoz de la osteopenia de la prematuridad. La calcemia no es útil como cribado para la deficiencia nutricional u osteopenia del pretérmino, pues el cuerpo humano mantiene un nivel de calcemia a expensas de la pérdida del calcio óseo. Puede estar también elevada en casos de depleción de fósforo con hipofosfatemia. En contraste la fosforemia es un buen marcador de la suficiencia de fósforo. Niveles persistentemente bajos reflejan un aporte de fósforo inadecuado y pueden indicar una probabilidad creciente de desarrollar osteopenia. Así la monitorización de los niveles de fósforo puede prevenir la osteopenia por deficiencia de fosfato (97).

La fosfatasa alcalina total es un marcador de recambio óseo que se ha usado frecuentemente como screening de la osteopenia. Un nivel de fosfatasa alcalina total mayor de 750 UI/L puede encontrarse asociado según algunos autores con osteopenia severa y puede preceder a la evidencia radiológica de raquitismo en prematuros. Sin embargo se han publicado correlaciones pobres entre niveles elevados de fosfatasa alcalina total y el grado de mineralización (97).

Hay discordancia en los estudios publicados, en cuanto a la utilidad de la fosfatasa alcalina para predecir el riesgo de osteopenia.

Kovar et al (143) introdujeron el uso de la fosfatasa alcalina sérica como screening para predecir el riesgo de osteopenia en RN pretérminos. Así encontraron que cuando la fosfatasa alcalina se elevaba cinco veces el límite superior de la normalidad existían cambios raquíuticos radiográficos en algunos de los pretérminos que estudiaron.

Narbona y cols midieron el contenido mineral óseo (CMO) y la densidad mineral ósea (DMO) mediante densitometría de rayos X de doble energía, en el fémur izquierdo de 27 recién nacidos a término y 44 prematuros apropiados para la edad de gestación. Evaluaron la antropometría y los valores séricos de calcio, fósforo y fosfatasa alcalina. Observaron que los prematuros presentaron valores más bajos de calcio y fósforo ($p < 0.05$) y más altos de fosfatasa alcalina ($p < 0.01$). Los prematuros presentaron valores más bajos de CMO y DMO ($p < 0.01$) que los nacidos a término. El CMO se correlacionó con la fosforemia ($r = 0.23$), las fosfatasa alcalina ($r = -0.23$), la edad gestacional ($r = 0.78$), el peso ($r = 0.81$) y la longitud ($r = 0.77$). La DMO se correlacionó con la edad gestacional ($r = 0.64$), el peso ($r = 0.61$) y la longitud ($r = 0.59$). Interpretaron los resultados como que la mineralización ósea depende directamente de la madurez fetal (51).

Recientemente Ashmeade y cols (144), como anteriormente había apuntado Narbona, han encontrado en recién nacidos pretérminos, una correlación negativa entre los valores de SOS y los valores séricos de fosfatasa alcalina y positiva entre los valores de SOS y los niveles en suero de fósforo. Por esto han concluido que la medida combinada con ultrasonidos a través del hueso y la medida en suero de fósforo y fosfatasa alcalina puedan identificar a los niños en riesgo de desarrollar la osteopenia de la prematuridad. El estudio fue prospectivo sobre 3 grupos de pretérminos: grupo 1: 24-26 semanas ($n = 8$); Grupo 2: 27-29 semanas ($n = 9$) y grupo 3: 30-32 ($n = 12$). Las mediciones de SOS realizadas en la tibia fueron realizadas a lo largo de 8 semanas (grupo 1), 5 semanas (grupo 2) y 4 semanas de vida (grupo 3), durante su hospitalización.

Faerk y cols (52) no consideran de utilidad la medida de la FA y el fosfato sérico para predecir los RN en riesgo de osteopenia. No encontraron correlación entre el contenido mineral óseo, en este estudio medido por DEXA, con los niveles de fósforo y de fosfatasa alcalina, por lo que concluyen que estos parámetros no pueden predecir una deficiente mineralización ósea.

Nuestros resultados nos orientan más a la escasa utilidad de la medida de la FA y de la fosforemia tal y como concluye Faerk.

Nosotros hemos encontrado niveles séricos de fosfatasa alcalina más elevados en los pretérminos que en el grupo control, que fueron estadísticamente significativos ($p= 0,039$). Hubo una correlación negativa estadísticamente significativa entre la fosfatasa alcalina y el peso ($R = -0,14$), y entre la FA y la edad gestacional ($R = -0,12$) y positiva entre la FA y los niveles de PTH ($R = 0,28$). No encontramos correlación entre la Ad-SOS y los niveles de fosfatasa alcalina ($R= 0,09$), ni con los de osteocalcina ($R= 0,04$). No hubo correlación entre los valores de FA maternos y del RN.

Por otro lado los valores de normalidad de fosfatasa alcalina en el recién nacido son difíciles de establecer, presentando los pretérminos al nacimiento cifras más elevadas reflejo del aumento fisiológico de la actividad osteoblástica. Por tanto cifras superiores a 700 UI/L podrían considerarse normales sin pensar en la existencia de enfermedad metabólica ósea, y parece que cifras por encima de 2000 podrían reflejar enfermedad metabólica ósea (97).

Pensamos que la medida de la fosfatasa alcalina de forma aislada no parece ser un parámetro útil para hablar de enfermedad metabólica ósea en un recién nacido.

- Osteocalcina

Otro de los marcadores de formación ósea estudiado en sangre de cordón, es la osteocalcina y parece ser un parámetro útil en el estudio de la mineralización fetal tanto en recién nacidos normales como patológicos (94).

La OTC es la responsable de la aposición del calcio en la matriz ósea, presentando cifras de dos a tres veces mayor en niños que en adultos, y como han demostrado

algunos autores incrementa sus valores durante los períodos de crecimiento acelerado pudiendo indicar un crecimiento linear de los huesos largos, así como un desarrollo general del cuerpo (145).

Diversos autores afirman en sus trabajos (141,146-148) como la calcificación de los huesos es directamente proporcional a la edad gestacional, así como a la concentración de osteocalcina en sangre de cordón, que puede ser útil como índice de la normal calcificación del esqueleto, ejerciendo su influencia sobre el peso del feto que es reflejo de un correcto desarrollo intrauterino.

Furmaga-Jablonska y cols (145) estudiaron 64 RN entre 27 y 42 semanas de edad gestacional y encontraron una correlación estadísticamente significativa entre el peso al nacimiento, los parámetros antropométricos y los niveles de osteocalcina en sangre de cordón.

Yamaga y cols (141) estudiaron marcadores de formación ósea (fosfatasa alcalina ósea y osteocalcina intacta) y de resorción ósea (β CTX) en 41 madres y sus RN encontrando valores mayores estadísticamente significativos en sangre de cordón, que en sus respectivas madres. No encontraron correlación entre los valores de las madres y los RN, y concluyeron que el turnover óseo es marcadamente mayor en el recién nacido que en la madre y además es independiente del metabolismo mineral óseo de ésta, en la vida fetal tardía. Estos datos son igualmente concordantes con lo encontrado en nuestro trabajo. Nosotros además aportamos una nueva observación tras el estudio de RN pretérminos en los que encontramos niveles séricos de OTC y de β CTX inferiores a los RN a término. Esto revela que a medida que avanza la gestación aumenta tanto la formación como la resorción ósea, y el hecho que no encontremos correlación de los valores de FA, OTC y β CTX entre madres y RN, podría indicar que el metabolismo mineral del RN es independiente del materno, tal como afirma Yamaga.

Yasumizu (1996) y Yamaga (1999) encontraron valores de OTC mucho mayores en RN que en sus madres (146, 141).

Seki (1993) y Alatas (1995) refieren que la alta concentración de OTC en sangre de cordón sugiere que la placenta, pueda ser una fuente de OTC en la vida fetal tardía, y también podría expresar la neoformación ósea del RN (147,148).

Pittard et al (53) hicieron un estudio prospectivo sobre recién nacidos pretérminos desde el nacimiento hasta las 16 semanas de vida observando un aumento de OTC durante la primera semana posparto correlacionado positivamente con los valores de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, pero no con los valores de PTH, ni con la concentración de calcio y fósforo. También encontraron una consistente correlación negativa con la fosfatasa alcalina total y ósea, que no se explica bien al ser dos marcadores de formación ósea, que son índices de la actividad osteoblástica.

Sin embargo no encontraron correlación entre el contenido mineral óseo medido en las primeras 16 semanas de vida con los valores de OTC o con los de la fosfatasa alcalina total o la ósea. Ellos concluyen que la medición de la OTC o de la fosfatasa alcalina en el recién nacido pretérmino no expresa adecuadamente, los cambios de contenido mineral óseo durante los 4 primeros meses de la vida.

Aunque todos los datos de nuestro estudio son fruto de un estudio transversal, en el momento del nacimiento, no hemos encontrado correlación entre la Ad-SOS y la fosfatasa alcalina o la osteocalcina. La OTC presentó una correlación negativa con la OPG y positiva con la edad gestacional. Encontramos que los niveles séricos de OTC fueron inferiores en RNPT aunque no presentaron significación estadística y esto podría significar que la formación ósea, en los dos primeros trimestres del embarazo no se encuentra bien representada por las cifras séricas de OTC o bien que la producción de OTC se intensifica al final del embarazo cuando ocurre la acreción máxima de calcio a través de la placenta. También podríamos pensar que estos valores más bajos de OTC en los pretérminos pueden ser el reflejo de una menor formación ósea. De cualquier modo sería necesario ampliar estudios en este sentido.

Martínez et al (95) estudiaron los niveles de OTC y PTH en madres diabéticas y sus RN, encontrando cifras más bajas de OTC que en las embarazadas del grupo control. Esto había sido estudiado en pacientes con diabetes, pero no en embarazadas. Los

RN presentaron cifras significativamente más elevadas que sus madres, pero sin diferencia con RN normales.

Esto concuerda con lo encontrado en nuestro trabajo, con la diferencia que las madres con diabetes gestacional no presentaron diferencias significativas en los valores de OTC con las madres del grupo control, lo que nos orienta a la conclusión que la diabetes gestacional en las madres no altera su metabolismo óseo, al contrario de lo publicado en madres con diabetes mellitus insulín dependiente.

- PTH

La parathormona es una hormona polipeptídica sintetizada en la glándula paratiroides. Es un péptido de 84 aminoácidos que circula, al menos, en cuatro formas moleculares. En individuos normales la parathormona completa, intacta (aminoácidos 1 a 84) tiene una vida media de, aproximadamente, cinco minutos. La parathormona intacta (PTH_i) es la que tiene el mayor grado de actividad. La PTH_i es medida directa de la función de la glándula paratiroides y es independiente de la función renal (20,21).

La hipocalcemia estimula su secreción. La PTH estimula la síntesis renal de la vitamina 1,25(OH)₂D₃, que promueve la resorción renal de calcio y la excreción de fosfato. La parathormona aumenta la reabsorción renal de calcio y magnesio, disminuye la reabsorción renal de fosfato. También estimula la absorción intestinal del calcio y la resorción osteoclástica en el hueso, aumentando la salida de calcio desde el hueso hacia el líquido extracelular (19-21).

Los métodos que determinan la hormona intacta parecen producir resultados más relacionados con su actividad biológica que la valoración de sus fragmentos. De todos los marcadores óseos estudiados sólo la PTH y la fosfatasa alcalina han mostrado una correlación negativa estadísticamente significativa con la edad gestacional. Las calcemias de los RN pretérminos fueron normales, por lo que el aumento de la PTH en los RN de menor edad gestacional pudiera ser para mantener las calcemias en los límites normales, en niños en los que aún no se ha completado el paso transplacentario de calcio.

Este resultado en RNPT no coincide con el de otros estudios que determinaron otras fracciones de PTH distintas a la de nuestra investigación o bien fueron medidas con otras técnicas distintas.

Con nuestra investigación demostramos la existencia de un cierto grado de hiperparatiroidismo en RN pretérminos en relación con el grupo control, en el que la función paratiroidea aparece prácticamente abolida, resultado concordante con el estado de hipercalcemia que presenta el RN a término.

La PTH tiene un efecto destructor óseo, cuando su elevación sérica es mantenida, pero también tiene un efecto formador de hueso cuando se administra de forma intermitente, siendo aceptado su uso en mujeres osteoporóticas postmenopáusicas con alto riesgo de fractura (20, 21).

Dado que la PTH ha mostrado ser un inhibidor *in vitro* de la OPG, no podemos explicar si existe relación entre la elevación de PTH y la de OPG en los RN pretérminos (43).

- Vitamina D

Si analizamos el papel de la vitamina D sabemos que es esencial para la salud de las mujeres embarazadas y sus hijos, así como para el normal crecimiento y mineralización ósea.

Una insuficiencia o deficiencia de vitamina D durante el embarazo puede provocar una escasa ganancia ponderal en la madre y trastornos en el esqueleto del feto, que en situaciones extremas reduce la mineralización ósea, con evidencia radiológica de raquitismo y mayor riesgo de fracturas. A corto plazo el déficit de vitamina D o la falta de suplementación con vitamina D en la infancia conduce a disturbios bioquímicos, mineralización ósea reducida, enlentecimiento del crecimiento, o mayor posibilidad de presentar fracturas o raquitismo en casos extremos. A largo plazo la falta de suplementación con vitamina D puede reducir la masa ósea y la talla final y aumentar el riesgo de diabetes mellitus tipo 1 (149).

La definición de deficiencia, insuficiencia y normalidad de vitamina D es complicada y está basada en los valores séricos de 25(OH)D, particularmente en relación con la asociación a cambios en los niveles séricos de PTH.

Bodnar y cols consideran insuficiencia valores ≤ 5 ng/ml (12 nmol/L), y que los valores de deficiencia serían más difíciles de establecer y presentarían un rango entre 8,3 ng/ml (20 nmol/L) y 33ng/ml (80 nmol/L) (149).

Clásicamente se ha considerado que los niveles de vitamina D durante el embarazo reflejan la homeostasis del calcio en la madre y en el recién nacido.

En los casos que los depósitos de vitamina D son escasos el crecimiento fetal se puede retardar y la acreción mineral puede reducirse así como el crecimiento lineal y la ganancia ponderal del feto. Esto hará igualmente que sea más frecuente encontrar una hipocalcemia neonatal (150)

Las concentraciones séricas del 1,25(OH)₂D son entre un 50-100 % superiores durante el 2º trimestre de embarazo, y el 100% superiores en el último trimestre al compararlos con la mujer no embarazada. El mecanismo por el que esto ocurre no está del todo aclarado. La PTH es usualmente considerada un estímulo para la hidroxilación renal del 25(OH)D, pero no está aumentada durante el embarazo por lo que la fuente de 1,25(OH)₂D en sangre materna puede tener un origen placentario.

Nosotros hemos encontrado valores más elevados de 25(OH)D en sangre de cordón que en sus respectivas madres, lo que coincide con lo publicado recientemente por Nicolaidou y cols (151), pero no con otras publicaciones (64,65).

Igual que otros autores hemos encontrado una correlación positiva entre los valores maternos y del recién nacido, pero el hecho que en éstos sean los niveles más elevados y que en la mayoría de los hijos de mujeres con un déficit aislado de 25(OH)D, sus recién nacidos mantienen valores dentro de la normalidad, nos hace pensar que existe una fuente de 25(OH)D que pudiera ser placentaria, y que otorga cierta independencia, de los valores maternos, o bien un paso transplacentario como han argumentado otros autores (64,65,152-155).

Delvin y cols han publicado la existencia de una correlación entre las cifras de 25(OH)D en sangre materna y sangre de cordón que sugiere una difusión pasiva a través de la placenta (152).

Lo que si es cierto que el feto parece tener una situación privilegiada durante el embarazo, porque en el caso del calcio, la acreción ocurre aún con la consecuente descalcificación del esqueleto materno y otro tanto podría ocurrir con la vitamina D.

Otro punto de interés ha sido el hallazgo en nuestro medio, de un déficit de vitamina D (<10 ng/ml) en casi un 13 % de las embarazadas, aunque sólo dos recién nacidos presentaron niveles por debajo de 10 ng/ml. No presentaron insuficiencia ninguna de las madres o RN estudiados, según los criterios de Bodnar (149).

En diversos estudios realizados sobre mujeres embarazadas y sus RN se ha visto unos niveles séricos de 25(OH)D inferiores en mujeres de raza negra que en las de raza blanca, además en el estudio de Pawley observaron que un 71 % de los RN presentaban valores de 25(OH)D inferiores a 8,3 ng/ml en sangre de cordón (150).

Marya y cols (155) estudiaron 120 multíparas indias de las que 75 no recibieron suplementos de vitamina D o calcio, 25 recibieron 1200 UI de vitamina D y 375 mg de calcio durante el tercer trimestre y 20 recibieron 2 dosis de 600000UI de vitamina D oral en los meses 7º y 8º del embarazo.

En las madres que se administró vitamina D en el último trimestre del embarazo disminuyó de forma significativa los niveles de fosfatasa alcalina, tanto en sangre materna como en la sangre del cordón, además el peso de sus RN fue mayor que en el grupo que no recibió suplemento de vitamina D. Tanto el descenso de FA y el aumento de peso de los RN, fue mayor en el grupo en el que se administró 600000 UI en el 7º y 8º meses del embarazo.

Maxwell y cols (156) realizaron un estudio sobre mujeres asiáticas y sus RN residentes en Londres, observando que al suplementar con vitamina D, en este caso, 1000 UI diarias en el último trimestre, redujeron los niveles de FA en las madres en el momento del parto y en sangre de cordón con respecto al grupo que sólo recibió placebo.

Weiler et al (156) en un estudio realizado en Canadá, encontraron que un 46 % de madres estudiadas y un 36 % de sus recién nacidos presentaban un déficit de 25(OH)D, que fue asociado a un mayor peso y longitud al nacimiento, pero a una menor masa ósea en relación con el peso. La persistencia del déficit de 25(OH) D en estas madres, a pesar de recibir una adecuada ingesta de vitamina D (>200 UI/día), no ha podido ser bien explicada, tal vez las mujeres del estudio estaban poco expuestas a la luz solar y precisarían mayores aportes de vitamina D durante el embarazo y la lactancia.

Otros estudios han asociado el déficit de vitamina D a la raza o a las costumbres de países como Turquía donde las mujeres van más cubiertas, o bien a la estación del año en que tiene lugar el nacimiento (151).

El déficit de vitamina D de nuestro estudio es en resumen, mucho menor al publicado por otros autores, que han publicado los siguientes porcentajes de déficit en mujeres embarazadas: Maghbooli y cols (2007): 66,8 % y 93,3 % en las madres y sus RN respectivamente; Nicolaidou y cols (2006): 19,5% y 8,1% en las madres y sus RN respectivamente; Sachan y cols (2005): 42,5 % de las mujeres y un porcentaje similar de sus RN (153, 151, 154). Estas diferencias de resultados pueden ser debidas a la mayor radiación solar de nuestra latitud.

Bodnar y cols (2007) estudiaron un grupo de 200 mujeres blancas y 200 de raza negra de Pittsburg y encontraron una deficiencia (<37 nmol/L) en el 29,2 % y 45,6 % en las mujeres negras y sus RN respectivamente y 5% y 9,7 % en las madres blancas y sus RN respectivamente). A tener en cuenta en este estudio que un 90 % de las madres recibieron un suplemento con vitamina D (149).

Según Pawley y cols el déficit de vitamina D durante el embarazo puede producir alteraciones en la homeostasis ósea del niño y en situaciones extremas una reducción de la mineralización ósea, una alteración del crecimiento lineal, un crecimiento fetal retardado, un raquitismo evidenciado radiológicamente, fracturas, así como riesgo de hipocalcemia neonatal (150).

El déficit de vitamina D en útero o tras el nacimiento, se ha relacionado con problemas esqueléticos, diabetes tipo 1 o esquizofrenia en la vida adulta (148).

La diabetes parece aumentar el riesgo de hipovitaminosis D. Así Martínez y cols (158) han descrito cifras inferiores de 25(OH)D en madres diabéticas lo cual puede influir sobre la presentación de hipocalcemia neonatal.

Delmas y cols no encontraron diferencia en los niveles de 25(OH)D en sangre de cordón de RNPT y el grupo control. Como en otros estudios encontraron cifras mayores en las madres que en sangre de cordón (159).

Cockburn y cols (159) han observado una relación inversa entre los niveles maternos de 25(OH)D y la incidencia de hipocalcemia neonatal que no ha podido ser bien explicada.

Nosotros hemos encontrado una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles del RN y sus madres, así como unos niveles de 25(OH)D significativamente más altos en la sangre de cordón que en la sangre materna, lo que no concuerda con la mayoría de los trabajos publicados anteriormente (64,65), pero sí con una reciente publicación de Nicolaidou y cols (151).

En trece de las madres pertenecientes al grupo control encontramos cifras inferiores a 10 ng/ml y aún así sus recién nacidos presentaron cifras normales en suero de calcio y PTH. Esto nos hace suponer que existe algún factor que actúe en la producción fetal de vitamina D₃, además de la transferencia pasiva, quizás podría tratarse de una producción placentaria. En estos niños no encontramos menor peso, ni longitud y los valores de Ad-SOS medidos fueron normales.

En los pretérminos hemos encontrado cifras menores de vitamina D que en el grupo control, que tuvieron significación estadística.

No hemos encontrado diferencias en los niveles séricos de 25(OH)D en madres con diabetes gestacional, bien tratadas sólo con dieta o con dieta e insulina, respecto a madres normales, ni tampoco en sus RN con respecto a los controles sanos.

En nuestro medio no se contempla la suplementación con vitamina D a las embarazadas, dada la exposición solar de nuestra latitud. Son cada vez más las investigaciones que reflejan un déficit de vitamina D tanto en las madres como en sus recién nacidos, que generalmente estarían asociados a los estilos de vida, a la

raza, la estación en la que ocurre el parto, o a la latitud. A pesar de todo esto no encontramos en nuestro estudio ningún recién nacido a término de madre con déficit de vitamina D que tenga hipocalcemia, aumento de la PTH o de la fosfatasa alcalina.

Quizás a la vista de estos resultados habría que prestar más atención a los niveles de 25 (OH)D en sangre materna con vistas a suplementar en las madres que presenten niveles más bajos, pues aunque en los RN estudiados no hemos encontrados alteraciones bioquímicas de la mineralización ósea, ni menor Ad-SOS no sabemos lo que ocurrirá con estos RN evolutivamente al ser nuestro trabajo, un estudio transversal.

También pensamos que esto adquiere mayor importancia en los RN pretérminos en los que sí presentan niveles significativamente más bajos que el grupo de RN control. Podríamos preguntarnos, si sería adecuado hacer un cribado al nacimiento en todos los RN, midiendo los niveles de 25(OH)D en sangre de cordón o medir los niveles séricos de 25(OH)D a lo largo del embarazo.

Según hemos ido viendo la mineralización ósea es un complicado mecanismo en el que actúan múltiples factores, por un lado los genéticos sobre los que aún no podemos actuar y por otro los hormonales, paracrinos, y autocrinos que son numerosos y de los que ninguno por separado nos da idea de lo que ocurre en un lugar concreto del esqueleto. Pero seleccionando algunos de ellos conjuntamente con pruebas como los ultrasonidos en el RN, y en casos seleccionados con DEXA, sean herramientas útiles para la detección precoz y seguimiento de niños en riesgo de osteopenia. Desgraciadamente la OPG sólo es una citoquina de las muchas que actúan en el complicado sistema óseo, pero que irá adquiriendo relevancia según vayamos ampliando investigaciones, tanto para monitorización como para el tratamiento de la osteoporosis utilizada ya con éxito en adultos.

Una limitación en todos los resultados que obtenemos en nuestro estudio es que al ser un estudio transversal, no sabemos evolutivamente lo que ocurrirá posteriormente a lo largo de los primeros años de la vida de los RN estudiados, lo

que abre nuevos caminos a investigaciones futuras que encontramos de primordial importancia en la prevención de la osteoporosis en las próximas generaciones.

CONCLUSIONES

1. La medida de la ADSOS ha demostrado ser un buen método de evaluación, rápido, no invasivo, reproducible y fiable para valorar recién nacidos tanto normales como en riesgo de osteopenia, como ocurre en los RN pretérminos y los RN de madres con diabetes gestacional.
2. Los valores de ADSOS en RN pretérminos e HMDG fueron inferiores a los de los RN a término con diferencia estadísticamente significativa, lo que revelan probablemente un menor grado de mineralización ósea.
3. En RN a término la ADSOS es mayor en varones con una significación estadística.
4. Los niveles de calcio, fósforo, osteocalcina, β crosslaps y 25(OH)D estudiados en sangre de cordón fueron más elevados que en sangre materna, lo que podría indicar que el recambio óseo fetal es marcadamente más acelerado e independiente del metabolismo mineral materno al final del embarazo.
5. Los RN pretérminos son lo que presentan valores más bajos de OTC, de β CTX y de AdSOS y niveles más elevados de OPG y de PTH.

6. La presencia de un incremento en la concentración sérica de OPG en RN pretérminos, podría indicar un efecto protector sobre el hueso, y su medición puede orientar el riesgo de osteopenia en los mismos.
7. El aumento de PTHi encontrado en los RN pretérminos pudiera deberse a un intento de mantener las calcemias en rango normal, en una etapa en la que aún no se ha completado el paso transplacentario de calcio.
8. La medida del β crosslaps , la fosfatasa alcalina y la OPG en suero podrían ser útiles en el diagnóstico y en la valoración de la respuesta al tratamiento de la osteopenia del RN, siendo necesario para confirmar esta hipótesis, estudios longitudinales más amplios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carrascosa A. Masa ósea. Factores reguladores. Rev Esp Pediatr 2003; 59(1):15-58.
2. Riancho JA, Gutiérrez GE. Factores reguladores de la resorción ósea. Rev Metab Oseo Min 2003; 1(2): 51-66.
3. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. J Bone Miner Res 1998; 13: 793-802.
4. Manolagas SC, Jilka BL. Bone marrow, cytokines and bone remodelling. New Engl J Med 1995; 332:305-311.
5. Elias Ja, Tang W, Howitz MC. Cytokine and hormonal stimulation of human osteosarcoma cytokine-11 production. Endocrinol 1995; 136:489-498.
6. Parfitt AM, Mundy GR, Roodman GD, Hughes DE, Boyce BF. A new model for regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of biphosphonates. J Bone Miner Res 1996; 11: 150-159.
7. Nguyen TV, Howard GM, Kelly PJ, Eisman JA. Bone mass, lean mass, and fat mass: same genes or same environments? Am J Epidemiol 1998; 147:3-16.

8. Greenfield EM, Goldberg VM. Genetic determination of bone density. *Lancet* 1997; 350:1263.
9. Kelly PJ, Hopper JL, Macaskill GT, Pocock NA, Sambrook PN, Eisman JA. Genetic factors in bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 808-813.
10. Sainz J, Tournout JM, Loro ML et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and bone density in prepuberal American girls of Mexican. *N Engl J Med* 1999, 337:77-82.
11. Riancho JA, Mundy GR. The role of cytokines and growth factors as mediators of the effects of systemic hormones at the bone local level. *Crit Rev Eukaryot Gene Express* 1995; 5: 193-217.
12. Abrams SA, O'Brien KO, Liang JK et al. Differences in calcium absorption and kinetic between black and white girls aged 5-16 years. *J Bone Miner Res* 1995.10:824-833.
13. Prentice A. Micronutrients and the bone mineral content of the mother, fetus and newborn. *J Nutr (Suppl)* 2003; 133(5): 1693S-1699S.
14. Crofton PM, Evans N, Stephen R. Serum crosslaps compared with other markers of bone turnover in severely malnourished children before and after refeeding. *Clin Chem* 2003; 49:192-5.
15. Hodges SJ, Alesson K, Vergnaud P et al. Circulating levels of vitamins K1 and K2 decreased in elderly women with hip fracture. *J Bone Miner Res* 1993. 8: 1241-1245.
16. Eliakim A, Nemet D, Friedland O, Dolfen T, Regev RH. Spontaneous activity in premature infants affect bone strength. *J Perinatol* 2002; 22:650-2.
17. Yeh JK, Liu CC, Aloia JF. Effects of exercise and immobilization on bone formation and resorption in young rats. *Am J Physiol* 1993; 264:E182-9.

18. Zhuang HM, Wang W, Seldes RM, Tahernia AD, Fan HJ, Brighton CT. Electrical stimulation induces the level of TGF-beta-1 mRNA in osteoblastic cells by a mechanism involving calcium/calmodulin. *Bioch Biophys Res Commun* 1997; 237: 225-229.
19. Silverman R, Yalow RS. Heterogeneity of parathyroid hormone: Clinical and physiologic implications. *J Clin Invest* 1973; 52: 1958-1971.
20. Flentje D, Schmidt-Gayk H, Fisher S, Stern J, Blind E, Buhr H, Herfarth Ch. Intact parathyroid hormone in primary hyperparathyroidism. *Br J Surg* 1990; 77:168-172.
21. Neer RN, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JI et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001; 344:1434-41.
22. Shevde N, Anklesaria P, Greenberger JS et al. Stromal-cell mediated stimulation of osteoclastogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 205: 306-15.
23. Key LL, Weichselbaum RR, Carnes DL. A link between calcitriol and bone resorption. *Bone Miner* 1988; 3:201-9.
24. Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev* 1994; 15: 275-300.
25. Prince RL. Estrogen effects on calciotropic hormones and calcium homeostasis. *Endocr Rev* 1994; 15:301-309.
26. Langlois JA, Rosen CJ, Visser M, Hannan MT, Harris T, Wilson PW et al. Association between insulin like growth factor I and bone mineral density in older women and men: the Framingham Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4257-4262.
27. Ohlson C, Bengtsson BA, Isaksson OGP, Andreasen TT, Słotweg MC. Growth hormone and bone. *Endocr Rev* 1998; 19:55-79.

28. Mosekilde L, Eriksen EF, Charles P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinol Metab Clin N Amer* 1990; 19:35-63.
29. Yamashita H, Ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K. Bone morphogenetic protein receptors. *Bone* 1996; 19:569-74.
30. Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, et al. Essential requirement of BMPs-2-4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res* 2000; 15:663-73.
31. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89 (2): 309-319.
32. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998; 139 (3): 1329-1337.
33. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption-a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 1982; 34(3):311.
34. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997, 89: 159-61.
35. Vidal K, Van den Broek P, Lorget F, Donnet- Hughes A. Osteoprotegerin in human milk: A potential role in the regulation of bone metabolism and immune development. *Pediatric Research Foundation* 2004; 55 (6): 1001-8.
36. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgués T et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93(2): 165-176.
37. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki SI, Tomoyasu A, Yano K, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for

- osteoprotegerin/ osteoclastogenesis inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci.1998.95: 3597-3602.
38. Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E,Orlinick J,Chao M et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates N terminal kinase in T cells. J Biol Chem 1997; 272 (40): 25: 190-194.
 39. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature 1997; 390 (6656):175-179.
 40. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C et al. The ligand of osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. J Cell Biol 1999; 145 (3): 527-538.
 41. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand family. .Endocr Rev 1999.20:345-347.
 42. Hofbauer LC, Koshla S, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Riggs BL. The role of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. J Bone Miner Res 2000;15:2-12.
 43. Rogers A, Eastell R. Review: Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor κ B ligand: Clinical utility in metabolic bone disease assessment. J Clin Endocrinol Metabol 2005. 90(11): 6323-6331.
 44. Khosla S. The OPG/RANKL/RANK system. Endocrinology 2001.142: 5050-5055.
 45. Hofbauer LC and Heufelder AE The role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. J Clin Endocrinol Metabol 2000.85: 2355-2363.
 46. Seibel MJ. Biochemical markers of bone remodelling. Endocrinol Metab Clin N Am 2003. 32:83-113.

47. Steelman J, Zeitler P. Osteoporosis in pediatrics. *Pediatr Rev.* 2001 Feb; 22(2):56-65.
48. Koo WWK, Succop P, Hambidge KM. Serum alkaline phosphatase and serum zinc concentrations in preterm infants with rickets and fractures. *Am J Dis Child* 1989; 143:1342-5.
49. Glass EJ, Hume R, Hendry GMA et al. Plasma alkaline phosphatase activity in rickets of prematurity. *Arch Dis Child* 1982; 57: 373-6.
50. Koo WWK. Laboratory assessment of nutritional metabolic bone disease in infants. *Clin Biochem* 1996; 29: 429-38.
51. Narbona E, Maldonado J, Molina JA. Mineralización ósea y fosfatasa alcalina ósea en recién nacidos: sus relaciones con la madurez y somatometría fetal. *Ars Pharmaceutica* 1996; 37:1011-18.
52. Faerk J, Peitersen B, Petersen S, Michaelsen KF. Bone mineralisation in premature infants cannot be predicted from serum alkaline phosphatase or serum phosphate. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2002; 87:133-36.
53. Pittard WD, Geddes KM, Hulsey TC, Hollis BW. Osteocalcin, skeletal alkaline phosphatase and bone mineral content in very low birth weight infants: a longitudinal assessment. *Pediatr Res* 1992; 31:181-5.
54. Seibel MJ. Biochemical markers of bone remodelling. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2003. 32:83-113.
55. Bonde M, Qvist P, Fledelius C, Riis BJ, Christiansen C. Applications of an enzyme immunoassay for a new marker of bone resorption (cross-laps): Follow-up on hormone replacement therapy and osteoporosis risk assessment. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:864-868.
56. Okabe R, Nakatsuka K, Inaba M, Miki T, Naka H, Masaki H, et al. Clinical evaluation of the Elecsys beta-crosslaps serum assay, a new assay for degradation products of type I collagen C- telopeptides. *Clin Chem* 2001; 47 (8):1410-1414.

-
57. Christgau S, Rosenquist C, Alexandersen P, Bjarnson NH, Ravn P, Fledelius C et al. Clinical evaluation of the serum crosslaps one step ELISA, a new assay measuring the serum concentration of bone derived degradation products from type collagen C-telopeptides. *Clin Chem* 1998; 44 (11): 2290-2230.
 58. Bonde M, Qvist P, Fledelius C, Riis BJ, Christiansen C. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin Chem* 1994; 40 (11): 2022-2025.
 59. Fledelius C, Johnsen A, Cloos P, Bonde M, Qvist P. Identification of a beta-isomerized aspartyl residue within the c-terminal telopeptide alfa 1 chain of type I collagen. Possible relation to aging of bone. *J Bone Miner Res* 1996; 11 (Suppl 1) 113.
 60. Crofton PM, Evans N, Taylor MR, Holland CV. Serum crosslaps: pediatric reference intervals from birth to 19 years of age. *Clin Chem* 2002; 48: 671-3.
 61. Rosen HN, Dresner-Pollak R, Moses AC, Rossenblatt M, Zeind AJ. Telopeptides of type I collagen as a marker of bone turnover. *Calcif Tissue Int* 1994; 54: 26-29.
 62. Eyre DR. New biomarkers of bone resorption. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 470.
 63. Forbes GB. Calcium accumulation by the human fetus. *Pediatrics* 1976; 57: 976-977.
 64. Casanova Román M, Souza Firmo F, Casanova Bellido M. Homeostasis del calcio y sus elementos reguladores. *Vox Paediatrica*, 2002; 10, 2: 22-27.
 65. Del Toro Salas A, Dueñas Díez JL, De Jaime Revuelta E. Concentraciones de calcio y marcadores del remodelamiento óseo en sangre de cordón umbilical y en orina del recién nacido en el parto. *An Esp Pediatr* 2001; 54:290-296.
 66. Pitkin RM, Reynolds WA, Williams GA, Hargis GK. Calcium metabolism in normal pregnancy: a longitudinal study. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 133: 781-90.

67. Heaney RP, Skillman PG. Ca metabolism in normal human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 33:661-70.
68. Namgung R, Mimouni F, Campaigne BN, Ho ML, Tsang RC. Low bone mineral content in summer-born compared with winter-born infants. *J Ped Gastroenter Nutric* 1992; 15: 285-288.
69. Namgung R, Tsang RC, Lee C, Han DG, Ho ML, Sierra RI. Low bone mineral content and high bone resorption in korean winter- born versus summer- born newborn infants. *J Pediatr* 1998; 132: 421-425.
70. Moncrieff M, Fadahunsi TO. Congenital rickets due to maternal vitamin D deficiency. *Arch Dis in Childhood* 1974; 49:810-811.
71. Park W, Paust H, Kaufmann HJ, Offermann G. Osteomalacia of the mother-rickets of the newborn. *Eur J Pediatr* 1987;146: 292-3.
72. Mimouni F, Steichen JJ, Tsang RC, Hertzberg V, Miodovnik M (1988). Decreased bone mineral content in infants of diabetics mothers. *Am J Perinat* 1988; 5: 339-343.
73. Demarini S , Specker BL, Sierra RI, Miodovnik M, Tsang RC. Evidence of increased intrauterine bone resorption in term infants of mothers with insulin-depedent diabetes. *J Pediatr* 1995; 1: 796-798.
74. Lapillonne A , Guerion S, Braillon P et al. Diabetes during pregnancy does not alter whole body bone mineral content in infants. *J Cl Endocrinol Metab* 1997; 82:3993-3997.
75. Regev RH, Dolfen T, Eliakim A, Arnon S, Bauer S, Nemet D, Litmanovitz I. Bone speed of sound in infants of mothers with gestational diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2004; 17(8):1083-8.
76. Luciano A, Bolognani M, Biondani P, Ghizzi C, Zoppi G, Signori E (1998). The influence of maternal passive and light active smoking on intrauterine growth and body composition of the newborn. *Eur J Cl Nutr* 1998; 52:760-763.

77. Guzmán JM, Jaraba MP, De la Torre MJ, Ruiz-González MD, Huertas MD, Álvarez R, Zapatero M. Parenteral nutrition and immature neonatos. Comparative study of neonatos weighing under 1000-1250 g at birth. *Early Hum Dev* 2001; 65: S133-44.
78. Koo WWK. Parenteral nutrition-related bone diseases. *J Parenteral Enteral Nutr* 1992; 16:386-94.
79. Pelegano JF, Rowe JC, Carey DE, LaBarre DJ, Raye JR, Edgren KW, Horak E. Simultaneous infusion of calcium and phosphorus in parenteral nutrition for premature infants: use of physiologic calcium/phosphorus ratio. *J Pediatr* 1989; 114: 115-9.
80. Zanardo V, Dani C, Trevisanuto D et al. Methylxantines increase renal calcium excretion in preterm infants. *Biol Neonate* 1995; 68:169-74.
81. Ng PC, Lam CWK, Wong GWK, et al. Changes in markers of bone metabolism during dexametasona treatment for chronic lung disease in preterm infants. *Arch Dis Child* 2002; 86: 49-54.
82. Koo WWK, Sherman R, Succop P et al. Fractures and rickets in very low birth weight infants: conservative management and outcome. *J Pediatr Orthop* 1989; 9:326.
83. Callenbach JC, Sheehan MB, Abramson SJ, Hall RT. Etiologic factors in rickets of very low birth-weight infants. *J Pediatr* 1981; 98: 800-805.
84. Tsang RC, Kleinman L, Sutherland JM et al. Hypocalcemia in infants of diabetics mothers: Studies in Ca, P and Mg metabolism and in parathormone responsiveness. *J Pediatr* 1972; 80: 384-395.
85. Tsang RC, Strub R, Steichen JJ, et al. Hypomagnesemia in infants of diabetic mothers: Perinatal studies. *J Pediatr* 1976; 89:115-19.
86. Mimouni F, Miodovnik M, Tsang RC et al. Decreased amniotic fluid magnesium concentration in diabetic pregnancy. *Obstet Gynecol* 1987; 69: 12-14.

87. Tsang RC, Chen IW, Freidman MA et al: Parathroid function in infants of diabetic mothers. *J Pediatr* 1975; 86: 399-404.
88. Steichen JJ, Tsang RC, Ho M et al. Perinatal magnesium, calcium and 1,25-(OH)₂D in relation to prospective randomized management of maternal diabetes. *Calcif Tissue Int* 1981; 33: 317.
89. Devoe DL, Youssef AA, Castillo RA, Croom CS: Fetal biophysical activities in third trimester pregnancies complicated by diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171:298-303.
90. Kainer F, Prechtl HF, Engele H, Einspieler C. Assesment of the quality of general movements in fetus and infants of women with type I diabetes mellitus. *Early Hum Dev* 1997; 24: 13-25.
91. Siddharth G, Kamath LK, Kelley AF, Smith F, Smith CH. Transport and binding in calcium uptake by microvillous membrane of human placenta. *Am J Physiol* 1992; 262:C789-794.
92. Care AD. Calcium homeostasis in the fetus. *J Dev Physiol* 1980; 2: 85-99.
93. Brommage R, Deluca H. Placental transport of calcium and phosphorus is not regulated by vitamin D. *Am J Physiol* 1984; 246: F526-F529.
94. Verhaeghe J, Van Herck E, Bouillon R. Umbilical cord osteocalcin in normal pregnancies and pregnancies complicated by fetal growth retardation or diabetes mellitus. *Biol Neonate*. 1995; 68(6):377-83.
95. Martínez ME, Catalán P, Lisbona A et al. Serum osteocalcin concentrations in diabetic pregnant women and their newborns. *Horm Metab Res* 1994; 26:338-342.
96. Vázquez Gómez MA, Montoya García MJ, Moruno García RM, Miranda García MJ, Gómez de Tejada Romero MJ, Pérez Cano R. Niveles séricos de OPG y RANKL en una población infantil sana. Variaciones estacionales. *Reemo*. 2003. Pag. 34.

97. KW So, PC Ng. Treatment and prevention of neonatal osteopenia. *Current Paediatrics* 2005; 15:106-113.
98. Cooke RJ. Rickets in very low birth weight infant. *J Pediatr Gastroenterol* 1989; 9: 397-9.
99. Jergas M, Genant HK. Current methods and recent advances in the diagnosis of osteoporosis. *Arthritis Rheum* 1993; 36:1649-1662.
100. Johnston CC, Slemenda CW, Melton J. Clinical use of bone densitometry. *N Eng J Med* 1991; 324:1105- 1109.
101. Del Río. Técnicas de medición ósea en pediatría. *Rev Esp Pediatr* 2003; 59 (1):29-46.
102. Rawlings DJ, Guibelalde E, Vaño E, Cooke RJ, Hetherington J. Investigación sobre los artefactos de movimiento y otras incertidumbres durante densitometría ósea de neonatos empleando absorciometría de energía dual de rayos X. *Rev Fis Med* 2000; 1 (1): 83-88.
103. Pacifici R, Rupich R, Griffin M, Chines A, Susman N, Avioli LV. Dual energy radiography versus quantitative computer tomography for diagnosis of osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metabol* 1990; 70:705-710.
104. McKeivie ML, Fordham J, Clifford C, Palmer SB. In vitro comparison of quantitative computed tomography and broadband ultrasonic attenuation of trabecular bone. *Bone* 1989; 10: 101-104.
105. Kang C, Speller R. Comparison of ultrasound and dual energy X-ray absorptiometry measurements in the calcaneus. *Br J Radiol* 1998; 71:861-7.
106. Wright LL, Glade MJ, Gopal J. The use of transmission ultrasonics to assess bone status in the human newborn. *Pediatr Res* 1987; 22: 541-44.
107. Sievonen H, Cheng S, Olikianen S, Uusi- Rasi K. Ultrasound velocity and cortical bone characteristics in vivo. *Osteoporosis Int* 2001; 5: 399-405.

108. Greenfield MA, Craven JD, Huddelston A, Kehrer ML, Wishko D, Stern R. Measurements of the velocity of ultrasound in human cortical bone in vivo. *Radiology* 1981; 138: 701-710.
109. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *Br Med J* 1995; 311:171-4.
110. Cooper C, Walker-Bone K, Arden N, Dennison E. Novel insight into the pathogenesis of osteoporosis: the role of intrauterine programming. *Rheumatology* 2000; 39:1312-5.
111. Gale CR, Martyn CN, Kellingray S, Eastell R, Cooper C. Intrauterine programming of adult body composition. *J Clin Endocrinol Metabol* 2001; 86:267-72.
112. Leon DA. The foetal origins of adult disease: interpreting the evidence from twin studies. *Twin Res* 2001; 4: 321-6.
113. Casanova Román M, Gutierrez Barrios P, Freís Mas, Casanova Bellido M. Utilidad de los ultrasonidos para la valoración de la mineralización ósea en recién nacidos. *An Esp Pediatr* 2002; 56 (5):443-7.
114. Pereda L, Ashmeade T, Zaritt J, Carver JD. The use quantitative ultrasound in assessing bone status in newborn preterm infants. *J Perinatol* 2003; 23:655-9.
115. Littner Y, Mandel D, Mimouni FB, Dollberg S. Bone ultrasound velocity curves of newly born term and preterm infants. *J Pediatr Endocr Metabol* 2003; 16:43-47.
116. Litmanovitz I, Tzipora D, Regev R et al. Bone turnover markers and bone strength during the first weeks of life in very low birth weight premature infants. *J Perinat Med* 2004; 32: 58-61.
117. Rubinacci A, Moro GE, Boehm G et al. Quantitative ultrasound for the assessment of osteopenia in preterm infants. *Eur J Endocr* 2003; 149:307-15.

118. Narbona López E, Maldonado Lozano J, García Sánchez D, Galdó Muñoz G, Molina Font JA. Mineralización ósea del fémur en recién nacidos medida por absorciometría de rayos X de doble energía. *An Esp Pediatr* 1994; 41:267-70.
119. Tomlinson C, McDewitt H, Ahmed SF, White MP. Longitudinal changes in bone health as assessed by the speed of sound in very low birth weight preterm infants. *J Pediatr* 2006; 148 (4):450-5.
120. Gonnelli S, Montagnani A, Gennari L, Martini S et al. Feasibility of quantitative ultrasound measurements on the humerus of newborn infants for the assessment of the skeletal status. *Osteoporosis Int* 2004; 15: 541-46.
121. Jaworski M, Lebiedowski M, Lorence RS, Trempe J. Ultrasound bone measurement in pediatrics subjects. *Calcif Tissue Int* 1995;56:368-71
122. McDewitt, Tomlinson C, White MP, Ahmed SF. Quantitative ultrasound assessment of bone in preterm and term neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2005; 90: 341-342.
123. Nemet D, Tzipora D, Wolach B Eliakin A. Quantitative ultrasound measurements of bone speed of sound in premature infants. *Eur J Pediatr* 2001. 160:736-740.
124. Baroncelli GI, Federico G, Vignolo M, Valerio G, del Puente A, Maghnie M, Baserga. Cross-sectional reference data for phalangeal quantitative ultrasound from early childhood to young-adulthood according to gender, age, skeletal growth, and pubertal development. *Bone*. 2006 Jul; 39(1):159-73.
125. Gimeno Ballester J, Azcona San Julián C, Sierrasesúmaga Ariznabarreta L. Estudio de la densidad mineral ósea mediante osteosonografía en niños y adolescentes sanos: valores de normalidad. *An Esp Ped* 2001;54 (6): 540- 546.
126. Indridason OS, Franzson L, Sigurdsson G. Serum osteoprotegerin and its relationship with bone mineral density and markers of bone turnover. *Osteoporos Int*. 2005 Apr; 16(4):417-23.

127. Rogers A, Saleh G, Hannon RA, Greenfield D, Eastell R. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87: 4470-4475.
128. Naylor KE, Rogers A, Fraser RB et al. Serum osteoprotegerin as determinant of bone metabolism in a longitudinal study of human pregnancy and lactation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(11): 5361-5365.
129. Hong JS, Santolaya-Forgas J, Romero R et al. Maternal plasma osteoprotegerin concentration in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193:1011-1015.
130. Masi L, Simonini G, Piscitelli E et al. Osteoprotegerin OPG/RANK-L system in juvenile idiopathic arthritis: is there a potencial modulating rol for OPG/RANK-L in bone injury? *J Reumatol* 2004; 31: 986-91.
131. Yano K, Tsuda E, Washida N et al. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/ osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1998; 14: 518-527.
132. Galluzi F, Stagi S, Salti R et al. Osteoprotegerin serum levels in children with type 1 diabetes: A potential modulating role in bone status. *Eur J Endocr* 2005; 153:879-85.
133. Misra M, Soyka LA, Miller KK, et al. Serum osteoprotegerin in adolescent girl with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88 (8): 3816-22.
134. Szulc P, Hofbauer LC, Heufelder AE, Roth S, delmas PD. Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3162-3165.
135. Vázquez Gámez,MA, Montoya García MJ, Gómez de Tejada Romero MJ, Moruno García R, Carrillo Vico A, Guerrero Montávez JM, Pérez Cano R. Niveles séricos de osteoprotegerina en mujeres sanas y osteoporóticas. *REEMO* 2003; 12(3): 63-67.

-
- 136.** Ueland T, Bollerslev J, Godang K, Muller F, Froland SS, Aukrust P. Increased serum osteoprotegerin in disorders characterized by persistent immune activation or glucocorticoid excess--possible role in bone homeostasis. *Eur J Endocrinol.* 2001 ;145(6):685-90.
- 137.** Gajewska J, Ambroszkiewicz J, Laskowska-Klita T. Osteoprotegerin and C telopeptide of type I collagen in polish healthy children and adolescents. *Adv Med Sci* 2006; 51: 269-72.
- 138.** Buzzi F, Maccarinelli G, Guaragni B, Ruggeri F, Radetti G, Meini A, Mazzolari E, Cocchi D. Serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factors kB (RANKL) concentrations in normal children and in children with pubertal precocity, Turner's syndrome and rheumatoid arthritis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004 Jan;60(1):87-91.
- 139.** Uemura H, Yasui T, Kiyokawa M et al. Serum osteoprotegerin/osteoclastogenesis –inhibitory factor during pregnancy and lactation and the relationship with calcium-regulating hormones and bone turnover markers. *J Endocrinol* 2002; 174:353-359.
- 140.** Christgau S, Bitsch-Jensen O, Hanover Bjarnason N, Gamwell Henriksen E, Qvist P, Alexandersen P, Bang Henriksen D. Serum CrossLaps for monitoring the response in individuals undergoing antiresorptive therapy. *Bone.* 2000 May; 26(5):505-11.
- 141.** Yamaga A, Taga M, Hashimoto S, Ota C. Comparison of bone metabolic markers between maternal and cord blood. *Horm Res.* 1999; 51(6):277-9.
- 142.** Pike JW, Gooze LL, Haussler MR. Biochemical evidence for 1-25-dihydroxyvitamin-D receptor macromolecules in parathyroid, pancreatic, pituitary and placental tissues. *Life Sci* 1980;26: 407-414.
- 143.** Kovar I, Mayne P, Barltrop D. Plasma alkaline phosphatase activity: a screening test for rickets in preterm neonates. *Lancet* 1982; 1: 308-310.

144. Ashmeade T, Pereda L, Chen M, Carver JD. Longitudinal measurements of bone status in preterm infants. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2007; 20(3):415-24.
145. Furmaga-Jablonska W, Kulik-Rechberger B, Kozłowska M. Association between leptin, markers of bone formation and physical growth of newborns. *Ann Hum Biol.* 2003; 30(3):250-61.
146. Yasumizu T, Kato J. Concentrations of serum markers of type I collagen synthesis and degradation and serum osteocalcin in maternal and umbilical circulation. *Endocr J.* 1996; 43(2):191-5.
147. Seki K, Makimura N, Mitsui C, Nagata I. Osteocalcin levels in maternal and cord blood. *Obstet Gynecol.* 1993; 81(2):189-90.
148. Alatas O, Colak O, Alatas E, Tekin B, Inal M, Ozalp S. Osteocalcin metabolism in late fetal life: fetal and maternal osteocalcin levels. *Clin Chim Acta.* 1995; 239(2):179-83.
149. Bodnar LM, Simhan HN, Powers RW, Frank MP, Cooperstein E, Roberts JM. High prevalence of vitamin D insufficiency in black and white pregnant women residing in the northern United States and their neonates. *J Nutr.* 2007; 137(2):447-52.
150. Pawley N, Bishop NJ. Prenatal and infant predictors of bone health: the influence vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(suppl): 1748S-1751S.
151. Nicolaidou P, Haszistamatiou Z, Papadopoulou A et als. Low vitamin D status in mother-newborn pairs in Greece. *Calcif Tissu Int.* 2006; 78:337-342.
152. Delvin EE, Salle BL. Vitamin D and calcium homeostasis in pregnancy: feto-maternal relationships. *Rickets* 1991; 91-105.
153. Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Shafaei AR, Karimi F, Madani FS, Larijan Vitamin D status in mothers and their newborns in Iran. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2007 Feb 12; 7:1.

- 154.** Sachan A, Gupta R, Das V, Agarwal A, Awasthi PK, Bhatia V. High prevalence of vitamin D deficiency among pregnant women and their newborns in northern India. *Am J Clin Nutr.* 2005 May; 81(5):1060-4.
- 155.** Marya RK, Rathee S, Lata V, Mudgil S. Effects of vitamin D supplementation in pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* 1981; 12: 155-161.
- 156.** Maxwell JD, Ang L, Brooke OG, Brown IR. Vitamin D supplements enhance weight gain and nutritional status in pregnant Asians. *Br Med J* 1981; 283: 1024.
- 157.** Weiler H, Fitzpatrick-Wong S, Veitch R et al. Vitamin D deficiency and whole-body and femur bone mass relative to weight in healthy newborns. *CMAJ.* 2005; 172(6): 757–761.
- 158.** Martinez ME, Catalán P, Balaguer G y cols. 25(OH)D levels in diabetic pregnancies relation with neonatal hypocalcemia. *Horm Metabol Res* 1991; 23:38-41.
- 159.** Delmas PD, Glorieux FH, Delvin EE, Salle BL, Melki I. Perinatal serum bone Gla-protein and vitamin D metabolites in preterm and fullterm neonates. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987; 65(3):588-91.
- 160.** Cockburn R, Belton NR, Purvis RJ et al. Maternal vitamin D intake and mineral metabolism in mothers and their newborn infants. *Br Med J* 1980; 281:11-14.

