

VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA (H·A)

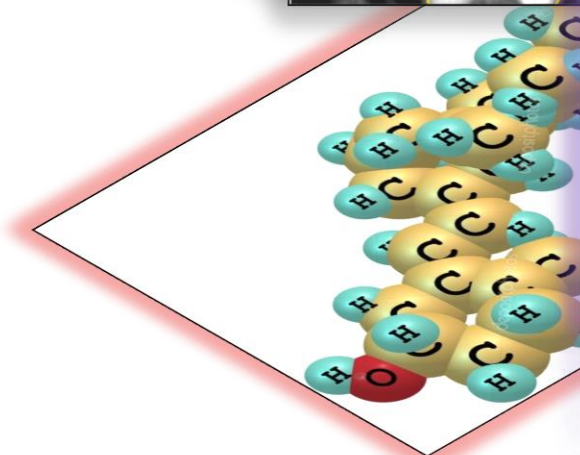
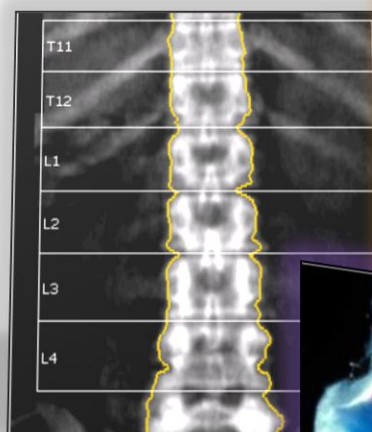
Facultat de Medicina i Odontologia

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN
MEDICINA (3139)

València, Julio de 2018

VALORACIÓN DE LOS NIVELES MATERNO-FETALES
DE 25-OH VITAMINA D Y GRADO DE
MINERALIZACIÓN ÓSEA DEL RECIÉN NACIDO



Presentada por:
Irene Ruiz Alcàntara

Directores:

Dr. Javier Estañ Capell
Dra. Susana Ferrando Monleón
Dr. Jaime Fons Moreno



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

M'agradaria expressar el meu agraïment a tots els professionals, amics i familiars que han fet possible la realització d'aquesta tesi, i en especial a:

Els meu director de tesi Jaime Fons per la generositat d'haver compartit amb mi els seus amplis coneixements, anys d'experiència i capacitat científica, en un marc de confiança, afecte i amistat que han fet possible la consecució d'aquest treball.

A la meua codirectora Susana Ferrando per haver-me animat a emprendre aquest camí i per la seva ajuda incondicional durant cadascuna de les etapes del desenvolupament de la tesi, per haver sigut per a mi sempre un gran exemple de treball i esforç i, principalment, per la seua amistat.

Al meu codirector Javier Estañ que, tot i haver-se incorporat més tard al projecte, ha mostrat sempre un gran compromís amb ell. Per la seua encertada orientació i discussió crítica que han permès un bon aprofitament del treball realitzat i que aquesta tesi arribés a bon terme en un període de temps raonable.

A Ricardo Bou, el "mag de l'estadística", que ha atès pacient tots els meus dubtes, ha resolt totes les dificultats metodològiques i ha sabut fer-me entendre tot allò em semblava incompreensible.

A Jesús Cervera, obstetra i treballador incansable i a tots els membres de l'equip de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital de la Ribera que, d'una forma o altra, han col·laborat en l'estudi.

A Pedro Estela, metge de laboratori encarregat de realitzar les determinacions bioquímiques. El seu gran coneixement sobre la vitamina D ha estat fonamental en la interpretació dels resultats. I a tots els tècnics del seu laboratori per la cura que han mostrat en el processat de les mostres i per la càrrega addicional de treball que els ha suposat.

A Belén Collado, per l'enorme i acurat treball realitzat amb les enquestes nutricionals. Perquè no hi ha dificultat que la seua alegria vital no solucione.

A Ceclia Martínez i a María Ángeles Montal, que ens van assessorar en la realització de l'estudi nutricional. Gràcies per compartir amb nosaltres la vostra gran experiència en l'àmbit de la Nutrició i la Dietètica.

A Luís Miguel del Río, que em va guiar en els primers passos per a la realització de densitometries en els nostres joves pacients. Als tècnics de radiologia (Adrià, Ruth i Marta) que han realitzat les densitometries. Per l'entusiasme mostrat i per la gran paciència i professionalitat amb la que heu treballat amb els nadons.

A tot l'equip de comares de l'àrea d'Alzira que establiren el primer contacte amb les mares per a oferir-los la participació en l'estudi. Sense la vostra ajuda mai no s'haguera pogut posar en marxa el projecte.

A tots els meus companys del Servei de Pediatria; i més que companys, amics. Sempre m'he sentit recolzada i acompanyada per vosaltres en aquest llarg camí. I a tota la resta de personal (residents, infermeres, auxiliars i zeladors) que formen part de la gran família de Pediatria i que feu que anar a treballar cada matí no suppose per a mi cap esforç.

A Julia, la meua companya al Servei de Nounats des de ja fa quasi deu anys. Perquè haver recorregut juntes el camí cap al Doctorat m'ha permès admirar-te i respectar-te més, encara si cap, com a professional. Els teus consells i recomanacions han estat una gran ajuda.

A totes les mares i famílies que han participat en l'estudi i que tan generosament han cedit part del seu temps en atendre els nostres requeriments. Gràcies per haver-nos deixat formar part d'un moment tan especial en la vida d'una dona com és l'embaràs i la maternitat.

A Javi, per totes les hores en família que s'han hagut de posposar. Les anirem recuperant...I per haver entès que açò era important per a mi. Per estar sempre al meu costat en tots els meus projectes.

A la meua germana Sonia. Per a mi no hi ha major reconeixement que el que tu sempre em fas arribar.

A totes aquelles persones (amics de la infància i facultat, cosins i oncles, companys de residència, gent del córrer, etc.) que, assabentats de que estava immersa en aquest projecte, sempre s'han interessat per la seua marxa i m'han fet arribar els seus millors desitjos. Una vegada vaig escoltar una frase que em va agradar molt: "La sort de que et vulguin be". Es així com jo em sent amb tota la gent que m'envolta.

A Jordi i a Blanca,

Perquè el vostre somriure fa tirar endavant qualsevol projecte

Als meus pares,

RESUMEN

Título: VALORACIÓN DE LOS NIVELES MATERNO-FETALES DE 25-OH VITAMINA D Y GRADO DE MINERALIZACIÓN ÓSEA DEL RECIÉN NACIDO

Introducción: La Vitamina D (VD) se obtiene mayoritariamente de la síntesis endógena cutánea tras exposición solar y, en menor medida, del aporte dietético. Su función fundamental es asegurar unos niveles séricos adecuados de calcio y fósforo que permitan una adecuada mineralización ósea. Su déficit durante la edad pediátrica causa raquitismo y podría afectar a la adquisición del pico de masa ósea durante la pubertad, lo que ha motivado que diversas recomendaciones para su suplementación. Pero hasta la fecha se desconoce qué efecto pueden tener los niveles bajos de 25(OH)VD o calcidiol de las embarazadas sobre la mineralización del esqueleto fetal.

Objetivo Principal: Conocer si existe relación entre los niveles de 25(OH)VD de las mujeres embarazadas y la Densidad Mineral Ósea (DMO) de los recién nacidos.

Pacientes y Métodos: Estudio observacional descriptivo y analítico prospectivo llevado a cabo en embarazadas del Departamento de Salud de La Ribera (Comunidad Valenciana) reclutadas, en el primer trimestre de gestación, entre enero-diciembre del 2014, y en sus recién nacidos. Se realizaron dos determinaciones analíticas durante el embarazo (A1: semana 23 a 26 y A2: parto) y en los recién nacidos (sangre de cordón y a las 24-48 horas de vida) para el estudio de los valores de 25(OH)VD, PTH, Calcio, Fósforo, FA, Proteínas Totales y Albumina. Se recopilaron los datos demográficos, obstétricos y de estilo de vida de las embarazadas (incluyendo la determinación del aporte dietético de VD mediante registro de 3 días y cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, CFCA), así como los relativos al parto y antropometría de los recién nacidos. En las semanas 20 y 34 de gestación se estimaron mediante ecografía 3D diferentes longitudes y áreas del fémur fetal y se realizó una densitometría dual de rayos-X (DEAXA) de columna lumbar (L1-L4) a los recién nacidos antes de los 15 días de vida para la obtención de contenido mineral óseo (CMO en g) y densidad mineral ósea (DMO en g/cm²)

Resultados: La muestra final del estudio está compuesta por 101 parejas de madres (media de edad 31,5±4,8 años) y recién nacidos (55,4% varones, edad gestacional media 39,9±1,4 semanas y promedio de peso 3245±470 g). El valor medio de 25(OH)VD es 17,0±8,4 ng/ml (A1) y 17,5±9,1 ng/ml (A2) con una prevalencia de déficit de VD (valores inferiores a 20 ng/ml) del 66,3% (IC del 95% 55,1-73,7 %) y del 57,5% (IC del 95% 48,7-67,2%) respectivamente. El sobrepeso materno (OR 19,5; IC 95%: 2,2-176,0) y el periodo invernal (OR 5,5; IC 95% 1,7-17,4) actuaron como factores de riesgo para el déficit de VD, mientras que la realización de actividad física regular actuó como factor protector (OR 0,2; IC 95% 0,05- 0,8). Ninguna de las variables relacionadas

con el aporte endógeno (tiempo de exposición solar) o exógeno (dieta y/o empleo de suplementación) de VD se perfilaron como relevantes para padecer déficit durante el embarazo, pero las embarazadas no caucásicas y/o las de fototipo cutáneo oscuro presentaron valores medios inferiores de 25(OH)VD durante la gestación (5,9 y 13,2 ng/ml respectivamente). No hemos encontrado asociación entre los valores maternos de VD en el momento del parto y la somatometría de los recién nacidos. El valor medio de calcidiol en sangre de cordón ($19,7 \pm 10,4$ ng/ml) muestra una correlación significativa con el materno en el momento del parto ($r = 0,868$; $r^2 = 0,764$; $p < 0,001$). No se encontró una correlación significativa entre los valores ecográficos de longitud femoral (LF), índice de ensanchamiento epifisario (IE) o volumen femoral (VF) en la semana 20 o 34 y los niveles maternos de 25(OH)VD en los análisis más recientes. En los 95 estudios de DEXA realizados tras el nacimiento (mediana 10 días de vida) se obtuvo un valor medio de DMO (L1-L4) de $0,259$ g/cm² (DE 0,052) con un rango de valores entre $0,129 - 0,360$ g/cm² y sin diferencias entre sexos. No se halló correlación lineal significativa entre el valor de DMO y las mediciones ecográficas relativas (IE, VF), ni tampoco con los valores de fosfatasa alcalina total (FA) a nivel de sangre de cordón ($r = 0,03$; $p = 0,82$) o en muestra sanguínea de los recién nacidos ($r = -0,17$; $p = 0,13$). En el análisis multivariante, el bajo peso de los recién nacidos fue el factor que más determinó la DMO (OR 78,04; IC 95% 5,33-1141,61; $p=0,01$). El valor de calcidiol de la madre en el momento del parto actuó como factor de protección débil para el déficit de mineralización de los recién nacidos (RR 0,9; IC 95% 0,8 – 1,0): por cada incremento de 1 ng/dl en el valor medio materno de VD se redujo en un 1% la probabilidad de que el valor de DMO fuese inferior al percentil 25.

Conclusiones: Existe una elevada proporción de embarazadas con valores de 25(OH)VD inferiores a 20 ng/ml. Existe una variación estacional de los valores de 25(OH)VD durante embarazo, con los niveles más bajos alcanzados en los meses finales de invierno e inicio de primavera. El sobrepeso materno y la ausencia de actividad física son factores de riesgo para el déficit de VD. Se observa una escasa influencia de los niveles de calcidiol sobre el grado de mineralización del esqueleto de los recién nacidos. El tamaño de los recién nacidos es el principal determinante del grado de mineralización del esqueleto fetal y no se observa correlación entre el valor de DMO (g/cm²) obtenido mediante DEXA y otros indicadores indirectos de mineralización (mediciones ecográficas prenatales, absolutas o relativas, del hueso fetal o valores de fosfatasa alcalina total).

Title: ASSESSMENT OF THE MATERNAL-FETAL LEVELS OF 25-OH VITAMIN D AND DEGREE OF BONE MINERALIZATION OF THE NEWBORN.

Introduction: Vitamin D (VD) is obtained mainly from endogenous skin synthesis by sun exposition and, to a lesser extent, by dietary intake. Its main function is to ensure calcium and phosphorus serum levels to allow adequate bone mineralization. VD deficiency during pediatric age causes rickets and it could affect the bone peak mass during puberty. This fact has motivated recommendations for its supplementation in children. But nowadays, the consequences of low levels of 25(OH)VD or calcidiol in pregnant women on the fetal skeleton mineralization are unknown.

Main objective: To establish if there is a relationship between 25(OH)VD in pregnant women and newborns' Bone Mineral Density (BMD).

Patients and methods: Observational descriptive and prospective analytical study carried out in La Ribera Department Health (Comunidad Valenciana). Pregnant women were recruited during the first trimester of pregnancy, between January-December 2014, and their newborns. Two analytical determinations were performed during pregnancy (A1: week 23 to 26 and A2: childbirth) and in newborns (cord blood and at 24-48 hours of life) studying 25(OH)VD, PTH, calcium, phosphorus, alkaline phosphatase (ALP), total proteins and albumin. Demographic, obstetric and lifestyle details of pregnant women (dietary VD assessment using a 3 days registration and a food frequency questionnaire, FFQ), and those relating to childbirth and newborn's anthropometry were registered. In the weeks 20 and 34 of gestation, 3d-ultrasound was used to obtain different fetal femur lengths and areas and a dual X-ray densitometry (DEXA) of the lumbar spine (L1-L4) was performed in newborns before 15 days of life to obtain bone mineral content (BMC in g) and bone mineral density (BMD in g/cm²).

Results: The final sample of the study was 101 couples of mothers (median age 31,5 ± 4.8 years) and newborns (55,4% males, mean gestational age 39,9 ± 1,4 weeks and median weight 3245 ± 470 g). The mean value of 25 (OH) VD was 17,0 ± 8,4 ng / ml (A1) and 17,5 ± 9,1 ng / ml (A2) with a prevalence of VD deficiency (VD less than 20 ng / ml) of 66,3% (95% CI 55,1-73,7%) and 57,5% (95% CI 48,7-67,2%) respectively. Maternal overweight (OR 19,5; 95% CI 2,2-176,0) and the winter months (OR 5,5; 95% CI 1,7-17,4) was a risk factor for VD deficiency, regular physical activity was protective (OR 0,2; 95% CI 0,05-0,8). None of the variables related to the endogenous (time of exposure to the sun) or exogenous (diet and / or supplementation) intake of VD were profiled as being relevant for deficiency during pregnancy, but non-caucasian pregnant women and / or those of dark skin phototype showed lower 25(OH)VD mean values

during pregnancy (5,9 and 13,2 ng / ml respectively). We did not find an association between maternal VD values at the time of delivery and newborn anthropometry. The mean value of calcidiol in cord blood ($19,7 \pm 10,4$ ng / ml) was significantly correlated with maternal at the time of delivery ($r = 0,868$, $r^2 = 0,764$, $p < 0,001$). No significant correlation was found between femoral length (FL), epiphyseal widening index (IE) or femoral volume (FV) at week 20 or 34 and maternal levels of 25(OH)VD. In the 95 DEXA studies obtained after birth (median 10 days of life), median BMD (L1-L4) was $0,259$ g/cm² with a range between $0,129$ - $0,360$ g/cm² and no sex differences. No significant linear correlation was found between BMD and relative ultrasonographic measurements (IE, FV), nor with cord blood or newborn ALP values ($r = 0,03$; $p = 0,82$ and $r = -0,17$; $p = 0,13$ respectively). In multivariate analysis, newborns' low weight was clearly associated to BMD (OR 78,04; 95% CI 5,33-1141,61; $p = 0,01$). Maternal calcidiol at the time of delivery was a weak protective factor for suboptimal mineralization of newborns (RR 0,9; 95% CI 0,8-1,0): for each increment of 1 ng/dl in the mean maternal VD, the probability that BMD was lower the 25th percentile was reduced by 1%.

Conclusions: There was a high proportion of pregnant women with 25(OH)VD levels lower than 20 ng/ml with a seasonal variation during pregnancy. The lowest levels reached at the final months of winter and beginning of spring. Maternal overweight and lack of physical activity were risk factors for VD deficiency. There was a slight association between calcidiol levels and mineralization in newborns. The size of the newborns was the main determinant of the degree of mineralization of the fetal skeleton. No correlation was observed between BMD (g/cm²) and other indirect indicators of mineralization (prenatal absolute, relative ultrasonographic fetal bone measurements or total alkaline phosphatase values).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.EL HUESO DURANTE LA EDAD PEDIÁTRICA	3
1.1.1.<u>DESARROLLO ÓSEO FETAL</u>	4
1.1.1.1.OSIFICACIÓN MEMBRANOSA	4
1.1.1.2.OSIFICACIÓN ENDOCONDRALE	5
1.1.2.<u>DESARROLLO ÓSEO POSTNATAL</u>	7
1.1.3.<u>CLASIFICACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO</u>	8
1.1.4.<u>MINERALIZACIÓN ÓSEA</u>	9
1.1.4.1.REGULACIÓN NO HORMONAL	11
<i>1.1.4.1.1.Factores nutricionales</i>	
1.1.4.1.1.1.Vitamina A	
1.1.4.1.1.2.Vitamina K	
1.1.4.1.1.3.Aporte de sodio	
<i>1.1.4.1.2.Equilibrio ácido-base</i>	
<i>1.1.4.1.3.Factores mecánicos</i>	
1.1.4.2.REGULACIÓN HORMONAL	14
1.1.4.2.1.Vitamina D	
1.1.4.2.2.Hormona Paratiroidea	
1.1.4.2.3.Proteína relacionada con la hormona paratiroidea	
1.1.4.2.4.Calcitonina	
1.1.4.2.5.Fosfatoninas y Factor de crecimiento fibroblástico 23	
(FGF23)	
1.1.4.2.5.1.Acciones en el riñón	
1.1.4.2.5.2.Acciones en la glándula paratiroidea	
1.1.4.2.5.3.Acciones en el hueso	
1.1.4.2.6.Integración hormonal e interacciones en la regulación	
de la homeostasis mineral. Eje osteo-renal VD-PTH-FGF23	
1.1.5.<u>EVALUACIÓN DE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA DEL RECIÉN</u>	
<u>NACIDO</u>	27

1.3.2.3.MAGNESIO	67
1.3.3.HORMONAS CALCITROPAS Y MARCADORES BIOQUÍMICOS	
<u>ÓSEOS FETALES</u>	68
1.3.3.1.PTH Y PTHrP	68
1.3.3.2.VD	70
1.3.3.3.CALCITONINA	71
1.3.3.4.MARCADORES ÓSEOS DURANTE EL DESARROLLO FETAL	73
1.3.4.METABOLISMO MINERAL Y DE LA VD EN EL RECIÉN	
<u>NACIDO</u>	75
1.4.ALTERACIÓN DE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA	
CAUSADA POR DÉFICIT DE VD	78
1.4.1.DEFINICIÓN DEL UMBRAL DE DÉFICIT DE VD	78
1.4.1.1.RIESGO DE FRACTURAS Y RAQUITISMO	78
1.4.1.2.NIVELES DE PTH	79
1.4.1.3.CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN BIOPSIA ÓSEA	80
1.4.2.PREVALENCIA DEL DÉFICIT DE VD Y GRUPOS DE	
<u>RIESGO</u>	82
1.4.2.1.EMBARAZADAS	83
1.4.2.2.LACTANTES	84
1.4.3.EFECTOS ESQUELÉTICOS Y SOBRE EL METABOLISMO	
<u>FOSFOCÁLCICO DEL DÉFICIT DE VD</u>	84
1.5.IMPLICACIONES DEL DÉFICIT DE VD DURANTE EL	
EMBARAZO	85
1.5.1. <u>COMPLICACIONES CALCÉMICAS Y ESQUELÉTICAS</u>	86
1.5.2. <u>CRECIMIENTO FETAL</u>	87
1.5.3. <u>PREECLAMPSIA</u>	89
1.5.4. <u>DIABETES GESTACIONAL</u>	89

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	91
3. OBJETIVOS.....	93
3.1.OBJETIVO PRINCIPAL	94
3.2.OBJETIVOS SECUNDARIOS	94
4. PACIENTES Y MÉTODOS.....	95
4.1.DISEÑO DEL ESTUDIO	96
4.2.POBLACIÓN	96
4.2.1.CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	97
4.2.2.CARACTERÍSTICAS GEOGRÁFICAS, SOCIODEMOGRÁFICAS <u>Y CLIMATOLÓGICAS DEL DEPARTAMENTO 11</u>	97
4.3.MÉTODOS	98
4.3.1.ETAPAS DEL ESTUDIO	98
4.3.1.1.ETAPA 1: INCLUSIÓN DE MUJERES EMBARAZADAS	98
4.3.1.2.ETAPA 2: SEGUIMIENTO DURANTE EL EMBARAZO	99
4.3.1.3.ETAPA 3: PARTO Y PERIODO PERINATAL INMEDIATO	99
4.3.1.4.ETAPA 4: PERIODO POSTNATAL. REALIZACIÓN DE DENSITOMETRÍAS	100
4.3.2.VARIABLES A ESTUDIO	102
4.3.2.1.CUESTIONARIO INICIAL	102
4.3.2.2.VARIABLES REGISTRADAS DURANTE EL EMBARAZO	102
4.3.2.3.VARIABLES REGISTRADAS EN EL MOMENTO DEL PARTO ...	102
4.3.3.INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN	103
4.3.3.1.ESTUDIO ANTROPOMÉTRICO	103

4.3.3.2.FOTOTIPO CUTÁNEO	103
4.3.3.3.MEDIDA DE LA EXPOSICIÓN SOLAR	104
4.3.3.4.MEDIDA DE LA ACTIVIDAD FÍSICA	104
4.3.3.5.ANÁLISIS DE LABORATORIO	105
4.3.3.6.ESTUDIO DIETÉTICO	106
4.3.3.6.1.Registro de 3 días	
4.3.3.6.2.Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA)	
4.3.3.7.ESTUDIO ECOGRÁFICO	107
4.3.3.8.ESTUDIO DENSITOMÉTRICO	108
4.3.4. <u>EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS RESULTADOS</u>	112
4.3.4.1.ANÁLISIS PRIMARIO DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS	112
4.3.4.2.ESTUDIO DE LAS VARIABLES ASOCIADAS AL DÉFICIT DE VD EN LAS MADRES	113
4.3.4.3.ESTUDIO DE LOS FACTORES ASOCIADOS AL ESTUDIO DE MINERALIZACIÓN ÓSEA DEL RECIÉN NACIDO	113

5. RESULTADOS.....114

5.1.DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA115

5.1.1.TAMAÑO Y DIAGRAMA DE FLUJO115

5.1.2.DATOS RELACIONADOS CON LA ESTACIONALIDAD117

5.1.3.DATOS DEMOGRÁFICOS DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO...119

5.1.3.1.MUNICIPIOS DE REMISIÓN119

5.1.3.2.VARIABLES DEMOGRÁFICAS DE LAS EMBARAZADAS120

5.1.3.3.VARIABLES OBSTÉTRICAS Y COMPLICACIONES DURANTE EL EMBARAZO124

5.1.3.4.DATOS PERINATALES	124
5.1.3.5.ANTROPOMETRÍA Y ALIMENTACIÓN DE LOS RECIÉN NACIDOS	127
5.1.3.6.CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ÁRABE	129
5.1.4. <u>CUESTIONARIOS MATERNOS: ESTILO DE VIDA Y DIETA DE LAS EMBARAZADAS</u>	130
5.1.4.1.GRADO DE CUMPLIMENTACIÓN	130
5.1.4.2.ACTIVIDAD FÍSICA	130
5.1.4.3.EXPOSICIÓN SOLAR Y EMPLEO DE CREMA PROTECTORA ...	131
5.1.4.4.APORTE DIETÉTICO DE VD Y CALCIO	131
5.1.4.5.EMPLEO DE SUPLEMENTACIÓN	135
5.2.ANÁLISIS POR OBJETIVOS	137
5.2.1. <u>HORMONAS CALCITROPAS Y MARCADORES BIOQUÍMICOS DE MINERALIZACIÓN ÓSEA DURANTE EL EMBARAZO</u>	137
5.2.1.1.CAMBIOS EN LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DURANTE EL EMBARAZO	139
5.2.1.2.ESTACIONALIDAD DE LOS NIVELES MATERNOS DE CALCIDIOL	141
5.2.1.3.EVOLUCIÓN DE LOS NIVELES DE CALCIDIOL DURANTE EL EMBARAZO	143
5.2.1.4.CORRELACIÓN ENTRE LOS VALORES DE 25(OH)VD Y EL RESTO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HORMONALES EN LAS MUJERES GESTANTES	144
5.2.2. <u>DÉFICIT DE VITAMINA D DURANTE EL EMBARAZO</u>	146
5.2.2.1.PREVALENCIA DEL DÉFICIT DE VD DURANTE EL EMBARAZO.....	146
5.2.2.2.ANÁLISIS BIVARIABLE DE LOS FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL DÉFICIT DE VD EN LAS EMBARAZADAS	146

5.2.2.3. MODELO MULTIVARIABLE DEL DÉFICIT DE VD DURANTE EL EMBARAZO	150
5.2.2.4. PATOLOGÍA MATERNA ASOCIADA AL DÉFICIT DE VD	152
5.2.2.5. TIPO DE PARTO Y NIVELES DE 25(OH)VD	152
5.2.2.6. ANTROPOMETRÍA DE LOS RECIÉN NACIDOS Y NIVELES MATERNOS DE 25(OH)VD	153
5.2.3. <u>NIVELES DE LAS HORMONAS CALCITROPAS Y DE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS DE MINERALIZACIÓN ÓSEA EN EL RECIÉN NACIDO</u>	155
5.2.3.1. CORRELACIÓN CON LOS VALORES MATERNOS Y EVOLUCIÓN TEMPORAL	158
5.2.3.1.1. <i>Calcio, fosforo y PTH</i>	
5.2.3.1.2. <i>Fosfatasa alcalina</i>	
5.2.3.1.3. <i>Vitamina D</i>	
5.2.3.2. INFLUENCIA DEL ESTADO MATERNO DE VD SOBRE EL RESTO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DEL METABOLISMO MINERAL EN EL RECIÉN NACIDO	161
5.2.4. <u>ESTUDIO MEDIANTE IMAGEN DE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA FETAL Y EN LOS RECIÉN NACIDOS</u>	162
5.2.4.1. ESTUDIO ECOGRÁFICO FETAL	162
5.2.4.1.1. <i>Correlación bivariada entre los indicadores ecográficos y factores demográficos de las embarazadas y los recién nacidos</i>	
5.2.4.1.2. <i>Influencia del estado materno de VD e ingesta dietética de calcio sobre las mediciones ecográficas fetales</i>	
5.2.4.2. VALORES NEONATALES DE DMO OBTENIDOS MEDIANTE DEXA	170
5.2.4.3. CORRELACIÓN ENTRE LOS ÍNDICES ECOGRÁFICOS FETALES Y EL ESTUDIO DE DMO NEONATAL	172

5.2.4.4.	<i>CORRELACIÓN ENTRE LOS INDICADORES BIOQUÍMICOS Y HORMONALES Y EL GRADO DE MINERALIZACIÓN</i>	172
5.2.4.5.	<i>INFLUENCIA DEL PESO DEL RECIÉN NACIDO SOBRE LOS RESULTADOS DE DMO AREAL</i>	173
5.2.4.6.	<i>PAPEL DE LA DIETA MATERNA EN EL GRADO DE MINERALIZACIÓN DEL ESQUELETO FETAL</i>	175
5.2.5.	<u>FACTORES DETERMINANTES DEL DÉFICIT DE MINERALIZACIÓN NEONATAL</u>	177
5.2.5.1.	<i>ANÁLISIS BIVARIABLE</i>	177
5.2.5.2.	<i>ANÁLISIS MULTIVARIANTE</i>	180
6.	DISCUSIÓN	182
6.1.	CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	183
6.1.1.	<u>DISTRIBUCIÓN TEMPORAL Y RECLUTAMIENTO</u>	183
6.1.2.	<u>DATOS DEMOGRÁFICOS</u>	184
6.1.3.	<u>DATOS OBSTÉTRICOS</u>	184
6.1.4.	<u>ANTROPOMETRÍA Y ALIMENTACIÓN DE LOS RECIÉN NACIDOS</u>	185
6.1.5.	<u>ESTUDIO NUTRICIONAL. DATOS APORTADOS SOBRE CONSUMO DE VD Y CALCIO. EMPLEO DE SUPLEMENTACIÓN</u>	186
6.2.	EVOLUCIÓN DURANTE EL EMBARAZO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HORMONAS CALCITROPAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO FOSFOCLACICO	189
6.2.1.	<u>NIVELES DE CALCIO Y FÓSFORO</u>	189
6.2.2.	<u>FOSFATASA ALCALINA</u>	190
6.2.3.	<u>VITAMINA D</u>	191

6.2.3.1.	<i>MODIFICACIONES INDIVIDUALES DURANTE LA GESTACIÓN</i>	191
6.2.3.2.	<i>ESTACIONALIDAD Y EXPOSICIÓN SOLAR</i>	192
6.2.4.	<u>HORMONA PARATIROIDEA. INTERACCIÓN CON LOS NIVELES DE VD</u>	196
6.2.5.	<u>INTEGRACIÓN DE LAS MODIFICACIONES EN EL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO ACONTECIDAS DURANTE EL EMBARAZO</u>	197
6.3.	<i>DÉFICIT DE VD DURANTE EL EMBARAZO</i>	198
6.3.1.	<u>INTEGRACIÓN DE LAS MODIFICACIONES EN EL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO ACONTECIDAS DURANTE EL EMBARAZO</u>	198
6.3.2.	<u>FACTORES DE RIESGO</u>	201
6.3.2.1.	<i>ESTACIONALIDAD</i>	201
6.3.2.2.	<i>FACTORES DEMOGRÁFICOS MATERNOS</i>	201
6.3.2.2.1.	Índice de Masa Corporal	
6.3.2.2.2.	Paridad	
6.3.2.2.3.	Etnia y fototipo cutáneo	
6.3.2.3.	<i>ESTILO DE VIDA</i>	206
6.3.2.3.1.	Tabaquismo materno	
6.3.2.3.2.	Actividad física y exposición solar	
6.3.2.4.	<i>APORTE DIETÉTICO Y EMPLEO DE SUPLEMENTACIÓN</i>	208
6.3.3.	<u>CONSECUENCIAS OBSTÉTRICAS Y PERINATALES DEL DÉFICIT DE VD DURANTE EL EMBARAZO</u>	209
6.3.3.1.	<i>PATOLOGÍA MATERNA ASOCIADA AL DÉFICIT DE VD</i>	210
6.3.3.1.1.	Preeclampsia	
6.3.3.1.2.	Diabetes gestacional	
6.3.3.2.	<i>TIPO DE PARTO</i>	211

6.3.3.3.SOMATOMETRÍA DE LOS RECIÉN NACIDOS.....	212
6.4.VALORES ANALÍTICOS NEONATALES RELACIONADOS CON LA MINERALIZACIÓN ÓSEA	214
6.4.1. <u>CAMBIOS EN EL EQUILIBRIO MINERAL ACONTECIDOS TRAS EL PARTO</u>	214
6.4.2. <u>FOSFATASA ALCALINA</u>	215
6.4.3. <u>VITAMINA D</u>	217
6.4.3.1. <i>VALORES EN SANGRE DE CORDÓN Y CORRELACIÓN CON LOS VALORES MATERNOS</i>	217
6.4.3.2. <i>EVOLUCIÓN TEMPORAL</i>	219
6.4.3.3. <i>INTERACCIÓN CON EL RESTO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS</i>	220
6.5.VALORACIÓN ECOGRÁFICA DEL HUESO FETAL	221
6.5.1. <u>NIVEL DE CORRELACIÓN CON LOS VALORES DE REFERENCIA</u>	221
6.5.2. <u>ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES MATERNOS DE CALCIDIOL E INGESTA DE CALCIO Y LOS INDICADORES ECOGRÁFICOS DE MINERALIZACIÓN FETAL</u>	223
6.6.VALORES DE DENSIDAD MINERAL ÓSEA EN LOS RECIÉN NACIDOS	226
6.7.CORRELACIÓN ENTRE DMO Y OTROS MARCADORES INDIRECTOS DE MINERALIZACIÓN	227
6.7.1. <u>CORRELACIÓN ENTRE DMO Y PARÁMETROS BIOQUÍMICOS: FOSFATASAS ALCALINAS</u>	227
6.7.2. <u>CORRELACIÓN ENTRE DMO Y EL ESTUDIO ECOGRÁFICO DE MINERALIZACIÓN FETAL</u>	228
6.7.3. <u>CORRELACIÓN ENTRE DMO Y LOS NIVELES DE VD</u>	229

6.8.DETERMINANTES DEL GRADO DE MINERALIZACIÓN DE LOS RECIÉN NACIDOS	232
6.8.1.<u>RELACIÓN ENTRE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA Y LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS EMBARAZADAS</u>	232
6.8.2.<u>RELACIÓN ENTRE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA Y EL APOORTE NUTRICIONAL DE LAS EMBARAZADAS</u>	235
6.8.3.<u>ESTACIÓN DEL PARTO Y GRADO DE MINERALIZACIÓN ..</u>	236
6.8.4.<u>RELACIÓN ENTRE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA Y EL SEXO DEL RECIÉN NACIDO</u>	237
6.8.5.<u>RELACIÓN ENTRE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA Y LA SOMATOMETRÍA DE LOS RECIÉN NACIDOS</u>	237
7. CONCLUSIONES.....	240
8. BIBLIOGRAFÍA.....	243
9. ANEXOS.....	288
9.1.ANEXO 1. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE.....	289
9.2.ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	292
9.3.ANEXO 3. REGISTRO DE 3 DÍAS DE CONSUMO DE ALIMENTOS.....	293
9.4.ANEXO 4. CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS.....	296
9.5.ANEXO 5. CUESTIONARIO SOBRE ESTILO DE VIDA....	297

ABREVIATURAS

- 1,25(OH)₂VD: 1,25-dihidroxicolecalciferol o calcitriol
- 1α-OHasa: 25-hidroxitamina D-1-α-hidroxilasa
- 24,25(OH)₂VD: 24,25-dihidroxitamina D
- 25(OH)VD: 25-hidroxitamina D o calcidiol
- 25-OHasa: 25-hidroxitamina D-hidroxilasa (CYP27A1, CYP2R1)
- A1: primera determinación analítica materna (23-26 semanas de gestación)
- A2: segunda determinación analítica materna (parto)
- ACV; accidente cerebrovascular
- ADHR: raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante
- Ad-SOS: velocidad de transmisión dependiente de la amplitud
- AE: éster de acridinio
- AEG: adecuado para la edad gestacional
- AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
- AI: ingesta adecuada (*adequate intake*)
- AMD: área metafisaria distal
- AMP: amino-metil-propanolol
- ANK: anakinra
- aQTC: tomografía computarizada cuantitativa axial
- ARHD: raquitismo hipofosfatémico autosómico recesiva
- ASARM: ácido rico en serina aspartato asociado a MEPE
- AVP: arginina vasopresina
- BALP: fosfatasa alcalina ósea
- BCG: verde de bromocresol
- BEDCA: Base Española de Datos de Composición de Alimentos
- BMC: *bone mineral content*
- BMD: *bone mineral density*
- BSP: sialoproteína ósea (*bone sialoprotein*)
- Ca: calcio
- Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂: hidroxiapatita
- CaBP: proteína de unión al calcio (*calcium binding protein*) o calbindina
- CaHPO₄: hidrógenofosfato de calcio
- CaMKII: Ca²⁺/calmodulina proteína quinasa II
- CaSR: receptor de sensor cálcico
- CFCA: cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos
- CMO: contenido mineral óseo
- CPA: célula presentadora de antígenos
- CTX: telopéptido C-terminal del colágeno de tipo I
- CV: coeficiente de variación

- CYP: Citocromo P450
- DBD: dominio de unión al DNA (*DNA binding domain*) de la VDR
- DE: desviación estándar
- DEXA: absorciometría dual de rayos X
- DFM: diámetro femoral medio
- DG: diabetes gestacional
- DMO: densidad mineral ósea
- DMOa: densidad mineral ósea areal
- DMOv: densidad mineral ósea volumétrica
- DMP: diámetro metafisario proximal
- DMP1: glicoproteína derivada de la matriz proteica de la dentina de tipo 1
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DPD: desoxipiridolina
- DRI: ingestas dietéticas de referencia (*dietary reference intakes*)
- EAR: necesidad promedio estimada (*estimated average requirement*)
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- EM: esclerosis múltiple
- EEM: error estándar de la media
- ENIDE: Encuesta Nacional de Ingesta Dietética
- ENPP1: ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1
- ENPP3: ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 3
- ERC: enfermedad renal crónica
- ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares
- FA: fosfatasa alcalina total
- FANET: fosfatasa alcalina no específica de tejido
- FAP: fosfatasa alcalina placentaria
- FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23
- FGFR: receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
- FGFR1c: receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1c
- FUR: fecha última regla
- GC: globulina de componente grupo-específico
- Hoxa3 null: modelo animal con ausencia de paratiroides/PTH
- HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia (*high performance liquid chromatography*)
- HTA: hipertensión arterial
- Hyp: modelo animal de la hipofosfatemia ligada al X
- IAM: infarto agudo de miocardio
- IC: intervalo de confianza
- ICTP: *carboxyterminal telopeptide of type I collagen*
- IE: índice de ensanchamiento
- Ihh: Indian hedgehog
- IMC: índice de masa corporal

- INE: Instituto Nacional de Estadística
- IOF: Fundación Internacional para la Osteoporosis
- IOM: Institute of Medicine
- IP: índice ponderal
- IRC: insuficiencia renal crónica
- ISCD: Sociedad Internacional de Densitometría Clínica
- ISI: índice de sensibilidad a la insulina
- LBD: dominio de unión al ligando (*ligand binding domain*) de la VDR
- LF: longitud femoral
- MAPK: proteína quinasas activadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*)
- M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos (*macrophage colony stimulating factor*)
- MED: dosis eritematosa mínima (*minimal erythema dose*)
- MEPE: fosfoglicoproteína derivada de la matriz extracelular (*matrix extracellular phosphoglycoprotein*)
- MGP: proteína de matriz Gla
- NaPi-IIa: cotransportador de sodio-fosfato tipo IIa
- NaPi-IIc: cotransportador de sodio-fosfato tipo IIc
- NKF-KDOQI: National Kidney Foundation-Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
- NR: no realizado
- NS: no significativo
- NTX: telopéptido N-terminal del colágeno de tipo I
- OC: Osteocalcina
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- OPN: osteopontina
- P: fósforo
- Pdia3: proteína-disulfido-isomerasa, familia A, miembro 3
- PEG: pequeño para la edad gestacional
- PHEX: homólogo de la endopeptidasa reguladora de fosfato ligado al cromosoma X
- Pi: fósforo inorgánico
- PICP: propéptido C-terminal del procolágeno de tipo I
- PINP: propéptido N-terminal del procolágeno de tipo I
- PKC: proteína quinasa C
- PLA2: fosfolipasa A2
- PLAA: proteína activadora de la fosfolipasa A2
- PLC: fosfolipasa C
- PMCA1: bomba de calcio adenosín trifosfatasa-1
- PMP: partículas paramagnéticas
- PN: peso al nacimiento

- pNPP: fofo-nitrofenil fosfato
- PPi: pirofosfato
- pQTC: tomografía computarizada cuantitativa periférica
- PTH: hormona paratiroidea o parathormona
- PTH1R: receptor de hormona paratiroidea de tipo 1
- PTH2R: receptor de hormona paratiroidea de tipo 2
- PTHrP: proteína relacionada con la hormona paratiroidea
- PYD: piridolina
- QUS: ultrasonografía cuantitativa
- RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa B
- RDA: aportes dietéticos recomendados (*recommended dietary allowances*)
- RIA: radioinmunoanálisis
- RLU: unidades relativas a la luz
- RNA: ácido ribonucleico
- RNPT: recién nacidos pretérmino
- RR: riesgo relativo
- RXR: receptor X retinoide
- SIBLING: glucoproteínas N-glucosiladas pequeñas con ligando de unión a integrina (*small integrin-binding ligand*)
- N-linked glicoprotein
- SOST: esclerostina
- TNAP: fosfatasa alcalina no específica de tejido
- TRAP5b: fosfatasa ácida resistente al tartrato 5b
- TRPV6 y TRPV5: canales epiteliales de calcio
- TSH: hormona estimulante de la tiroides o tirotropina
- UI: Unidad Internacional
- UL: nivel máximo de ingesta tolerable (*tolerable upper intake level*)
- UVA: radiación ultravioleta de tipo A
- UVB: radiación ultravioleta de tipo B
- VD: vitamina D
- VDBP: Proteína transportadora de vitamina D
- VDR: receptor nuclear de la vitamina D
- VDRE: elementos respondedores a VD
- VDRm: receptor de superficie celular de la vitamina D
- VDR-null: modelo animal con ausencia de receptor de VD
- VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor*)
- VF: volumen femoral
- VPPI: ventilación presión positiva intermitente
- XLH: hipofosfatemia ligada al X
- α -KL: α -Klotho

UNIDADES

- g: gramo
- kg: quilogramo ($=10^3$ g)
- ng: miligramo ($=10^{-3}$ g)
- μ g: microgramo ($=10^{-6}$ g)
- ng: nanogramo ($=10^{-9}$ g)
- pg: picogramo ($=10^{-12}$ g)
- m: metro
- dm: decímetro ($=10^{-1}$ m)
- cm: centímetro ($=10^{-2}$ m)
- mm: milímetro ($=10^{-3}$ m)
- l: litro
- dl: decilitro ($=10^{-1}$ l)
- ml: mililitro ($=10^{-3}$ l)
- mEq: miliequivalente
- mmol: milimol
- UI: unidades internacionales

NOMENCLATURA VITAMINA D

- Calciferol: Vitamina D
- Ergosterol: provitamina D₂
- 7-dehidrocolesterol: provitamina D₃
- Ergocalciferol: vitamina D₂ (origen animal)
- Colecalciferol: vitamina D₃ (origen cutáneo)
- Calcidiol: 25-hidroxivitamina D
- Calcitriol: 1,25-dihidroxivitamina D
- Ácido calcítico: 24,25-dihidroxivitamina D

1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años hemos asistido a un interés creciente en relación con el déficit de vitamina D (VD), el cual es considerado, hoy en día, una pandemia mundial que afecta aproximadamente a mil millones de personas de diferentes etnias y edades (Mazhar, 2012). Diversos ensayos clínicos randomizados han demostrado la eficacia de esta vitamina en la prevención del raquitismo y de la osteomalacia (Bichoff-Ferrari, 2012a; Cranney, 2007), por lo que existe consenso sobre los efectos beneficiosos que poseen unos niveles suficientes de VD para alcanzar y mantener un adecuado grado de mineralización ósea. Pero, además, el estudio de la VD ha suscitado el interés por su posible relación con la prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares, procesos autoinmunes y neurodegenerativos y complicaciones perinatales (Maxmen, 2011). Este hecho se ha traducido en un aumento exponencial en el número de artículos científicos relacionadas con la VD (38.278 entradas en Medline entre el 1 de enero 2000 y el 31 de diciembre 2015), siendo la vitamina sobre la que más se ha publicado durante el siglo XXI (Glade, 2013).

Existen dos consecuencias directas derivadas del creciente interés que ha generado el papel que juega la VD en el estado de salud de la población. Por una parte, se ha producido un incremento masivo de las determinaciones séricas de 25-hidroxivitamina D [25(OH)VD] o calcidiol, considerada, hasta el momento, la medida bioquímica del estado de VD (Sattar, 2012). Pero si tenemos en cuenta la elevada prevalencia de valores insuficientes de 25(OH)VD (<20 ng/ml), con cifras que superan el 50% en diferentes estudios poblacionales (Hypponen, 2007; Mata-Granados, 2008; Vierucci, 2014), deberíamos plantearnos si la determinación indiscriminada de calcidiol resulta útil en la práctica clínica diaria – sobre todo si tenemos en cuenta que no existe consenso acerca de los valores que definen la suficiencia- y si el conocer la existencia de unos niveles bajos es ventajoso. Por otra parte, se está generalizando la recomendación de que la mayoría de la población debería recibir suplemento de una vitamina que el organismo produce de forma natural cuando se expone a la radiación solar, pero sin clara evidencia de los objetivos que alcanzar.

Si analizamos la situación de las mujeres embarazadas, diversos estudios muestran que la deficiencia de VD es también muy frecuente (Bodnar, 2007b; Johnson, 2011; Achkar, 2015), lo que puede suponer un problema de salud de primer nivel por la doble implicación que conlleva. Por una parte, compromete la salud ósea de las madres en un momento en el que los elevados requerimientos nutricionales del feto van a condicionar una mayor desmineralización de sus huesos. Esta disminución del contenido mineral óseo se acentuará durante el periodo de lactancia y en posteriores embarazos, pudiendo favorecer la aparición de osteoporosis y fracturas patológicas tras la menopausia (Kanis, 1994; Bischoff-Ferrari, 2004; Binkley, 2012). Por

otra parte, se ha demostrado que los hijos de madre con déficit de VD tienen valores igualmente deficitarios al nacimiento (Waiters 1999; Sachan 2005; Hossain, 2011). Si entendemos el desarrollo óseo como un proceso continuo, que se inicia durante el periodo embrionario y finaliza en la adolescencia con el cierre de los cartílagos de crecimiento y la adquisición del pico de masa ósea, resulta lógico pensar que las estrategias encaminadas a mejorar la formación ósea y prevenir la osteoporosis deberían iniciarse ya en las etapas más tempranas de la vida. En este sentido, diversas sociedades pediátricas avalan la suplementación con VD durante el primer año de vida con el fin de facilitar la mineralización ósea de los lactantes en un periodo especialmente susceptible de su crecimiento y desarrollo (Alonso C, 2010; Martínez V, 2012; Braegger, 2013; Wagner, 2008). No obstante, no existe un criterio claro acerca de la necesidad de suplementación a las gestantes, ya que queda por establecer si esta aparente pandemia de déficit de VD durante el embarazo representa un “riesgo real” para la salud ósea del binomio madre-recién nacido, así como los niveles que pueden considerarse como “suficientes” en estos grupos de población. En este sentido, una revisión reciente de la Cochrane concluyó que la suplementación con VD durante el embarazo mejora los niveles séricos de 25(OH)VD de las embarazadas en el momento del parto, pero que aún no existe la suficiente evidencia que justifique su recomendación (De-Regil, 2016). Es posible que los niveles de VD durante el embarazo influyan sobre el proceso de mineralización fetal, pero hasta la fecha los pocos trabajos realizados no han logrado clarificar esta relación. Pero también es posible que, tal y como defienden diversos autores, el transporte activo de calcio a través de la placenta se preserve con independencia de los niveles maternos de VD (Kovacs, 2013) o que la 25(OH)VD no defina de forma adecuada el estatus de VD y deban explorarse nuevos biomarcadores (Alonso MA, 2015).

1.1 EL HUESO DURANTE LA EDAD PEDIÁTRICA

La osteogénesis es un epifenómeno que comprende diversos procesos biológicos y que depende de la presencia de osteoblastos metabólicamente activos que sintetizan proteínas hacia la matriz extracelular para su posterior mineralización. Ya desde el periodo fetal coexisten dos procesos simultáneos de osificación: el *membranoso*, a partir del tejido conectivo mesenquimal, y el *endocondral*, sobre la base de un molde cartilaginoso. En ambos casos, el resultado es la formación de un *hueso no laminar (primario, primitivo o inmaduro)* con unas fibras de la matriz ósea orientadas de forma irregular, que se convertirá, antes de la época adulta, en un *hueso*

laminar (secundario, definitivo o maduro), con una matriz ósea más calcificada y resistente y en la que las fibras de colágeno se disponen en una orientación determinada.

1.1.1 DESARROLLO ÓSEO FETAL

El mesodermo es una de las tres capas celulares que constituyen el embrión y de la que dependerá la formación de los huesos fetales. Se origina durante el periodo trilaminar (tercera semana de gestación) a través del proceso de mitosis del ectodermo y comúnmente se divide en 3 regiones:

- Mesodermo paraxial: Da lugar a la formación de los somitas, que son estructuras segmentadas, formadas a ambos lados del tubo neural y que poseen un rol importante en la organización del patrón segmentario en los embriones de los vertebrados, dando origen a las células que formarán las vértebras y costillas, la dermis de la piel dorsal, los músculos esqueléticos de la espalda y los músculos esqueléticos de la pared corporal y de las extremidades (Figura 1.A).
- Mesodermo intermedio
- Mesodermo lateral: Produce células para la formación de los sistemas cardiovascular y sanguíneo, para el revestimiento de cavidades corporales y para los componentes de los miembros con excepción de los músculos. De él derivan los huesos largos.

Existen 2 tipos de osificación durante el periodo fetal para la formación de las estructuras óseas derivadas del mesodermo.

1.1.1.1 OSIFICACIÓN MEMBRANOSA

Los huesos planos del cráneo, parte de la mandíbula y las clavículas se desarrollan de esta forma. Las células mesenquimales se diferencian en osteoblastos y forman numerosos centros de osificación o nódulos desde donde se secreta osteoide (matriz orgánica de proteoglicanos y fibras de colágeno de tipo I) para la formación de las primeras *espículas* óseas (Figura 1.B) (Long, 2011). Llegados a este punto, la matriz ósea osteoide se mineraliza, quedando atrapados en su interior los osteoblastos, que se convierten de este modo en osteocitos; las espículas se espesan y entrelazan dando lugar a una red tridimensional de *trabéculas* óseas, cubiertas por osteoblastos

en su superficie que continuarán con la síntesis de matriz ósea (Figura 1.C) (Ovalle, 2013). Las trabéculas de hueso así formadas (*hueso esponjoso o membranoso*) son posteriormente remodeladas según el hueso al que pertenezcan. En ciertas localizaciones, este hueso se remodelará en forma de hueso esponjoso secundario manteniendo una estructura trabecular. En cambio, en regiones seleccionadas, el hueso esponjoso se desarrolla hacia un *hueso compacto o cortical* gracias a la reorganización de las fibras de colágeno en forma de capas concéntricas (laminillas) alrededor de un vaso central constituyendo los *canales de Havers u osteonas* (Kierszenbaum, 2012).

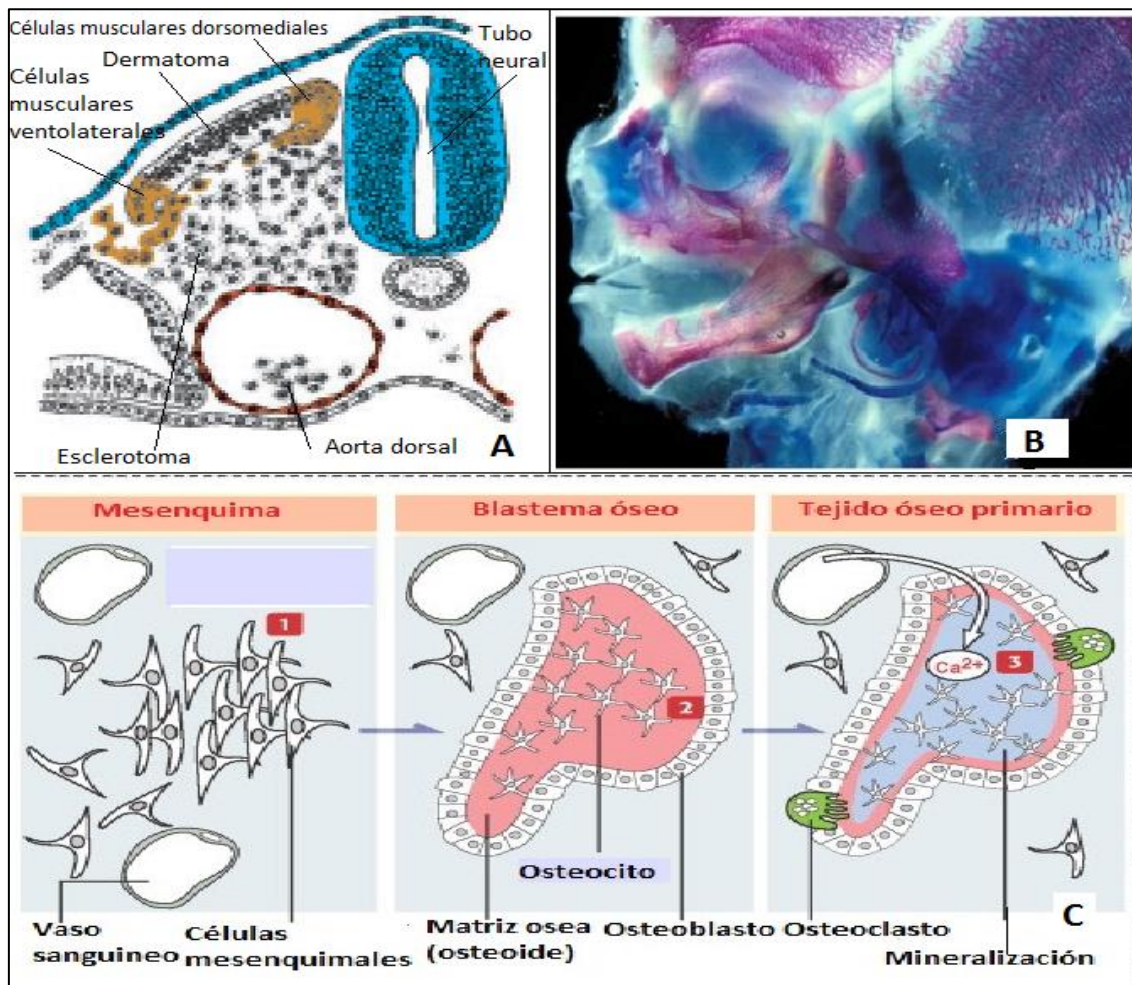


Figura 1. (A) En los somitas se diferencia una porción ventromedial, el esclerotoma, y una parte dorsolateral, el dermatotoma. Al final de la 4ª semana, las células del esclerotoma se convierten en polimorfas y dan lugar a células mesenquimales, las cuales se convertirán en células cartilaginosas (condrocitos) que darán origen a las vértebras y costillas. **(B)** Expansión de las espículas óseas desde los centros de osificación intramembranosa de un feto de 12 semanas a nivel de la bóveda craneal, hueso temporal, órbita y región maxilar y mandibular. **(C)** Osificación membranosa. Tomado de: Sadler TW et al ⁽⁴⁵²⁾.

1.1.1.2 OSIFICACIÓN ENDOCONDRALE

A diferencia de la anterior, esta osificación se desarrolla a partir de un molde de cartílago hialino. La mayoría de los huesos largos de las extremidades, columna vertebral, costillas y pelvis se desarrollan mediante este tipo de osificación (Ovalle, 2013).

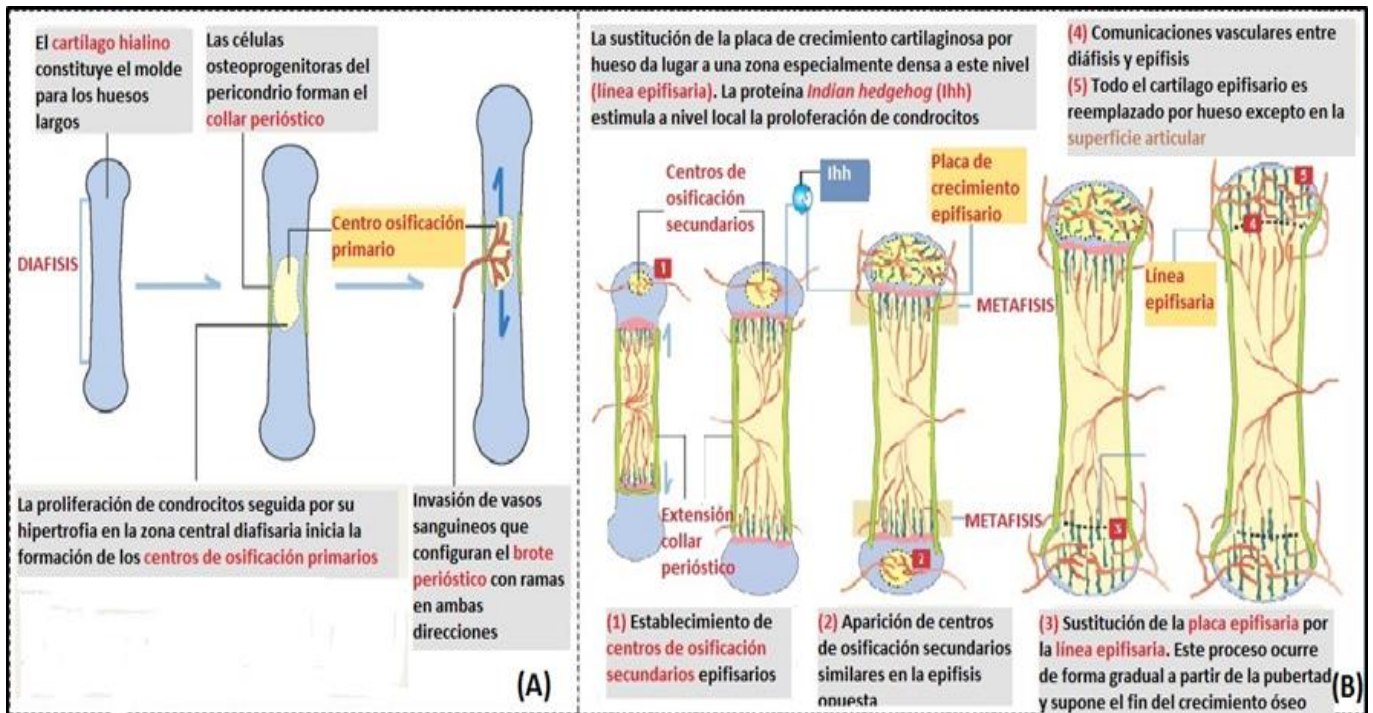


Figura 2. (A) Osificación endocondral durante el periodo embrionario. (B) Crecimiento postnatal en los huesos largos. Tomado de: Ovalle W et al (398).

El proceso se inicia con la agregación de células mesenquimales indiferenciadas que forman condensaciones. Las células se diferencian en condrocitos, secretan una matriz cartilaginosa y dan lugar a la aparición de moldes cartilagosos con la forma del futuro hueso (Long, 2011). En la periferia, las células pericondrales se diferencian en osteoblastos y forman, alrededor del molde cartilaginoso, una estructura mineralizada denominada *collar óseo* (Frances, 2011) que se convertirá, posteriormente, en la cobertura perióstica. Una vez diferenciados, los condrocitos hipertróficos se rodean de una matriz extracelular calcificada (*centro de osificación primaria*) que es invadida por vasos sanguíneos procedentes del collar óseo y que aportan condroblastos para la degradación matricial y progenitores osteoblásticos. Se constituye así un proceso secuencial de proliferación condrocítica, hipertrofia y remplazamiento por osteoblastos que da lugar a una estructura histológica característica denominada *placa de crecimiento embrionario* (Figura 2.A) en la que los osteoblastos inician la formación de matriz ósea sobre un molde cartilaginoso

parcialmente degradado (Gilbert, 2000). Las placas de crecimiento se desplazan hacia las metáfisis, dando lugar a las *fisis o cartílagos de crecimiento* de los huesos largos, que permiten su crecimiento longitudinal mediante la misma secuencia de estadios acontecidos en la región central del molde cartilaginoso original.

1.1.2 DESARROLLO ÓSEO POSTNATAL

Denominamos modelación al proceso de formación y resorción ósea selectiva que ocurre durante la infancia y la primera juventud y mediante el cual los huesos crecen manteniendo su forma externa. El proceso de modelación conlleva un incremento constante de la masa ósea durante el periodo de crecimiento, hasta alcanzar un valor máximo o “masa ósea pico” alrededor de los 20-25 años (Heaney, 2000).

Los huesos con un origen membranoso están cubiertos en su superficie por capas de tejido conectivo condensadas (periostio y endostio) que contienen células fusiformes con potencial osteoprogenitor. Aumentan su tamaño por aposición de nuevas capas en la superficie externa y resorción osteoclástica simultánea desde el interior (Yang, 2013).

En el caso de los huesos con un origen endocondral, hacia el final de la vida fetal, aparecen dos frentes de crecimiento cartilaginoso (*placas de crecimiento epifisario*) en el punto de unión entre epífisis y metáfisis: la *fisis o cartílago de crecimiento* (Long, 2011). Histológicamente se distinguen 5 zonas transversales en la placa de crecimiento que reflejan la secuencia de eventos de la osificación endocondral (Figura 3.A y 3.B). De este modo, se produce un aumento de la longitud ósea gracias al reemplazamiento continuo del cartílago hialino del extremo epifisario de la placa de crecimiento por hueso esponjoso primario en su extremo distal, la metáfisis (Shapiro F, 2005) (Figura 2.B).

Tras la adolescencia se produce la unión ósea entre la epífisis y la diáfisis y el crecimiento cesa. Simultáneamente a este crecimiento longitudinal, también se produce un crecimiento radial mediante aposición de capas de hueso, por los osteoblastos, en la superficie perióstica y reabsorción, por los osteoclastos, en la superficie endóstica de las diferentes cubiertas que rodean el hueso (pericondrio, periostio y anillo pericondral).

Además de los centros de osificación primarios, existen, a nivel de las condroepífisis, *centros de osificación secundarios*. Algunos aparecen hacia el final de la gestación, pero la mayoría lo hacen

posnatalmente. Desde ellos, se inicia un crecimiento óseo radial que permite la osificación de las epífisis.

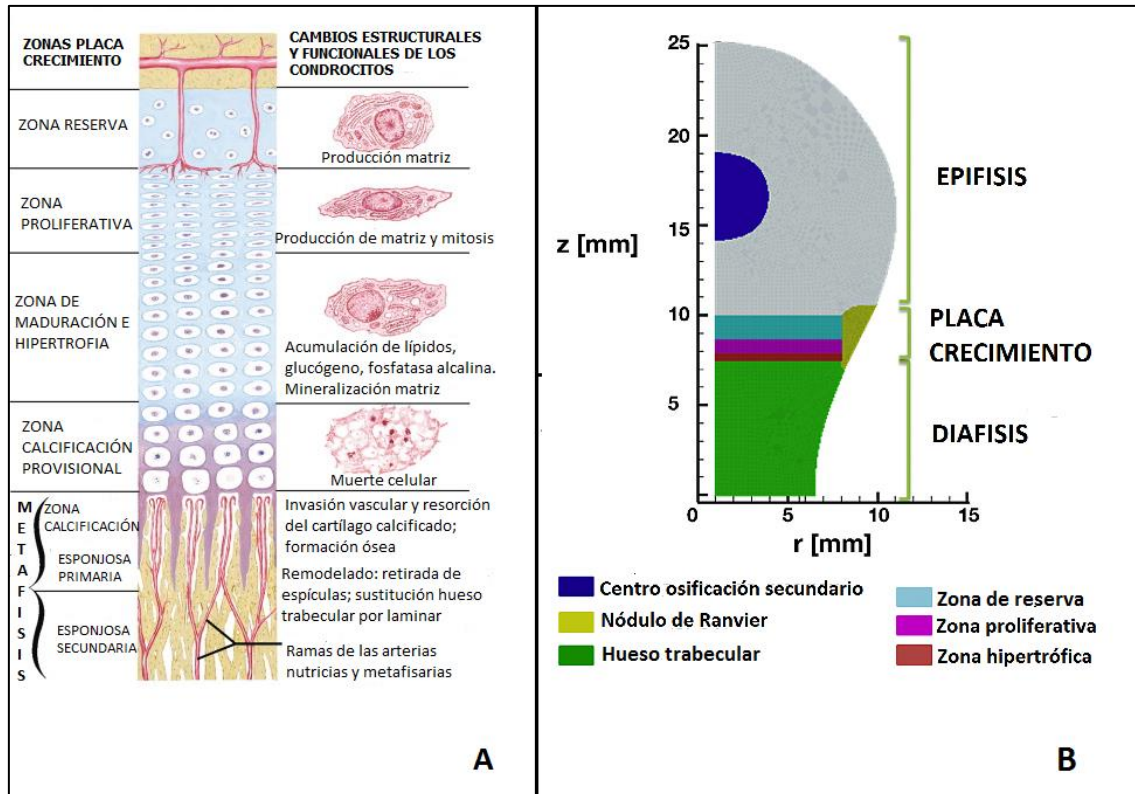


Figura 3. (A) Esquema de la placa de crecimiento epifisario en la que se distinguen cinco zonas histológicas transversas que reflejan la secuencia de eventos de la osificación endocondral. Tomado de: Ovalle WK et al ⁽³⁹⁸⁾. **(B)** Escala de la geometría ósea general. Tomado de: Guevara JM et al ⁽¹⁸⁶⁾.

1.1.3 CLASIFICACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO

Desde el punto de vista de la arquitectura macroscópica se distinguen dos tipos de hueso: compacto (o cortical) y esponjoso (o trabecular). La mayoría de los huesos contienen ambos tipos, pero sus cantidades relativas y distribución varían dependiendo de la edad y su funcionalidad.

El tejido óseo compacto representa aproximadamente el 80% del total de la masa ósea. Se localiza a nivel de la cubierta externa (córteX) de todos los huesos y forma la mayor parte del interior de los huesos largos (Barrett, 2012). Está compuesto por múltiples sistemas Haversianos adyacentes u osteonas (Figura 4.B). Cada osteona es una unidad cilíndrica, de unos 250 μm de

diámetro, constituida por un canal Haversiano central, que contiene un pequeño vaso sanguíneo y una terminación nerviosa y que aparece rodeado por 4-20 laminillas concéntricas. Los osteocitos se encuentran ubicados circunferencialmente alrededor del canal central. Los canales Haversianos conectan con otros canales y con la cavidad medular a través de los canales transversos de Volkman que también les aportan vascularización desde la superficie perióstica (Hall, 2016).

El hueso esponjoso, que constituye un 20% del total de masa ósea, está ubicado en las áreas más internas de los huesos y posee una estructura relativamente simple de trabéculas interconectadas, formadas por hueso laminar, que conforman una red tridimensional alineada a lo largo de las áreas de estrés (Figura 4.A). Proporcionan una amplia superficie para las actividades metabólicas vinculadas al hueso y provee de fuerza mecánica sin un peso excesivo (Ovalle, 2013).

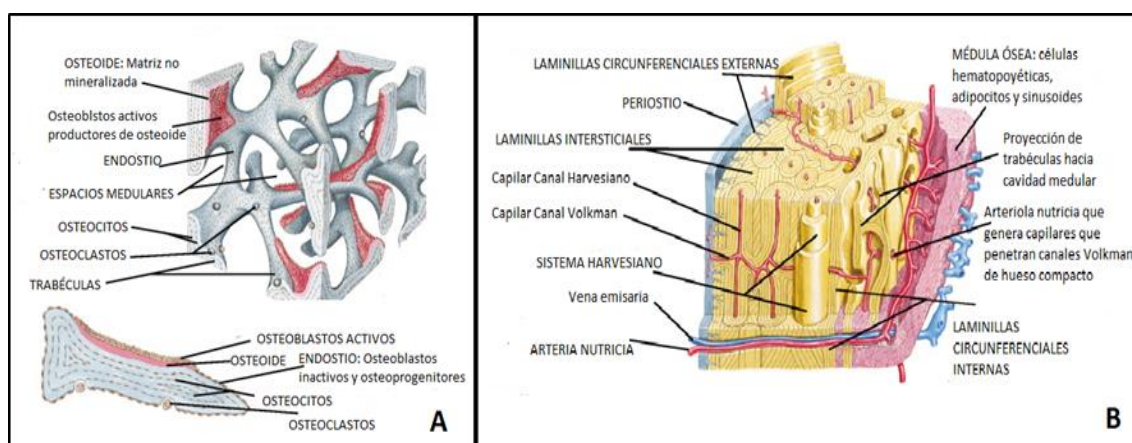


Figura 4. (A) Vista esquemática del hueso trabecular. **(B)** Sección de la microestructura compacta de parte de la diáfisis. Tomado de Ovalle et al ⁽³⁹⁸⁾.

1.1.4 MINERALIZACIÓN ÓSEA

El mecanismo por el que tiene lugar la mineralización durante el desarrollo óseo no presenta grandes diferencias entre los dos tipos de osificación. El hueso está compuesto por un 70-80% de mineral y un 20-30% de matriz orgánica, constituida fundamentalmente por colágeno de tipo I (90%) y V (<5%), en combinación con pequeñas cantidades de proteoglicanos como el condroitín sulfato y el ácido hialurónico, glicoproteínas y de proteínas del plasma (Zhu W, 2010).

El componente mineral del hueso está formado principalmente por calcio y por fosfato en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. En las sales óseas también existen iones magnesio, sodio, potasio y carbonato, aunque los estudios de difracción de rayos X no demuestran que formen cristales definidos independientes y se cree que se conjugan con los cristales de hidroxiapatita (McKee, 2012). El hueso concentra la práctica totalidad del calcio del organismo ($\approx 99\%$), la mayoría del fosfato (85%) y alrededor del 35-45% del sodio y del magnesio (Risteli, 2012).

En una fase inicial, los osteoblastos secretan monómeros de colágeno y sustancia fundamental (fundamentalmente proteoglicanos). Los monómeros de colágeno se polimerizan con rapidez para formar fibras de colágeno; el tejido resultante, denominado osteoide, es un material parecido al cartílago, pero difiere de éste por la facilidad con que las sales de calcio precipitan en él, inicialmente como compuestos amorfos, conformándose posteriormente los cristales de hidroxiapatita a lo largo de semanas o meses (McKee, 2012). Sin embargo, un pequeño porcentaje del calcio óseo (0,4-1%) suele persistir en forma amorfa, permitiendo su rápido intercambio con el espacio extracelular y evitando así que su concentración fluctúe demasiado en situaciones transitorias de exceso o falta de disponibilidad (Hall, 2016).

Las concentraciones de calcio y fosfato en el líquido extracelular son considerablemente superiores a las necesarias para la formación de hidroxiapatita. En casi todos los tejidos del organismo, así como en el plasma, existen inhibidores que evitan que se produzca esa precipitación pese al estado de sobresaturación de los iones. Aunque el mecanismo que regula todo este proceso no se conoce por completo, parece depender en gran medida del efecto inhibidor del pirofosfato (PPi), el cual es producido y regulado por los osteoblastos mediante: (1) el ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 y 3 (ENPP1 y ENPP3), que produce PPi en el interior de los osteoblastos, y (2) la proteína transmembrana anakinra (ANK), que transporta el PPi desde el interior hasta la superficie de la célula. Las deficiencias de ENPP1, ENPP3 o ANK ocasionan disminución en los niveles de PPi extracelular y calcificación excesiva del hueso o de los tejidos adyacentes. La acción del PPi, a su vez, están regulada por otras moléculas, una de ellas es la fosfatasa alcalina no específica de tejido (FANET), secretada por los osteoblastos en el osteoide para neutralizar el PPi (Hall, 2016). Otro potente inhibidor de la mineralización ósea es la osteopontina (OPN) de la matriz extracelular, cuya secreción parece estar estimulada por la ENPP1 (Staines, 2012).

Existen múltiples aspectos que influyen sobre la acreción de calcio en el hueso, la densidad mineral ósea (DMO) y/o el pico de masa ósea adquiridos durante el desarrollo esquelético,

siendo el primero de ellos el propio mecanismo de elongación ósea o crecimiento óseo endocondral. De este modo, suele existir una correlación lineal entre el crecimiento óseo y la DMO (Wongdee, 2012), pero existen otra serie de factores (hormonales y no hormonales) que pueden influir sobre el proceso de acumulación de calcio en el hueso y la microarquitectura ósea.

1.1.4.1 REGULACIÓN NO HORMONAL

1.1.4.1.1 Factores nutricionales

El crecimiento y mineralización ósea requiere de una serie de nutrientes y vitaminas que proporcionen la cantidad suficiente de precursores para que tenga lugar el proceso. Entre ellos, cabe destacar el papel que juegan el aporte de las vitaminas A y K, y del sodio.

1.1.4.1.1.1 Vitamina A

El déficit de vitamina A puede tener efectos perjudiciales sobre el crecimiento óseo endocondral, ya que altera el desarrollo de los condrocitos. Así, los huesos largos de los animales deficientes en vitamina A son más cortos y densos de lo habitual. El acortamiento está ocasionado por el fracaso del crecimiento óseo endocondral, mientras que el aumento de densidad se debe a un desequilibrio entre la aposición de calcio y el proceso de remodelación, con un predominio del primero. Un estudio in vitro en un cultivo primario de condrocitos de la placa de crecimiento mostró que el ácido retinoico desarrolla un papel importante en la maduración de la placa de crecimiento a través de la modulación de los receptores de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) y de la proteína de señalización intercelular Indian hedgehog (Ihh) (Kirimoto, 2005).

1.1.4.1.1.2 Vitamina K

El déficit de Vitamina K también puede influir de forma negativa sobre el crecimiento óseo (Price, 1982). Preece y cols. demostraron que en los ratones tratados durante 8 meses con warfarina (antagonista de la vitamina K) se producía una desestructuración de la placa de crecimiento tibial caracterizada por una completa fusión de ésta y un cese del crecimiento óseo longitudinal, que asemejaba al síndrome fetal por warfarina en humanos. Este efecto parece deberse a un déficit en la síntesis de dos proteínas vitamina K-dependientes: la osteocalcina y la proteína de matriz Gla (MGP). La osteocalcina es una proteína con capacidad de unión con el calcio, secretada por los osteoblastos maduros y por los condrocitos hipertróficos, que sirve como andamio para la calcificación de la matriz cartilaginosa (Pullig, 2000). La MGP también posee una gran afinidad por el calcio y las mutaciones en su gen son responsables del síndrome de Keutel, enfermedad que cursa con calcificación anómala del cartílago.

1.1.4.1.1.3 Aporte de sodio

Aproximadamente algo más de un tercio del total de sodio del organismo se encuentra en el hueso y el 40% de este sodio óseo puede ser intercambiado con el sérico. Así pues, la hiponatremia crónica teóricamente podría conducir a una pérdida del sodio óseo y ocasionar desmineralización (Ayus, 2010). De hecho, estudios recientes en animales sugieren que la hiponatremia mantenida induce osteoporosis. Verbalis y cols. demostraron que los ratones que se mantuvieron hiponatremicos durante 3 meses mostraron una reducción del 30% de la densidad mineral ósea estudiada por absorciometría dual de rayos X (DEXA) y que a nivel histomorfológico se producía una reducción del contenido tanto del hueso trabecular como del cortical, con un aumento de los osteoclastos por área ósea. A nivel epidemiológico, también parece probada la relación que existe entre la hiponatremia y el desarrollo de osteoporosis (Verbalis, 2010; Upala, 2016) y fracturas patológicas (Kinsella, 2010; Ayus, 2012).

Aunque no está bien establecido el mecanismo mediante el cual la hiponatremia produce déficit de mineralización, se cree que puede estar en relación con los receptores de la arginina vasopresina (AVP) presentes en los osteoblastos y osteoclastos (Tamma 2013; Carbone, 2008; Ceccoli, 2013) o con la reabsorción de calcio sodio dependiente que tiene lugar en algunas partes de la nefrona (Park, 2014).

A nivel histológico, se ha demostrado que los valores bajos de sodio están asociados con una disrupción de la organización de la tubulina en el estroma derivado de los osteoblastos (Fibbi,

2015) y que existe un mecanismo de membrana regulado por sodio que estimula a los osteoclastos en respuesta a la hiponatremia (Kizilgul, 2015).

Es posible que esta relación entre hiponatremia y hueso tenga un papel importante en la mineralización esquelética durante el periodo fetal y neonatal.

1.1.4.1.2 Equilibrio ácido-base

La mineralización ósea conlleva generación de H^+ ($10 Ca^{++} + 4.8 HPO_4^{2-} + 1.2 H_2PO_4^- + 2 H_2O \leftrightarrow Ca_3(PO_4)_2 + 3Ca(OH)_2 + 9.2 H^+$) y la constitución del buffer óseo y la acidosis crónica produce desmineralización ósea e incremento del flujo de calcio óseo hacia el espacio extracelular (Bushinsky, 1989). El calcio liberado desde el hueso genera hipercalciuria, la magnitud de la cual es proporcional a la carga ácida que el organismo debe soportar (Lemann, 1986). Se cree que el calcio es movilizado desde el esqueleto gracias al aumento directo de la solubilidad de las sales óseas generado por la propia acidosis (Meisenberg, 2012) o por estimulación directa de la resorción ósea mediada por osteoclastos (Krieger, 1992). Pero, además, diversos autores defienden que el exceso de protones también puede ocasionar disminución de la velocidad de formación ósea y defectos en la mineralización del osteoide (Brandao-Burch, 2005), de modo que se considera que la acidosis metabólica conduce a una enfermedad ósea que combina características tanto de osteoporosis como de osteomalacia (Gasser, 2014).

Es conocida la disminución en la DMO que se produce en los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) y que se considera es el resultado de la combinación de un metabolismo inadecuado de VD y una acidosis metabólica parcialmente compensada (Bushinsky, 1989). Estudios recientes han demostrado que esta relación entre niveles bajos de bicarbonato y desarrollo de osteoporosis también ocurre en la población general (Chen W, 2015) y que adquiere una mayor significación estadística en el subgrupo de mujeres postmenopáusicas.

1.1.4.1.3 Factores mecánicos

El hueso es capaz de detectar las fuerzas mecánicas que se le aplican, debidas a la acción del peso y a las tensiones, fundamentalmente de la contracción muscular, y responder a ellas

adaptando su contenido mineral al diseño arquitectónico óseo que resulta tras la aplicación de estas fuerzas (Land, 2008).

En 1987, H.M. Frost planteó un modelo mecanostático de formación ósea basado en un sistema de retroalimentación negativa según el cual el tejido óseo monitoriza, a través de una red de osteocitos, las deformaciones que resultan de las fuerzas mecánicas aplicadas (Frost, 2000). Cuando la deformidad ósea se aleja demasiado de las líneas de fuerza, los osteocitos envían señales hacia las células efectoras, que entonces adaptan la arquitectura y masa ósea y, por consiguiente, su fortaleza (Donahue, 2000). A través de estas adaptaciones, la deformidad ósea retorna al rango aceptable, y la homeostasis es mantenida. Esta adaptación de la fortaleza ósea controlada mediante retroalimentación por los cambios en las fuerzas mecánicas se conoce como modelo funcional de desarrollo óseo (Frost, 2003).

Durante el desarrollo fetal, los golpes regulares contra la pared uterina son los que actúan como estímulo mecánico y proporcionan, de este modo, una forma de entrenamiento de resistencia. La importancia de esta interacción músculo-hueso a nivel intrauterino es particularmente obvia en recién nacidos con hipotonía muscular de inicio prenatal, que pueden incluso presentar fracturas óseas al nacimiento, a pesar del polihidramnios que suelen presentar. Tras el nacimiento, los movimientos del neonato se producen sin mucha resistencia y ésta es una de las razones por las que se cree que, al alcanzar la misma edad gestacional corregida, los huesos de los recién nacidos pretérmino (RNPT) poseen una menor masa mineral ósea y/o DMO que los de los recién nacidos a término. Por lo tanto, parece lógico estimular el sistema musculoesquelético de los RNPT para mejorar el poder muscular y, por lo tanto, la mineralización de los huesos largos. De hecho, la evidencia muestra que la realización de ejercicios de la gama de los movimientos pasivos conlleva un incremento en la masa mineral ósea y ayudan a atenuar la disminución de DMO de los RNPT (Moyer-Mileur, 2000).

1.1.4.2 REGULACIÓN HORMONAL

Tanto el proceso de mineralización ósea como el mantenimiento de unos niveles séricos de calcio y fósforo adecuados están sujetos a un complejo sistema de retroalimentación en el que, además de la VD, aparecen implicadas diversas hormonas: la hormona paratiroidea (PTH) y la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), con actividad hipercalcemiante, y la calcitonina, con actividad hipocalcemiante (Marshall, 2012).

En los últimos años, además, el descubrimiento de un nuevo grupo de factores humorales fosfatúricos, las fosfatoninas, ha permitido demostrar la existencia de un eje osteo-renal que resulta esencial en la regulación de todas estas interacciones; de todos ellos, el mejor caracterizado hasta la fecha es el Factor de Crecimiento Fibroblástico 23 (FGF23) (Blau, 2015).

1.1.4.2.1 Vitamina D

De manera esquemática, la principal función de la VD es la de mantener las concentraciones extracelulares de calcio y fosfato en los niveles adecuados para permitir el depósito de hidroxapatita en la matriz ósea (Bringham, 2012). Favorece la absorción intestinal de calcio y de fosfato e incrementa la reabsorción tubular de calcio (Sánchez, 2002). Asimismo, también contribuye a la movilización del calcio óseo en aquellas situaciones en las que el calcio dietético resulta insuficiente para el mantenimiento de sus niveles séricos. La VD está también reconocida como un factor determinante de la mineralización ósea, aunque el mecanismo por el que se produce este efecto no se encuentra del todo bien establecido (Hall, 2016); probablemente se deba a la capacidad del 1,25-dihidroxicolecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{VD}$) para incrementar el transporte de iones de calcio a través de las membranas celulares de los osteoblastos y osteocitos. A nivel de la glándula paratiroides, el receptor de VD ejerce efecto antiproliferativo sobre las células paratiroides y suprime la transcripción del gen de la PTH, disminuyendo así su síntesis y secreción (Bringham, 2012).

1.1.4.2.2 Hormona paratiroidea

La hormona paratiroidea (PTH) es un polipéptido de cadena simple formado por 84 aminoácidos, sintetizado por las células principales de las cuatro glándulas paratiroides. Posee un extremo N-terminal (aminoácidos 1 al 34) que es el biológicamente activo, mientras que las posiciones 48 a 84 constituyen la región C-terminal (Prada, 2011). La PTH regula la homeostasis fosfocálcica a través de una serie de interacciones complejas que afectan al recambio óseo y a la excreción renal y que pueden esquematizarse en tres puntos fundamentales:

- A nivel óseo, la PTH favorece la movilización de los depósitos de calcio y fósforo y su paso al espacio extracelular mediante dos mecanismos (Hall, 2016). El primero de ellos constituye la respuesta rápida, se inicia en minutos tras la elevación de PTH y se debe a

la activación de las células ya presentes en el hueso (principalmente osteocitos) que promueven la liberación de las sales óseas. El segundo mecanismo, en cambio, posee un desarrollo mucho más lento y requiere días e incluso semanas para completarse. Consiste en una proliferación de los osteoclastos (sin receptores de membrana para la PTH) mediada por segundas señales procedentes de los osteoblastos y osteocitos activados, y que condiciona un gran aumento de la resorción osteoclástica del propio hueso. Transcurridos unos meses de exceso de PTH, la resorción osteoclástica puede generar debilidad ósea y estimulación secundaria de los osteoblastos que tratarán de corregir esta situación.

- En los túbulos renales, la PTH incrementa la reabsorción de calcio y disminuye la de fósforo (efecto fosfatúrico) mediante el bloqueo del cotransportador de fósforo dependiente de sodio (Chen TC, 1981).
- Asimismo, la PTH es necesaria para la conversión de la 25(OH)VD en 1,25(OH)₂VD mediante la activación de la 1 α -hidroxilasa renal, lo que favorecerá, de forma indirecta, el aumento de los niveles séricos de calcio por incremento de su absorción intestinal.

La PTH tiene una vida media muy corta (de aproximadamente 4 minutos) y en situaciones de calcemia estable, se sintetiza y secreta de forma continua, aunque con unos niveles pico en las horas iniciales de la mañana. Se han identificado 2 subtipos de receptores para la PTH: el PTH1R, mayoritario a nivel del hueso y de los riñones, al que se une la PTH por su extremo N-terminal y la PTHrP y el PTH2R, que muestra muy poca afinidad por la PTHrP, se encuentra sólo a nivel de algunos tejidos, y tanto su estructura como su significado fisiológico están escasamente caracterizados (Mannstadt, 1999).

1.1.4.2.3 Proteína relacionada con la hormona paratiroidea

La PTHrP fue descubierta en el transcurso del estudio de la hipercalcemia en el síndrome paraneoplásico de hipercalcemia vinculado a determinados cánceres (Albright, 1941; Stewart, 1980; Strewler, 2000). Posee, en su extremo N-terminal, una secuencia de aminoácidos muy similar a los de la PTH, lo que permite su unión al receptor común PTH1R en los “tejidos diana clásicos” (hueso y riñón). Como resultado, cuando la PTHrP es secretada por tumores imita las acciones de la PTH y condiciona una excesiva resorción ósea e hipercalcemia (Wysolmerski, 2016). Pero, además, la PTHrP está considerada como un importante regulador paracrino y

autocrino de proliferación, apoptosis y diferenciación de diferentes estirpes celulares (Philbrick, 1996) e interviene en el desarrollo de algunos tejidos y órganos (Strewler, 2000).

En contraposición al gen de la PTH, el gen de la PTHrP se expresa en una amplia variedad de tejidos normales; sin embargo, los niveles circulantes de PTHrP son inferiores a los niveles de PTH. Esta observación sugiere que los papeles biológicos de la PTHrP son probablemente múltiples, difieren de las funciones de la PTH y tienen lugar fundamentalmente a nivel tisular (efectos autocrinos y paracrinos).

La PTHrP es expresada y secretada por el pericondrio periarticular y los condrocitos proliferativos de la placa de crecimiento (van der Eerden, 2003). En esta localización, la PTHrP mantiene a los condrocitos en su estado proliferativo y evita que se hipertrofien. En su ausencia, los condrocitos no logran la tasa de proliferación habitual, aceleran su diferenciación y se produce una mineralización prematura de su matriz extracelular, lo que da lugar a huesos acortados. En esta labor de regulación del patrón de crecimiento óseo, la PTHrP trabaja junto con otros componentes, entre los que destaca el *Indian hedgehog* (Ihh). El sistema Ihh-PTHrP resulta clave en la regulación del crecimiento lineal del hueso, estableciéndose como un punto de decisión en la vida del condrocito en el que la célula puede continuar su proliferación o diferenciarse terminalmente a un condrocito hipertrófico (Figura 5).

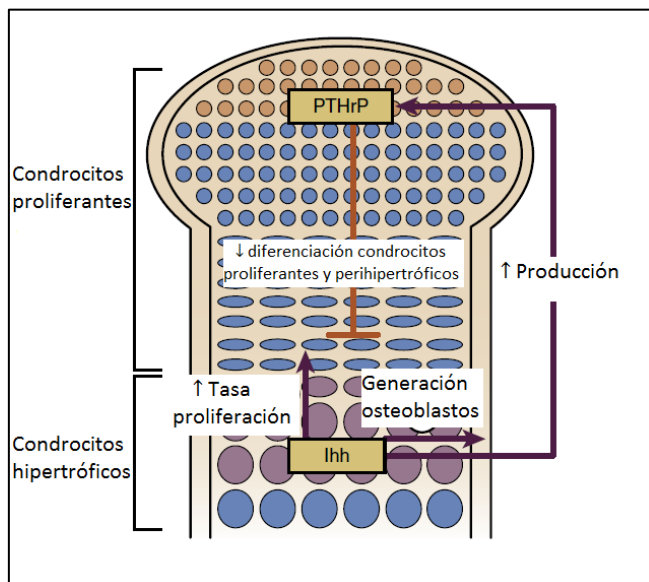


Figura 5. Sistema de retroalimentación negativa PTHrP-Ihh para la regulación de la proliferación y diferenciación condrocítica. Tomado de: Kronenberg HM ⁽²⁸⁴⁾.

La PTHrP también se produce en otros cartílagos, como el pericondrio que envuelve el cartílago costal y nasal (Chen X, 2007) y también se ha demostrado la presencia de PTHrP en diversos

tejidos, fundamentalmente vinculada a la regulación de procesos de diferenciación y maduración celular (Thiede, 1991; Philbrick, 1996; Zhang B, 2003; Wysolmerski, 2016).

1.1.4.2.4 Calcitonina

La calcitonina es un péptido producido por las células parafoliculares del tiroides y que actúa como antagonista fisiológico de la PTH. Su efecto hipocalcemiante se produce por inhibición directa de la resorción ósea mediada por osteoclastos y, de forma secundaria, mediante el aumento de la excreción renal de calcio y fósforo (a dosis altas) (Potts, 2012). La secreción de la calcitonina es dependiente de los niveles de calcio, de forma que las situaciones de hipercalcemia aumentan su concentración, pero también puede observarse un aumento de su producción vinculada a la elevación de los niveles circulantes de magnesio o tras la ingesta de alimentos con alto contenido cálcico con el objetivo de prevenir picos de elevación de calcio postprandiales (Prada, 2011). Una vez secretada, la calcitonina desaparece rápidamente de la circulación, su vida media es de 2 a 15 minutos.

1.1.4.2.5 Fosfatoinas y Factor de Crecimiento Fibroblástico 23 (FGF23)

Recientemente ha surgido una nueva clase de reguladores sistémicos de la homeostasis del fósforo denominados fosfatoinas, que establecen un nexo de comunicación directo entre el metabolismo óseo y el manejo renal del fosfato. El conocimiento de esta nueva clase de controladores del balance de fósforo surgió de la observación de que existía un grupo de condiciones patológicas en las cuales los niveles de fósforo estaban alterados sin una modificación significativa en las concentraciones de PTH, $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ o calcio, lo que resultaba incomprensible según el esquema clásico de regulación del fósforo. Estas enfermedades que se caracterizan por hipofosfatemia, hiperfosfaturia y mineralización ósea defectuosa, incluyen a la hipofosfatemia ligada al X (XLH), el raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (ADHR), su forma recesiva (ARHR) y la osteomalacia inducida por tumores. El estudio del ratón *Hyp*, que es un modelo animal del trastorno humano XLH, demostró que se puede inducir pérdida renal de fosfato en un ratón normal al ponerlo en parabiosis con un ratón *Hyp* y también cuando el riñón de un ratón normal es trasplantado en un ratón *Hyp*, lo que apuntaba a la existencia de un factor circulante fosfatúrico en el ratón mutado que fue denominado fosfatoina (Meyer, 1989; Nesbitt, 1992). Posteriormente, diferentes moléculas han sido tipificadas como fosfatoinas y

entre ellas destaca el FGF23, que se ha establecido como el más potente regulador sistémico del balance de fósforo.

El FGF23 disminuye la reabsorción renal de fósforo actuando sobre la expresión renal de cotransportadores NaPi tipo II. De forma simultánea, el FGF23 inhibe la expresión compensatoria de la 1α -hidroxilasa renal que normalmente se encuentra aumentada en situaciones de hipofosfatemia y que produciría un incremento del calcitriol. También aumenta la expresión de la 24 hidroxilasa que convierte al calcitriol en un metabolito más hidrofílico y de menor actividad (Figura 6.B).

El gen del FGF23 codifica una glicoproteína que contiene una porción N-terminal que abarca un péptido señal y una porción común a los otros factores de crecimiento fibroblástico con un dominio de unión a los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y un extremo C-terminal específico del FGF23 y que interacciona con su cofactor α -Klotho (α -KL). El gen Klotho codifica la síntesis de una proteína transmembrana cuya expresión está restringida a pocos tejidos. El cofactor Klotho parece ser indispensable para que el FGF23 actúe, de modo que la coexpresión KL-FGFR es la que define la especificidad tisular de los efectos del FGF23 (Figura 6.A). Así, mientras que los FGFRs están ampliamente expresados en muchos tejidos, la expresión de Klotho se encuentra limitada a los túbulos proximales y distales renales, plexo coroideo, testículos, nodo sinoauricular cardíaco y hueso, que serían los posibles blancos de esta hormona. (Murali, 2016).

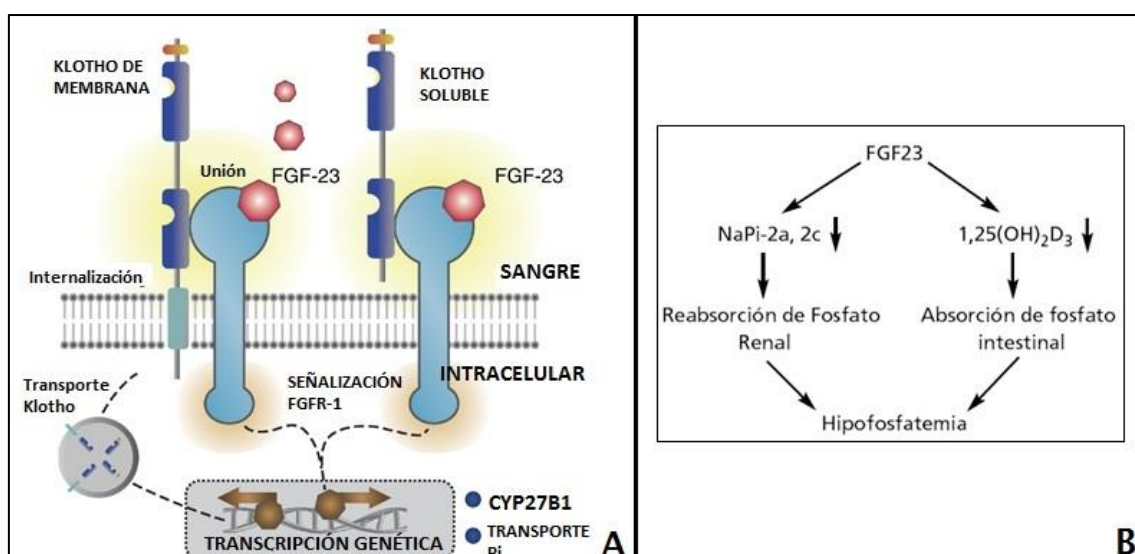


Figura 6. (A) Receptor del FGF23. En azul claro FGFR-1 (receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos); azul oscuro Klotho unido a membrana (parte izquierda) y soluble (parte derecha).

El hexágono rojo simboliza al FGF23. La señal de transducción del FGF23 se establece cuando KL y FGFR-1 se colocan (parte izquierda). Se desconoce si esta señalización también puede ocurrir con el factor KL soluble (parte derecha). Tomado de Vervloet MG, Larsson TE ⁽⁵²⁶⁾. **(B)** Acciones del FGF23.

1.1.4.2.5.1 Acciones en el riñón

- En el túbulo renal proximal, el complejo receptor FGFR:Klotho regula a la baja (*down-regulation*) la transcripción, traducción y translocación de los cotransportadores de sodio-fosfato tipo IIa y IIc (NaPi-IIa y IIc), produciendo una disminución en la reabsorción tubular de fosfato (Gattineni, 2009).
- FGF23 disminuye la síntesis de 1,25(OH)₂D, suprimiendo la actividad de la enzima 1 α -hidroxilasa (CYP27B1) (Blau, 2015). Además, FGF23 estimula también la degradación de 1,25(OH)₂VD mediante el estímulo de la enzima 24-hidroxilasa (Shimada, 2004).

Mediante estos mecanismos, FGF23 pasa a ser la principal hormona fosfatúrica y contrarreguladora de la VD (Liu, 2006). A su vez, los niveles séricos de 1,25(OH)₂VD se muestran como uno de los más importantes reguladores de la producción de FGF23 (Glade, 2013). En animales se ha objetivado que la 1,25(OH)₂VD estimula de una forma directa y dependiente de la dosis la secreción de FGF23 por el osteoblasto (Saito, 2005). Este sistema permite mantener la fosfatemia dentro de unos márgenes estrechos: cuando se produce un incremento de los niveles de 1,25(OH)₂VD y, por tanto, de la absorción gastrointestinal del fosfato, el estímulo de la producción del FGF23 por parte del osteoblasto favorecerá la fosfaturia, impidiendo la aparición de hiperfosfatemia.

1.1.4.2.5.2 Acciones en la glándula paratiroidea

FGF23 disminuye la secreción proteica de PTH, de manera dependiente de su concentración y, al igual que con el calcitriol, los niveles de PTH séricos también influyen en la regulación del FGF23 estimulando su producción en las situaciones de hipercalcemia secundarias a hipersecreción de PTH. El incremento de FGF23 aumentaría la eliminación renal del fosfato, evitando así la aparición de calcificaciones extraóseas causadas por la peligrosa asociación de hipercalcemia e hiperfosfatemia (Sánchez-Gonzalez, 2011).

1.1.4.2.5.3 Acciones en el hueso

La ausencia de FGF23 o del correceptor α -KL conlleva una deficiencia severa en la mineralización ósea, a pesar de la presencia de hipercalcemia e hiperfosfatemia (Shimada, 2004; Sitara 2004). El complejo FGF23-KL disminuye la síntesis de calcitriol (Wang Y, 2009; Liu, 2006) y se sabe que la administración en ratones de grandes dosis de $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ produce un aumento de la transcripción de las enzimas productoras y transportadoras de PPI y OPN que actúan como inhibidores de la mineralización (Wronski, 1986) (Figura 7.B).

Pero, además, también se ha demostrado que el FGF23 regula la mineralización ósea mediante un mecanismo no mediado por Klotho o el calcitriol. El modelo de experimentación animal FGF23^{-/-} de Murali y cols. demostró que el FGF23 suprime la transcripción de FANET en las células osteoblásticas actuando a través del receptor FGFR-3 (receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos) y la disminución de la actividad de la FANET en la membrana plasmática conllevará disminución de la degradación del PPI y de la liberación de fosfato inorgánico. El fosfato extracelular estimula la transcripción y secreción de OPN mediante un mecanismo de señalización desconocido de modo que, el FGF23 indirectamente también regula a la baja la secreción de OPN vía supresión de FANET y su déficit conlleva un acúmulo adicional de este inhibidor de la formación de hidroxiapatita (Figura 7.B).

Las principales acciones del FGF23 aparecen resumidas en la Figura 7.A

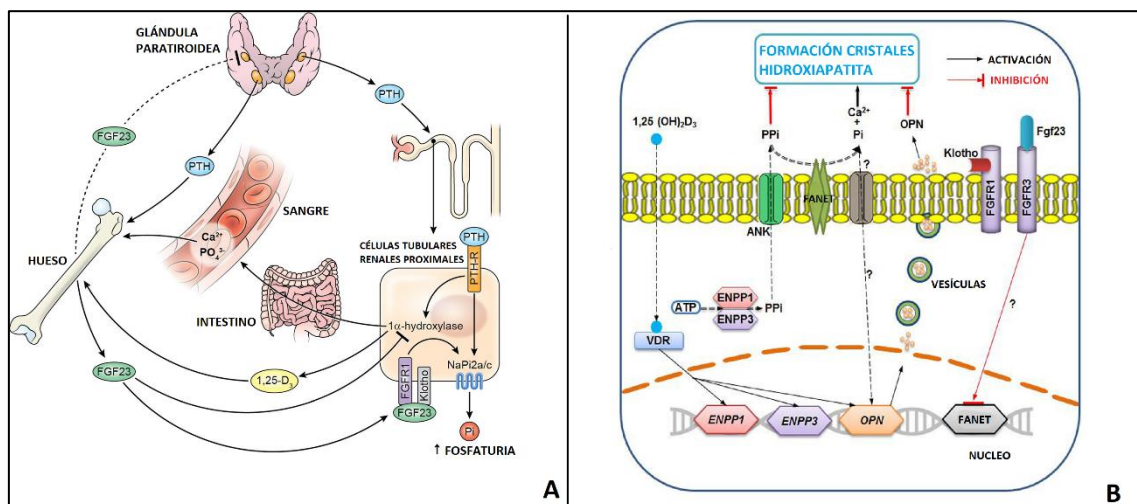


Figura 7. (A) Acciones del FGF23 **(B)** Modelo de interacción FGF23-FGFR3 y FGF23-FGFR:Klotho para el establecimiento de señales autocrinas y paracrinas reguladoras de la mineralización en osteoblastos y osteocitos. Tomado de: Murali et al ⁽³⁶⁷⁾.

1.1.4.2.6 Integración hormonal e interacciones en la regulación de la homeostasis mineral. Eje osteo-renal VD-PTH-FGF23

La homeostasis mineral está coordinada por factores sistémicos y locales que regulan la absorción intestinal de calcio y fósforo, la aposición y reabsorción ósea y la regulación renal a través de una compleja red hormonal.

Tradicionalmente, el eje PTH-VD ha proporcionado el marco conceptual para entender el metabolismo mineral. En casos de hipocalcemia, se estimula la secreción de la PTH, lo que conlleva la activación de la 1α -hidroxilasa y el incremento de $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ que favorece la absorción intestinal de calcio y fósforo y, en asociación con la PTH, moviliza el calcio óseo. Además, la PTH previene de la pérdida renal de calcio, reabsorbiendo más del 98% del calcio filtrado. La PTH secretada en respuesta a la hipocalcemia es el principal factor estimulador de la síntesis y secreción del calcitriol (el cual de forma directa e indirecta frenará su producción) (Quesada, 2000). En cambio, en situaciones de hipercalcemia, es la secreción de calcitonina la que aumenta, frenando la resorción ósea de calcio y estimulando la excreción urinaria de calcio y fósforo (Figura 8.A). La precisión de este sistema de control integrado es tal que, en condiciones normales, el nivel sérico de calcio ionizado sufre variaciones no superiores a los 0,025 mmol/L (0,1 mg/dl) a lo largo del día (Namgung, 2011). En esta visión clásica son estas mismas dos hormonas las que regulan el metabolismo del fósforo:

- La PTH inhibe la reabsorción renal de fosfato al producir la rápida internalización y degradación lisosomal del cotransportador NaPi-IIa. A su vez, las elevaciones crónicas de PTH también modulan a la baja la transcripción del ARNm y la síntesis de la proteína del NaPi-IIa. La PTH también incrementa de manera indirecta la absorción intestinal de Pi al estimular la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ mientras que el fósforo también regula la secreción de PTH: de forma indirecta a través de sus efectos sobre la calcemia y los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ y de forma directa mediante la supresión de síntesis de PTH que se produce en las situaciones de hiperfosfatemia (Combe, 1994).
- El calcitriol incrementa la absorción intestinal y la reabsorción renal de Pi, mientras que el aumento de la fosfatemia actuará inhibiendo la 1α -hidroxilasa y la síntesis de calcitriol.

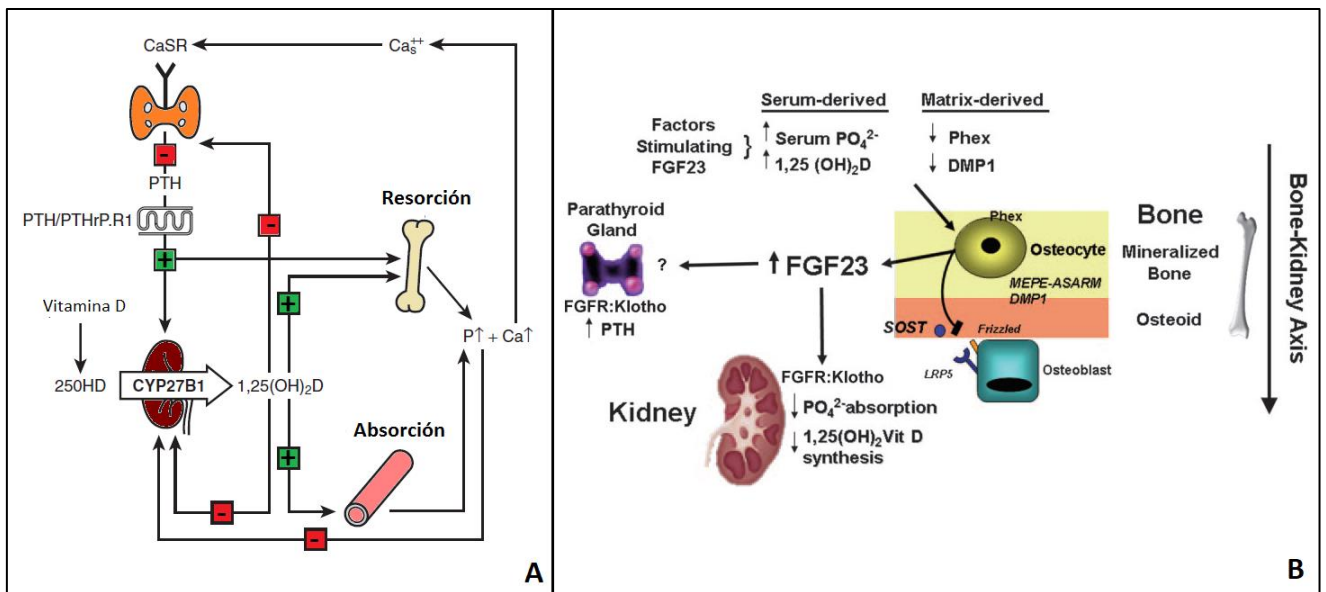


Figura 8. (A) Regulación de la síntesis renal de 1,25(OH)₂VD por la hormona paratiroidea y el calcio con múltiples mecanismos de control de retroalimentación. CaSR: Receptor de sensor cálcico. **(B)** Eje osteo-renal. Tomado de: Liu S, Quarles LD ⁽³⁰⁴⁾.

Pero el descubrimiento del FGF23 puso de manifiesto que los procesos implicados en la homeostasis vinculada al proceso de mineralización ósea eran mucho más complejos de lo que se creía y se introdujo el concepto de *eje osteo-renal VD-PTH-FGF23* en el que FGF23 protege al organismo del exceso de VD y coordina la excreción renal del fósforo con el proceso de mineralización. El conocimiento de que los osteoblastos y osteocitos son los responsables principales de la producción y secreción de FGF23 identificó el hueso, no sólo como el principal reservorio de calcio y fósforo, sino como un órgano endocrino en estrecha relación con los otros órganos involucrados en la homeostasis mineral (Figura 8.B).

Las anomalías de la producción de FGF23 subyacen en muchos trastornos hereditarios y adquiridos de la homeostasis del fósforo, hasta el punto de que resulta más claro entender el papel que desempeña a nivel patológico que fisiológico. Tanto en la hipofosfatemia ligada al cromosoma X (HLX) -entidad que permitió el descubrimiento de las fosfatoninas- como en el modelo de ratón *Hyp*, existe una mutación del gen *PheX* (*Phosphate Regulating Endopeptidase Homolog X-Linked*), que codifica la enzima endopeptidasa PHEX localizada en la parte externa de la membrana celular de los osteocitos. En ambos casos, se produce un defecto de mineralización ósea como consecuencia del acúmulo de un factor desconocido, que sería el sustrato teórico de la enzima PHEX, denominado minibina. Existe otra enfermedad con un fenotipo similar al de la XLH, que es el raquitismo autosómico recesivo (ARHR), causado por mutaciones inactivadoras de la proteína extracelular de matriz DMP1 (*Dentin Matrix Protein 1*),

que pertenece a las llamadas proteínas SIBLING (*Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein*). Ambas enfermedades (XLH y ARHR) presentan un cuadro clínico común de raquitismo/osteomalacia, hiperfosfaturia, hipofosfatemia y niveles bajos de $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ asociado a una elevación del FGF23 de origen osteocítico, lo que sugiere la presencia de una vía paracrina/endocrina que coordina el proceso de mineralización ósea con la reabsorción renal de fósforo (Lorenz-Depiereux, 2006).

El punto de unión de ambos procesos parece ser, precisamente, las glicoproteínas SIBLINGs de la matriz extracelular: DMP1, MEPE (*Matrix Extracelular Phosphoglycoprotein*) y osteopontina (OSP) (Liu, 2007). DMP1 y MEPE son expresadas por los osteoblastos (en etapas tardías) y osteocitos que están localizados en los canalículos y paredes de las lagunas osteocíticas (Negri, 2011). DMP1 es una proteína cuya expresión génica está estimulada por el fósforo. La expresión de DMP1 se induce en forma marcada en respuesta a la carga mecánica y promueve la formación de mineral en las superficies perilacunares durante el proceso de remodelación ósea. En contraste con la DMP1, MEPE inhibe de forma directa la formación de hidroxiapatita en el hueso mediante su producto de degradación ASARM (*Acidic Serine-Aspartate-Rich-Motief*), que se cree que podría corresponderse con la hasta ahora no identificada minhibina. MEPE también inhibe el número y actividad de los osteoclastos. Se ha sugerido que PHEX interfiere con las acciones de otras enzimas que degradan las proteínas de la matriz extracelular y previene así la proteólisis de MEPE y la liberación de péptidos ASARM (minhibina), que acumulados en la matriz extracelular inhibirían el proceso de mineralización (Staines, 2012). De este modo, la pérdida de expresión de PHEX en los osteoblastos funcionales es la responsable del déficit de mineralización en el modelo animal *Hyp* y en los pacientes afectados de XLH. La osteopontina (OPN) es otro inhibidor de la mineralización en su forma fosforilada y su secreción está marcadamente reducida en los ratones "knockout" para ENPP1 (ver apartado 1.1.4). Asimismo, y junto con la sialoproteína ósea (BSP, *bone sialoprotein*), la OSP también es expresada por los osteoclastos, en los que inhibe su actividad. La figura 9 esquematiza la (A) expresión y (B) función de las SIBLINGs.

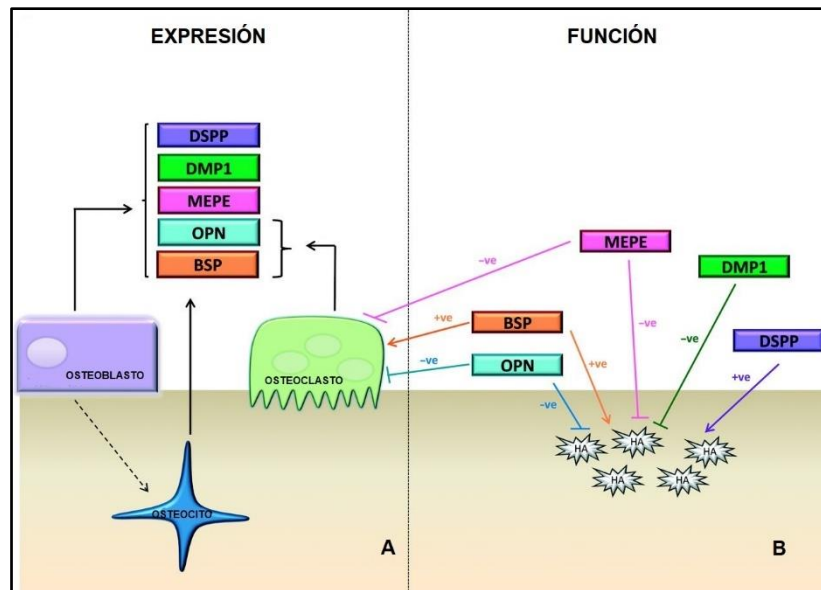


Figura 9. Figura esquemática que detalla la (A) expresión y (B) función de la familia de proteínas SIBLING: sialoproteína dentinal (DSPP), Proteína de la matriz dentaria I (DMP1) sialoproteína ósea (BSP), glicoproteína de la matriz extracelular (MEPE) y osteopontina (OPN). Tomado de: Staines KA et al ⁽⁴⁹²⁾.

En los modelos animales *Hyp*⁻ y *Dmp1*⁻ se observa, junto al raquitismo hipofosfatémico, un incremento de la expresión in vitro del gen FGF23 en las células del estroma, lo que indica que las alteraciones intrínsecas resultantes de la inactivación de los genes PHEX y DMP1 conducen a un aumento de la producción de FGF23 en los osteocitos, aunque se desconoce el mecanismo exacto por el que se produce este proceso (Martin A, 2011). Los modelos animales del grupo de Martin A (2012) proporcionan una hipotética explicación para este proceso según la cual las concentraciones séricas de FGF23 dependerían de equilibrio entre su síntesis y degradación, controladas, a su vez, por la interacción de DMP1 con PHEX para regular su transcripción genética, así como por un efecto adicional de DMP1 para controlar la degradación de FGF23 (Figura 10).

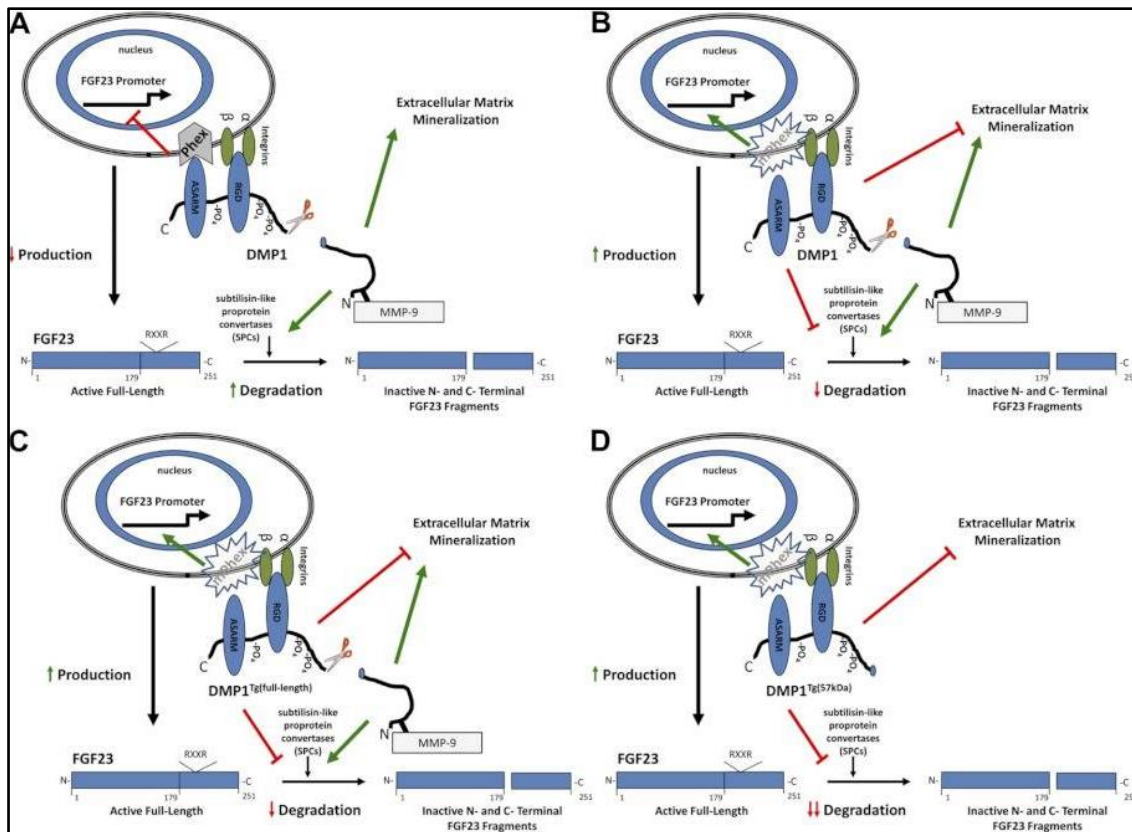


Figura 10. (A) En condiciones normales (especie salvaje), DMP1 se une a PHEX y las integrinas, ocasionando la supresión de la transcripción genética de FGF23 e incrementando su degradación. (B) En el caso de las mutaciones inactivadoras de PHEX, se produce un incremento de la producción y reducción de la degradación. En los otros dos modelos se muestra a la especie mutante Hyp con sobreexpresión transgénica de DMP1 en longitud completa (C) o en su fragmento C-terminal (D). En el primer caso, el extremo N-terminal presente cuando la DMP1 se encuentra en su forma completa estimula a *subtilisin-like proprotein convertases* para la degradación de FGF23, mientras que el extremo C-terminal no produce este efecto, produciendo un mayor desequilibrio entre producción y degradación y empeorando, así, el defecto de mineralización. Tomado de: Martin A et al ⁽³²⁸⁾.

De este modo, en el llamado eje osteo-renal, la presencia en el estroma que rodea a los osteocitos de MEPE o de su fragmento ASARM y/o la deficiencia de DMP1 produce una disminución de la mineralización ósea proporcional al efecto fosfatúrico ocasionado por el incremento paralelo de FGF23 que se produce (Quarles, 2012; Yamazaki, 2002). Asimismo, cuando se produce un descenso de la VD activa, también se produce un incremento compensatorio de la PTH, en un intento de mantener la normocalcemia, mientras que el FGF23 actúa disminuyendo la síntesis de calcitriol. Aunque la relación entre el FGF23 y la PTH es compleja y no está del todo aclarada, datos *in vitro* sugieren un efecto inhibitorio directo del FGF23 sobre la PTH mediado por su correceptor Klotho.

1.1.5 EVALUACIÓN DE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA DEL RECIÉN NACIDO

El estudio de la mineralización ósea en niños se encuentra dificultado por la necesidad de utilizar técnicas que, además de sensibles, reproducibles y exactas, sean rápidas, indoloras, inocuas y no invasivas.

En términos generales, podemos hablar de dos grandes grupos de estudios: radiológicos o bioquímicos, que tratan de conocer el estado óseo a través de marcadores de su recambio.

1.1.5.1 ESTUDIOS RADIOLÓGICOS

El estudio radiológico incluye tanto técnicas cualitativas como cuantitativas. Las primeras se basan en la descripción, a partir de imágenes radiológicas, de la apariencia del patrón cortical o trabecular óseo, de la presencia de fracturas por compresión o de la existencia de estriaciones lineales vinculadas a resorción ósea. Entre las cuantitativas, encontramos la absorciometría dual de rayos X (DEXA, *Dual Energy Xray Absorptiometry*), la tomografía cuantitativa computarizada (QTC)- técnica que permite la medición real de la densidad mineral ósea en forma volumétrica (g/cm^3)-, la ultrasonografía cuantitativa, la resonancia magnética o la radiogrametría. De entre todas ellas, la DEXA sigue siendo el método preferido para el estudio clínico de la DMO en niños (Bachrach, 2011). Las características del resto de estudios aparecen resumidas en la Tabla 1, así como algunos de los trabajos llevados a cabo con dichas técnicas en Pediatría.

Tabla 1. Métodos radiológicos cuantitativos para el estudio de la mineralización ósea en niños

Técnica	Descripción	Referencia	n	Edad
Tomografía computarizada cuantitativa axial (aQTC)	-Obtención imagen tridimensional a partir de los coeficientes de absorción de los tejidos al paso de un haz lineal de rayos X. -(V) Cálculo DMO volumétrica, determinación de la geometría y propiedades estructurales de la distribución ósea, diferenciación entre hueso compacto y esponjoso.	Gilsanz, 1991	150	2-20 años
		Gilsanz, 2009	1222	5-21 años
Tomografía computarizada cuantitativa periférica (pQTC)	-(I) Duración de la prueba y exposición a mayores dosis de radiación.	Binkley, 2008	105	7-16 años
		Wetzsteon, 2009	125	9-12 años
		Farr, 2011	465	8-13 años
		Viljakainen, 2010	87	0-14 mes
Ultrasonografía cuantitativa (QUS) esqueleto periférico	-Estudio de la velocidad de transmisión cuando el ultrasonido atraviesa un determinado medio y se genera un descenso de su energía acústica. -(V) Bajo coste, ausencia de radiación, portabilidad y rapidez. -(I) Mediaciones específicas de localización y ausencia de datos de referencia amplias	McDevitt, 2005	110	RNT/RNPT
		Baroncelli, 2006	3044	2-21 años
		Chen M, 2007	144	RNPT
		Pereira, 2011	158	RNT/RNPT
		Yu X, 2013	203	2m-6 años
Radiogrametría	-Método cuantitativo para establecer la geometría cortical de huesos tubulares a partir de radiografías simples mediante el cálculo de la anchura perióstica, anchura endóstica medular, el índice cortical y el espesor cortical combinado -(V) Técnica sencilla, simple y barata -(I) Escasa precisión, elevado CV en las mediciones manuales e información limitada	Ilich, 1996	456	8-13 años
		Malich, 2003	200	4-18 años
		van Rijn, 2004	535	4-20 años
		Bottcher, 2006	93	6-15 años

V: Ventajas; I: Inconvenientes; RNT: Recién nacidos a término; RNPT: Recién nacidos pretérmino; CV: Coeficiente de variación

Las determinaciones de mineralización ósea mediante DEXA se basan en la medición de la atenuación (absorción) de dos haces de rayos X de diferente energía. Los fotones de baja energía son atenuados por los tejidos blandos que rodean al hueso, mientras que los fotones de alta energía se atenúan por el hueso y por los tejidos blandos. Un detector localizado por debajo del tubo generador de rayos X mide los fotones salientes de la zona escaneada y un ordenador substraer los valores de baja energía de los valores de alta energía, permitiendo determinar el contenido mineral óseo (CMO o *Bone Mineral Content*, BMC) que posee el área de proyección. El CMO vertebral no sólo depende de la cantidad del depósito de minerales en la matriz ósea, sino también del tamaño vertebral, de modo que para la obtención de un indicador relativo que permita expresar los cambios en la mineralización ósea debemos dividir su valor (g) entre el volumen vertebral (cm³). Sin embargo, el cálculo de este volumen, que permitiría obtener el valor de la densidad mineral ósea volumétrica (DMOV), resulta técnicamente difícil e impreciso (Katzman, 1991). Por este motivo, los valores de CMO obtenidos en las poblaciones pediátricas suelen ser referidos al área ósea proyectada (cm²) y expresados como valores de DMO areal (DMOa) (g/cm²) que proporcionará una medida bidimensional de una estructura tridimensional: el hueso. La DMOa depende del tamaño óseo, de modo que se obtienen valores falsamente

aumentados de DMOa cuanto mayor es la distancia ósea que atraviesan los haces de rayos X (Figura 11.A). Este es un aspecto para tener en cuenta en pediatría, dado que las tablas de referencia están basadas en la edad, y que para cada edad existen amplias diferencias de tamaño corporal y óseo en la población normal y más en la que presenta alguna alteración patológica. Así, vemos como la DMOa estudiada mediante DEXA se incrementa con la edad, mientras que los cálculos del volumen óseo mediante tomografía computarizada permiten obtener valores de densidad mineral ósea volumétrica (DMOv) que reflejan más fielmente el estado de mineralización del hueso y que se mantienen relativamente constantes durante la infancia hasta alcanzar la pubertad, cuando se produce un gran incremento de ésta (Specker, 2005).

La exposición a radiación en los estudios de DEXA es baja (Blake, 2006), aunque puede variar dependiendo del fabricante, del modelo del aparato y de las características de la exposición. Los niños reciben una dosis de radiación efectiva mayor que la de los adultos debido a que el haz de radiación abarca una superficie corporal proporcionalmente mayor. En general, esta dosis no supera el $1 \mu\text{Sv}$ (Damilakis, 2013), lo que se traduce en una estimación de riesgo vital de cáncer vinculado al estudio insignificante (inferior a 1 en 1,000.000). La Figura 11.B muestran una comparativa entre la dosis media de radiación de un estudio de columna lumbar (0,2-0,3 mrem) obtenido en un sistema GE Lunar-DPX (Njeh, 1997) y otros procedimientos o actividades cotidianas.

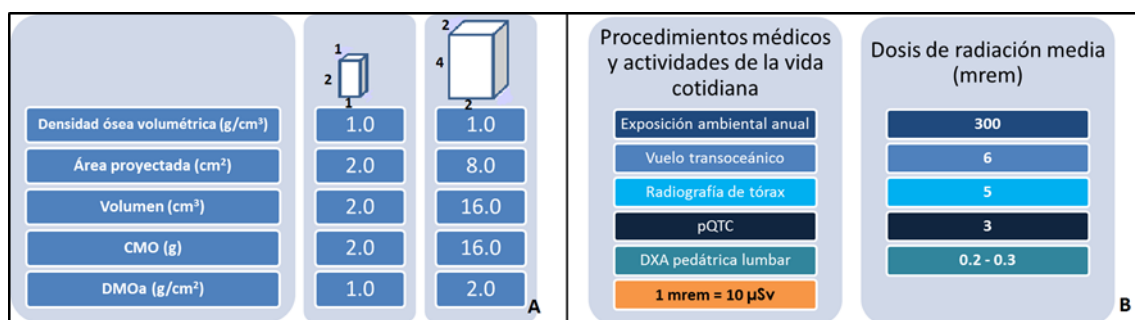


Figura 11 (A) Efecto del tamaño del hueso sobre la medida de densidad ósea areal (DMOa): para una densidad ósea volumétrica similar, los huesos de mayor tamaño poseen una DMOa mayor en los estudios de absorciometría dual de rayos X **(B)** Dosis de radiación media en procedimientos médicos habituales y actividades cotidianas.

Los resultados de DMOa se presentan habitualmente en forma de T y Z scores. La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece el diagnóstico de osteoporosis en adultos basándose en el T-score, que se define como el número de desviaciones estándar [DE] de la DMOa observada respecto a la de un adulto joven sano. Cuando el T-score se encuentra entre -1 y -2.5 DE, se

considera que existe osteopenia, y valores por debajo de -2,5 DE son diagnósticos de osteoporosis (Kanis, 1994). Por establecer comparación con adultos jóvenes, los T score no son adecuados durante la infancia. En el año 2007, la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (ISCD), en la actualización de sus posicionamientos oficiales, avaló la utilización del Z-score como método de valoración más adecuado en pediatría (Baim, 2008; Gordon, 2008). El Z-score se define como el número de DE de la DMOa respecto a los valores específicos según sexo y edad. En esta conferencia de consenso quedó establecido que para el diagnóstico de osteoporosis en niños y adolescentes se requería de la combinación del criterio densitométrico de disminución de masa ósea (Z-score igual o inferior a -2 DE) junto con el antecedente de una historia clínica significativa de fracturas (Rauch, 2008). En el año 2013, esta misma sociedad establece que el estudio de columna lumbar es el más apropiado entre los 0-5 años por su viabilidad y reproductibilidad (nivel de evidencia B) (Kalkwarf, 2014). Aunque se acepta que el estudio de DMOa corporal total que puede realizarse con los aparatos más modernos aporta datos adicionales de composición corporal, su uso en los menores de 3 años se encuentra limitado en la práctica clínica debido a las dificultades de posicionamiento y al movimiento durante su realización, que se traducen en coeficientes de variación superiores al 5% (Godang, 2010) (nivel de evidencia C).

Con todo y, pese a ser la técnica de elección, la DEXA presenta una serie de limitaciones para el estudio de la mineralización ósea en pediatría:

- a) Adquisición de la imagen y calibración. Los dos fabricantes de aparatos de DEXA existentes: Hologic y General Electrics Lunar, emplean métodos de calibración diferentes - de hecho, los valores obtenidos con el primero son inferiores-, lo que impide establecer comparaciones entre los estudios realizados con cada uno de ellos (Leonard, 2011).
- b) Análisis de la imagen. El hueso pediátrico presenta una menor densidad que el del adulto (Rauch, 2001a), por lo que los aparatos calibrados para los estudios en adultos subestiman la DMO en niños. Existen softwares de análisis con algoritmos modificados que mejoran los límites de detección de los huesos pediátricos con el objetivo de minimizar este problema (Binkovitz, 2007). Pero a pesar de ello, los valores de CMO y DMOa difieren entre los aparatos de los dos fabricantes y entre las diferentes versiones de software de estos (Kalkwarf, 2014).

- c) Precisión del estudio. La precisión es una medida de la reproductibilidad de un estudio y puede expresarse en términos de coeficientes de variación (%CV). La precisión a corto plazo depende tanto de la imprecisión del equipamiento (que los fabricantes afirman ser inferior al 1%) como de la resultante del posicionamiento del paciente y de los efectos del movimiento (se acepta que estos valores son inferiores al 2-3% en la columna, alrededor del 5% en la cadera y del 1-2% para el cuerpo entero en las series pediátricas) (Binkovitz, 2007).
- d) Región de estudio. En un mismo individuo, existe una baja correlación entre los Z-scores obtenidos en regiones de predominio de hueso cortical frente a las de predominio de hueso trabecular (Shore, 1995). Incluso si se compara el fémur proximal y la columna, ambas regiones con porcentajes elevados de hueso trabecular, aunque el nivel de correlación es mayor ($r = 0,73$), los Z-score resultantes son en muchas ocasiones dispares (Henderson, 1997).
- e) Errores de interpretación. La DEXA no permite diferenciar entre hueso cortical y trabecular y, como ya se ha explicado previamente, subestima la densidad volumétrica de los niños con estatura baja (Prentice, 1994) y su interpretación resulta compleja en el caso de adolescentes con retraso puberal (Leonard, 2001).
- f) Datos de referencia. En el año 2007, la Conferencia de Consenso sobre Posicionamiento Pediátrico de la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica, advirtió de que los datos de referencia adecuados deberían incluir una muestra de población general sana lo suficientemente grande para caracterizar la variabilidad normal de las mediciones óseas tomando en consideración el sexo, edad, raza y etnia. La Tabla 2 resume los principales trabajos que aportan datos densitométricos de referencia en recién nacidos y lactantes menores de un año clasificados según el aparato y técnica empleada.

Tabla 2. Valores de contenido mineral óseo y densidad mineral ósea areal en niños sanos menores de un año

	Referencia	Muestra	Etnia	Edad	CMO (g) o DMOa (g/cm ²) por edad y localización esquelética [media ± DE (n)]	
Hologic 4500A	Koo, 2003	n = 98	Blanca 37 Negra 55 Hispana 6	RN 3m 6m	CMO cuerpo completo 89.4 ± 13.9 148.6 ± 24.9 214.7 ± 34.6	DMO cuerpo completo 0.238 ± 0.021 0.257 ± 0.023 0.296 ± 0.024
	Hammami, 2003	n = 73	Blanca 26 Negra 42 Hispana 5	RN	CMO cuerpo completo 89.3 ± 14.1	DMO cuerpo completo 0.240 ± 0.022
	Gallo, 2012	n = 63	Blanca 51 Asiática 7 Negra 2 Otras 3	RN 6m 12m RN 6m 12m	CMO cuerpo completo 75.98 ± 14.17 169.48 ± 29.01 227.00 ± 29.73 CMO L1-L4 2.35 ± 0.42 3.59 ± 0.63 5.37 ± 1.02	DMOa L1-L4 0.226 ± 0.044 (62) 0.252 ± 0.031 (62) 0.304 ± 0.440 (57)
	Kalkwarf, 2013	n = 307	Blanca 225 Negra 63 Mestizos 15 Asiática 4	1m 6m 12m		p50 DMOa L1-L4 (p9, p90) 0.204 (0.171, 0.241) 0.254 (0.215, 0.297) 0.312 (0.267, 0.361)
	Gallo, 2013	n = 132	Blanca	1m 3m 6m 9m 12m	CMO L1-L4 2.76 ± 0.62 (132) 2.94 ± 0.55 (116) 3.59 ± 0.63 (107) 4.55 ± 0.86 (100) 5.58 ± 0.98 (97)	DMOa L1-L4 0.267 ± 0.057 (132) 0.243 ± 0.037 (116) 0.264 ± 0.041 (107) 0.296 ± 0.041 (100) 0.333 ± 0.046 (97)
GE Lunar – DPX / Pro	Yeste, 1998	n = 53	Blanca	0-1,5m 1,5-3m 3-6m 6-12m		DMOa L2-L4 0.19 ± 0.04 (9) 0.23 ± 0.05 (10) 0.24 ± 0.03 (13) 0.29 ± 0.05 (21)
	Godang, 2010	n = 207	Blanca	RN	CMO cuerpo completo H: 95.7 ± 12.0 (112) M: 88.9 ± 12.3 (95)	DMO cuerpo completo H: 0.348 ± 0.043 (112) M: 0.338 ± 0.044 (95)
	Ay, 2011	n = 252	Blanca	6m	CMO L2-L4 H: 2.7 ± 0.5 (145) M: 2.6 ± 0.4 (107)	DMOa L1-L4 H: 0.31 ± 0.04 (145) M: 0.33 ± 0.04 (107)
	Manousaki, 2016	n = 155	80% Caucásicos 8% Negros 5% Hispanos 5% Árabes 2% Asiáticos	0-1m 1-3m 3-6m 6-12m 1-2a 2-3a 3-4a 4-5a		DMO cuerpo completo 0.30 ± 0.04 (30) 0.31 ± 0.03 (12) 0.33 ± 0.03 (14) 0.34 ± 0.04 (22) 0.40 ± 0.05 (20) 0.51 ± 0.07 (18) 0.58 ± 0.05 (20) 0.58 ± 0.08 (19)

1.1.5.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS

Los marcadores bioquímicos de recambio óseo proporcionan un método no invasivo para establecer los cambios que se producen en el metabolismo óseo y pueden dividirse en marcadores de formación y marcadores de resorción ósea (Tabla 3). No obstante, debemos tener en cuenta que no todos los marcadores de recambio óseo son específicos de hueso, ya que algunos pueden encontrarse también en otros tejidos.

Tabla 3. Marcadores bioquímicos de resorción y formación ósea

MARCADORES DE RESORCIÓN ÓSEA	
PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL COLÁGENO	Piridolina (PYD)
	Desoxipiridolina (DPD)
	Telopéptidos del colágeno de tipo I C-terminal (CTX o ICTP) N-terminal (NTX)
ENZIMAS OSTEOCLÁSTICOS	Fosfatasa ácida resistente al tartrato 5b (TRAP5b)
MARCADORES DE FORMACIÓN ÓSEA	
BIOPRODUCTOS DE LA SÍNTESIS DE COLÁGENO	Propéptido C-terminal y N-terminal del procolágeno de tipo I (PICP, PINP)
PROTEÍNAS MATRICIALES	Osteocalcina total e intacta (OC)
ENZIMAS OSTEOLÁSTICAS	Fosfatasa alcalina total (FA) Fosfatasa alcalina ósea (BALP)

Los marcadores de resorción ósea incluyen enzimas vinculadas a la actividad de los osteoclastos, pero fundamentalmente están basados en la detección de los productos de degradación del colágeno de tipo I (Naylor, 2015). La mayoría poseen un ritmo diurno de producción, de manera que los valores se encuentran más elevados por las mañanas, siendo este el momento que se recomienda para la recolección de las muestras (Klemm, 2017).

Los marcadores de formación ósea reflejan la actividad de los osteoblastos. Dentro del ámbito de la investigación y la práctica clínica en pediatría, los más empleados son la fosfatasa alcalina y sus diferentes isoformas, la osteocalcina y los productos derivados del procolágeno (Shaw, 2011).

No existe un marcador ideal para la valoración del recambio óseo y tampoco ninguno es específico de los tres procesos biológicos diferenciados de crecimiento epifisario, modelado y remodelado, por lo que se recomienda su uso combinado. Además, debido a que no se han establecido marcadores de referencia para el recambio óseo, resulta difícil la comparación

directa de los resultados publicados por diferentes estudios. La Fundación Internacional para la Osteoporosis (IOF) ha recomendado el telopéptido C-terminal del colágeno de tipo I (CTX o ICTP) y el propéptido N-terminal del procolágeno de tipo I (PINP) como los marcadores de referencia para la resorción y la formación ósea respectivamente (Vasikaran, 2011a), debido a su respuesta dinámica al tratamiento. No obstante, se trata de dos determinaciones que no se hallan disponibles de manera habitual en muchos laboratorios clínicos, por lo que la fosfatasa alcalina total (FA) sigue siendo la determinación bioquímica más empleada en la práctica clínica diaria.

Las FA son un grupo de isoenzimas localizadas en la capa externa de las membranas celulares y que catalizan la hidrólisis de los ésteres de fosfato orgánico en el espacio extracelular, generando un radical orgánico y fosfato inorgánico. El zinc y el magnesio son importantes cofactores de estas enzimas cuya función fisiológica precisa aun es ampliamente desconocida (Lowe, 2017). En humanos, las FA se encuentran codificadas por 4 genes: 3 genes expresan 3 isoenzimas de FA específicas de tejido (intestinal, placentaria y de células germinales o *placenta-like*; el cuarto gen codifica una isoenzima de FA que es ubicua, pero especialmente abundante en hígado, hueso y riñón y que puede denominarse FA no específica de tejido (FANET). La fracción ósea de FANET en suero supone entre el 77-89% en los niños y entre el 58-67% en los adultos (Turan, 2011). Las dos isoenzimas mayores circulantes de FA, ósea y hepática, son difíciles de diferenciar porque proceden de un único gen y sólo difieren en su glicosilación post-translacional (Shaw, 2011). Actualmente, el inmunoensayo es el método de elección para la cuantificación de la fosfatasa alcalina ósea (BALP) debido a su alta especificidad y precisión satisfactoria (Klemm, 2017), aunque se trata de una determinación que no se realiza de forma rutinaria. La BALP se encuentra unida a la membrana de los osteoblastos y es liberada a la circulación sistémica mediante la formación de vesículas a través de la actividad del fosfatidilinositol glucanasa sin que exista una variabilidad circadiana significativa (Shaw, 2011). Su función es incierta, pero se ha postulado que probablemente tenga un papel en la mineralización del nuevo hueso formado actuando como neutralizador del PPI (ver apartado 1.1.4) y en la maduración de la matriz osteoide. Diferentes estudios han demostrado que la actividad de BALP en los osteoblastos y en el hueso es proporcional a la formación de colágeno, por lo que su determinación puede traducir el índice de formación ósea (Naylor, 2015). De hecho, la mutación en el gen de FANET da lugar a la aparición de hipofosfatasa, una enfermedad caracterizada por una mineralización anormal del tejido óseo y dental (Whyte, 2010).

Tradicionalmente, la actividad FA sérica total ha sido empleada como marcador bioquímico para seguir la actividad de enfermedades óseas metabólicas asociadas con grandes cambios en el recambio óseo, tales como la enfermedad de Paget, el osteosarcoma, el hiperparatiroidismo

primario, el raquitismo o la osteomalacia, en las que la cantidad de las isoenzimas óseas se encuentra excepcionalmente elevada (Figura 12.B). La interpretación de los valores de FA debe realizarse con cautela, teniendo en cuenta que carece de especificidad y que los intervalos de referencia varían en función de la edad y del sexo, alcanzando valores máximos durante las fases de rápido crecimiento tales como la infancia y la pubertad (Turan, 2011). La tabla 4 y la Figura 12.A resumen las variaciones fisiológicas en los valores de FA durante la edad pediátrica en comparación con diferentes tipos de raquitismo (Figura 12.B).

Tabla 4. Valores medios de FA (U/L) ± 2 DE en función de la edad y el sexo. Tomado de: Turan et al⁽⁵⁰⁹⁾

EDAD	MUJERES				HOMBRES			
	N	-2DE	Media	+2DE	N	-2DE	Media	+2DE
0-6 meses	90	355	663	1037	86	297	746	1178
6-12 meses	40	350	563	812	36	299	611	998
1 año	79	311	570	884	61	327	664	1118
2-3 años	62	265	526	849	48	319	509	734
4-5 años	74	294	516	783	64	273	485	755
6-7 años	97	255	473	738	96	388	570	785
8-9 años	116	326	530	769	89	241	458	743
10-11 años	100	328	587	899	92	400	641	938
12-13 años	99	204	515	924	91	286	596	1000
14-15 años	97	82	282	564	108	164	559	1000
16-17 años	50	88	180	293	66	68	210	430

DE: Desviación estándar

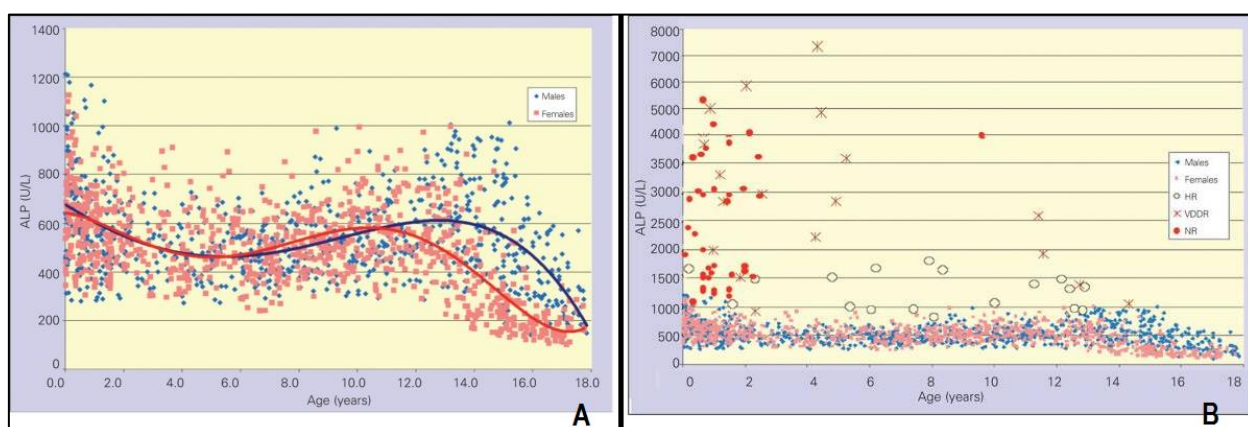


Figura 12. (A) Valores séricos de FA en ● hombres y ■ mujeres según edad mostrando un curso tetrafásico desde el nacimiento hasta la edad adulta. (B) Niveles de FA en diferentes tipos de raquitismo. ● NR: Raquitismo nutricional; X VDDR: Raquitismo dependiente de VD; ○ HR: Raquitismo Hipofosfatémico. Tomado de: Turan et al⁽⁵⁰⁹⁾.

Al igual que ocurre con la FA, la infancia y la pubertad ocasionan un aumento de las concentraciones séricas del resto de los marcadores de formación y resorción ósea, demostrando su correlación con la velocidad de crecimiento (van Coeverden, 2002).

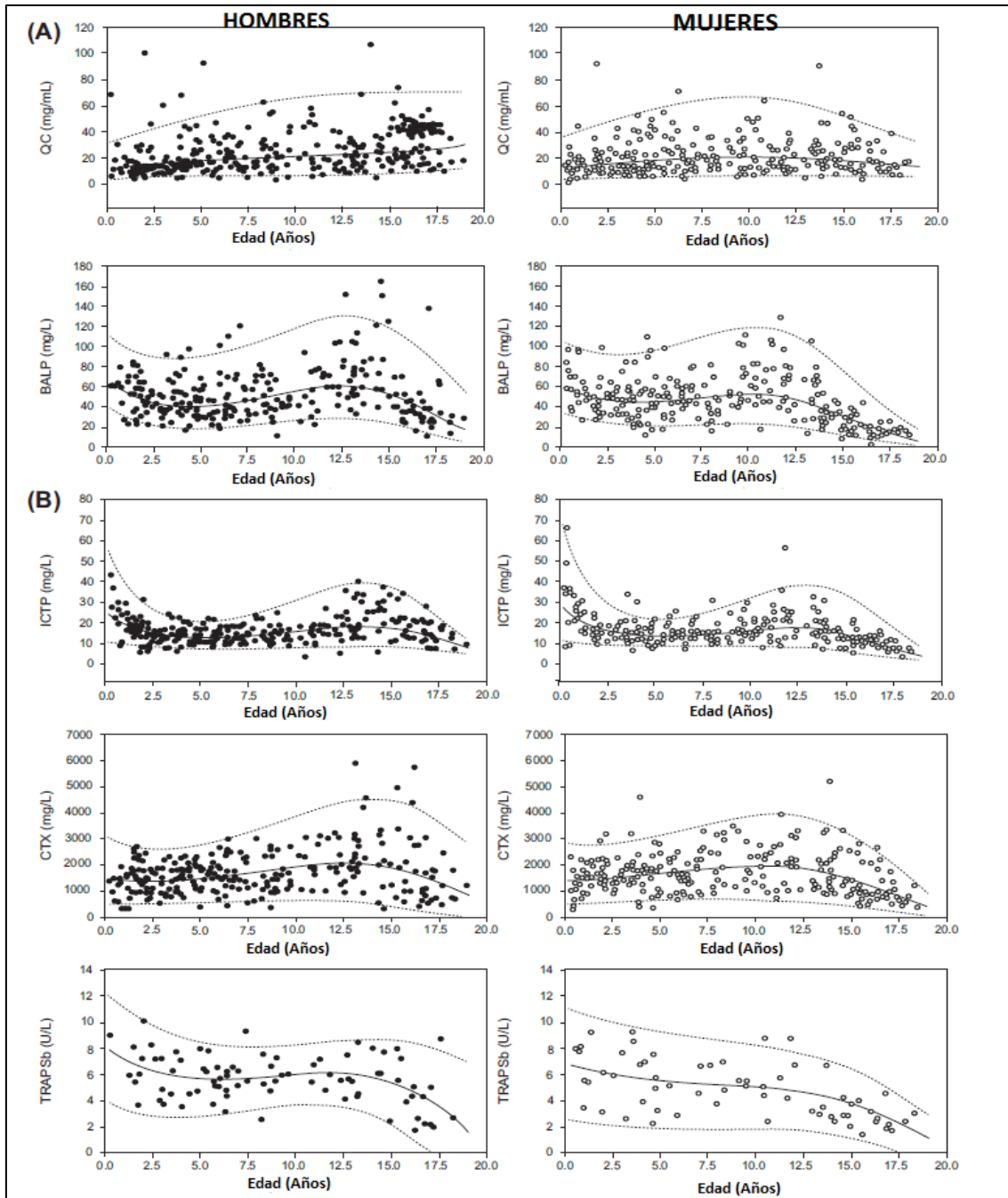


Figura 13. (A) Curvas de referencia de los marcadores de formación ósea osteocalcina (OC) y fosfatasa alcalina ósea (BALP) en niños (círculos rellenos) y niñas (círculos huecos). Las curvas representan el percentil 50 (línea continua) y los percentiles 3 y 97 (líneas discontinuas). (B) Curvas de referencia de los marcadores de degradación ósea región carboxi-terminal del telopéptido colágeno de tipo I (ICTP), cadena 1 α de la región carboxi-terminal del telopéptido colágeno de tipo I (CTX) y Fosfatasa ácida resistente al tartrato 5b (TRAP5b) en niños (círculos

rellenos) y niñas (círculos huecos). Las curvas representan el percentil 50 (línea continua) y los percentiles 3 y 97 (líneas discontinuas). Tomado de Rauchenzauner et al⁽⁴³⁰⁾.

Tanto en hombres como en mujeres, las concentraciones de la mayoría de los marcadores disminuyen hacia el final de la pubertad alcanzando los valores más bajos en la transición a la edad adulta. Así, el seguimiento longitudinal de un determinado paciente basado en marcadores bioquímicos requiere de la comparación con los cambios fisiológicos que muestran las curvas de referencia pediátricas. De entre los múltiples estudios disponibles, probablemente el más completo sea el de Rauchenzauner y cols. en el que se infieren curvas de referencia específicas de edad y sexo de cinco marcadores óseos diferentes derivadas de una gran cohorte de niños sanos entre los 2 meses y los 18 años (Figura 13).

1.1.5.3 RELEVANCIA CLÍNICA Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO DE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA

Existe una fuerte asociación estadística entre las mediciones de DMO y el riesgo de fracturas. No obstante, el establecimiento del riesgo de fracturas mediante la determinación de la DMO carece de sensibilidad: estudios prospectivos de cohortes en población adulta han demostrado que más de la mitad de los pacientes que sufren una fractura incidental no vertebral no cumplen con los criterios de osteoporosis (T-score de DMO de -2,5 o menor) (Wainwright, 2005; Schuit, 2004). Los marcadores bioquímicos de recambio óseo son más sensibles a los cambios sutiles, pero su valor predictivo en un paciente individual también resulta incierto (Vasikaran, 2011b). La gran variabilidad intraindividual en la liberación y concentración de marcadores óseos descartan su uso con una finalidad exclusivamente diagnóstica, siendo mucho más útiles para el seguimiento del curso evolutivo de las enfermedades óseas metabólicas y su respuesta al tratamiento (Shaw, 2011).

1.2 VITAMINA D (VD)

1.2.1 HISTORIA DE LA VD

La VD está considerada como una de las hormonas más antiguas con presencia sobre la Tierra, con datos sobre su existencia durante, al menos, los últimos 750 millones de años. Se cree que se originó por la exposición del fitoplancton del océano a la luz solar, transfiriéndose, a través de la cadena alimentaria, hasta formar parte del plancton animal y de los crustáceos, donde se almacenó y concentró (Holick, 1995) - de ahí la importancia de los pescados grasos y el aceite de hígado de bacalao como fuente de VD-. Aunque no se conoce con exactitud el papel fisiológico de la VD en estas formas de vida inferiores, se supone que su función inicial fue la de proteger a las macromoléculas sensibles (proteínas, DNA y RNA) de la radiación ultravioleta (Holick, 2003). A lo largo de la evolución, la VD se convirtió en un factor determinante para la supervivencia de los vertebrados terrestres por su papel en el desarrollo y mantenimiento de sus esqueletos osificados (Hochberg, 2003). La principal función fisiológica de la VD en todos ellos consiste en mantener las concentraciones séricas de fósforo y calcio en los niveles adecuados para poder llevar a cabo los procesos celulares, las funciones neuromusculares y la mineralización ósea.

Las diferencias étnicas y de género que existen en la pigmentación cutánea apuntan al importante papel que la VD ha jugado durante la evolución del ser humano. Las primeras poblaciones que ocuparon el continente africano requerían de un mínimo sustrato y almacenamiento de VD en el ambiente tropical en el que se desenvolvían. Cuando los homínidos primitivos migraron hacia el norte, los diversos grados evolutivos de despigmentación facilitaron la síntesis de previtamina D₃ inducida por la radiación ultravioleta de tipo B (UVB). Se entiende así, que la pigmentación cutánea en función de la latitud es la consecuencia del equilibrio entre síntesis de VD y fotoprotección necesario para la pervivencia de la especie. Esta presión de la selección evolutiva hacia una coloración cutánea más clara para aumentar la capacidad de producción de VD parece estar también vinculada al sexo femenino. En todas las poblaciones, las mujeres presentan tonalidades de piel más claras que sus homólogos masculinos, lo que podría estar determinado por los mayores requerimientos de VD de las mujeres durante los periodos de embarazo y lactancia (Holick, 2007b).

La historia de la VD es paralela a la del raquitismo y la osteomalacia. A pesar de la referencia anecdótica de casos de raquitismo en la Antigüedad, no fue hasta el siglo XVII cuando esta entidad adquirió relevancia clínica, con las primeras descripciones del cuadro realizadas por Daniel Whistler (1645) y Francis Glisson (1650). Este último fue quien acuñó el término de raquitismo (del griego *rhajis*, “espinas del dorso”) para referirse a esta entidad, tanto por su parecido fonético con el término inglés clásico “rickets” (derivado de *wrikken to twist* que significa “encorvado, torcido”) como por la parte del cuerpo que consideraba era una de las que se afectaba en primer lugar. Más adelante, durante los siglos XVIII y XIX, fueron muchos los investigadores que cuestionaron el origen de la enfermedad; en 1772, Levachander de la Feutrie insiste en el papel patogénico de una “alimentación deficiente” y, en 1822, Sniadecki sugiere, por primera vez, la posibilidad de que esta enfermedad ósea esté asociada a la falta de exposición solar.

En 1919, Edward Mellanby, un médico inglés, dirigió el primer estudio experimental con el fin de valorar el papel de la dieta en la etiología y tratamiento del raquitismo. Descubrió que el aceite de hígado de bacalao curaba el raquitismo, atribuyendo esta acción a la vitamina A. Tres años más tarde, McCollum, después de destruir por oxidación la vitamina A de una muestra de aceite, vio que ésta seguía curando el raquitismo y predijo que otro factor era el responsable de la actividad antirraquítica, demostrando así, la existencia de una nueva vitamina a la que llamó Vitamina D. Al mismo tiempo que se afianzaba el conocimiento sobre la eficacia de ciertos alimentos como tratamiento para el raquitismo, se estableció el papel de la radiación ultravioleta como agente terapéutico de esta entidad. En 1919, Kurt Huldschinsky demostró la curación del raquitismo de los niños mediante su exposición a los haces de luz procedentes de una lámpara de vapor de mercurio. En ese mismo periodo, el grupo del Dr. Chick llevó a cabo en Viena diversos estudios clínicos controlados que confirmaron el valor preventivo y terapéutico de la exposición solar en esta enfermedad. Esta disyuntiva entre el tratamiento nutricional o mediante exposición a la luz ultravioleta fue acogida inicialmente con cierta perplejidad, pero supuso un avance significativo en el estudio del raquitismo a principios del siglo XX, permitiendo la comprensión de las variaciones estacionales en su incidencia, el papel de la pigmentación o el escaso aporte de la leche materna como fuente de VD.

La estructura química de la vitamina fue determinada en los años 30 en el laboratorio del profesor Windaus en la Universidad de Göttingen en Alemania quien recibió el Premio Nobel de Química en 1928 por su trabajo sobre los esteroides y su relación con las vitaminas. La vitamina D₂ fue caracterizada en 1931 y en el año 1936 se obtuvo la estructura química de la vitamina D₃ a partir de la irradiación ultravioleta del ergosterol y el 7-dehidrocolesterol respectivamente. De este modo, las dos vitaminas fueron aisladas y su estructura esteroidea definida, aunque su

mecanismo de acción no se entendería hasta 30 años más tarde. En 1969, el equipo liderado por el profesor DeLuca en la Universidad de Wisconsin demostró la existencia de la 25-hidroxivitamina D o calcidiol de origen hepático. Finalmente, en 1971, Lawson identificó la estructura química de un segundo metabolito activo (1,25-dihidroxivitamina D o calcitriol) consecuencia de una segunda y definitiva hidroxilación a nivel renal.

La contribución más reciente en la historia de la VD y el raquitismo se produjo en el año 1975 con el descubrimiento del receptor proteico que permite la unión del calcitriol con el núcleo de las células intestinales por parte de los profesores Brumbaugh y Haussler.

1.2.2 FISILOGIA Y METABOLISMO DE LA VD

1.2.2.1 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS

La VD se presenta bajo el aspecto de un polvo cristalino blanco amarillento. Es una vitamina liposoluble, ligeramente soluble en aceites y grasas e insoluble en el agua. Es sensible a la luz, al oxígeno y a los ácidos, que provocan su rápida degradación y es relativamente termosensible: en su forma cristalizada resiste la acción del calor, pero, en solución oleosa, se isomeriza (Holick, 1996).

La VD es un secoesteroide con una estructura molecular muy similar a la de las hormonas esteroideas clásicas (estradiol, cortisol y aldosterona) con las que comparte el mismo anillo ciclopentanoperhidrofenantreno (Norman, 2008) y de las que se diferencia por la rotura del enlace C9-C10 del anillo B del colesterol. En realidad, al describir a la VD o calciferol no nos referimos a un único compuesto, sino a una familia de secoesteroides que presentan actividad vitamínica similar, siendo los más importantes el ergocalciferol o vitamina D₂, de origen vegetal, y el colecalciferol o vitamina D₃, de origen animal. La única diferencia entre ambos compuestos reside en la cadena lateral fijada al C17 del esqueleto esterol: saturada para la D₃ e insaturada (C22 y C23) y metilada (C24) para la D₂ (Figura 14).

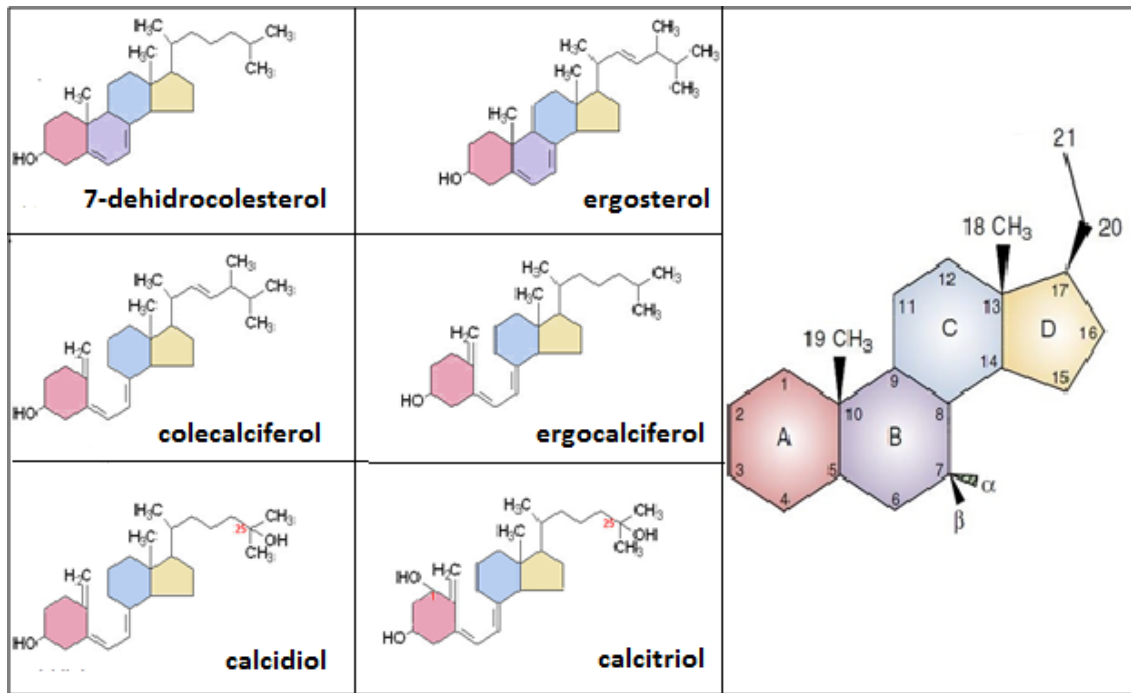


Figura 14 Estructura química de la familia de la VD. En el núcleo esteroideo los anillos aparecen identificados con letras y los átomos de carbono están numerados. Los sustitutos e hidrógenos se muestran proyectados hacia arriba (β) o debajo (α) del plano del núcleo esteroideo.

Tanto el ergocalciferol como el coledalciferol derivan de sus respectivas provitaminas: ergosterol vegetal (provitamina D₂) presente en hongos y plantas y 7-dehidrocolesterol de la piel (provitamina D₃). La radiación ultravioleta de tipo B (UVB; 290-315 nm) produce sobre ambas provitaminas la rotura fotoquímica de su anillo B entre los carbonos 9 y 10, dando lugar a la formación de una cadena triinsaturada que los convierte en previtaminas (Rapado, 2000). Estas previtaminas son termodinámicamente inestables y se transforman, por acción del calor y mediante una reacción no enzimática (~36 horas), en un isómero de doble enlace, que es la vitamina activa biológicamente (Hart, 2006; Lips, 2006; Holick, 2011a) (Figura 15).

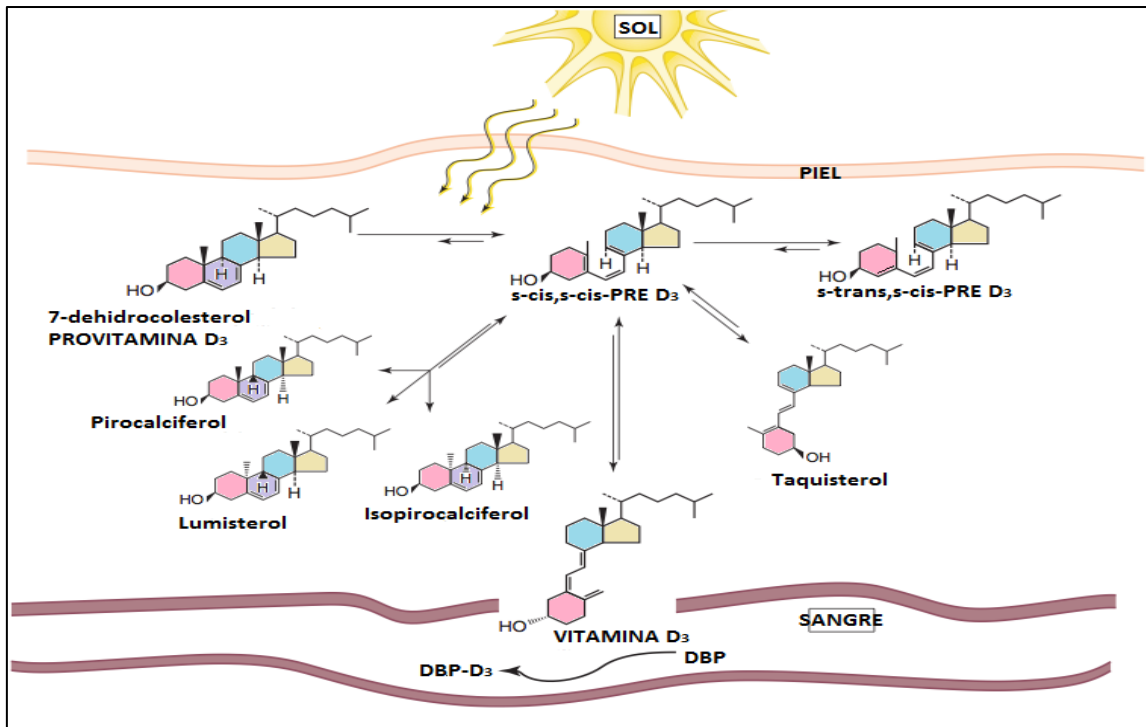


Figura 15 Fotólisis de la provitamina D₃ en previtamina D₃ y su isomerización térmica en vitamina D₃.

Durante mucho tiempo, se pensó que las vitaminas D₂ y D₃ poseían mecanismos de acción y efectos biológicos similares en humanos. No obstante, en los últimos años, se han documentado diferencias sutiles en cuanto al procesamiento de estos dos esteroides (Baillie, 2002) que sugieren una mayor efectividad de la vitamina D₃ en la elevación y mantenimiento de los niveles séricos de 25(OH)VD o calcidiol, con una potencia hasta 10 veces superior (Houghton, 2006).

La vitamina D₃ (colecalfierol) localizada en la membrana plasmática de las células de la epidermis presenta una estructura abierta y flexible que permite su difusión hacia el espacio extracelular, desde donde es atraída por la proteína transportadora de vitamina D (VDBP), alcanzando así la circulación sanguínea. Cuando la síntesis de vitamina D₃ alcanza valores adecuados, la previtamina D₃ formada en la piel puede seguir absorbiendo radiación solar UVB y convertirse en los fotoisómeros biológicamente inactivos lumisterol y taquisterol (Holick, 1981) (Figura 15). Además, el exceso de vitamina D₃ sintetizada también puede absorber fotones ultravioletas e isomerizarse en, al menos, tres fotoproductos que incluyen el supraesterol I, supraesterol II y 5,6-trans-vitamina D₃. Así pues, la propia irradiación solar puede regular la producción cutánea de vitamina D₃, favoreciendo su fotodegradación en situaciones de exceso de síntesis (Bouillon, 2010).

Los derivados de la VD con mayor relevancia a nivel metabólico son el calcidiol (25-hidroxitamina D), el calcitriol (1,25-dihidroxitamina D) y la 24,25-vitamina D, aunque la actividad de esta última se encuentra en discusión. Los efectos biológicos de todos ellos parecen estar ligados a la presencia de tres dobles enlaces en el ciclo abierto (Holick, 1996).

La Organización Mundial de la Salud ha definido la “Unidad Internacional” (UI) de vitamina D₃ como la actividad de 0,025 mcg o 65 pmol de la preparación estándar de vitamina D₃ cristalizada. La unidad internacional del metabolito activo calcitriol ha sido establecida para ser equivalente en términos molares a la de la vitamina D₃ original. De este modo, 1 UI de calcitriol equivalen a 0,025 mcg o 65 pmol de este mismo compuesto, la cual posee mucha mayor actividad que la propia unidad de VD. La Tabla 5 muestra distintas equivalencias entre unidades de VD.

Tabla 5. Medidas equivalentes de la vitamina D

Cantidad de vitamina D	Peso equivalente
1 UI	0,025 mcg
40 UI	1 mcg
400 UI	10 mcg

1.2.2.2 FUENTES DE VD

La VD existente en el organismo tiene dos orígenes: endógeno y exógeno.

1.2.2.2.1 Fuente endógena. Exposición solar

La síntesis cutánea de VD representa la principal fuente de esta vitamina en el ser humano que habita en países soleados. Aunque resulta difícil de evaluar, la síntesis cutánea podría cubrir entre el 50% y el 90% (Holick, 1996) de los requerimientos de VD. Las recomendaciones sobre la exposición solar necesaria para satisfacer las necesidades corporales de VD son muy controvertidas. En el año 2001, Holick estimó que la exposición corporal total a un MED (“*Minimal Erythema Dose*” o dosis mínima de radiación UV necesaria para provocar un eritema) ponía en circulación entre 10.000 y 20.000 UI de VD en las siguientes 24 horas. Con ello, se calculó que se requería de la exposición diaria de cara, brazos y manos a un cuarto de MED para producir unas 1.000 UI de VD y prevenir, así, su deficiencia. Otros autores, en cambio, apuntan

que entre 5-10 minutos 2-3 veces por semana podrían ser suficientes para producir eficazmente VD (Diffey, 2010).

Existen dos formas de medir la exposición solar de la población: los cuestionarios de exposición solar y los dosímetros. Los cuestionarios recogen información sobre los minutos diarios y los hábitos de exposición solar (zonas corporales expuestas o empleo de cremas protectoras). Los dosímetros miden las radiaciones UV que reciben los participantes que los llevan mediante el empleo de un filme sensible a las radiaciones UV (Diffey, 1996a), un reactivo fotosensible (Du, 2001) o esporas de *Bacillus subtilis* (Moehrle, 2000). Aunque, en general, aportan datos de exposición solar más objetivos y consiguen un mayor nivel de adherencia (Thieden, 2006), resulta complejo emplearlos en estudios poblacionales amplios. Por otra parte, diferentes trabajos han demostrado que existe una correlación positiva entre los datos aportados por ambos tipos de medición (Cargill, 2013; Rodríguez M, 2010), avalando el empleo de los cuestionarios como herramienta adecuada para estimar los niveles de exposición solar. En la tabla 6 aparecen resumidos los métodos de medición de exposición solar empleados en estudios recientes que valoran niveles de VD, así como los países y los grupos de edad estudiados.

Tabla 6. Técnicas para la determinación de la exposición solar

País	Estudio	Sexo	Grupo de edad	Técnica
Australia	Kimlin, 2014	M,H	Adultos	Dosímetro y cuestionario
Israel	Korchia, 2013	M,H	Niños	Cuestionario
España	Rodríguez M, 2010	M	Adolescentes	Dosímetro y cuestionario
Grecia	Nicolaidou., 2006	M	Embarazadas	Cuestionario
Reino Unido	Diffey, 1996b	M,H	Niños y adolescentes	Dosímetro y cuestionario
China	Song, 2013	M	Embarazadas	Cuestionario

M: mujer, H: hombre

Aunque la duración de la exposición solar es el principal determinante de la producción endógena de VD en las franjas tropicales y subtropicales (45º latitud norte y 45º latitud sur), donde se congrega el 80% de la población mundial (Moya, 2000), existen otros muchos factores ambientales e individuales que deben de ser considerados.

- a) Factores ambientales. La cantidad de radiación solar que llega a la tierra depende de:

- La latitud: en las zonas más cercanas al ecuador la radiación solar tiene mayor intensidad. Concretamente, a latitudes mayores de 40º-45º al norte o al sur del ecuador, disminuye la síntesis de VD (Holick, 2007b).
- La estación del año: en otoño e invierno la cantidad de radiación solar que llega a la tierra es menor que en primavera y verano. En la parte norte de EE. UU. y Canadá, así como en el noroeste de Europa, la producción de VD está prácticamente ausente durante el invierno, siendo de marzo a octubre el período de máxima fotoconversión (Holick, 2007b).
- La hora del día: la radiación UVB (290-315 nm) posee una longitud de onda más corta que la UVA (320-400 nm) y tiende a dispersarse con los rayos oblicuos del inicio o el final del día. Al mediodía, la incidencia vertical de la radiación UV sobre la superficie de la tierra favorece que aumente la relación UVB-UVA y que la producción de VD sea máxima (Holick, 2007b)
- La altitud: a mayor altitud, menor cantidad de atmósfera debe atravesar la radiación; de manera que, por cada 1000 metros de altura, la radiación UV aumenta entre un 6% y un 8%.
- Las condiciones climatológicas: las nubes muy gruesas disminuyen la cantidad de radiación UV. Sin embargo, las nubes finas dejan pasar la mayoría de la radiación UV e incluso, en ocasiones, se produce un efecto contrario y la cantidad de radiación aumenta.
- La reflexión: cuando los rayos UV llegan a la superficie terrestre, parte son absorbidos y parte reflejados. La hierba y la arena reflejan menos de un 10%; sin embargo, la nieve puede reflejar hasta el 80% de la radiación que le llega.
- Otros: la polución ambiental, la concentración de oxígeno en la atmósfera y estratosfera, etc. disminuyen la cantidad de radiación solar que llega a la población, comprometiéndose la síntesis endógena.

b) Factores individuales y de estilo de vida.

- Cantidad de 7-dehidrocolesterol (provitamina D₃) en la piel: En situaciones de nutrición adecuada suele haber una cantidad suficiente (25-50 mcg/cm²) de 7-dehidrocolesterol en las capas cutáneas superficiales (Rapado, 2000).
- Edad: Con la edad se ve disminuida la cantidad de 7-dehidrocolesterol que hay en la dermis y, además, existe una menor exposición solar (Mataix, 2002).

- **Tipología de piel:** La síntesis de VD está regulada por la pigmentación (cantidad de melanina) y la queratinización (grosor) del estrato córneo. La melanina compite con la provitamina D₃ por los fotones de luz UV, limitando así la producción de vitamina D₃ en la piel. Por ello, en las personas de piel oscura la producción de vitamina D₃ es menor, requiriéndose mayor exposición solar para la biosíntesis de cantidades similares de VD (Matsuoka, 1990). Por otra parte, la queratinización regula la cantidad de radiación UV que penetra desde la capa externa de la piel hasta el lugar de síntesis de VD (Bringham, 2012).
- **Uso de cremas protectoras:** La mayoría de las cremas de protección solar combinan un fotoprotector químico (que absorbe los rayos UV) con un fotoprotector físico inorgánico que previenen de las quemaduras solares, el cáncer de piel y el envejecimiento cutáneo prematuro, pero que disminuye el número total de fotones UVB que alcanzan los depósitos de 7-dehidrocolesterol en la epidermis. En un estudio en adultos jóvenes, la aplicación de cremas solares con factor de protección mayor de 8, previa a la exposición corporal completa a un MED de luz solar simulada, redujo en un 95% la síntesis cutánea de vitamina D₃ (Matsuoka, 1987). Sin embargo, hay otros autores (Moloney, 2002) que afirman que los niveles de VD no se ven afectados por el uso de cremas con protección solar.
- **Ropa:** a menor área corporal expuesta (Kimlin, 2014) o tejidos más gruesos (Hart, 2006) menor será la síntesis de VD. De hecho, se ha demostrado que, dentro de una misma población, los niveles de calcidiol experimentan variaciones en relación con los hábitos de vestido (Guzel, 2001).

1.2.2.2 Fuente exógena. Dieta: biodisponibilidad e ingestas recomendadas

La VD puede obtenerse de fuentes dietéticas de origen vegetal (vitamina D₂ o ergocalciferol) o animal (vitamina D₃ o colecalciferol). Aproximadamente el 75% de la VD aportada por la dieta es absorbida por los enterocitos yeyunales e ileales mediante un mecanismo de difusión pasiva e incorporada a la circulación linfática, donde se encuentra en forma de fracciones de quilomicrones (Misra, 2008). No existe regulación sobre esta etapa, de forma que la absorción de VD es proporcional a la ingesta (Moya, 2000). Parte de la VD que circula por la linfa se

deposita a nivel de los tejidos adiposo y muscular, pero la mayoría penetra en la circulación sanguínea unida a la VDBP y alcanza finalmente los hepatocitos (Rapado, 2000).

Las fuentes nutricionales de VD son escasas, reduciéndose, fundamentalmente, a los pescados grasos o sus aceites (salmón, caballa, anguila, anchoa, sardina, atún, pez espada); también contribuyen, aunque en menor medida, la mantequilla, nata, yema de huevo, carne, aves o pescados no grasos (Varela, 2003). Tanto la leche humana como la de vaca presentan un bajo contenido en VD (15-40 UI/L). Actualmente, el método más preciso para determinar el contenido de VD y de sus metabolitos en los alimentos es la cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (*“High Performance Liquid Chromatography”*) (Ovesen, 2003). En la tabla 7 aparecen recogidos los principales alimentos fuente de VD. La cantidad de VD de los pescados corresponde a la media anual (registrándose la cantidad máxima al final del verano y la mínima al final del invierno).

Tabla 7. Alimentos ricos en Vitamina D

ALIMENTO	VITAMINA D (μg por 100 g)	ALIMENTO	VITAMINA D (μg por 100 g)
Aceite hígado de bacalao	210 ^b	Sardinas en aceite	7 ^a -8,2 ^b
Angulas	110 ^{ab}	Boquerón	7 ^b -8 ^a
Atún	25 ^{ab}	Salmón	Trazas ^a -8 ^b
Caballa en aceite	25 ^b	Sardina	8 ^{ab}
Bonito en aceite	23,8 ^b	“Corn Flakes” (Kellogg’s)	4,20 ^{ab}
Atún en aceite	23,5 ^{ab}	Huevas frescas	2 ^a
Congrio	22 ^{ab}	Huevos	1,75 ^{ab}
Atún, caballa (escabeche)	20 ^{ab}	Mantequilla	0,76 ^a
Bonito	20 ^{ab}	Hígado	0,60 ^a
Salmón ahumado	20 ^b	Queso en porciones	0,28 ^a
Langostinos	Trazas ^a -18 ^b	Queso manchego curado	0,27 ^a
Caballa	16 ^{ab}	Queso manchego semicurado	0,23 ^a
Palometa	16 ^{ab}	Queso gallego	0,18 ^a
Anchoas en aceite	11,8 ^b	Leche de vaca	0,03 ^a
Sardinas en salsa tomate	9,8 ^b	Yogur natural	0,08 ^a

^aMoreiras, 2011; ^bMataix, 2009

Para establecer los requerimientos nutricionales diarios de VD, la estimación debería realizarse teniendo en consideración la exposición solar durante todo el año, lo que dificulta establecer recomendaciones para la población general (Whiting, 2011). Se considera que, en las situaciones

de ausencia de exposición solar, los requerimientos medios diarios de VD oscilan entre 2000 UI y 4000 UI y que disminuyen a 500-1000 UI en aquellas personas con exposición solar adecuada (Heaney, 2003a). Basándose en estas estimaciones, se han establecido los consumos dietéticos de referencia (DRIs), nombre bajo el que agrupan cuatro valores de referencia nutricionales empleados para el establecimiento de los planes dietéticos de la población sana. En la Tabla 8 se proporciona una breve definición de las cuatro categorías de DRI, así como las recomendaciones más recientes realizadas por el Institute of Medicine (IOM) de la Academia Americana de Ciencias en el año 2011 y suscritas por la mayoría de las sociedades científicas de nuestro entorno (Braegger, 2013; Martínez V, 2012; Holick, 2011d). El objetivo de estas recomendaciones es el de mantener unos niveles de calcidiol superiores a los 20 ng/ml en situaciones de exposición solar mínima, aunque ya existen autores que ponen en discusión este punto de corte.

Tabla 8. Consumos dietéticos de referencia (UI/día) de vitamina D recomendados por el IOM en el año 2011

Edad	EAR <i>Estimated Average Requirement</i>	RDA <i>Recommended Dietary Allowance</i>	AI <i>Adequate Intake</i>	UL <i>Tolerable Upper Intake Level</i>
	Niveles de ingesta que cubren los requerimientos de la mitad de la población o requerimientos promedio	Niveles de ingesta que cubren los requerimientos del 97,5% de la población	Ingesta diaria recomendada basada en aproximaciones observacionales o experimentales del aporte del nutriente en un grupo de población sana ^a	Niveles máximos tolerables por encima de los cuales existe un riesgo potencial de toxicidad
0-6 meses	-	-	400	1000
6-12 meses	-	-	400	1500
1-3 años	400	600	-	2500
4-8 años	400	600	-	3000
9-18 años	400	600	-	4000
Adultos	400	600	-	4000
Mayores de 70 años	400	800	-	4000
Embarazadas o en periodo de lactancia	400	600	-	4000

^a Se emplea cuando no puede determinarse la RDA

Existen distintas formas para valorar la ingesta de VD. Los registros de alimentos de 24 horas - de uno o varios días- presentan la ventaja de incluir todas las fuentes dietéticas con contenido en VD, proporcionando una estimación más precisa. Como desventaja, la adherencia de respuesta es menor y el procesamiento de la información resulta más complejo. Por ello, numerosos estudios epidemiológicos emplean los Cuestionarios de Frecuencia de Consumo de Alimentos (CFCA) centrados en los alimentos ricos en VD y que suponen una menor carga para

los encuestados y una mayor facilidad en el análisis de datos. En los diferentes estudios se emplean tablas de composición de alimentos propias de cada país, debido a la gran variabilidad de las prácticas de suplementación alimentaria en las diferentes regiones. Por ello, existen pocos CFCA validados que estimen el consumo de VD en relación con los niveles de 25(OH)VD. Uno de los más empleados es el del estudio canadiense de Wu y cols. del año 2009 en el que un CFCA diseñado para determinar la ingesta de VD en un grupo multiétnico de jóvenes sanos mostró una elevada correlación con el registro alimentario de 24 horas durante 7 días y la concentración sérica de calcidiol.

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) realizó entre los años 2009-2010 un estudio de valoración nutricional en población adulta española donde se evaluó la ingesta de energía, y de macro y micronutrientes. La estimación se llevó a cabo cruzando los datos de consumo de alimentos obtenidos en la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética ENIDE (http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/evaluacion_riesgos/subseccion/enide.shtml) y los de composición nutricional de dichos alimentos, recogidos en la Base Española de Datos de Composición de Alimentos BEDCA (www.bedca.net). La Tabla 9 resume los datos referentes al consumo de VD.

Tabla 9 Ingesta diaria de VD por género y edad del estudio ENIDE II (2011) obtenida en el registro de 3 días

HOMBRES												
EDAD	18-24 años			25-44 años			45-64 años			Total		
	Media	N	DS	Media	N	DS	Media	N	DS	Media	N	DS
Vitamina D (UI/día)	164	297	158	173	623	171	173	595	194	171	1515	178
RDA (Moreiras, 2011) (UI/día)	200			200			400					
% Adecuación	84			85			42					
MUJERES												
EDAD	18-24 años			25-44 años			45-64 años			Total		
	Media	N	DS	Media	N	DS	Media	N	DS	Media	N	DS
Vitamina D (UI/día)	129	306	129	141	687	136	160	630	170	146	1623	150
RDA (Moreiras, 2011) (UI/día)	200			200			400*					
% Adecuación	61			70			19					

*Utilizada la DRI para el grupo de edad de 50 a 59 años

N: Número de casos. DE: Desviación estándar. EEM: Error estándar de la media

Se compararon los valores medios de ingestas observadas con las ingestas recomendadas (RDAs) para la población española (Moreiras, 2011). El valor aportado como objetivo para el cálculo del porcentaje de adecuación (5 µg o 200 UI/día) es inferior al que actualmente recomienda el IOM

(600 UI/día) por corresponder a grupos de población sana con exposición solar adecuada, aunque el propio autor matiza que este aporte debería aumentar hasta los 10 mcg o 400 UI/día en situaciones de baja exposición solar. La ingesta observada de VD fue mayor en hombres (171 UI/día) que en mujeres (146 UI/día), las cuales presentaron una ingesta deficiente (definida con inferior al 80% de su RDA) en todos los tramos de edad (Carbajal, 2003).

1.2.2.3 METABOLISMO DE LA VD: ACTIVACIÓN, TRANSPORTE Y ELIMINACIÓN

Desde el punto de vista biológico, la VD es una hormona intrínsecamente inactiva que requiere de dos hidroxilaciones sucesivas (a nivel del C25 y en la posición α del C1) para formar el calcitriol, su metabolito activo. Todas las hidroxilasas de VD caracterizadas hasta la fecha pertenecen a la superfamilia de enzimas del citocromo P450 (CYP) (St-Arnaud, 2011). La VD y sus metabolitos son moléculas lipofílicas que requieren ser transportadas unidas a proteínas plasmáticas, concretamente a la VDBP (85%) y a la albúmina (15%) (Quesada, 2004). La VDBP, también conocida como *globulina de componente grupo-específico* (GC) es una alfa₂ globulina de 458 aminoácidos con un elevado peso molecular (52KDa) y cuyo gen, localizado en el cromosoma 4q11-q13, se solapa con el de la albumina y la α -fetoproteína, con las que comparte una estructura similar (Harper, 1983). Su estructura α -helicoidal contiene tres dominios que adoptan una morfología peculiar con dos grandes ranuras que configuran un lugar de unión de elevada afinidad por el esqueleto esteroide, aunque con el siguiente orden de afinidades: 25(OH)VD-25,26-lactona > 25(OH)VD = 24,25(OH)₂VD > 1 α -25(OH)₂VD >> VD. La síntesis de la VDBP es exclusivamente hepática y se elimina, de forma mayoritaria, a nivel renal. Su vida media es relativamente corta (2,5-3 días) y es por ello por lo que su producción diaria es elevada (~10 mg/Kg/día) (Kawakami, 1981). Su concentración plasmática se incrementa durante el periodo postnatal hasta alcanzar el valor habitual de 4-8 μ M (232-464 mg/litro) que se mantendrá relativamente estable a partir de entonces. El estímulo de las hormonas sexuales femeninas (por ejemplo, durante el embarazo) produce un aumento de su nivel, mientras que las situaciones de fracaso renal o pérdida proteica los disminuyen (Bouillon, 2011).

Así pues, el ergocalciferol y el colecalciferol (procedente de la dieta o sintetizado en la piel) alcanzan, unidos a la VDBP, el hígado, donde sufren la primera hidroxilación en el C25, acción mediada por la enzima 25-hidroxivitamina D-hidroxilasa (25-OHasa: CYP27A1, CYP2R1) presente en los microsomas y mitocondrias hepáticos y que da lugar a la formación de calcidiol [25(OH)VD] (Rapado, 2000; Grober, 2013). La enzima hepática 25-OHasa carece de una

regulación estrecha, con escasa inhibición de su actividad en relación con los niveles de VD, por lo que los niveles circulantes de 25(OH)VD (1 ng/ml = 2,5 nmol/L) son los que actualmente se emplean en los estudios de laboratorio para determinar el estado de suficiencia o insuficiencia de VD (Hart, 2006). El calcidiol pasa a la sangre unido a la VDBP y es transportado al riñón, donde se convierte, a través de la enzima 25-hidroxivitamina D-1- α -hidroxilasa (1 α -OHasa renal: CYP27B1) en 1,25-dihidroxivitamina D [1 α ,25(OH)₂VD] o calcitriol, el metabolito activo de la VD (efectos endocrinos) (Rapado, 2000; Grober, 2013). La síntesis renal de 1 α ,25(OH)₂VD se produce a nivel de las células del túbulo contorneado proximal y está regulada por diversos factores, incluyendo los niveles de calcio y fósforo séricos, el FGF23, la PTH y sus propios niveles (Tabla 10). Cuando los niveles de 1 α ,25(OH)₂VD son suficientes, se produce una hidroxilación renal alternativa a nivel del C24 (24-OHasa: CYP24A1), dando lugar a la formación de (24,25(OH)₂VD) o ácido calcitoico, que posteriormente será catabolizado, dando lugar a más de 30 metabolitos hidrosolubles que son eliminados a través de la orina y las heces (Lips, 2006; Borrajo, 2001). El papel metabólico de la 24,25(OH)₂VD está aún hoy en discusión, pues mientras que unos autores lo consideran un producto de degradación inactivo, otros le reconocen acciones en el crecimiento y maduración del cartílago fetal (Martínez ME, 2000). Además del riñón, múltiples tejidos tales como los huesos, placenta, próstata, macrófagos activados, linfocitos T, células dendríticas y queratinocitos, poseen 1- α -hidroxilasas locales que les permiten sintetizar VD biológicamente activa dependiendo de la disponibilidad de 25(OH)VD y de los requerimientos (efectos autocrinos y paracrinos) (St-Arnaud, 2011).

La vitamina D₂ está sujeta a la misma conversión metabólica que la vitamina D₃, para formar 25(OH)D₂ y 1,25(OH)₂D₂, pero la importancia cuantitativa de estos derivados es mucho menor (Biancuzzo, 2013).

Tabla 10. Efecto de diversos factores sobre el incremento en la concentración de 1,25(OH)₂VD o actividad de la 1 α -OHasa renal.

FACTOR	ANIMALES	HUMANOS	REFERENCIA
Hormona paratiroidea	↑	↑	Brenza, 1998; Quesada, 2000; Sawada, 2000; Tebben, 2013
Fósforo sérico inorgánico	↓	↓	Cramer, 1980; Yoshida, 2001
1,25(OH)₂D	↓	↓	Murayama, 1999; Sawada, 2000; Borrajo, 2001; Lips, 2006
Calcio	¿?	↓	Omdahl, 1972; Wasserman, 1992
Calcitonina	↑,↓,≈	↑	Watson, 1981; Sawada, 2000; Zhong, 2009
Iones hidrógeno	↓	≈	Weber, 1976; Lu, 1995
Esteroides sexuales	↑	↑	Saarem 1987; Somjen, 2007
Prolactina	↑	≈	Adams, 1979
GH y IGF-1	↑	↑,↓,≈	Menea, 1995; Bianda, 1998
Glucocorticoides	↓,≈	↑,↓,≈	Seeman, 1980; Nielsen, 1988
Hormona tiroidea	¿?	↓ ^a	Bouillon, 1980; Zhou 2016
FGF-23	↓	↓	Liu, 2007; Blau, 2015
Embarazo	↑	↑ ^a	Fenton, 1980; Kubota, 1982

^(a)Los efectos pueden ser secundarios a los cambios en el calcio, fósforo o PTH. (↑): Estímulo o aumento, (↓): Supresión o disminución, (≈): Sin efecto, (¿?): Desconocido

1.2.2.4 MECANISMO DE ACCIÓN Y FUNCIONES BIOLÓGICAS

El calcitriol es una molécula más hidrófila y con menor afinidad por la VDBP que la 25(OH)VD, lo que facilita que en su forma libre alcance los órganos diana donde ejerce sus efectos mediante dos tipos de mecanismos: regulando la transcripción genética (vía genómica) y mediante un receptor de membrana -receptor de superficie celular de la vitamina D o VDRm- todavía no bien caracterizado (vía no genómica) (Quesada, 2000).

1.2.2.4.1 Vía genómica

El receptor nuclear de la VD o VDR es una proteína de 50-KDa perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroideas/tiroideas que actúa como factor de transcripción dependiente de ligando (Levine, 2003). La figura 16 muestra esquemáticamente el funcionamiento del sistema VDR/VD, que coincide con el mecanismo de acción generalmente aceptado de los receptores nucleares. El calcitriol transportado hasta la célula diana entra, mediante difusión, en el citoplasma y se une con el VDR en su dominio de unión al ligando (LBD, *Ligand Binding Domain*) que difunde entonces hacia el núcleo gracias a las señales de localización nuclear que posee. De manera alternativa, la VD también puede entrar en el núcleo mediante difusión y unirse allí con el VDR. Tras la unión con el ligando $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$, el VDR modifica su conformación a una forma activa transcripcional e interactúa con el *Receptor X Retinoide* (RXR), conformando un heterodímero. Este complejo VDR/RXR se unirá, a través de su dominio de unión al DNA (DBD, *DNA Binding Domain*), con regiones promotoras de genes específicos (VDRE, *elementos respondedores a VD*) y regulará la transcripción de RNAs mensajeros que, a su vez, controlarán la síntesis de proteínas específicas (CaBP o calbindina, osteocalcina, FA, etc.) (Figura 16).

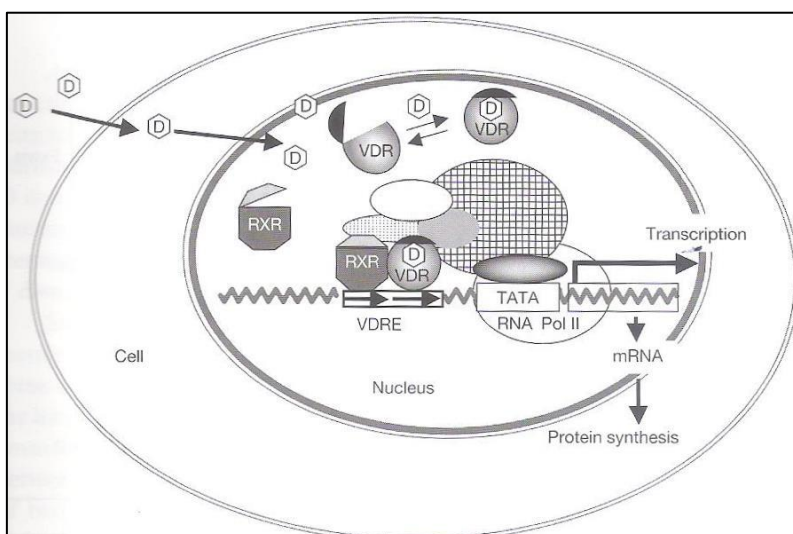


Figura 16. Mecanismo de acción de la Vitamina D₃ mediado por el receptor nuclear VDR. Tomado de Yamada et al⁽⁵⁶¹⁾.

Esta acción de la VD sobre los genes diana, produce una gran variedad de respuestas que pueden clasificarse en:

- **Respuestas clásicas:** los órganos diana tradicionales de la VD (intestino, hueso, riñón y glándulas paratiroides) poseen receptores que, ocupados por el calcitriol, producen respuestas biológicas relacionadas con la regulación de la homeóstasis fosfocálcica y del metabolismo óseo.

- Respuestas no clásicas o extraesqueléticas: relacionadas con la presencia de VDR en diferentes tipos celulares (testículos, ovarios, hipófisis, paratiroides, páncreas, piel, glándulas mamarias, músculo, linfocitos y algunas líneas celulares tumorales), y que, a su vez, pueden dividirse en 3 categorías (Grober, 2013):
 - Regulación de la proliferación y diferenciación celular
 - Regulación de la secreción hormonal
 - Regulación de la función inmune

La Tabla 11 resume las principales acciones extraesqueléticas descritas hasta el momento.

Tabla 11. Acciones no clásicas de la VD

	Mecanismo de acción	Efecto	Referencia
REGULACIÓN SECRECIÓN HORMONAL	Inhibición de la síntesis y secreción de PTH	<ul style="list-style-type: none"> • Frena la producción renal de calcitriol estimulada por la PTH • Permite el empleo de calcitriol y/o análogos para controlar el hiperparatiroidismo secundario en la IRC 	Demay, 1992 Martin KJ, 2004
	Estimulación de la secreción de insulina	<ul style="list-style-type: none"> • Incremento del riesgo de Diabetes Mellitus tipo 2 en las situaciones de déficit de VD 	Lee S, 1994 Pittas, 2007
	Estimulación de la producción de FGF-23 por osteoblastos y osteocitos	<ul style="list-style-type: none"> • Permite mantener estables los niveles de calcitriol inhibiendo su síntesis y favoreciendo su degradación • Efecto fosfatúrico mediante la inhibición de la reabsorción renal de fósforo 	Kolek, 2005 Bacchetta, 2013
REGULACIÓN FUNCIÓN INMUNE	Inmunidad adaptativa	<ul style="list-style-type: none"> • Regula la proliferación de linfocitos T_H y su producción de citoquinas • Inhibe la proliferación de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ relacionados con enfermedades autoinmunes • Suprime la proliferación y producción de inmunoglobulinas y retrasa la diferenciación de linfocitos B precursores en células plasmáticas 	Boonstra, 2001 Chen S, 2007 Heine, 2008 Jeffery, 2012
	Inmunidad innata	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la expresión de VDR y 1α-hidroxilasa (CYP27B1) en los macrófagos induciendo la formación del péptido antimicrobiano catelicidina. • Regula la maduración de las células dendríticas favoreciendo su acción como CPA a los linfocitos T 	Hewison, 2003 Wang, 2004 Hewison, 2011 Chun, 2014
REGULACIÓN PROLIFERACIÓN Y	Epidermis y folículos capilares	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la diferenciación de queratinocitos e inhibe su proliferación • Regula el ciclo del folículo piloso, dando lugar a alopecia en situaciones de ausencia de VDR 	Su, 1994 Cianferotti, 2007
	Cáncer	<ul style="list-style-type: none"> • Disminuye la angiogénesis y la proliferación celular • Incrementa la diferenciación celular y la apoptosis • Respuesta antiproliferativa in vitro demostrada en cáncer mama, próstata, colon, osteosarcoma y melanoma 	Ylikomi, 2002 Field, 2013 Feldman, 2014 Maalmi, 2014

IRC: Insuficiencia renal crónica; PTH: hormona paratiroidea; CPA: células presentadoras de antígenos; FGF23: *Fibroblast Growth Factor 23*

No obstante, el principal papel biológico del calcitriol está relacionado con la inducción de la expresión de proteínas vinculadas al transporte de calcio y fósforo sobre los órganos diana clásicos: intestino, riñón y hueso (vía genómica clásica).

1.2.2.4.1.1 Intestino

A nivel intestinal, la unión de la VD con el receptor VDR de los enterocitos intestinales induce la expresión de proteínas vinculadas al transporte de calcio (Bouillon, 2010):

- Canales epiteliales de calcio (TRPV6 y V5) en la membrana luminal
- Proteína de unión al calcio (CBP: *Calcium Binding Protein* o Calbindina D9k) en el citosol
- Bomba de calcio adenosín trifosfatasa-1 [PMCA1] en la membrana basolateral

Durante un periodo de 24 horas, un humano adulto típico debería ingerir unos 1000 mg de calcio elemental. Aproximadamente el 40% del calcio ingerido es absorbido, fundamentalmente a nivel del intestino delgado (un 60% en el íleon, un 20% a nivel de yeyuno y un 10% en duodeno) (Borrajó, 2001). Asimismo, cada día se secretan al tracto intestinal unos 150 mg de calcio a través de las secreciones pancreática e intestinal (calcio fecal endógeno), lo que supone un balance neto de calcio de 250 mg al día. La absorción intestinal de calcio combina mecanismos de transporte activos y pasivos (Tebben, 2013). Cuando la concentración de calcio en la luz intestinal es inferior a los 10 mmol/L, el calcio entra en el enterocito desde la luz intestinal mediante los canales epiteliales TRPV6 y V5; es transportado en el citosol unido a la calbindina-D9K y se transfiere al espacio extracelular gracias a la acción de una bomba de calcio dependiente de ATP situada en la membrana basal y que trabaja contra gradiente electroquímico y de concentración (Figura 17.A). Este transporte transcelular es un proceso activo y saturable, a diferencia del transporte mediante difusión pasiva (transporte paracelular), que es un mecanismo independiente de VD, no saturable, pero dependiente del gradiente de concentración transluminal de calcio y, por lo tanto, vinculado a la ingesta. En una dieta estándar, el contenido en calcio suele ocupar el intervalo normal-bajo, mientras que la presencia de fosfato es abundante. En estas condiciones dietéticas, la absorción de calcio requiere de la contribución del transporte transcelular activo, mientras que la de fosfato tiene lugar fundamentalmente mediante el proceso pasivo. De este modo, los niveles adecuados de calcitriol aseguran una absorción suficiente de calcio, incluso en situaciones de escaso aporte de este mineral (Christakos, 2014).

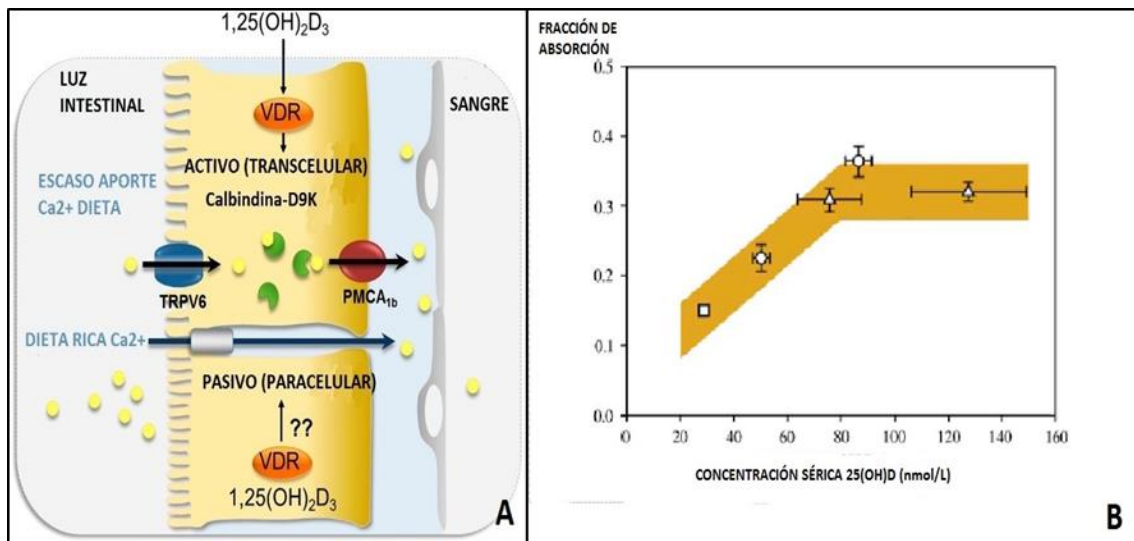


Figura 17. (A) Modelo del transporte intestinal de calcio. Tomado de: Tebben PJ and Kumar R⁽⁵⁰⁴⁾. **(B)** Relación entre la concentración sérica de $25(\text{OH})\text{VD}$ y la fracción de absorción de calcio en el intestino. Las parejas de símbolos representan datos de diferentes estudios (\square , estudio de Bischoff y cols; \circ , estudio de Heaney y cols; Δ , estudio de Barger-Lux y cols). Las barras de error indican 1DE. Tomado de: Heaney RP⁽²⁰³⁾.

Existe una correlación lineal entre la concentración sérica de $25(\text{OH})\text{VD}$ y la absorción intestinal de calcio (Vieth, 2006), aunque este efecto alcanza una meseta para valores en torno a los 80 nmol/L (32 ng/ml), por encima de los cuales no se producen incrementos adicionales (Heaney, 2003b). En la Figura 17.B aparece representada la fracción de absorción de calcio en relación con la concentración de $25(\text{OH})\text{VD}$, basándose en los datos aportados por tres estudios diferentes (Bischoff-Ferrari, 2012b; Heaney, 2003a; Barger-Lux 2002).

Aunque normalmente el fósforo se absorbe fácilmente, la VD también estimula la absorción de fosfato inorgánico libre (HPO_4^{2-} y H_2PO_4^-) en el intestino delgado (Hall, 2016). La mayor parte del fósforo ingerido es absorbido en el duodeno y el yeyuno a través de dos mecanismos: uno de difusión pasiva no saturable paracelular y otro de transporte activo saturable transcelular sodio dependiente. Bajo condiciones normales, con un exceso de fósforo en la dieta, la absorción ocurre por difusión pasiva paracelular. En cambio, en condiciones de restricción dietética, el fósforo inorgánico (Pi) entra en el enterocito a través del cotransportador dependiente de sodio (Na/Pi) situado en el borde en cepillo y que depende de la existencia de un gradiente de Na^+ que se mantiene gracias a una $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ (Kestenbaum, 2015). Posteriormente, se produce su unión con una proteína que promueve su transporte transepitelial y subsiguiente liberación a la

circulación a través de la membrana basolateral. Se ha demostrado que la administración de $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ incrementa la absorción de Pi mediante un aumento en la velocidad del cotransportador Na/Pi y por estimulación de la síntesis de la proteína de transporte transcelular (Katai, 1999).

1.2.2.4.1.2 *Riñón*

A nivel renal, el calcitriol actúa de forma sinérgica con la PTH incrementando la reabsorción de calcio a nivel del túbulo contorneado distal mediante el aumento de la expresión de las mismas proteínas que a nivel intestinal (canal epitelial TRPV5, calbindina-D9K y 28K y Ca-ATPasa) (Bouillon, 2010). No obstante, la PTH parece ser un regulador más potente de la reabsorción renal de calcio que la VD tal y como lo demuestra el hecho de que tras una paratiroidectomía se incrementa la excreción fraccional de calcio, sin que altas dosis de VD puedan corregir este efecto (Barrett, 2012). Además, como en el intestino, la VD promueve la reabsorción renal de Pi, aunque de nuevo de manera menos intensa que el efecto mediado por la PTH. Finalmente, la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ inhibe de manera directa la $1-\alpha$ -hidroxilación renal del calcidiol mediante un sistema de retroalimentación negativa.

1.2.2.4.1.3 *Hueso*

El tercer mecanismo de acción genómico clásico de la VD tiene lugar en el hueso. Las acciones de la VD sobre el hueso son complejas y resultan de la combinación de mecanismos directos e indirectos. De forma indirecta, la VD promueve la calcificación ósea al proporcionar, a través de sus acciones a nivel intestinal y renal, una mayor disponibilidad de calcio y fósforo (Bringham, 2012). De manera directa, la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ posee efectos duales en el hueso: estimula la osteoclastogénesis y la resorción ósea a la vez que modifica la función de los osteoblastos y actúa sobre la regulación de la placa de crecimiento y la mineralización ósea (Bouillon, 2010).

En relación con la presencia de VDR en los osteoblastos, se han descrito diversos efectos tras el tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ de cultivos primarios de células óseas o líneas celulares osteoblásticas establecidas. Los estudios publicados sugieren que los efectos directos del calcitriol sobre los osteoblastos son pleiotrópicos y están vinculados a procesos de crecimiento

y diferenciación celular (St-Arnaud, 2008). En general, se acepta que, en las fases iniciales de la osteoblastogénesis, las señales dependientes del VDR podrían inhibir su diferenciación, ya que, en ausencia de $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$, se produce un aumento de la diferenciación celular hacia el linaje osteoblástico. En cambio, la sobreexpresión de VDR en los osteoblastos ya diferenciados podría producir un incremento de su actividad (Suda, 2003). Uno de los efectos que se ha demostrado que ejerce la activación osteoblástica mediada por la VD es el de favorecer la osteoclastogénesis: el calcitriol estimula a las células osteoblásticas para secretar factores como el M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) que inducen a las células madre a diferenciarse en precursores osteoclasticos, osteoclastos mononucleares y, finalmente, en osteoclastos maduros multinucleados. Los osteoclastos maduros no poseen VDR ni responden de forma directa a la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$, sino que lo hacen a través de la unión de la VD a los osteoblastos, donde se producen una variedad de citoquinas, entre ellas la IL-6 y el ligando RANK (Ligando de Receptor Activador para el Factor Nuclear Kappa B), que promueven la resorción ósea de los osteoclastos y, por lo tanto, la liberación de calcio y fosfato desde el hueso (Suda, 2003; Levine, 2003; Kondo, 2004) (Figura 18.A). La evidencia de este efecto la proporcionan los estudios en animales raquíticos con déficit de VD a los que se les mantiene una dieta deficitaria en calcio. Al tratar a estos animales con VD, se produce una elevación de la concentración sérica de Ca^{2+} , indicando la existencia de una resorción neta de este ion (Carmeliet, 2003).

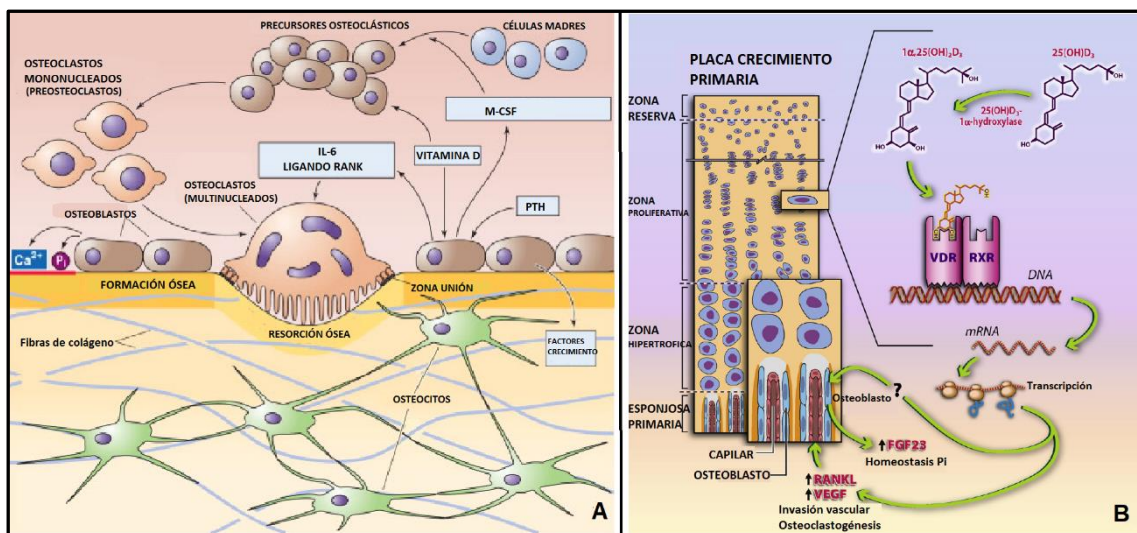


Figura 18. (A) Mecanismo favorecedor de la osteoclastogénesis mediada por VD a partir de la activación de osteoblastos. Tomado de: Barrett EJ and Barrett P⁽³¹⁾. **(B)** Mecanismo de acción directo de la VD sobre la placa de crecimiento óseo. Tomado de St-Arnaud R⁽⁴⁹¹⁾.

El último efecto directo de la VD en el hueso tiene lugar a nivel de la placa de crecimiento, donde los condrocitos proliferantes expresan CYP27B1 ($1\alpha\text{-OHasa}$) y VDR, cuya activación conduce a

un aumento de la expresión de RANKL y del factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*, *Vascular Endothelial Growth Factor*) que modulan la osteoclastogénesis y la invasión vascular a nivel de la unión condro-ósea. Asimismo, la señal genómica del $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ en los condrocitos afecta a la expresión y secreción de una serie de factores aún hoy no caracterizados que influyen sobre la secreción de FGF23 desde los osteoblastos de la esponjosa primaria (Figura 18.B). Este papel que parecen tener las señales mediadas por el calcitriol en la formación ósea endocondral queda demostrado en ratones con ausencia de receptor de VD (*VDR-null*), en los que el desarrollo aberrante de la placa de crecimiento precede al inicio de la hipocalcemia (Bouillon, 2013).

Aunque parece existir cierta contradicción entre los diferentes efectos que promueve la VD en el hueso, la acción antirraquítica de la VD es predominantemente indirecta, a través de la elevación del producto iónico calcio*fósforo en sangre y líquido extracelular, lo que da como resultado un aumento de la mineralización y ensombrece su efecto directo sobre el hueso, basado en la movilización de Ca^{2+} hacia el exterior. Los estudios llevados a cabo en humanos y animales demuestran que el déficit de VD o su resistencia afectan a la mineralización de la matriz ósea, a pesar de que la actividad de los osteoblastos y la síntesis de la matriz se encuentren estimuladas y de que el exceso de calcitriol incrementa la osteoclastogénesis y la resorción ósea (Carmeliet, 2003). Puede considerarse, de este modo, que los efectos directos de los metabolitos de la VD sobre los condrocitos y las células óseas son innecesarios si el aporte de calcio y fósforo está garantizado, tal y como demuestra el hecho de que la alteración en la mineralización y estructura ósea que se produce en ratones deficientes o resistentes a la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ puede normalizarse en gran parte tras la suplementación suficiente de minerales (St-Arnaud, 2011). No obstante, gracias a estas acciones aparentemente enfrentadas, se crea una situación de equilibrio en la que el hueso “viejo” mineralizado es reabsorbido para proporcionar más Ca^{2+} y Pi al espacio extracelular, lo que facilita la mineralización del hueso “nuevo” (remodelamiento óseo).

1.2.2.4.2 Vía no genómica

Además de los efectos genómicos o transcripcionales derivados de la unión VD-VDR a nivel del núcleo celular, diversos grupos de investigación han descrito una serie de acciones rápidas vinculadas al calcitriol (Bouillon, 2010). Estas acciones, denominadas no genómicas, están relacionadas con la estimulación rápida del flujo transmembrana de iones Ca^{++} a través de

vesículas o de canales operados por voltaje y con la activación de proteínquinas y segundos mensajeros (Fleet, 2004) y, aunque no se encuentran completamente caracterizadas, parece que su activación depende de la unión de la VD a la *Proteín-disulfido-isomerasa, familia A, miembro 3* (Pdia3, también conocida como ERp60, ERp57, Grp58 y 1,25-MARRS), proteína multifuncional considerada como un receptor de membrana del calcitriol (Chen J, 2010).

La $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{VD}$ se une a la Pdia3 localizada en las caveolas (pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática) y activa los canales iónicos de Ca^{++} así como diversas secuencias metabólicas en las que intervienen la fosfolipasa A2 (PLA2), la fosfolipasa C (PLC), la proteínquina C (PKC) y las proteínquinas activadas por mitógenos (MAPK) (Doroudi, 2014) y en las que las cascadas de fosforilación proteica juegan un papel crucial. Algunos de los efectos del Pdia3, en especial a nivel de los osteoblastos y condrocitos, requieren también de la presencia del VDR clásico a nivel de las caveolas de la membrana plasmática y la subsiguiente activación del *proto-oncogén tirosín-proteín quinasa Src* (Figura 19).

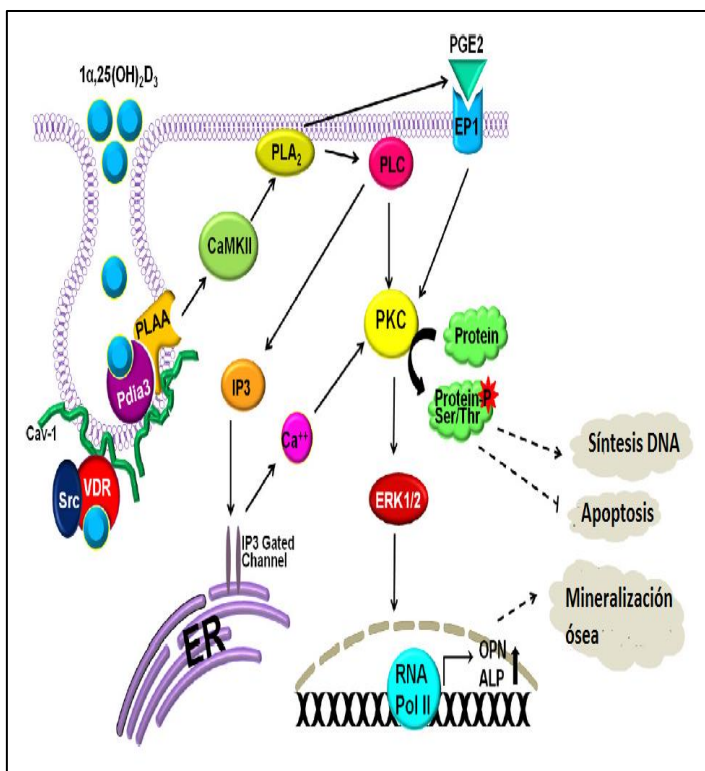


Figura 19. Las respuestas rápidas al calcitriol dependientes de Pdia3 se inician en las caveolas, donde interactúa con mediadores, incluyendo la Proteína Activadora de la Fosfolipasa A2 (PLAA) vía la proteínquina II Ca^{++} /calmodulina dependiente (CaMKII), para el inicio de una cascada metabólica que tiene como resultado la activación de la PKC y su translocación hacia la membrana plasmática, implicada en el proceso de mineralización ósea. Tomado de: Doroudi M et al (138).

Las acciones rápidas de la $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{VD}$ han podido ser observadas en una gran variedad de estirpes celulares, incluyendo células óseas, condrocitos, queratinocitos, enterocitos y células

musculares. La tabla 12 describe algunos de los principales efectos no genómicos atribuidos a la VD.

Tabla 12. Efectos no genómicos relacionados con la VD

RESPUESTA	TIPO CELULAR/ÓRGANO	REFERENCIA
Trasporte rápido del Ca ²⁺	Intestino	Nemere, 1984
Activación del metabolismo del fosfoinositol	Paratiroides, enterocitos, mioblastos	Lieberherr, 1989 Morelli, 1993
Incremento de la [Ca ²⁺] en el citosol	Osteoblastos, enterocitos	Lieberherr, 1987 Lucas, 1989
Incremento de los niveles de GMP _c	Intestino, células renales corticales	Guillemant, 1980 Vesely, 1984
Activación de la vía PKC	Condrocitos	Sylvia, 1996
Activación de las MAP-Quinasas	Células hepáticas	Baran, 1986
Activación de apertura de los canales de Cl ⁻	Osteoblastos	Zanello, 1996

1.2.2.5 DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE LA 25-OH VD

La estimación del estado de VD se realiza mediante la determinación analítica de la 25(OH)VD. La vida media del calcidiol es de 2 a 3 semanas, mucho mayor que la de su metabolito activo, el calcitriol, cuya vida media es de tan solo 4 horas (Misra, 2008); además, no existe regulación en el proceso de 25-hidroxilación, por lo que sus niveles reflejan la disponibilidad de sustrato (Holick, 1996). El suero es la muestra recomendada para la medición de VD, aunque las muestras de plasma (EDTA y heparina de litio) pueden también ser adecuadas. El calcidiol permanece estable en estas muestras durante más de 2 semanas a 30°C (Carter, 2004) y permiten su congelación a -20°C sin experimentar variaciones de sus valores durante periodos superiores a un año (Zerwekh, 2004). La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas está considerada como el método de referencia y de validación en la determinación analítica de los diferentes metabolitos de la VD (Wootton, 2005), pero la complejidad técnica de su realización imposibilita su empleo como herramienta rutinaria de medición. Por ello, en la actualidad, la mayoría de los laboratorios realizan las mediciones de VD mediante técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) o radioinmunoanálisis (RIA), aunque existen diversas limitaciones que dificultan la determinación:

- El 85% de la 25(OH)VD está unida a la VDBP por lo que, en la realización de técnicas de separación por cromatografía, se requiere de un paso previo de extracción que puede estar sujeto a una coprecipitación variable (Vogeser, 2004).
- Debido a la naturaleza lipofílica de la 25(OH)VD, los métodos de inmunoensayo no extractivos pueden ser susceptibles a los efectos matriciales vinculados a la existencia de componentes endógenos en la muestra de sangre diferentes al metabolito analizado y que pueden modificar la capacidad de asociación del anticuerpo (Hollis, 2004).
- Necesidad de empleo de métodos de medición que reaccionen de forma equiparable con la 25(OH)VD₃ y la 25(OH)VD₂. Algunos inmunoensayos no miden la 25(OH)VD₂, por lo que se está infraestimando la cantidad total de 25(OH)VD, en especial, en aquellos individuos que toman preparados farmacéuticos de VD a base de ergocalciferol (Hollis, 2000). En nuestro estudio, se empleó una técnica de RIA que proporciona una medición total equimolar de los derivados tanto del ergocalciferol como del colecalciferol (ver apartado 4.3.3.5).
- Existencia de niveles bajos (nanomolares) de los diferentes metabolitos de la VD en suero (3-epi-25-hidroxitamina D; 24,25-dihidroxitamina D), cuya importancia fisiológica está aún por clarificar y que pueden ser o no incluidos en el valor reportado de 25(OH)VD.

Los resultados de la determinación de 25(OH)VD se expresan habitualmente en forma de nanogramos por mililitro (unidades aportadas por la mayoría de los laboratorios) o nanomoles por litro (unidades empleadas por la mayoría de literatura científica). Dividiendo el valor de 25(OH)VD en nmol/L entre 2,5 obtenemos una aproximación cercana al valor en ng/ml.

En general resulta difícil establecer comparaciones entre los diferentes estudios que evalúan los niveles de VD, puesto que la metodología empleada influye de manera notable en la medición de la 25(OH)VD, de ahí la gran variabilidad entre los valores obtenidos por unos métodos u otros, e incluso con la misma metodología se han observado diferencias interlaboratorio (Martínez ME, 2000). En la Figura 20 se representa de manera gráfica la variabilidad en las medidas de 25(OH)VD a través de un ejemplo en el que 25 alícuotas de suero fueron enviadas a 7 laboratorios clínicos diferentes para la medición de calcidiol mediante diferentes técnicas de RIA y sus resultados comparados con los obtenidos con el método de referencia de HPLC (Binkley, 2010).

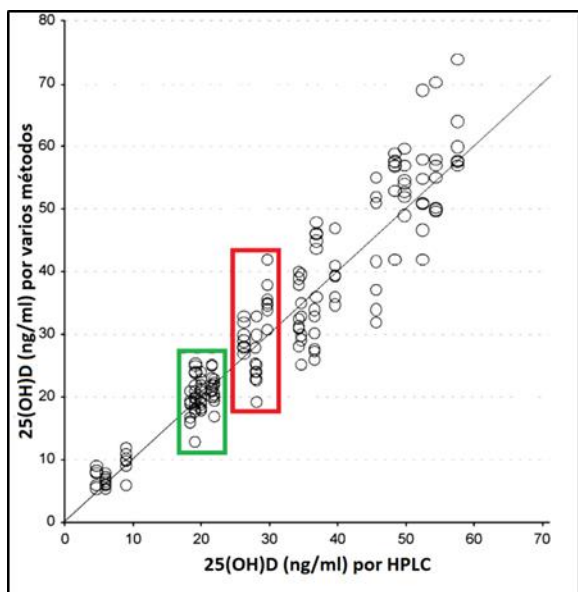


Figura 20. En el rectángulo verde se muestra cómo, para un valor “real” en torno a los 20 ng/ml, los clínicos pueden recibir resultados de laboratorio entre 12-27 ng/ml. De forma parecida, para un valor “real” de 30 ng/ml (rectángulo rojo) los valores reportados oscilan entre 17 y 42 ng/ml. Tomado de: Binkley N et al ⁽³⁹⁾.

1.3 SISTEMA HORMONAL CALCOTROPO DURANTE EL EMBARAZO Y EL PERIODO NEONATAL INMEDIATO

La homeostasis mineral y ósea durante el periodo fetal y neonatal está sometida a unas regulaciones peculiares. El transporte activo placentario de calcio, magnesio y fósforo cubre los elevados requerimientos de minerales del feto en desarrollo, mientras que el recién nacido deberá adaptarse a la brusca interrupción del transporte placentario sin que ello interfiera en el rápido crecimiento esquelético. Asimismo, la mineralización del esqueleto fetal y su posterior crecimiento durante la infancia obligan a una serie de ajustes hormonales en el metabolismo fosfocálcico materno durante los periodos de embarazo y lactancia en el que además del sistema endocrino clásico VD-PTH intervienen otros mecanismos hormonales.

1.3.1 ADAPTACIONES MATERNAS DURANTE EL EMBARAZO

En relación con el metabolismo fosfocálcico, en la mujer embarazada acontecen una serie de estrategias biológicas adaptativas que permiten responder a los elevados requerimientos minerales que impone el feto en desarrollo.

- Se produce un aumento de 2-3 veces los niveles séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ total y libre durante el primer trimestre del embarazo y este incremento se mantiene hasta el final de la gestación (Kovacs, 1997), con lo que se optimiza la absorción intestinal de calcio y disminuye su excreción renal (Gertner, 1986). Este incremento se debe a un aumento de la actividad de la 1α -hidroxilasa renal materna (Fenton, 1980; Kubota, 1982) no mediado por la PTH, cuyos niveles se mantienen en valores normales-bajos durante el embarazo. Es posible que la actividad de la 1α -hidroxilasa en diversos tejidos fetales, tales como los riñones, la decidua o la placenta también contribuya en cierta medida al aumento de los niveles maternos de calcitriol, pero todavía se desconoce la repercusión real de estos mecanismos (Zerwekh, 2004).
- Los valores maternos de calcitonina se elevan durante el embarazo como consecuencia de un aumento de su síntesis a nivel de las células C del tiroides, las glándulas mamarias y la placenta (Balabanova, 1987) y ejercen un papel protector sobre la desmineralización ósea materna.
- Mayor disponibilidad en sangre materna de PTHrP y de sus fragmentos procedentes de diferentes tejidos materno-fetales (Bertelloni, 1994) que contribuyen a la elevación de los niveles séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ y calcio y a la supresión de la PTH.
- El embarazo también favorece una marcada elevación de otras hormonas (estradiol, prolactina, y lactógeno placentario) con potencial efecto regulador sobre los niveles de calcio y el metabolismo óseo, y que se han relacionado en estudios animales con un aumento del transporte intestinal de calcio, una disminución de su excreción urinaria y una estimulación de la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ y PTHrP (Kovacs, 2008).
- El calcio iónico mantiene unos niveles estables (normales-altos) durante el embarazo, a pesar de la disminución que experimenta la concentración sérica de calcio total como consecuencia de la hemodilución y el descenso de la albúmina sérica (Gertner, 1986).
- El embarazo incrementa la resorción ósea en el esqueleto materno tal y como queda demostrado por la elevación de los marcadores bioquímicos de resorción (Namgung, 2003), las evidencias histológicas en biopsias óseas realizadas a mujeres coincidiendo con abortos del primer trimestre (Purdie, 1988) y el descenso entre el 1-4% en los valores maternos de DMO en estudios longitudinales realizados antes y después de un embarazo (Drinkwater, 1991). No obstante, existen datos dispares sobre cómo influye este mecanismo sobre el nivel de calcio fetal, aunque se considera que, en general, su repercusión es escasa (Kovacs, 2011a).

La Tabla 13 aporta valores de referencia de calcio, fósforo y hormonas calciotropas durante el embarazo

Tabla 13. Concentraciones séricas de minerales y hormonas calciotropas durante el embarazo. Tomado de Ardawi MS et al ⁽¹⁴⁾.

	Primer trimestre	Segundo trimestre	Tercer trimestre	Adulto no gestante
Calcio (mg/dl)	8,8-10,6	8,2-9,0	8,2-9,7	8,7-10,2
Fosfato (mg/dl)	3,1-4,6	2,5-4,6	2,8-4,6	2,5-4,3
PTH (pg/ml)	10-15	18-25	9-26	8-51
PTHrP (pmol/L)	0,7-0,9	1,8-2,2	2,5-2,8	<1,3
1,25(OH)₂VD (pg/ml)	20-65	72-160	60-119	25-45
25(OH)VD (ng/ml)	18-27	10-22	10-18	14-80

1.3.2 NIVELES FETALES DE MINERALES

Calcio, fósforo, magnesio y zinc son los minerales primarios implicados en la formación ósea. Cada recién nacido posee unos 20-30 g de calcio, 16 g de fósforo, 750 mg de magnesio y 50 mg de zinc, de los cuales, aproximadamente el 98%, 80%, 60% y 30% respectivamente se encuentran formando parte del esqueleto (Prentice, 2003). Cuantitativamente, el periodo de mayor acreción mineral fetal tiene lugar durante el 3º trimestre de embarazo, gracias a un transporte activo transplacentario que asegura unos niveles séricos fetales de estos micronutrientes superiores a los del adulto.

Si observamos los datos sobre composición corporal obtenidos de los análisis químicos realizados en fetos entre las 24 y 40 semanas de gestación y que constituyen el llamado *feto de referencia* (Ziegler, 1976), podemos ver que las concentraciones de sodio, agua y cloro por unidad de peso disminuyen a medida que aumenta la edad gestacional. En cambio, las de proteínas, lípidos, calcio, fósforo, magnesio y potasio aumentan (Tabla 14), en clara relación con la cronología de mineralización fetal.

Tabla 14 Datos sobre composición corporal fetal según edad gestacional. Tomado de: Ziegler EE et al ⁽⁵⁸³⁾.

EG (sem)	Peso (g)	POR 100 g DE PESO				POR 100 g DE MASA LIBRE DE GRASA							
		Agua (g)	Prot (g)	Lípido (g)	Otros (g)	Agua (g)	Prot (g)	Ca (mg)	P (mg)	Mg (mg)	Na (mmol)	P (mmol)	Cl (mmol)
24	690	88,6	8,8	0,1	2,5	88,6	8,8	621	387	17,8	9,9	4,0	7,0
26	880	86,6	9,2	1,5	2,5	88,1	9,4	611	384	17,5	9,7	4,1	7,0
28	1160	84,6	9,6	3,3	2,4	87,5	10,0	610	385	17,4	9,4	4,2	6,9
30	1480	82,6	10,1	4,9	2,4	86,8	10,6	619	392	17,4	9,2	4,3	6,8
32	1830	80,7	10,6	6,3	2,4	86,1	11,3	640	406	17,8	9,1	4,4	6,6
34	2230	79,0	11,0	7,5	2,5	85,4	11,9	675	428	18,3	8,9	4,5	6,4
36	2690	77,3	11,4	8,7	2,6	84,6	12,5	726	460	19,0	8,8	4,5	6,1
38	3160	75,6	11,8	9,9	2,7	83,9	13,1	795	501	20,0	8,8	4,5	5,9
40	3450	74,0	12,0	11,2	2,8	83,3	13,5	882	551	21,1	8,7	4,6	5,7

1.3.2.1 CALCIO

Aproximadamente el 80% del calcio fetal se adquiere durante el tercer trimestre, lo que supone una transferencia diaria superior a los 150 mg/Kg (Kovacs, 2011a). Existe un transporte activo en contra de gradiente electroquímico a través de las células sincitiotrofoblásticas, lo que permite que a partir de la semana 12-15 de gestación, los niveles plasmáticos fetales superen en 1,2-2 mg/dl a los maternos (Kovacs, 2013). El transporte transplacentario de calcio tiene lugar mediante un mecanismo similar al de la absorción intestinal: el canal epitelial de calcio TRPV6 se abre en la membrana basal de la cara materna del sincitotrofoblasto permitiendo la entrada del calcio en las células; se une a la calbindina-D9K y es transportado hacia la membrana basal opuesta desde donde alcanza la circulación fetal gracias a la Ca^{2+} -ATPasa (Ohata, 2016).

Las elevadas concentraciones de calcio sérico fetal son necesarias para la mineralización esquelética, ya que cuando el calcio sérico se reduce al nivel materno, el contenido mineral del feto también se reduce de forma significativa (Kovacs, 2011a). Entre los factores que determinan el aporte de calcio al feto se incluye la concentración plasmática materna y fetal de calcio iónico, el flujo sanguíneo placentario y la capacidad y eficiencia de los mecanismos de transporte (Husain, 2011). En cuanto a la regulación hormonal, tanto la PTH como la PTHrP estimulan la transferencia placentaria de calcio, existiendo datos contradictorios sobre el papel que juega la

VD materna en este transporte, aunque se asume un efecto directo permisivo de la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ fetal (Belkacemi, 2005). Según apuntan los estudios en animales, el transporte activo transplacentario de calcio se mantiene incluso en situaciones de hipocalcemia y déficits hormonales maternos (Halloran, 1981; Bourdeau, 1990). No obstante, existen dudas de que estos resultados puedan extrapolarse a los fetos humanos, pues se ha demostrado que la hipocalcemia materna por hipoparatiroidismo genera hiperparatiroidismo fetal, cuyas consecuencias incluyen desmineralización ósea, fracturas y abombamiento de huesos largos (Sann, 1976).

1.3.2.2 FÓSFORO

El fósforo sérico mantiene en el feto unos niveles 1,55 mg/dl por encima de los maternos (Reitz, 1977) lo que, combinado con la situación de hipercalcemia fetal, condiciona un elevado producto calcio*fósforo que favorece la mineralización. El flujo de fósforo a través de la placenta es bidireccional, con un flujo en la dirección materno-fetal que excede al de la dirección fetomaterna. Así, la transferencia materno-fetal de fósforo, que tiene lugar fundamentalmente en los estadios finales del embarazo, se produce en contra de un gradiente de concentración. El mecanismo de transporte transplacentario de fósforo no se conoce de forma detallada, pero se sugiere que se trata de un sistema transcelular dependiente del sodio y del pH, sin haberse podido demostrar si el FGF23 interviene o no en su regulación (Husain, 2011; Ohata, 2016).

Los factores que modulan el transporte placentario de fósforo no han sido estudiados de manera extensa. Parece ser que la administración de calcitriol o análogos a la madre incrementan la concentración sérica fetal de fósforo, aunque se desconoce si por una estimulación neta del transporte placentario o debido al aumento de la concentración sérica de fósforo materno. Asimismo, la PTH fetal parece disminuir la transferencia de fósforo en la dirección fetomaterna (Brunette, 1989).

1.3.2.3 MAGNESIO

Los niveles de magnesio fetal también se alcanzan con independencia de los valores maternos (Kovacs, 2011a) y la mayoría de los estudios en humanos muestran la existencia de una modesta hipermagnesemia con valores 0,12 mg/dl superiores respecto a los maternos (Bogden, 1978).

Se conoce poco a cerca del mecanismo de transporte placentario de magnesio, que se supone es bidireccional, y de los factores que intervienen en su regulación (Ohata, 2016).

1.3.3 HORMONAS CALCITROPAS Y MARCADORES BIOQUÍMICOS ÓSEOS FETALES

1.3.3.1 PTH Y PTHrP

La PTH y la PTHrP desarrollan un papel complementario y aditivo en la regulación de la homeostasis mineral fetal. La PTH materna (cuyos valores durante el embarazo no suelen superar los 30 pg/ml) no cruza la placenta; la concentración en la sangre fetal es prácticamente indetectable (<0,5 pg/ml) y depende de la síntesis endógena a nivel de las glándulas paratiroides fetales (activas desde la semana 12 de gestación) (Kovacs, 2011a). En cambio, los valores de PTHrP en sangre de cordón (20-40 pg/ml) superan en más de 15 veces a los de PTH. Hasta la fecha, se desconoce cuál es la fuente de la PTHrP en la circulación fetal (Kovacs, 2014); se ha detectado PTHrP en las células citotrofoblásticas y sincitiotrofoblásticas placentarias, así como en el líquido amniótico (Bowden, 1994), pero también se produce en muchos otros tejidos fetales (glándulas paratiroides, placa de crecimiento esquelético, músculo liso cardiaco y vascular...). El efecto combinado de las altas concentraciones de PTHrP y los bajos niveles de PTH en la circulación fetal permite mantener, en condiciones normales, una concentración de calcio iónico fetal superior a la materna.

La PTH y la PTHrP poseen efectos superpuestos y aditivos en la regulación del metabolismo óseo y mineral fetal, de manera que la pérdida de cualquiera de las dos hormonas conduce a una situación de hipocalcemia fetal (Fig. 21.A). Los fragmentos moleculares intermedios de PTHrP favorecen, a través de un receptor aún sin identificar, el transporte activo transplacentario de calcio (también el de magnesio) mediante el incremento de la expresión de la Ca^{2+} -ATPasa y la calbindina-D9K (Kovacs, 2010), lo que eleva el calcio fetal y conlleva la supresión de la PTH de la circulación fetal mediada por el receptor sensor de calcio (CaSR). Pero, a pesar de sus bajos niveles, la presencia de PTH también resulta determinante en el mantenimiento de los niveles de calcio y fósforo en la circulación fetal, actuando como mecanismo de rescate compensador: en ausencia de PTHrP, existe una elevación de los niveles de PTH en respuesta a la disminución de calcio sérico que permite que el feto mantenga el nivel normal del adulto (Kovacs, 2011b).

En cambio, la pérdida combinada de PTH y PTHrP, la ausencia de glándulas paratiroides o la pérdida de PTH1R ocasionan los niveles más bajos de calcio iónico fetal (Kovacs, 2014).

Además, la PTHrP controla el desarrollo óseo endocondral retrasando la diferenciación terminal de los condrocitos y estimulando la formación, reclutamiento, actividad y supervivencia de los osteoblastos (Figura 21.B).

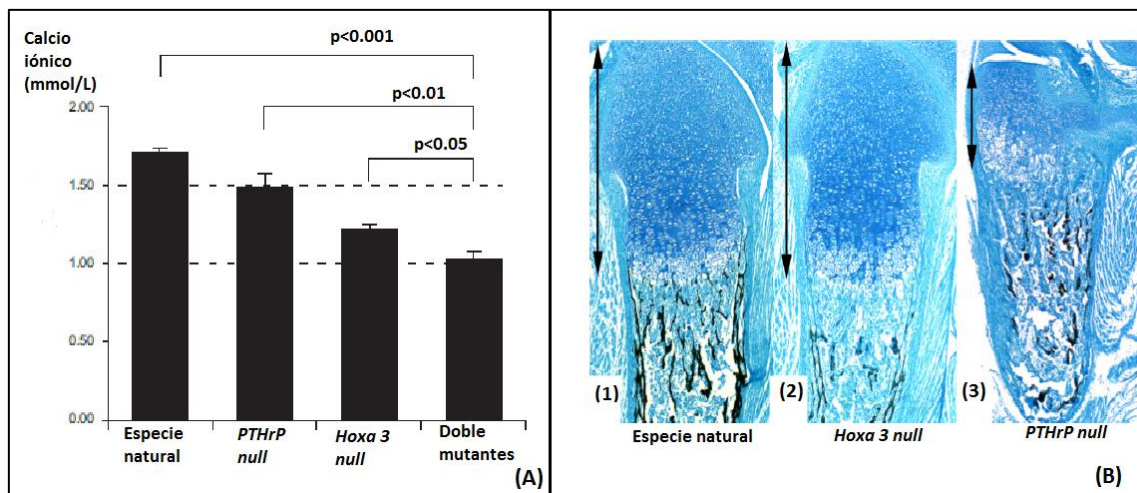


Figura 21. (A) Variaciones en los niveles de calcio iónico en diferentes modelos de ratones: especie natural, *PTHrP null* (especie con ausencia de PTHrP), *Hoxa3 null* (especie con ausencia de paratiroides/PTH) y dobles mutantes (ausencia simultánea de PTHrP y PTH). **(B)** Secciones de tibias fetales tratadas con tinción argéntica de von Kossa y contrateñidas con azul de metileno. La morfología general y longitud de las porciones superiores de la tibia (zonas condrocíticas y óseas) son normales en los modelos *Hoxa3 null* (2), en comparación con el progresivo acortamiento y desorganización de las placas de crecimiento de los modelos *PTHrP null* (3). Las flechas de doble punta comparan las longitudes de la placa de crecimiento desde la zona proliferante hasta la hipertrófica. La cantidad de mineral (tinción negra) parece estar reducida en los modelos *Hoxa3 null*, pero ser normal en los *PTHrP null*. Tomado de Kovacs CS ^(275, 278).

Los diferentes modelos de ratones (Kovacs, 2001) han demostrado que PTHrP regula la transferencia placentaria de calcio, el calcio sanguíneo fetal y la diferenciación de la placa de crecimiento cartilaginosa en el hueso endocondral mientras que las pérdidas aisladas de PTH no afectan a la morfología ni a la expresión genética en las placas de crecimiento esquelético, pero reducen de forma significativa la mineralización esquelética y el calcio sérico fetal (Figura 22). Estos hallazgos sugieren que:

- La PTH juega un papel más dominante que PTHrP en la regulación del calcio sanguíneo fetal.
- El calcio sanguíneo y los niveles de PTH son los factores limitantes de la acreción mineral esquelética fetal.
- La ausencia combinada de PTH y PTHrP originará una restricción del crecimiento fetal.

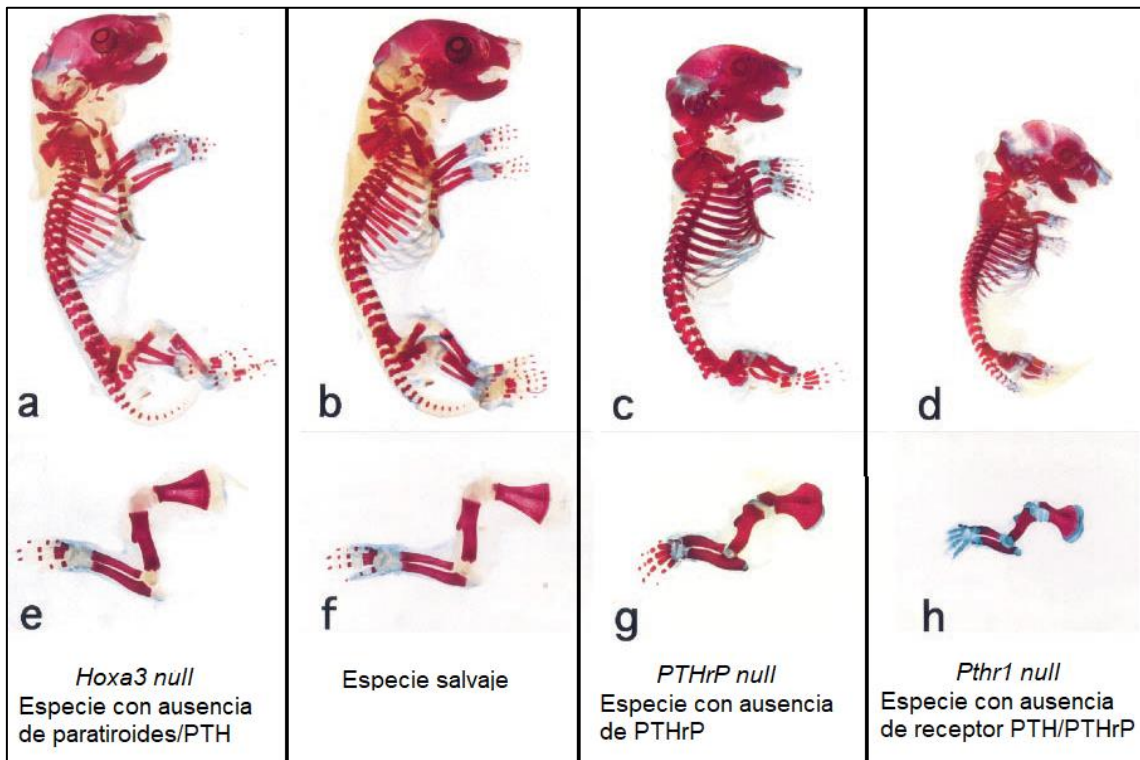


Figura 22. Morfología de esqueleto completo en fetos de ratones (18,5 días) teñidos con rojo de alizarina S (mineral) y PAS-azul alcian (cartílago). La longitud craneocaudal, la longitud de los huesos largos y el patrón de mineralización parecen no modificarse en las especies *Hoxa3 null* (A) en comparación con la especie salvaje (B). El feto *PTHrP null* (C) es más corto, posee una bóveda craneal redondeada, huesos largos acortados y engrosados y una mineralización anómala de la porción cartilaginosa de costillas y esternón. El ratón *Pthr1-null* (D) muestra unos cambios groseros similares en el esqueleto, aunque con un mayor acortamiento craneocaudal y de la longitud de los huesos largos. (E-H) muestran extremidades superiores de estos mismos fetos a mayor aumento. Tomado de Kovacs CS et al ⁽²⁷⁵⁾.

1.3.3.2 VD

La 25(OH)VD atraviesa la placenta, por lo que existe una correlación lineal entre los niveles de calcidiol en la embarazada y los de la sangre de cordón del recién nacido, que suelen suponer un 75% de los maternos (intervalo 50-100%) y que, por lo tanto, están sometidos a los mismos

factores (época del año, hábitos de vestido, tono de piel, dieta...) que regulan los valores maternos. El calcitriol, en cambio, no cruza la barrera placentaria, por lo que sus niveles en sangre fetal son bajos y dependen de la síntesis endógena que tiene lugar en la placenta y en diversos tejidos fetales, aunque en escasa cantidad, pues los valores sanguíneos del feto (niveles bajos de PTH y elevados de calcio y fósforo) suprimen a la 1α -hidroxilasa renal (Kovacs, 2013). Hasta el momento, no se ha establecido de forma clara el papel que juega la VD materna y sus metabolitos en el desarrollo óseo fetal, existiendo datos contradictorios al respecto. Este aspecto se desarrollará de forma más extensa en el apartado 1.5.1.

1.3.3.3 CALCITONINA

Los valores fetales están elevados al compararlos con los simultáneos maternos tanto en recién nacidos a término como pretérmino. La calcitonina no puede cruzar la placenta, así que los valores en el feto proceden de las células C, estimuladas por el elevado nivel de calcio fetal. La evidencia sugiere que su papel no es muy importante en la regulación de la homeostasis mineral fetal (Kovacs, 2013).

Las tablas 15 y 16 comparan las concentraciones séricas de minerales y hormonas calciotropas maternas y fetales.

Tabla 15. Principales variaciones en los niveles de minerales y de hormonas calcitropas durante el embarazo, la relación entre las concentraciones maternas y fetales y el mecanismo de transporte placentario

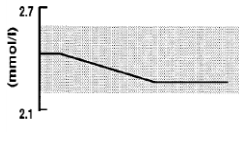
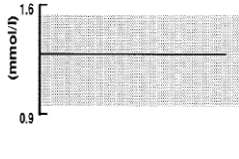
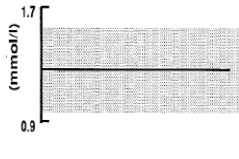
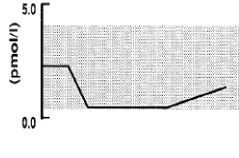
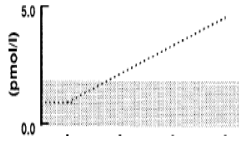
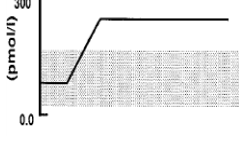
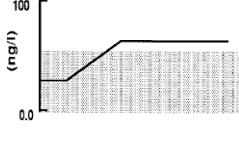
	Mecanismo de transporte placentario	Evolución durante embarazo	Concentración materna	Concentración fetal
Calcio total (mmol/L) [mg/dl]	Transporte activo en contra de gradiente electroquímico y de concentración		2,13 ± 0,15 [8,54 ± 0,6]	2,65 ± 0,19 [10,62 ± 0,76]
Calcio iónico (mmol/L) [mg/dl]			1,12 ± 0,06 [4,49 ± 0,24]	1,41 ± 0,09 [5,65 ± 0,36]
Fósforo (mmol/L) [mg/dl]	Transporte activo en contra de gradiente		1,43 ± 0,5 [4,43 ± 1,55]	1,92 ± 0,4 [5,95 ± 1,24]
PTH (pmol/L) [pg/ml]	No cruza la placenta		1-3 [10-30]	<0,05 [<0,5]
PTHrP (pmol/L) [pg/ml]	¿Síntesis placentaria?		1-5 [10-50]	2-4 [20-40]
25(OH)VD (nmol/L) [ng/mL]	Paso libre transplacentario	Dependiente de la síntesis cutánea y el aporte dietético	12,5-125 [5-50]	75-100% de los valores maternos
1,25(OH)₂VD (pmol/L) [pg/ml]	No existen datos que demuestren paso placentario		33,5 ± 20,3 [87,1 ± 52,8]	<50% valores maternos (síntesis renal y placentaria a partir de 25(OH)VD)
Calcitonina (pmol/L) [pg/ml]	No cruza placenta		0,88 ± 0,56 [2,57 ± 1,93]	5,42 ± 2,44 [18,56 ± 8,37]

Tabla 16. Comparación de los niveles séricos feto/maternos de minerales y hormonas calciotropas. Tomado de: Ohata Y et al ⁽³⁸⁹⁾.

Calcio	Feto	>>	Madre	Gestación tardía
Fosfato	Feto	>>	Madre	Gestación tardía
Magnesio	Feto	>	Madre	Gestación tardía
iPTH	Feto	<<	Madre	Final gestación
1,25(OH)₂VD	Feto	<	Madre	Gestación tardía
Calcitonina	Feto	>	Madre	A término

1.3.3.4 MARCADORES ÓSEOS DURANTE EL DESARROLLO FETAL

Durante el embarazo, se produce un incremento significativo de los valores de FA a expensas, fundamentalmente, de la isoenzima placentaria. La fosfatasa alcalina placentaria (FAP) es una glucoproteína sintetizada en las vellosidades del sincitiotrofoblasto (Abu-Hasan, 1985). En el suero materno los valores iniciales son muy bajos, incrementándose progresivamente en la segunda parte de la gestación y alcanzando sus concentraciones máximas al término del embarazo, con valores entre 30-400 UI/dl (Okesina, 1995). En condiciones normales la isoenzima placentaria representa entre el 40 y el 67% del total de la FA de la embarazada durante el tercer trimestre, lo que hace que los niveles conjuntos de FA al final de la gestación sean el doble a los de las mujeres no embarazadas (Tabla 17). La fracción ósea de FA también contribuye a este incremento, ya que también experimenta un discreto aumento durante el embarazo (Nakano, 2006), en probable relación con el mayor recambio óseo de las mujeres embarazadas (ver apartado 1.3.1). Tras el puerperio, los niveles totales de FA retornan al intervalo fisiológico (Makiya, 1992). Aunque las funciones precisas de la isoenzima placentaria no son bien conocidas, parece jugar un papel importante en el transporte y metabolismo placentario y varios estudios han sugerido la posible asociación entre concentraciones elevadas de FAP y preeclampsia, bajo peso al nacer e insuficiencia placentaria (Okpere, 1988; Onyesom, 2009). La FAP tiene un peso molecular elevado (130 kD), por lo que se considera que no puede ser transferida a través de la placenta, al menos mediante difusión, y sólo se encuentran pequeñas cantidades en tejidos fetales a los que llega mediante transfusión sanguínea materno-fetal (Nouwen, 1986). Esto mismo ocurre con la fracción ósea, de modo que se considera que el remodelado óseo fetal es independiente del materno y que los valores neonatales de FA al nacimiento dependen de la actividad osteoblástica fetal y no guardan relación con el metabolismo mineral materno (Briana, 2008; Högler, 2003; Sachan, 2005). En un estudio

realizado en recién nacidos prematuros y a término (edad gestacional media 31,3 semanas y peso medio al nacimiento 1,510 g) el valor medio de BALP obtenida durante las primeras 3 horas de vida fue de $127,5 \pm 49,2$ U/L y tendió a ser menor en los recién nacidos a término (Nitta, 2016). El análisis de regresión múltiple mostró que la actividad de la BALP (empleado como indicador de formación ósea) se correlacionó de manera negativa con la edad gestacional, porcentaje de recién nacidos PEG y peso al nacimiento, lo que sugiere que la formación ósea durante el crecimiento fetal decrece de manera gradual desde la mitad del embarazo hasta el nacimiento.

Tabla 17. Niveles durante el embarazo de las isoenzimas de FA según edad gestacional. Tomado de: Okesina AB et al ⁽³⁹⁰⁾.

		Mujeres embarazadas (semanas de gestación)			
		8-12	13-16	31-32	>38
N	18	14	14	24	15
Edad (años)					
Media \pm 1DE	27 \pm 4,9	27 \pm 4,5	26 \pm 4,9	26 \pm 3,7	30 \pm 2,3
Intervalo	19-38	21-38	20-36	18-33	25-33
FA total (UI/L)					
Media \pm 1DE	106,6 \pm 22,5	73,4 \pm 16,4	76,9 \pm 19,3	148,8 \pm 32,6	267,9 \pm 52,7
Intervalo	75-144	51-144	59-121	91-219	149-366
FA ósea (UI/L)					
Media \pm 1DE	59,4 \pm 14,7	39,7 \pm 9,4	41,5 \pm 24,1	69,3 \pm 17,7	96,8 \pm 32,3
Intervalo	6-67	24-60	6-95	35-133	54-142
FA placentaria (UI/L)					
Media \pm 1DE	2,0 \pm 2,0	2,6 \pm 2,9	3,7 \pm 2,8	41,0 \pm 16,3	122,7 \pm 31,2
Intervalo	0-6	0-8	0-8	19-97	73-167
FA no ósea (UI/L)					
Media \pm 1DE	46,0 \pm 12,1	30,4 \pm 11,1	31,8 \pm 12,9	37,2 \pm 21,9	48,2 \pm 43,7
Intervalo	30-120	20-54	20-60	42-122	1-125

En cuanto al resto de marcadores bioquímicos de metabolismo óseo, tampoco se ha podido demostrar que exista relación entre los niveles maternos y fetales, con valores fetales que suelen ser superiores a los maternos (Yasumizu, 1996; Yamaga, 1999). El estudio de las concentraciones en sangre de cordón muestra que la osteocalcina se incrementa a partir de la semana 22-27 de gestación y disminuye posteriormente (Seki, 1994), mientras que los valores de PICP, PINP y ICTP disminuyen con la edad gestacional (Hytinanti, 2000; Saarela 2001). Estos resultados sugieren en el feto, durante el tercer trimestre, existe una formación y resorción

activa del colágeno de tipo I con un predominio de osteoblastos en fase proliferativa. No obstante, debemos tener en cuenta que en todos estos estudios la sangre fue obtenida después del nacimiento, lo que deja abierta la posibilidad de que los resultados se encuentren influenciados por el proceso del parto.

1.3.4 METABOLISMO MINERAL Y DE LA VD EN EL RECIÉN NACIDO

Tras el nacimiento, el cese del flujo transplacentario de calcio hace que el recién nacido pase a depender del aporte de los depósitos esqueléticos y de la reabsorción renal para mantener unos niveles adecuados de calcio a la vez que se continúa con el crecimiento esquelético. La concentración sérica de calcio disminuye entre un 20 y un 30% durante las primeras 24-36 horas de vida. Como consecuencia, la PTH, frenada por la situación de hipercalcemia fetal, se eleva (de 2 a 5 veces durante las primeras 48 horas de vida), lo que favorece un aumento del calcitriol y del calcio y una disminución de los niveles de fósforo sérico (Kovacs, 2014). Las concentraciones de PTH en sangre de cordón no dependen del sexo, raza, mes de nacimiento o peso adecuado a la gestación (Namgung, 1994), pero sí que pueden experimentar variaciones en relación con el tipo de parto (siendo superiores en las cesáreas electivas sin trabajo de parto, frente a las urgentes asociadas a trabajo de parto o al parto vaginal espontáneo) (Bagnoli, 1990). Tras un período de estabilización, la concentración sérica de calcio se eleva lentamente, alcanzando hacia la semana de vida valores similares a los que se encuentran en el resto de la infancia. La absorción intestinal pasiva de calcio se encuentra favorecida en estos primeros meses de vida por el elevado contenido en lactosa de la leche humana. A medida que el lactante va madurando, va adquiriendo importancia la absorción activa de calcio, que es un proceso saturable y dependiente de calcitriol. Este será el mecanismo de absorción dominante en el momento del destete.

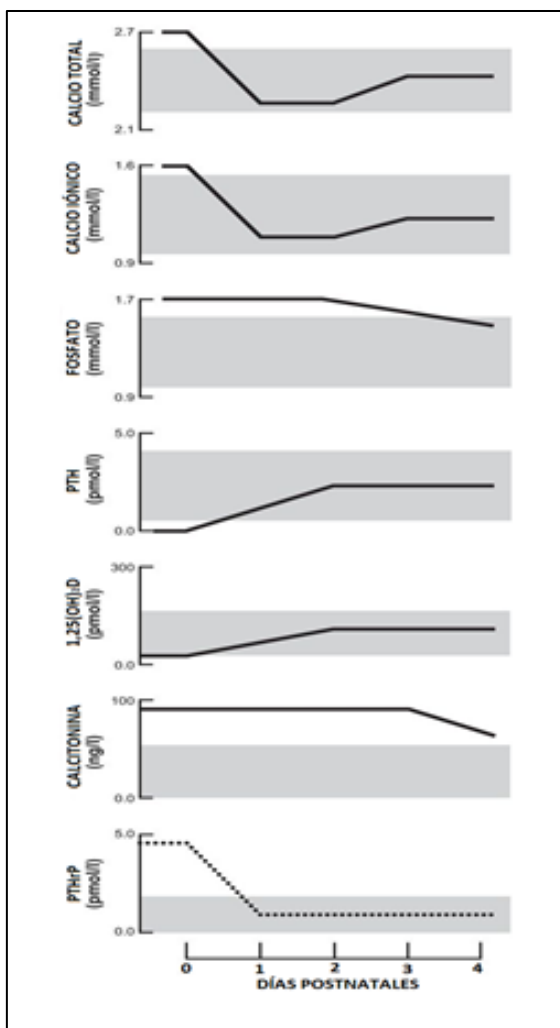


Figura 23. Representación sistemática de los cambios longitudinales en los niveles de minerales y hormonas calciotropas que se producen durante periodo fetal y neonatal. Tomado de: Kovacs CS (278).

Por su parte, las concentraciones de fósforo del recién nacido empiezan a aumentar poco después del nacimiento. La razón para esta elevación aguda no está del todo establecida. Es posible que el incremento sea debido al inicio de la gluconeogénesis que libera fósforo endógeno, a la existencia de hemólisis o bien secundario a una disminución en la tasa de filtrado glomerular con la consiguiente reducción en la excreción renal de fósforo. Los niveles medios de fósforo sérico aumentan hasta 8,1 mg/dl al final de la primera semana de vida e irán disminuyendo hasta valores alrededor de 4,5 mg/dl a lo largo de la infancia, propios de la edad adulta (Namgung, 2011).

La figura 23 y la tabla 18 representan las modificaciones en los niveles de minerales y hormonas calciotropas que se producen durante los primeros días de vida.

Tabla 18. Valores medios \pm desviación standard de concentración de iones en suero del recién nacido según horas de vida. Tomado de: David L and Anast CS ⁽¹¹⁹⁾.

HORAS DE VIDA	Sangre cordón	0-24	24-48	48-72	72-96	>96
Ca ⁺⁺ (mg/dl) [mmol/L]	5,52 \pm 0,30 [1,38 \pm 0,07]	4,67 \pm 0,33 [1,17 \pm 0,08]	4,42 \pm 0,34 [1,10 \pm 0,08]	4,46 \pm 0,36 [1,11 \pm 0,09]	4,47 \pm 0,38 [1,12 \pm 0,09]	4,82 \pm 0,34 [1,20 \pm 0,08]
Ca (mg/dl) [mmol/L]	10,8 \pm 0,66 [2,70 \pm 0,16]	9,82 \pm 0,83 [2,45 \pm 0,21]	9,46 \pm 0,87 [2,36 \pm 0,22]	9,67 \pm 0,81 [2,42 \pm 0,20]	9,76 \pm 0,74 [2,44 \pm 0,18]	9,97 \pm 0,88 [2,49 \pm 0,22]
Mg (mg/dl) [mmol/L]	1,81 \pm 0,14 [0,74 \pm 0,06]	1,85 \pm 0,19 [0,76 \pm 0,08]	1,94 \pm 0,18 [0,80 \pm 0,07]	2,01 \pm 0,22 [0,83 \pm 0,09]	2,00 \pm 0,21 [0,82 \pm 0,09]	2,08 \pm 0,24 [0,85 \pm 0,10]
P (mg/dl) [mmol/L]	6,17 \pm 1,03 [1,99 \pm 0,33]	6,55 \pm 1,10 [2,11 \pm 0,35]	7,50 \pm 1,03 [2,42 \pm 0,33]	8,10 \pm 1,18 [2,61 \pm 0,38]	7,74 \pm 1,33 [2,50 \pm 0,43]	8,16 \pm 1,09 [2,63 \pm 0,35]

En cuanto a la arquitectura ósea, también se producen importantes modificaciones del sistema esquelético para adaptarse a las condiciones extrauterinas. La DMO de los huesos largos disminuye un 30% durante los primeros meses de vida. Esto se debe principalmente a un rápido aumento de la médula ósea, cuyo grosor se incrementa más rápidamente que el área de la sección transversal del hueso cortical (Land, 2008). Este proceso se ha denominado frecuentemente como “osteoporosis fisiológica de la infancia”. No obstante, resulta cuestionable si realmente representa una verdadera disminución postnatal de la fuerza funcional ósea, ya que el criterio más importante en la osteoporosis infantil – fragilidad ósea incrementada – está ausente (Figura 24).

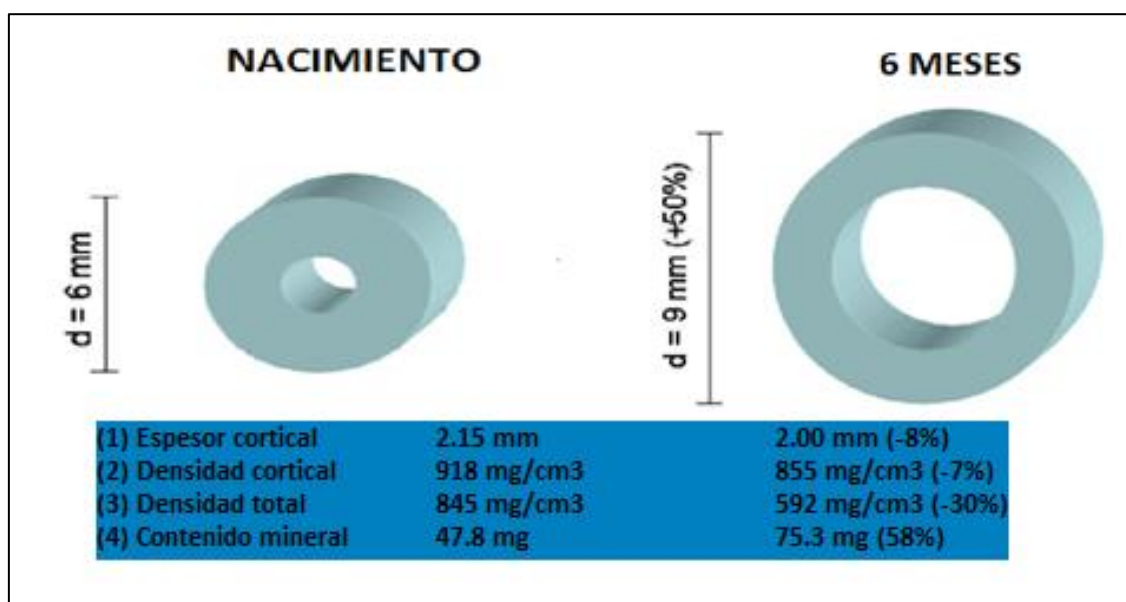


Figura 24. Cambios postnatales fisiológicos en la sección transversal de la diáfisis femoral. Durante los primeros 6 meses de vida el diámetro externo óseo (d) se incrementa en un 50%, mientras que el espesor cortical (1) disminuye discretamente. La densidad total de la diáfisis femoral (3) se reduce sobre un 30%, aunque la densidad cortical (2) sólo lo hace en un 7%. La

diferencia es debida al aumento relativo de la cavidad medular sin contenido mineral. Pero incluso a pesar de la reducción en la DMO, la cantidad absoluta de mineral (4) aumenta en un 58%. Tomado de: Land C and Schoenau E ⁽²⁸⁸⁾.

1.4 ALTERACIÓN DE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA CAUSADA POR DÉFICIT DE VD

1.4.1 DEFINICIÓN DEL UMBRAL DE DÉFICIT DE VD

A pesar de la reciente avalancha de publicaciones de estudios clínicos y revisiones sistemáticas relacionadas con la VD, sigue existiendo controversia en relación con el valor que define el umbral de deficiencia de esta vitamina, la ingesta diaria requerida y los potenciales efectos adversos que, sobre la salud, pueda ocasionar su “insuficiencia”. Desde un punto de vista clínico, podemos basarnos en la valoración de 3 aspectos para definir el estado de suficiencia de VD: riesgo de fracturas y raquitismo, niveles de PTH y modificaciones histológicas de la arquitectura ósea.

1.4.1.1 *RIESGO DE FRACTURAS Y RAQUITISMO*

El déficit de VD se ha relacionado clásicamente con un aumento del riesgo de fracturas en la edad adulta debido a la disminución de la mineralización de la matriz ósea y a una mayor fragilidad muscular que favorece las caídas. Un metaanálisis reciente que ha evaluado diferentes ensayos clínicos sobre prevención de fracturas en relación con la suplementación con VD muestra una tendencia decreciente en la incidencia de fracturas a medida que se incrementan las concentraciones de 25(OH)VD en el grupo de tratamiento (Bischoff-Ferrari, 2012). No obstante, la concentración de 25(OH)VD circulante requerida para obtener los máximos beneficios a este nivel resulta aún hoy controvertida. De hecho, en la valoración del riesgo de fracturas en relación con los niveles de VD, también debería tenerse en cuenta la actividad física como posible factor de confusión, la cual realizada de forma regular es un factor protector para el desarrollo de osteoporosis en todas las edades (Langsetmo, 2012; Howe, 2011). Con la edad, la disminución de la DMO asociada a una menor actividad física podría favorecer la presencia de fracturas patológicas aún con niveles similares de calcidiol.

La entidad clásica vinculado al déficit de VD en la edad pediátrica es el raquitismo, cuadro clínico caracterizado por una serie de deformidades esqueléticas causadas por la hipertrofia y

desorganización de los condrocitos de la placa de crecimiento, así como por defectos en la mineralización esquelética. Aunque generalmente los lactantes y niños con raquitismo tienen concentraciones de 25(OH)VD inferiores a los 10 ng/ml, resulta fundamental considerar el aporte de calcio en la dieta, encontrándose casos de raquitismo con concentraciones superiores a los 20 ng/ml (Braegger, 2013). Tanto es así que, hasta la fecha, no se han podido definir umbrales precisos de 25(OH)VD que mejoren la salud ósea en los distintos grupos de edad (Alonso MA, 2015), ni un nivel de 25(OH)VD por encima del cuál el raquitismo no se produce (Braegger, 2013; Greer, 2009).

1.4.1.2 NIVELES DE PTH

Desde el punto de vista analítico, los niveles óptimos de VD han tratado de definirse a partir de la relación existente entre las concentraciones séricas de hormona paratiroidea (PTH) y 25(OH)VD. La 1,25(OH)₂VD suprime la transcripción del gen codificante de la PTH (Demay, 1992) de forma que, incluso las insuficiencias leves de VD son compensadas mediante un incremento en la PTH sérica que propicia un aumento del recambio óseo que ocasiona osteopenia, osteoporosis e incrementa el riesgo de fracturas. Así pues, en teoría, podría establecerse el valor óptimo de calcidiol determinando el punto en el que la PTH sérica inicia su elevación. No obstante, se hace difícil identificar un único punto de inflexión, ya que existe una gran variabilidad individual en esta relación que está condicionada por diversos factores que incluyen edad, sexo, variaciones genéticas, función renal, nivel de actividad, ingesta de calcio y niveles de fósforo y magnesio (Vieth, 2003; Salameh, 2010; Valcour, 2012). De hecho, la correlación inversa entre los niveles de 25(OH)VD y PTH no ha podido ser demostrada en lactantes y niños (Cranney, 2007; Alonso A, 2011).

En estudios amplios de población adulta, si enfrentamos el criterio de un aparente aplanamiento en la concentración de PTH contra la curva de 25(OH)VD, se intuye una zona de seguridad en el intervalo de 15-30 ng/ml (Holick, 2011b; Heaney, 2005; Saliba 2011) (Figura 25.A), aunque las mujeres requieren, en general, niveles más elevados de calcidiol para que se produzca este efecto meseta (Salameh, 2010).

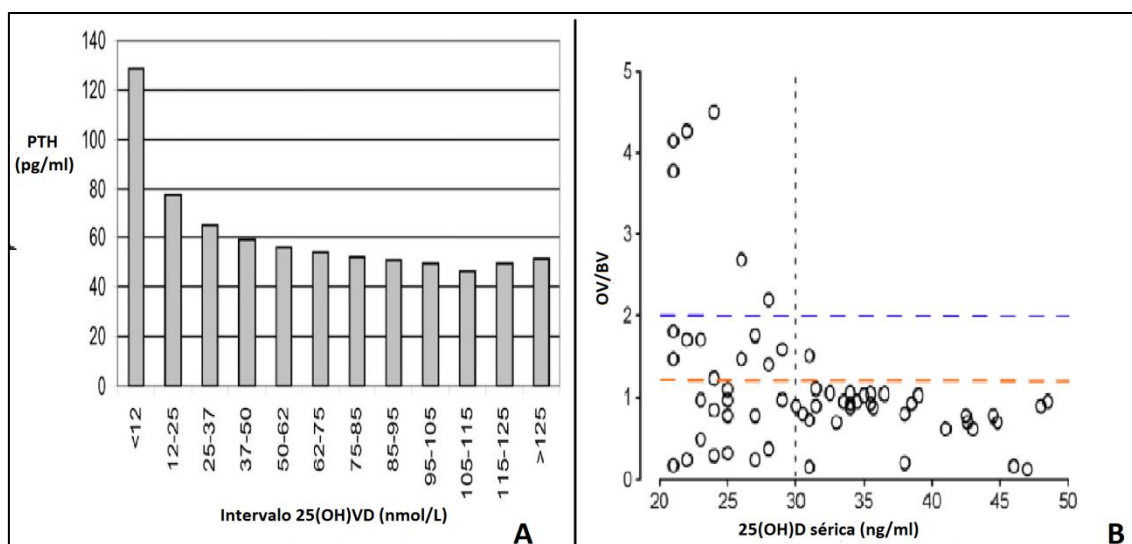


Figura 25. (A) Valores medios de PTH sérica (pg/ml) por subgrupos de valores de 25(OH)VD en suero (nmol/L), CHS 2009. Sujetos con calcio sérico y función renal normal (N = 13.723). Tomado de Saliba et al (457). **(B)** Relación entre los niveles de 25(OH)VD y el volumen osteoide óseo. Aproximadamente una cuarta parte de los individuos con [25(OH)VD] entre 20-30 ng/ml poseen un aumento del volumen osteoide (las líneas discontinuas indican las 2 definiciones más ampliamente aceptadas de aumento de volumen osteoide). BV: bone volume; OV, osteoid volume. Tomado de Priemel M et al (420).

1.4.1.3 CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN BIOPSIA ÓSEA

Uno de los principales cambios con los que se ha relacionado el déficit de VD a nivel ultraestructural es con el aumento del volumen osteoide. Desde este punto de vista histomorfométrico, la osteomalacia podría ser definida como un incremento patológico (superior al 2%) del volumen osteoide en relación con el volumen óseo (OV/BV). Según datos del estudio de Priemel y cols. llevado a cabo en Alemania a partir de las biopsias de crestas ilíacas de adultos jóvenes fallecidos en accidentes de tráfico, los cambios histológicos de osteomalacia estarían presentes en un 26% del total de los pacientes, en el 21% (6 de 28) de los que presentaban valores entre 20 y 30 ng/ml de 25(OH)VD (Figura 25.B) y en ninguno de los individuos con niveles superiores a los 30 ng/ml.

Teniendo en consideración todos estos aspectos, el Institute of Medicine (IOM), dependiente de la Academia Americana de Ciencias, publicó en el año 2011 las últimas recomendaciones oficiales sobre VD. Este grupo de expertos, tras revisar diversos metaanálisis y ensayos clínicos randomizados amplios, concluyó que no existe suficiente evidencia que avale los beneficios extraesqueléticos que algunas publicaciones atribuyen a la VD y estableció como valor objetivo

el de 20 ng/ml (vinculado a una ingesta diaria de 600-800 UI de colecalciferol en situaciones de exposición solar adecuada), por ser el que, a su juicio, ha demostrado ser suficiente para mantener un estado de salud musculoesquelético óptimo (Ross, 2011). No obstante, existen opiniones encontradas al respecto. Múltiples publicaciones definen los valores entre 20-30 ng/ml de 25(OH)VD como insuficientes y defienden la existencia de una pandemia poblacional de déficit de VD con posibles consecuencias de salud pública (Vieth, 2006; Shaw, 2013; Mandarino, 2015). Para ello, se basan en la opinión de diversos autores que abogan por ingestas diarias de colecalciferol más elevadas (1000-2000 UI/día) que permitan alcanzar niveles de 25(OH)VD superiores a los 30 ng/ml (Holick, 2011c), y en diversos estudios de asociación y pequeños ensayos clínicos aleatorizados que sugieren la existencia de beneficios extraesqueléticos vinculados a la VD. La Tabla 19 sintetiza algunos ejemplos de trabajos que apuntan a los posibles efectos extraesqueléticos de mantener el nivel de calcidiol superior a 30 ng/ml.

Así pues, nos encontramos hoy en día en un escenario en el que la disyuntiva sobre qué niveles de VD pueden considerarse adecuados no está todavía resuelta. Por ello, resulta cada vez más frecuente la postura de indefinición de diversas Sociedades Científicas, según la cual, la imprecisión de los estudios disponibles no permite definir umbrales precisos de 25(OH)VD que mejoren la salud ósea en los distintos grupos de edad (Cranney, 2007; Health Quality Ontario, 2010).

En nuestro trabajo, hemos seguido la postura más ampliamente aceptada en la que la deficiencia de VD se define por valores de 25(OH)VD inferiores a 20 ng/ml mientras que las concentraciones entre 20-30 ng/ml son consideradas como insuficientes.

Tabla 19. Efectos extraesqueléticos vinculados al mantenimiento de unos niveles adecuados de 25(OH)VD

	REFERENCIA	MUESTRA	RESULTADO
MEJORÍA DE LAS FUNCIONES INMUNES	Brehm, 2010	1024 niños con asma persistente	Tras el ajuste multivariable, el estado de VD se correlacionó con el riesgo de hospitalización y/o visitas a urgencias (OR 1,5; 95% IC 1,1-1,9; p = 0,01)
	Urashima, 2010	2 grupos 167 escolares (tratamiento vs placebo)	La suplementación con VD durante el invierno puede reducir la incidencia de influenza A, especialmente en algún subgrupo (RR 0,58; 95% IC 0,34-0,99; p =0,04)
	Munger, 2006	257 casos 514 controles	El riesgo de EM disminuyó de forma significativa con el incremento de los niveles de 25(OH)D en personas de raza blanca (OR 0,59; 95% IC 0,36-0,97)
MEJORÍA DE LAS FUNCIONES NEUROCOGNITIVAS	Spedding, 2014 Metaanálisis	15 ensayos clínicos controlados	Mejoría en la puntuación de escala de la depresión mediante el empleo de suplementos de VD (RR 0,78; 95% IC 0,24-1,27)
	Knekt, 2010	Cohorte 3173 mujeres y hombres	Los individuos con concentraciones más elevadas de 25(OH)D presentaron una disminución del riesgo de Enfermedad de Parkinson (RR 0,33; 95% IC 0,14-0,80)
RIESGO DE CÁNCER	Bauer, 2013 Metaanálisis	5206 casos 6450 controles	Relación inversa entre niveles de 25(OH)D y el riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas
	Albanes, 2011	1000 casos 1000 controles	Los hombres con niveles más altos de VD tienen un riesgo aumentado de desarrollar cáncer de próstata
	Ma, 2011 Metaanálisis	>1,000.000	RR combinado de cáncer colorrectal 0,88 (95% IC 0,80-0,96) en los intervalos superiores de [25(OH)D] frente a 0,67 (95% IC 0,54-0,80) en los inferiores (Efecto protector)
DISMINUCIÓN DEL RIESGO METABÓLICO	Anderson, 2010 IHC Study	41504	Los niveles de 25(OH)D < 15 ng/ml se asociaron a mayor prevalencia de DM tipo II, HTA, dislipemias y enfermedad vascular periférica
	Chiu, 2004	126	Correlación independiente positiva entre la [25(OH)D] y el ISI (p = 0,0007)
DISMINUCIÓN DEL RIESGO CARDIOVASCULAR	Pilz, 2008 LURIC Study	3316	Valores bajos de 25(OH)D y 1,25(OH) ₂ VD fueron predictores independientes de ACV
	Giovannucci, 2008	18225 hombres	Aumento del riesgo de sufrir IAM de los deficientes en VD (<15ng/ml) frente a los suficientes (<30ng/ml) (RR 2,42; IC 95% 1,53-3,84; p < 0,001)
	Forman, 2007	613 hombres 1198 mujeres	Valores deficientes de 25(OH)D aumentan el RR multivariable de HTA incidental en ambos sexos (6,13 en hombres y 2,67 en mujeres)

EM: esclerosis múltiple; RR: riesgo relativo; IC: intervalo de confianza; ISI: índice de sensibilidad a la insulina; HTA: hipertensión arterial; ACV: accidente cerebrovascular; IAM: infarto agudo de miocardio

1.4.2 PREVALENCIA DEL DÉFICIT DE VD Y GRUPOS DE RIESGO

La prevalencia del déficit de VD en una población viene determinada por aquellos factores que limitan la exposición solar (latitud, pigmentación razones socioculturales, etc.) y/o el acceso a los alimentos ricos en VD, así como por la existencia de determinadas enfermedades o tratamientos farmacológicos que interfieren en su absorción y/o metabolismo.

Hay una gran dispersión en los datos sobre la prevalencia de deficiencia de VD en la población europea de todas las edades. Recientemente, un amplio grupo de investigadores europeos han utilizado una metodología validada a partir de la cromatografía líquida asociada a un tándem en

masas para analizar por segunda vez los sueros de pacientes de 18 estudios europeos, nacionales o regionales, sobre niveles de calcidiol (únicamente en uno de ellos se incluían sujetos españoles) y comparar los resultados con los obtenidos en el estudio inicial (Cashman, 2016). Para la consideración de deficiencia, los autores escogieron un punto de corte de 30 nmol/L (12 ng/ml), según el criterio del Instituto de Medicina Norteamericano. Al reanalizar las muestras con esta metodología uniforme, las tasas de prevalencia variaron respecto a los resultados iniciales: en algún estudio hacía una mayor prevalencia y en otros en sentido contrario. En los resultados globales, de los 55.844 sujetos (jóvenes y adultos), un 13% presentaba cifras de 25(OH)VD <30 nmol/L, pero los porcentajes variaron en función de la época del año: el 17,7% en los realizados en invierno y el 8,2% en verano. No se encontraron diferencias en función del sexo. En cuanto a la edad, los adolescentes tenían un riesgo de deficiencia mayor que en las edades infantiles (el 12-40% en adolescentes, el 4-7% en niños de 1-6 años y el 1-8% en los de 7-14 años). La prevalencia era muy variable según los países: mayor en los más meridionales (5-20%) que en los del sur de Europa (4,2-6,9%). También el color de la piel era determinante: el riesgo de padecer deficiencia era entre 3 y 71 veces superior en las poblaciones de piel oscura.

Los datos de prevalencia de déficit de VD en España en población sana son muy variables, con valores reportados entre el 17 y el 63% (Rodríguez, 2010; Calatayud 2009; Mata-Granados, 2008) dependiendo de la edad, época del año y características de la población estudiada. Existen determinados grupos de riesgo (inmigrantes, personas de edad avanzada, etc.) en los que la prevalencia puede ser aún mayor y que, por lo tanto, deben ser analizados por separado. Nos centraremos en el caso de las mujeres embarazadas y lactantes, por ser objeto del presente estudio.

1.4.2.1 EMBARAZADAS

Se estima que la prevalencia del déficit de VD durante el embarazo es elevada, con cifras que oscilan entre el 18-84%, dependiendo del país de residencia y de diferentes aspectos socioculturales (Dawodu, 2007; van der Meer, 2006). En nuestro país, los valores maternos de VD han sido estudiados como parte del proyecto INMA (Infancia y Medio Ambiente), un estudio prospectivo de cohortes poblacional que incluye 1.643 embarazadas y recién nacidos de diferentes zonas geográficas (Morales, 2015). El valor medio de 25(OH)VD fue de $29,1 \pm 7,4$ ng/ml, con más del 19% y del 33% de determinaciones inferiores a 20 ng/ml o 30 ng/ml

respectivamente. En nuestro centro, en un estudio descriptivo previo llevado a cabo durante el mes de marzo de 2012, el 53% de las embarazadas presentó niveles de 25(OH)VD deficientes (<20 ng/ml) en el momento del parto. Asimismo, se observó una correlación positiva y significativa ($r = 0,83$; $p < 0,001$) entre los niveles maternos medios de 25(OH)VD durante el tercer trimestre de gestación ($19,5 \pm 7,6$ ng/ml) y los valores en el recién nacido en sangre del cordón ($19,9 \pm 9,3$ ng/ml).

1.4.2.2 LACTANTES

Los lactantes, y especialmente aquellos amamantados al pecho, han sido considerados clásicamente un grupo de riesgo para presentar déficit de VD. En España, los datos más recientes sobre niveles de 25(OH)VD en este subgrupo son los aportados por el trabajo de Alonso A y cols. del año 2011 en una población asturiana de lactantes sanos en función de si recibieron o no profilaxis con VD (402 UI/día). En el grupo de los no tratados, los valores medios de calcidiol fueron de $27,6 \pm 12,8$ ng/ml a los 3 meses y de $32,5 \pm 8,9$ ng/ml a los 6 meses, significativamente inferiores a los del grupo con profilaxis, aunque estas diferencias se igualaron a partir de los 12 meses. De los 88 lactantes incluidos en el estudio, 5 (5,6%) presentaron déficit severo (<11ng/ml). Estos valores medios son ligeramente superiores a los del estudio de Cabezuelo del año 2007 que, en una muestra de 60 lactantes entre 1-6 meses, reportó valores medios de calcidiol de 18,4 ng/ml en el grupo de lactancia materna y de 22,7 ng/ml en el grupo de alimentación artificial y una prevalencia de 8,3% de lactantes con déficit severo (<10ng/ml).

1.4.3 EFECTOS ESQUELÉTICOS Y SOBRE EL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO DEL DÉFICIT DE VD

La interacción de la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ con el VDR intestinal incrementa la eficiencia de la absorción intestinal de calcio en un 30-40% y hasta cerca del 80% en el caso del fósforo (Heaney, 2003b) y en ausencia de esta vitamina solo se absorbe el 10-15% del calcio de la dieta y el 60% del fósforo (Holick, 2006; DeLuca, 2004). La tendencia a la hipocalcemia que se produce cuando los niveles séricos de calcidiol descienden por debajo de los 20 ng/ml genera un aumento de la PTH que estimula la reabsorción tubular de calcio y activa la producción renal de $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ (Quesada,

2000). Asimismo, el hiperparatiroidismo compensador induce la transformación de preosteoclastos en osteoclastos maduros que disuelven la matriz de colágeno mineralizada de los huesos (Bouillon, 2010; Holick, 2007a), lo que favorece la liberación del calcio óseo, pero provoca osteoporosis e incrementa el riesgo de fracturas (Boonen, 2006; Holick, 2006). A su vez, la PTH ocasiona la internalización y subsiguiente degradación de la proteína cotransportadora de fósforo dependiente de sodio (NaPi-2a y NaPi-2c) en los túbulos renales proximales, lo que ocasiona hiperfosfaturia y da lugar a unos valores normales-bajos de fósforo sérico. De hecho, se considera que la hipofosfatemia es uno de los principales estimuladores de la síntesis de calcitriol mediante la estimulación de la expresión de la 1α -hidroxilasa renal (Shimada, 2004).

La ausencia de un adecuado producto calcio*fósforo condiciona una disminución de la mineralización de la matriz de colágeno que dará lugar a los signos clásicos de raquitismo en niños (Pettifor, 2011) y osteomalacia en adultos (Holick, 2006). Esta segunda se ha asociado a dolor óseo aislado o generalizado, como consecuencia de la hidratación de la matriz desmineralizada por debajo del periostio, empujándolo hacia fuera y ocasionando dolor pulsátil.

Diversos trabajos han demostrado la asociación directa que existe entre los valores de 25(OH)VD y la DMO (Bischoff-Ferrari, 2004), así como con la incidencia de caídas y fracturas relacionadas con la edad tanto en mujeres como en hombres adultos de diferentes etnias y rangos de edad (Bischoff-Ferrari, 2009; Bischoff-Ferrari, 2012b). Durante la edad pediátrica, en cambio, la relación de causalidad no está tan bien establecida. En una amplia revisión sistemática publicada por Cranney en el año 2008 se analizaron diversos estudios que valoraban la relación entre los niveles de 25(OH)VD y la incidencia de raquitismo y/o mineralización (CMO/DMO) y, en ambos casos, la evidencia de asociación fue considerada insuficiente.

1.5 IMPLICACIONES DEL DÉFICIT DE VD DURANTE EL EMBARAZO

Aunque el papel y el metabolismo de la VD durante el embarazo no está del todo establecido, son diversas las publicaciones que apuntan hacia una posible relación entre el déficit de VD y múltiples potenciales efectos adversos gestacionales.

1.5.1 COMPLICACIONES CALCÉMICAS Y ESQUELÉTICAS

Existe controversia con relación al efecto del déficit materno de VD y el desarrollo esquelético del feto. Estudios en animales y algunos datos obtenidos en humanos sugieren que la mineralización del esqueleto fetal es independiente de la VD y que, por lo tanto, el déficit materno de colecalciferol tiene escaso efecto sobre su desarrollo (Kovacs, 2008). Entre ellos, cabe destacar los llevados a cabo en ratones con ausencia del receptor de la VD (*VDR-null*), que son fenotípicamente normales al nacimiento y que sólo se desarrollan hipocalcemia, hiperparatiroidismo y signos radiológicos de deformidades óseas tras el destete (Kovacs 2005; Erben, 2002) (Figura 26). En este mismo sentido, el estudio del cuadro de raquitismo por pseudodéficit de VD, una rara entidad autosómica recesiva ocasionada por la mutación en el gen de la 1α -hidroxilasa (CYP27B1) que impide la síntesis de calcitriol, ha mostrado ausencia de signos de hipocalcemia o raquitismo esquelético en los recién nacidos homocigotos afectados, que sí los desarrollarán con posterioridad, apuntando a que la placenta es capaz de proporcionar calcio al feto con independencia de los metabolitos de la VD (Glorieux, 2014).

En contraposición, algunos estudios recientes observacionales sugieren que los niveles maternos de VD durante el embarazo pueden influir sobre desarrollo óseo fetal. En un estudio llevado a cabo en el Reino Unido mediante ecografía tridimensional de alta resolución, se demostró un ensanchamiento del área metafisaria distal femoral del feto cuando los niveles maternos de 25(OH)VD eran inferiores a 20 ng/ml (Mahon, 2010), efecto que se asemeja al aspecto radiológico del raquitismo por déficit de VD. De forma parecida, un estudio finlandés del año 2010 (Viljakainen, 2010) mostró que el contenido mineral óseo y el área de sección transversal a nivel de la tibia distal de los recién nacidos era mayor cuando las concentraciones séricas maternas de 25(OH)VD durante el primer trimestre eran superiores a la media (21,8 ng/ml), aunque no se encontraron diferencias significativas en la DMO.

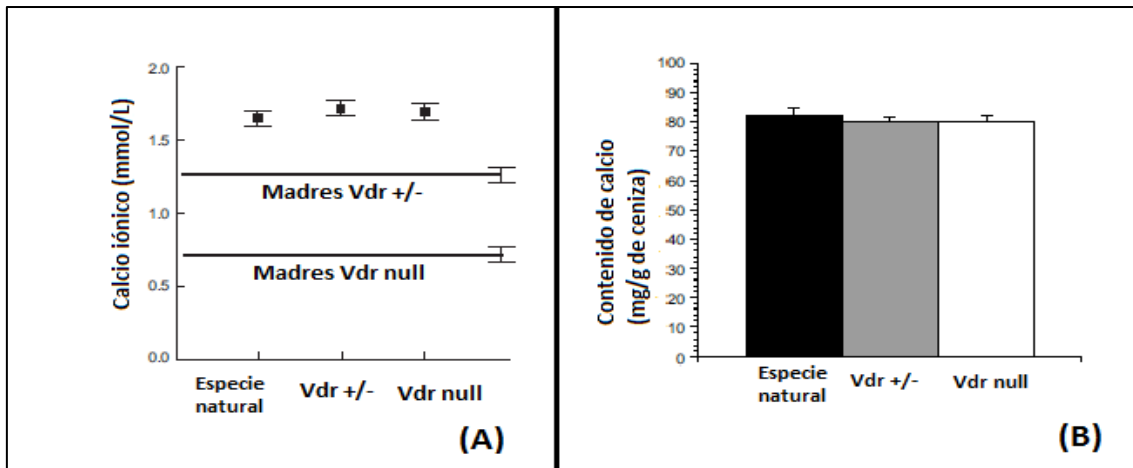


Figura 26. (A) Niveles de calcio iónico fetos de madres $Vdr^{+/-}$ y Vdr^{null} (media \pm DE). Se demuestra que la hipocalcemia de las madres Vdr^{null} no afecta al nivel de calcio iónico fetal. **(B)** Contenido de calcio (por espectroscopia atómica de absorción) de los fetos Vdr^{null} en comparación con sus compañeros de camada sanos y $Vdr^{+/-}$. Como puede observarse no existían diferencias a pesar de la hipocalcemia materna. Tomado de Kovacs CS ⁽²⁷⁸⁾.

La Tabla 20 resume los principales estudios observacionales llevados a cabo en embarazadas con el fin de establecer las consecuencias del déficit materno de VD sobre la mineralización del esqueleto fetal. Tomados de forma conjunta, los resultados de los estudios sugieren una posible relación entre los niveles maternos bajos de 25(OH)VD durante el embarazo y el desarrollo óseo fetal, aunque la asociación con una disminución de la masa ósea neonatal no ha podido ser probada, requiriéndose ensayos clínicos controlados aleatorizados con un mayor tamaño muestral para establecer el efecto de la suplementación materna con VD sobre el desarrollo óseo fetal.

Tabla 20. Resumen de trabajos que estudian los niveles maternos VD en relación con el grado de mineralización del esqueleto valorada en el feto o en el recién nacido durante los primeros días de vida.

Referencia	N	Metabolito de Vitamina D estudiado	Variable de mineralización	Resultado
Brooke, 1980	126	• [25(OH)VD] sangre de cordón <10nmol/L	• Radiografía simple de rodilla • Marcadores bioquímicos	• Ausencia de signos radiológicos de raquitismo • Elevación FA
Specker, 1992	256	• [25(OH)VD] sangre de cordón en dos regiones de China	• Radiografía simple de muñeca	• Menor presencia de centros de osificación en la región del norte
Namgung, 1998	71	• Variación estacional en la [25(OH)VD] sangre de cordón	• CMO corporal total estudiado por DEXA • Marcador bioquímico de resorción ósea (ICTP)	• Niveles significativamente menores de CMO y mayores de ICTP en invierno
Morley, 2006	374	• Niveles maternos 25(OH)VD semana 28-30 de gestación	• Longitud recién nacido • Distancia talón-rodilla	• Significativamente menores en hijos de madres deficitarias
Weiler, 2008	50	• Niveles maternos 25(OH)VD	• DEXA corporal total, lumbar y femoral	• No diferencias en el CMO
Dijkstra, 2007	87	• Niveles maternos y en sangre cordón 25(OH)VD	• Valores de calcio, fósforo, PTH FA en sangre cordón	• Elevación valores medios de FA en el grupo deficitario
Mahon, 2010	424	• Niveles maternos 25(OH)VD	• Estructura tridimensional del fémur fetal estudiada mediante ultrasonografía	• Asociación entre [25(OH)VD] y el área metafisaria distal en la sección transversal
Viljakainen, 2011	87	• Niveles maternos de 25(OH)VD	• pQTC y área de sección transversal en tibia distal	• Mayor CMO y área de sección transversal en RN de madres con 25(OH)VD superiores a la media sin diferencias DMO
Dror, 2012	80	• Niveles maternos y en sangre cordón 25(OH)VD	• DEXA corporal total recién nacidos	• No asociación entre los niveles de 25(OH)VD y el grado de mineralización

FA: Fosfatasa alcalina; CMO: Contenido mineral óseo; DEXA: absorciometría dual de rayos X; ICTP: Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I; pQTC: Tomografía computarizada cuantitativa axial; DMO: Densidad mineral ósea

1.5.2 CRECIMIENTO FETAL

Clásicamente, el déficit de VD ha sido relacionado con una mayor incidencia de retraso de crecimiento intrauterino (Brooke, 1980), lo que se ha argüido como una de las razones de la mayor prevalencia de bajo peso para la edad gestacional en poblaciones no caucásicas (Leffelaar, 2010). No obstante, publicaciones recientes de nuestro entorno, han establecido una posible correlación entre el déficit materno de 25(OH)VD (<20ng/ml) y la incidencia de sobrepeso fetal (OR = 1,50; 95% IC 1,01-2,21; p = 0,041 para para circunferencia abdominal \geq

percentil 90 o OR = 1,47; 95% IC 1,00-2,16; p = 0,046 para peso fetal estimado \geq percentil 90) (Morales, 2015).

1.5.3 PREECLAMPSIA

Aunque la evidencia científica con relación al estado de VD y el riesgo de preeclampsia aporta datos contradictorios, los estudios más recientes apuntan a que los niveles adecuados de 25(OH)VD (≥ 20 ng/ml) antes de la semana 26 de gestación actúan como factor protector para el desarrollo de las formas más severas de este cuadro (RR ajustado 0,65; 95% IC 0,43-0,98) (Bodnar, 2014).

1.5.4 DIABETES GESTACIONAL

La diabetes gestacional (DG) es el resultado de una resistencia a la insulina inducida por el embarazo y compensada mediante un aumento en su secreción. La VD mejora la respuesta del transportador celular de glucosa a la insulina, de forma que se ha demostrado una mayor prevalencia de déficit severo de VD en mujeres con DG (Bener, 2013). En un metaanálisis del año 2008, Clifton-Bligh y McElduff concluyeron que las mujeres embarazadas con DG poseían niveles significativamente inferiores de 25(OH)VD.

Con todo, y a pesar de la reciente avalancha de publicaciones relacionadas con la VD, aún queda por establecer el riesgo real que supone el déficit de VD durante el embarazo. Pero, además, se da la circunstancia de que durante el embarazo y en la edad pediátrica concurren una serie de circunstancias que dificultan aún más si cabe la identificación de un nivel que defina el estado de suficiencia, dado que:

- No se pueden definir umbrales precisos de 25(OH)VD que mejoren la salud ósea en los distintos grupos de edad pediátricos (Alonso MA, 2015) ni un nivel de 25(OH)VD por encima del cuál, el raquitismo no ocurra (Braegger, 2013; Greer, 2009).
- La relación entre los niveles de 25(OH)VD y PTH está sometida a una gran variabilidad individual que hace difícil establecer un único punto de inflexión que defina la deficiencia de VD. De hecho,

la correlación inversa entre los niveles de 25(OH)VD y PTH no ha podido ser demostrada en lactantes y niños (Alonso A, 2011; Cranney, 2007).

- Ausencia de estudios pediátricos que avalen los efectos fisiológicos que la VD ha demostrado en adultos (optimización de la absorción de calcio, incremento del CMO y la DMO y disminución del riesgo de fracturas) (Cranney, 2008).

- Modificaciones en la síntesis proteica durante el embarazo, con un incremento de los valores de VDBP, aunque sin variación aparente en los niveles de 25(OH)VD (total y libre) (Schwartz JB, 2014), justificada por una aparente menor afinidad de unión a la proteína.

A pesar de todo, sí que se ha alcanzado consenso sobre la necesidad de suplementación con VD a todos los lactantes durante el primer año de vida, pero aún queda por determinar si se debe o no recomendar la suplementación en las mujeres embarazadas y si esta aparente pandemia de déficit de VD durante el embarazo representa un “riesgo real” para la salud ósea del binomio madre-recién nacido.

2 HIPOTESIS DE TRABAJO

Verificar que existe asociación entre el déficit de VD materno durante el embarazo y el grado de mineralización ósea en el recién nacido. La principal función de la VD es regular los niveles de calcio y fósforo en sangre y favorecer su depósito en los huesos, por lo que resulta esencial para el desarrollo del esqueleto. El desarrollo y mineralización del esqueleto fetal es un proceso secuencial complejo fuertemente condicionado por el adecuado paso transplacentario de minerales. Dado que los niveles de VD del feto dependen de los maternos, el déficit de VD durante el embarazo puede altera este proceso y que los hijos de madres con hipovitaminosis D muestren un menor grado de mineralización esquelética.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal de este proyecto es conocer si existe relación entre los niveles de 25(OH)VD de las mujeres embarazadas y la DMO de sus recién nacidos.

3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Describir la prevalencia del déficit de VD en las gestantes de nuestra área e identificar los diferentes factores demográficos (edad, etnia, dieta, etc.) y ambientales (estacionalidad, exposición solar, actividad física, dieta, etc.) que pueden modificar sus niveles
- Establecer la relación que existe entre los niveles de calcidiol de la madre y del recién nacido, así como de otros marcadores bioquímicos implicados en la mineralización ósea (PTH, fosfatasa alcalina, calcio y fósforo)
- Describir los principales cambios que se producen en los recién nacidos durante las primeras horas de vida en los indicadores analíticos bioquímicos y hormonales implicados en la homeostasis mineral
- Obtener valores de DMO a nivel lumbar (L1-L4) en una población de recién nacidos sanos
- Establecer si existe correlación entre la valoración ecográfica ósea fetal y el ulterior estudio de la DMO neonatal
- Estudiar qué factores pueden influir en el grado de mineralización del esqueleto fetal

4 PACIENTES Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional descriptivo y analítico prospectivo. Ha sido realizado en el Servicio de Pediatría del Hospital Universitario de La Ribera (Alzira), perteneciente al Departamento de Salud 11 de la Comunidad Valenciana. El estudio fue aprobado por la Comisión de Investigación del Hospital.

4.2 POBLACIÓN

La población que representa la muestra de estudio la formaron las embarazadas del primer trimestre del Departamento de Salud, reclutadas de forma aleatoria desde alguno de los 8 Centros de Salud colaboradores durante los meses de enero a diciembre del 2014.

Dado que no encontramos en la literatura científica sobre el tema de estudio trabajos similares, consideramos dos escenarios basados en asociaciones con variables vinculadas al desarrollo mineral óseo. El tamaño muestral estimado se situó entre ambos escenarios, asumiendo, además, un 20 % de pérdidas.

- Basándonos en el estudio de Leffelaar del año 2010 con respecto a la diferencia observada en la edad gestacional y los niveles de VD de las madres, se necesitarían 200 madres y niños considerando una potencia del 80% y una precisión de 0,05%.

- Basándonos en el estudio de Hashemipour del año 2013 sobre los niveles de VD en madres y en niños con medias de 25(OH)VD de 19,5 ng/ml y 14,8 ng/ml respectivamente, y DE correspondientes de 7,6 ng/ml y 9,2 ng/ml, haría falta estudiar 74 madres y niños considerando una potencia del 90% y una precisión de 0,05%.

Así pues, y teniendo en cuenta las posibles pérdidas potenciales (abortos espontáneos, pérdidas de seguimiento, prematuridad, etc.) nos propusimos alcanzar un tamaño muestral de 120 parejas de madres y recién nacidos durante un periodo de 1 año.

4.2.1 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Mujeres con una edad inferior a los 16 años en el momento del parto
- Embarazos gemelares
- Edad gestacional inferior a 37 semanas
- Antecedente de cualquier enfermedad crónica que pueda causar alteraciones en el metabolismo fosfocálcico (enfermedad renal, hepática, paratiroidea o de malabsorción gastrointestinal)

4.2.2 CARACTERÍSTICAS GEOGRÁFICAS, SOCIODEMOGRÁFICAS Y CLIMATOLÓGICAS DEL DEPARTAMENTO 11

El departamento de Salud 11 (La Ribera) atiende a una población de 250.644 habitantes pertenecientes a 29 municipios de las comarcas de la Ribera Alta y de la Ribera Baixa de la provincia de Valencia. Está dividido en 11 zonas básicas de salud y su hospital de referencia (Hospital Universitario de La Ribera) está ubicado en Alzira, localidad situada 35 kilómetros al sur de Valencia y a 25 kilómetros de la costa y que se encuentra a 15-20 metros sobre el nivel del mar. El clima es de tipo mediterráneo, con temperaturas suaves a lo largo de todo el año. Se alcanzan unas 2.700 horas de sol anuales, con un índice máximo diario de radiación UVB de 0-1 durante los meses de invierno y 7-8 durante los de verano (<http://www.aemet.es/es/el tiempo/observacion/radiacion/ultravioleta>). La población de mujeres en edad fértil (entre 14 y 45 años) es de 48.849, registrándose un número de partos anuales entorno a los 1.800 (1.829 en el año 2013 y 1.866 en el año 2014). El porcentaje de inmigrantes en este subgrupo de población es del 10,6% y del 9,1% en las localidades de más o menos de 20.000 habitantes respectivamente, suponiendo las mujeres de origen árabe el 16,6% del total de inmigrantes según datos del INE del año 2011 (http://www.ine.es/inebmenu/mnu_cifraspob.htm).

4.3 MÉTODOS

4.3.1 ETAPAS DEL ESTUDIO

El estudio se inició en el mes de enero del 2014 y dividimos su realización en 5 etapas, tal y como aparece resumido en el cronograma de la Figura 27.

4.3.1.1 ETAPA 1: INCLUSIÓN DE MUJERES EMBARAZADAS

Se convocó a las matronas de los Centros de Salud del área a una reunión informativa sobre el estudio en las que se solicitaba su colaboración voluntaria. Finalmente, un total de 8 Centros de Salud participaron en el estudio. Las matronas ofrecían, a aquellas mujeres embarazadas que se encontraban en el primer trimestre de gestación, la posibilidad de ser incluidas en el estudio, remitiendo sus datos de contacto a alguno de los miembros del equipo de investigación que concertaba con ellas una primera entrevista. En ella, además de explicar verbalmente los detalles del estudio, se entregaba información por escrito a la embarazada (Anexo 1) y se obtenía el consentimiento firmado para participar en el estudio (Anexo 2). En la misma visita se cumplimentaba un cuestionario inicial sobre antecedentes obstétricos y otras variables demográficas (ver apartado 4.3.2.1). Después de obtener el consentimiento, los datos del paciente eran introducidos en la base de datos correspondiente, así como la información relativa al cuestionario inicial.

Debido a las variaciones estacionales en los niveles de VD (que se encuentran disminuidos tras los meses de invierno), se trató de alcanzar una distribución homogénea de reclutamiento de embarazadas en los diferentes meses del año, finalizando el periodo de inclusión el 31 de diciembre del 2014.

4.3.1.2 ETAPA 2: SEGUIMIENTO DURANTE EL EMBARAZO

Las madres incluidas en el estudio realizaban, a lo largo de la gestación, una serie de controles orientados a conocer los niveles de hormonas calciotropas y metabolitos vinculados a la

mineralización/resorción ósea, así como todos aquellos factores que pudieran modificarlos. Estos controles incluían:

- 1) Cumplimentación de cuestionarios en dos momentos diferentes del embarazo (semana 20-24 y a partir de la semana 34) con el fin de establecer hábitos nutricionales y de estilo de vida que pudieran estar relacionados con los niveles de 25(OH)VD. En concreto, las embarazadas cumplimentaban un registro de 3 días de consumo de alimentos (Anexo 3), un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) ricos en calcio y VD (Anexo 4) y una encuesta sobre estilo de vida que valoraba el grado de exposición solar, actividad física semanal y el consumo voluntario de algún tipo de suplemento que contuviese VD (Anexo 5).
- 2) Determinación analítica. Junto con la determinación analítica del segundo trimestre de embarazo (semana 23 a 26) se estudiaron los valores maternos de 25(OH)VD, PTH, Calcio, Fósforo, FA, Proteínas Totales y Albumina. Esta primera determinación analítica materna aparece recogida en el estudio como A1.
- 3) Estudio ecográfico. Durante la ecografía morfológica propia de la semana 20 y 34 de gestación, se realizaba la estimación mediante ecografía 3D de diferentes longitudes y áreas del fémur fetal relacionadas en estudios previos con el déficit materno de VD (Ioannou, 2012; Mahon, 2010).

4.3.1.3 ETAPA 3: PARTO Y PERIODO PERINATAL INMEDIATO

En el momento del parto, se obtenía una segunda muestra sanguínea de las embarazadas (A2) para la determinación de parámetros hormonales y bioquímicos relacionados con el metabolismo fosfocálcico (25(OH)VD, PTH, Calcio, Fósforo, FA, Proteínas Totales y Albúmina). Estos mismos parámetros se estudiaban en la sangre del cordón obtenida mediante punción venosa de la porción fetal (2ml) y posteriormente de nuevo a las 48-72 horas de vida aprovechando la extracción sanguínea para la realización del despistaje de metabopatías de la Comunitat Valenciana o prueba del talón (la determinación analítica tras el nacimiento se identifica en el estudio como analítica del recién nacido). Asimismo, durante el ingreso en Sala de Maternidad, se recopilaban los datos antropométricos del recién nacido y las variables propias del parto y periodo perinatal.

4.3.1.4 ETAPA 4: PERIODO POSTNATAL. REALIZACIÓN DE DENSITOMETRÍAS

Tras el nacimiento y antes de los 15 días de vida, se realizaba una densitometría de columna lumbar a los recién nacidos participantes del estudio con el objetivo de documentar, mediante en contenido mineral óseo (CMO en g) y la densidad mineral ósea (DMO en g/cm²) el grado de mineralización del esqueleto fetal.

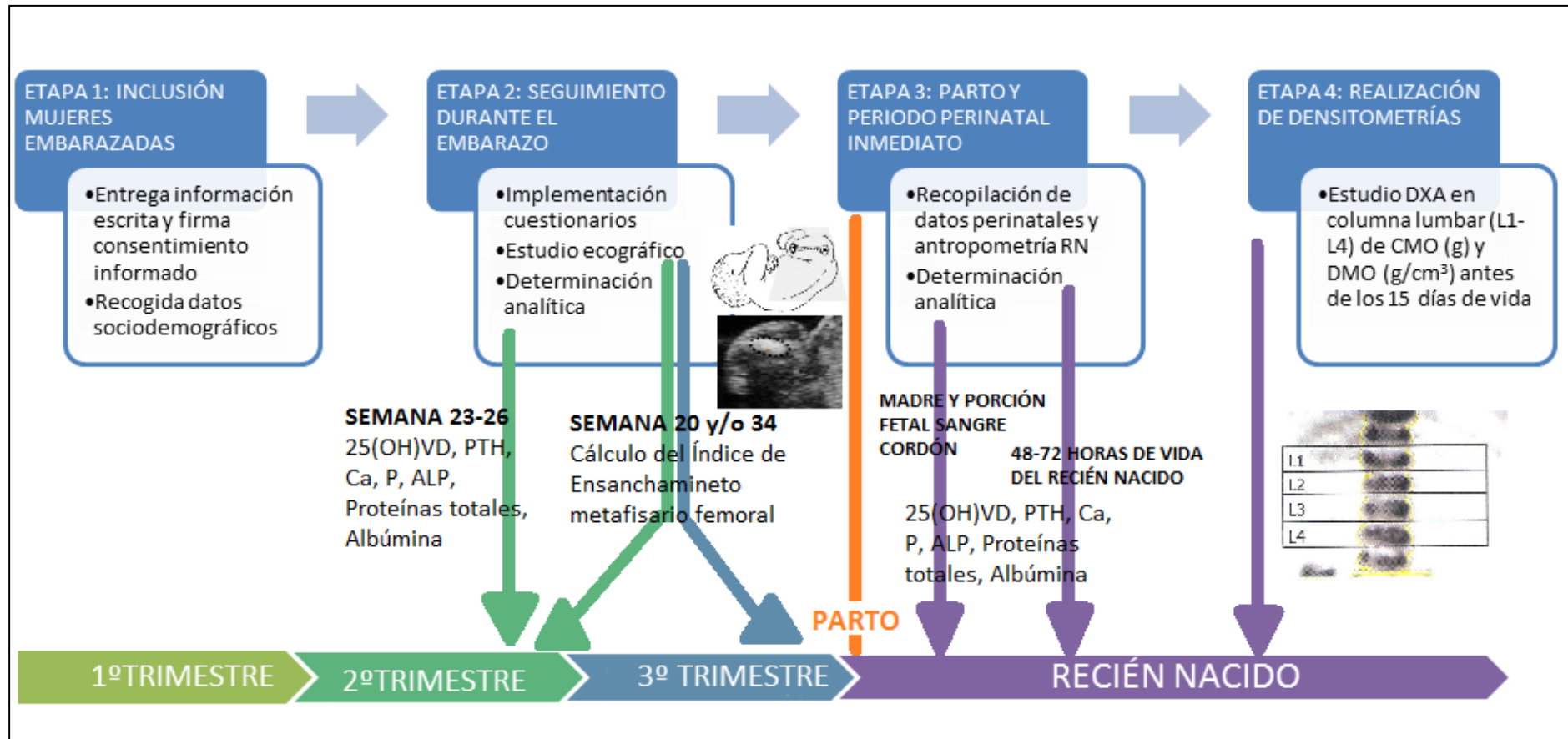


Figura 27. Cronograma de las etapas de realización del estudio

4.3.2 VARIABLES A ESTUDIO

4.3.2.1 CUESTIONARIO INICIAL

- Factores obstétricos (fecha de última regla, número de gestaciones, paridad, tipo de gestación, toma previa de anticonceptivos orales)
- Factores físicos (edad de la madre, peso y talla, fototipo cutáneo)
- Factores sociales (nivel de estudios, etnia, hábito tabáquico)

4.3.2.2 VARIABLES REGISTRADAS DURANTE EL EMBARAZO

- Parámetros analíticos maternos vinculados al metabolismo óseo (calcio, fósforo, FA, proteínas totales, albúmina, 25(OH)VD, PTH)
- Aporte dietético de calcio y VD
- Ingesta de suplementos de VD
- Hábitos de vida (exposición solar y ejercicio físico)

4.3.2.3 VARIABLES REGISTRADAS EN EL MOMENTO DEL PARTO

- Variables obstétricas (inicio de parto, tipo de parto, anestesia, horas de bolsa rota, empleo de antibióticos)
- Variables perinatales (edad gestacional, sexo, somatometría, puntuación de Apgar al minuto y cinco minutos de vida, pH arterial de sangre de cordón, tipo de alimentación del recién nacido)
- Parámetros analíticos maternos y fetales vinculados al metabolismo óseo (calcio, fósforo, FA, proteínas totales, albúmina, 25(OH)VD, PTH)
- Parámetros de mineralización ósea (absorción dual de rayos X (DXA) en columna lumbar para el cálculo del CMO y DMO)

4.3.3 INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN

4.3.3.1 ESTUDIO ANTROPOMÉTRICO

Las medidas antropométricas maternas se obtuvieron de los datos registrados en la cartilla de seguimiento del embarazo tras el primer examen físico realizado por las matronas a las gestantes incluidas en el estudio, siguiendo una metodología y un utillaje estandarizado. Se realizaron las medidas de:

- Talla. La altura se medía con un tallímetro (precisión 1 cm) estando el individuo descalzo y con los talones juntos. La cabeza debía estar en posición horizontal, en el llamado “Plano de Frankfurt”. El sujeto debía alcanzar la altura máxima con las piernas juntas y la planta del pie apoyada en el suelo.
- Peso. El peso se medía con una báscula (precisión 100 g) estando el sujeto descalzo. El índice de masa corporal (IMC) se obtuvo mediante la relación:

$$\text{IMC} = \text{peso (kg)} / (\text{talla (m)})^2$$

Todas las mediciones fueron obtenidas antes de las 12 semanas de gestación (media $7,3 \pm 2,3$ semanas) de manera que los datos obtenidos pretenden ser una aproximación de la composición corporal previa al embarazo minimizando el error que supone tomar como referencia los datos de peso y talla pregestacional reportados por las propias participantes.

4.3.3.2 FOTOTIPO CUTÁNEO

El fototipo cutáneo se tipificaba mediante la Escala de Fitzpatrick que es un esquema de clasificación numérico que tiene como objetivo clasificar los diferentes tipos de piel en función de su respuesta a la radiación UV y que combina el color básico de la piel (pigmentación melánica constitutiva) y la estimación que hace la propia persona de su capacidad para el bronceado y su sensibilidad para el eritema solar (Fitzpatrick, 1988) (Figura 28).

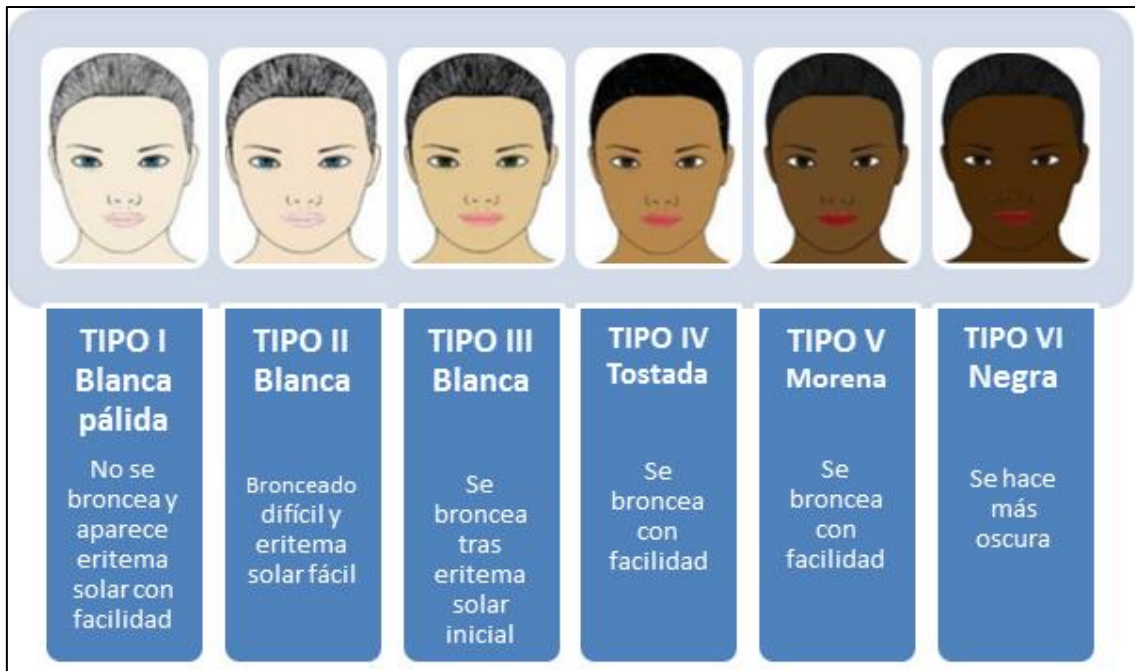


Figura 28. Fototipos cutáneos según escala de Fitzpatrick

4.3.3.3 MEDIDA DE LA EXPOSICIÓN SOLAR

La medida de la exposición solar se realizaba determinando el tiempo (minutos) referidos de exposición solar diaria y las regiones corporales expuestas (cara, manos y antebrazos, piernas). Atendiendo a las recomendaciones publicadas por Holick en el año 2001, se consideraban suficientes aquellas exposiciones equivalentes o superiores a 20 minutos diarios de 2 o más regiones corporales distintas.

4.3.3.4 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD FÍSICA

Para evaluar la actividad física realizada se contabilizaban el número de horas semanales dedicadas de forma reglada a cualquier tipo de ejercicio físico, La actividad física se catalogó como ausente, ligera (menor a 3 horas semanales), moderada (entre 3 y 6 horas semanales) o intensa (mayor de 6 horas semanales).

4.3.3.5 ANÁLISIS DE LABORATORIO

Se realizaban dos extracciones sanguíneas en las madres (A1 durante el segundo trimestre de embarazo y A2 en el momento del parto) y dos extracciones en los niños (sangre de cordón y analítica del recién nacido obtenida entre las 36 y 72 horas de vida).

Cada una de las muestras eran procesadas por el analizador Advia® Centauro XP (*Siemens Healthcare Diagnostics*®) que emplea técnicas de quimioluminiscencia para la cuantificación de 25(OH)VD y PTH. La determinación de 25(OH)VD se realizó mediante el ensayo *ADVIA Centaur Vitamin D total*, que es un inmunoensayo competitivo de anticuerpos de un solo paso que utiliza un anticuerpo monoclonal de ratón anti-fluoresceína unido de forma covalente a partículas paramagnéticas (PMP), un anticuerpo monoclonal de ratón anti-25(OH)VD marcado con éster de acridinio (AE) y un análogo de la VD marcado con fluoresceína. Existe una relación inversa entre la cantidad de VD presente en la muestra del paciente y la cantidad de unidades relativas de luz (RLUs) detectadas por el sistema. El ensayo *ADVIA Centaur Vitamin D Total* mide la 25(OH)VD en concentraciones de 3,7 a 150 ng/ml y proporciona una medición total equimolar de los derivados tanto del ergocalciferol (D₂) como del colecalciferol (D₃). La sensibilidad funcional del ensayo es de 3,3 ng/ml. La especificidad analítica reflejada a través del porcentaje de reactividad cruzada con otros metabolitos es de 97% para 25(OH)D₃, 106% para 25(OH)D₂ y 1% para el epímero C3 de 25(OH)D₃. En el ensayo *PTH intacta de ADVIA Centaur* es un inmunoensayo tipo sándwich de dos puntos que utiliza tecnología quimioluminométrica directa, empleando cantidades constantes de dos anticuerpos anti-PTH humana en el reactivo lumínico: un anticuerpo policlonal de cabra anti-PTH humana (N-terminal 1-34) marcado con AE y un anticuerpo policlonal de cabra biotinilado anti-PTH humana (región 39-84). Este ensayo mide concentraciones de PTH intacta de hasta 1900 pg/ml, con una concentración mínima detectable (sensibilidad analítica) de 2,5 pg/ml.

El resto de los metabolitos se determinaron en el analizador bioquímico integrado *ADVIA® Chemistry XPT System* (*Siemens Healthcare Diagnostics*®). El ensayo para calcio ADVIA con reactivo concentrado se basa en el trabajo de Michaylova y Kouleva que descubrieron que, a pH alcalino, el calcio reacciona con arsenazo III dando un complejo de color azul que se mide fotocolorimétricamente a 658/694 nm. La cantidad de calcio presente en la muestra es directamente proporcional a la intensidad del complejo coloreado que se forma. Este método es lineal entre 0,5 y 16,0 mg/dl para suero y plasma. La medición de fósforo inorgánico está

basada en el procedimiento de Daly y Ertinghausen, en el que el fósforo inorgánico reacciona con el molibdato amónico en presencia de ácido sulfúrico para formar un complejo de fosfomolibdato no reducido que absorbe la radiación ultravioleta y que se mide con un espectrofotómetro a 340/658 nm como reacción de punto final. Este método es lineal entre 0,3 mg/dl y 20 mg/dl.

Los valores séricos de proteínas totales se obtuvieron mediante el *método ADVIA Chemistry Total Protein II* que emplea el reactivo biuret concentrado (sulfato cúprico en una solución alcalina) (Schweer, 1957). Los enlaces peptídicos de las proteínas interactúan con los iones de cobre del reactivo y forman un complejo morado que se mide a 545 nm como reacción de punto final. Este método es lineal entre 2,0 y 12,0 g/dl para suero y plasma. La determinación de albúmina de Siemens utiliza una solución de verde de bromocresol (BCG) como reactivo de unión (Doumas, 1971). La albúmina presente en el suero o el plasma se une cuantitativamente al BCG para formar un complejo de albúmina-BCG que se mide a 596/694 nm como una reacción de punto final. Este método es lineal entre 1–6 g/dl para suero y plasma.

En el caso de la fosfatasa alcalina, la determinación de Siemens está basada en su capacidad para hidrolizar el sustrato fosfo-nitrofenil fosfato (pNPP) y formar fosfo-nitrofenol (Tietz, 1983). La medición colorimétrica de la velocidad de formación de fosfo-nitrofenol a 410/478 nm es proporcional a la actividad de la fosfatasa alcalina. Se utiliza un tampón de 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) para mantener el pH de la reacción entre 10,3-10,4 y se añaden iones de magnesio y cinc al tampón AMP para activar y estabilizar la enzima. Este método es lineal entre 5 y 1100 UI/L para suero y plasma.

4.3.3.6 ESTUDIO DIETÉTICO

El estudio dietético se basó en la cumplimentación de un registro de 3 días de consumo de alimentos (Anexo 3) y un cuestionario estandarizado de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) con elevado contenido en VD y calcio (Anexo 4).

4.3.3.6.1 Registro de 3 días

Las propias encuestadas, previamente instruidas, anotaban todos los alimentos y bebidas ingeridos, día a día, dentro y fuera del hogar, empleando medidas de peso, siempre y cuando

fuese posible, o medidas caseras. Se solicitó cumplimentar 2 días laborables y un festivo en cada registro. La clasificación y el estudio de la composición de macro y micronutrientes de los diferentes alimentos y bebidas para estimar el aporte medio de calcio y VD se realizó trasladando los datos aportados en los registros al programa informático Dietsource (1.2).

4.3.3.6.2 Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA)

Se elaboró una lista de alimentos con el propósito de estimar la ingesta de VD y calcio en la que se incluyeron los alimentos que contribuyen al 95% de la ingesta de VD y al 75% en el caso del calcio de los españoles (Andersen, 2005), teniendo también en cuenta los alimentos enriquecidos o fortificados. Los tamaños de las porciones fueron estimados mediante el peso medio, volumen y cuando esto no fue posible se emplearon medidas caseras. Se recogía la frecuencia diaria, semanal o mensual de consumo habitual de cada una de las raciones. Los grupos de alimentos incluidos en el cuestionario fueron: leche y derivados lácteos (2 tipos), cereales (3 tipos), frutas y hortalizas (10 tipos), pescados (11 tipos), carnes (2 tipos) y otros productos (incluyendo huevos, frutos secos y platos preparados).

4.3.3.7 ESTUDIO ECOGRÁFICO

Las mediciones ecográficas se realizaron durante las visitas obstétricas rutinarias programadas de la semana 20 y 34 de embarazo por personal médico obstétrico especializado. Se empleó el ecógrafo *Voluson E8 de General Electrics®*, que cuenta con un módulo de imágenes en 3D que permite la reconstrucción volumétrica de estructuras óseas para el cálculo de áreas seccionales. La duración de la gestación era calculada en base a la fecha de última regla (FUR) o, cuando ésta era incierta o discrepaba de las mediciones ecográficas, a la antropometría fetal en las fases iniciales del embarazo.

Se obtuvo una medición estándar de la longitud del fémur (LF), así como del área metafisaria distal (AMD) femoral en la sección transversal, ya empleada en estudios ecográficos previos por exhibir mayor evidencia de ensanchamiento en situaciones de hipovitaminosis que las áreas de la sección transversa del extremo proximal o de la diáfisis media (Mahon, 2010). A partir de estos parámetros se calculó el llamado *índice de ensanchamiento femoral* [área metafisaria distal (cm²) / longitud femoral (cm)].

Asimismo, también se empleó la medición de tres medidas ecográficas lineales – longitud femoral (LF), diámetro metafisario proximal (DMP) y diámetro femoral medio (DFM)- para estimar el volumen femoral (VF) expresado en mililitros mediante una ecuación de volumen en la que se asume que el fémur es un cilindro modificado, más estrecho en el centro y más ancho en las metáfisis, y que cada sección transversal es circular (Ioannou, 2012). Esta forma tridimensional se denomina hiperboloide y su volumen puede ser calculado utilizando una simple fórmula matemática (Figura 29).

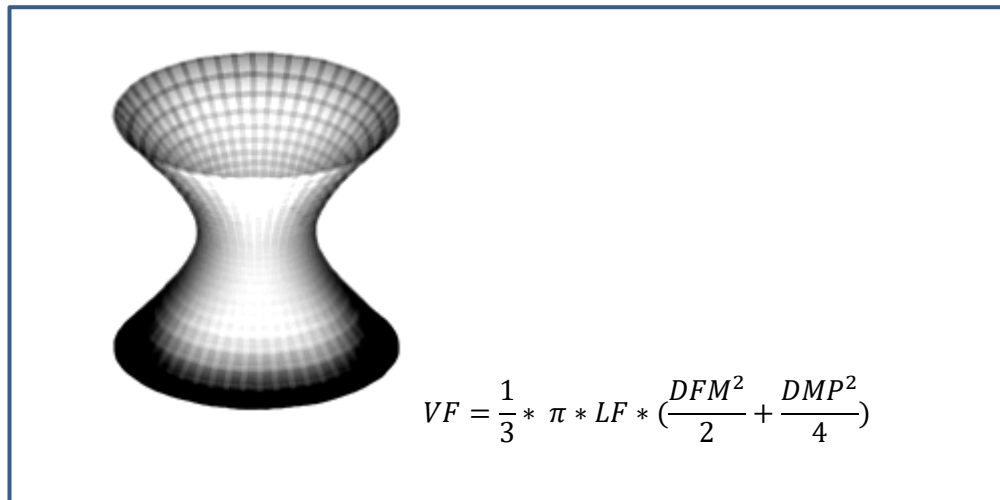


Figura 29. Ecuación para el cálculo de VF a partir de mediciones ecográficas lineales

La validez de este modelo ha sido establecida comparando el VF fetal calculado mediante ecografía tridimensional y el obtenido mediante tomografía axial computarizada (Brailon, 2002).

4.3.3.8 ESTUDIO DENSITOMÉTRICO

El estudio del CMO y de la DMO a nivel de columna lumbar (L1-L4) de los recién nacidos se realizaba mediante un dispositivo de densitometría de rayos X de doble energía, *Lunar DPX-L* (Madison, WI, USA). Este equipo dispone de una fuente de rayos X que emite haces de fotones de dos niveles de energía (38 keV y 70 keV). El tiempo de adquisición del estudio osciló entre los 3 y los 5 minutos, con lo que la dosis de radiación a nivel cutáneo de la región lumbar se estimó inferior a 1 mrem, lo que representa una insignificante dosis gonadal (inferior a 0,25 mrem en niños e inferior a 0,5 mrem en niñas). Todos los estudios se realizaban en presencia de un técnico de rayos especializado en densitometrías y uno de los pediatras colaboradores en el estudio, con el fin de optimizar al máximo la adquisición de imágenes, supervisar que la interpretación

automatizada de márgenes que realiza el aparato y corregir manualmente los errores que pudieran generarse. No se requirieron el empleo de fármacos sedantes para realización del estudio, siendo suficientes las medidas de confort habituales (succión, administración oral de glucosa 33%, contención).

La Tabla 21 resume las diferentes variables de estudio tal y como han sido introducidas en la base de datos.

Tabla 21. Variables a estudio

	VARIABLE	TIPO	VALORES	DESCRIPCIÓN
VARIABLES DEMOGRÁFICAS MATERNAS	Edad materna	Cuantitativa	Numérico con 1 decimal	Edad en años de la madre en la fecha de inclusión del estudio
	IMC	Cuantitativa	Numérico con dos decimales	Índice de masa corporal previo a la gestación (peso (kg)/ (talla (m)) ²)
	Estudios	Cualitativa	Sin estudios Básicos Medios Superiores	Nivel máximo de estudios alcanzados por la madre
	Etnia	Cualitativa	Caucásica Negra Árabe Otras	
	Tipo de piel	Cualitativa	1-6	Clasificación visual por comparación con la escala de Fitzpatrick de fototipos cutáneos
	Hábito tabáquico	Cualitativa	Sí No Previo	
	Gestación espontánea	Cualitativa	Sí No	Se consideraron no espontaneas las inseminaciones artificiales, fecundaciones in vitro e inyecciones intracitoplasmáticas de espermatozoides
	Gestaciones	Cuantitativa	Numérico absoluto	Número de gestaciones incluyendo la actual
ESTILO DE VIDA	Ingesta media VD registro 3 días	Cuantitativa	Numérico absoluto	Valor promedio* de ingesta de VD obtenido mediante el registro de 3 días
	Ingesta media VD CFCA	Cuantitativa	Numérico absoluto	Valor promedio* de ingesta de VD obtenido mediante CFCA
	Ingesta media calcio registro 3 días	Cuantitativa	Numérico absoluto	Valor promedio* de ingesta de calcio obtenido mediante el registro de 3 días
	Ingesta media calcio CFCA	Cuantitativa	Numérico absoluto	Valor promedio* de ingesta de calcio obtenido mediante CFCA
	Suplementos VD	Cualitativa	Sí No	Ingesta durante al menos 3 meses de embarazo de suplementos que aporten VD exógena
	Exposición Solar	Cualitativa	Sí No	Se consideraban suficientes aquellas exposiciones superiores a 20 minutos/día de 2 o más regiones corporales distintas
	Crema Protectora	Cualitativa	Sí No	Empleo rutinario de crema con filtro UVB durante la exposición solar diaria
	Ejercicio físico	Cualitativa	Ausente Ligero	Tiempo dedicado semanalmente a la realización de algún tipo de actividad

ESTUDIO ANALÍTICO				Moderado Intenso	física reglada (inferior a 3 horas, entre 3 y 6 horas, mayor a 6 horas o ausencia de actividad física reglada)
		Valores maternos 2º trimestre (A1)	Cuantitativa	Numérico con 1 decimal	25(OH)VD, PTH, Ca, P, FA, Proteínas totales, Albúmina
		Valores maternos parto (A2)	Cuantitativa	Numérico con 1 decimal	25(OH)VD, PTH, Ca, P, FA, Proteínas totales, Albúmina
		Valores recién nacido sangre cordón	Cuantitativa	Numérico con 1 decimal	25(OH)VD, PTH, Ca, P, FA, Proteínas totales, Albúmina
		Valores recién nacidos 48-72 horas de vida	Cuantitativa	Numérico con 1 decimal	25(OH)VD, PTH, Ca, P, FA, Proteínas totales, Albúmina
VARIABLES PERINATALES Y OBSTÉTRICAS		Edad gestacional	Cuantitativa	Numérico absoluto	Calculada como diferencia entre fecha de última regla y fecha de parto en días
		Patología gestacional	Cualitativa	DG Preeclampsia Hipotiroidismo gestacional	
		Sexo	Cualitativa	Mujer Hombre	
		Peso	Cuantitativa	Numérico absoluto	Peso del recién nacido en g
		Longitud	Cuantitativa	Numérico con 1 decimal	Talla del recién nacido en cm
		Perímetro craneal	Cuantitativa	Numérico con 1 decimal	Perímetro craneal del recién nacido en cm
		Clasificación peso recién nacido	Cuantitativa	AEG PEG	Según si el peso del recién nacido sea igual o superior o inferior al percentil 10 para la edad gestacional
		Inicio del parto	Cualitativa	Espontaneo Inducido Cesárea electiva	
		Finalización del parto	Cualitativa	Eutócico Instrumentado Cesárea	
		Tipo de anestesia	Cualitativa	Ninguna Local Epidural Raquídea General	
		Horas de bolsa rota	Cuantitativa	Numérico Absoluto	Número de horas transcurridas entre la amniorraxis y el nacimiento
		Antibioterapia	Cualitativa	Sí No	Administración de antibióticos a la madre durante el proceso de parto
		pH cordón	Cuantitativa	Numérico con 2 decimales	
		Apgar 1 minuto	Cuantitativa	Numérico entre 1-10	Puntuación en el Test de Apgar al recién nacido al minuto de vida
		Apgar 5 minutos	Cuantitativa	Numérico entre 1-10	Puntuación en el Test de Apgar al recién nacido a los 5 minutos de vida

VARIABLES DE MINERALIZACIÓN FETAL	Alimentación	Cualitativa	Materna Fórmula Inicio Mixta	Tipo de lactancia que reciben los recién nacidos en el momento del alta
	Diferencia de peso al alta	Cuantitativa	Numérico absoluto	Diferencia entre peso al nacimiento y el peso al alta en g
	Longitud fémur semana 20	Cuantitativa	Numérico con 1 decimal	Longitud del fémur fetal en ecografía de la semana 20 expresada en cm
	Área metafisaria distal semana 20	Cuantitativa	Numérico con 2 decimales	Área de la sección transversa metafisaria distal expresada en cm ² obtenida en la ecografía de semana 20
	Índice de ensanchamiento femoral semana 20	Cuantitativa	Numérico con 2 decimales	Área metafisaria distal (cm ²)/longitud femoral (cm) en ecografía de semana 20
	Longitud fémur semana 34	Cuantitativa	Numérico con 1 decimal	Longitud del fémur fetal en ecografía de la semana 34 expresada en cm
	Área metafisaria distal semana 34	Cuantitativa	Numérico con 2 decimales	Área de la sección transversa metafisaria distal expresada en cm ² obtenida en la ecografía de semana 34
	Índice de ensanchamiento femoral semana 34	Cuantitativa	Numérico con 2 decimales	Área metafisaria distal (cm ²)/longitud femoral (cm) en ecografía de semana 34
	Densidad mineral ósea	Cuantitativa	Numérico con 3 decimales	DMO (g/cm ²) obtenida mediante DEXA a nivel de columna lumbar (L1-L4) de los recién nacidos

DG: Diabetes gestacional; AEG: Adecuado a la edad gestacional; PEG: Pequeño para la edad gestacional
 (*) Calculado con el valor medio de las madres que aportan registros cumplimentados en dos momentos diferentes del embarazo o con el valor único referido en aquellas madres con un único registro cumplimentado

4.3.4 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS RESULTADOS

4.3.4.1 ANÁLISIS PRIMARIO DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS

- Las variables cuantitativas se expresaron como media y desviación estándar (DE) o como mediana con el intervalo de valores. Las variables cualitativas se expresaron como porcentajes.
- Se calculó la prevalencia de la variable principal con sus intervalos de confianza (IC) del 95%
- Comparación de variables cualitativas: Se aplicó la prueba de la χ^2 de Pearson o la prueba exacta de Fisher.
- Comparación de variables cuantitativas: Se empleó la prueba t de Student, tras haber comprobado que la muestra sigue una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnov). En caso contrario se empleó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

4.3.4.2 ESTUDIO DE LAS VARIABLES ASOCIADAS AL DÉFICIT DE VD EN LAS MADRES

- Los datos se resumieron mediante estadística descriptiva según se comenta en el apartado de análisis general (ver apartado 4.3.4.1).
- Se realizó un análisis de regresión logística no condicional múltiple para identificar los factores de riesgo potenciales asociados al déficit de VD en las madres.

4.3.4.3 ESTUDIO DE LOS FACTORES ASOCIADOS EL ESTADO DE MINERALIZACIÓN ÓSEA DEL RECIÉN NACIDO

- Análisis descriptivo de las variables de estudio.
- Análisis bivariante, según se describe en el apartado análisis primario.
- Análisis estratificado, utilizando la variable DMO del recién nacido en forma categórica para determinar posibles asociaciones entre la DMO y el cuartil de peso al nacimiento.
- Análisis de regresión lineal múltiple, para la predicción de la DMO medio atribuible al déficit de VD en las madres. Se utilizó una transformación logarítmica de la variable dependiente tras comprobar que la DMO no seguía una distribución normal. El coeficiente de regresión de cada variable se multiplicó por el valor de cada variable del modelo. Se utilizó una transformación antilogarítmica para calcular el DMO medio ajustado atribuible al déficit de VD en las madres y resto de variables incluidas en el modelo de regresión.

Todos los tests estadísticos se consideraron estadísticamente significativos cuando el nivel de significación de P fue inferior a 0,05 de forma bilateral. El análisis estadístico se realizó con “*Statistical Package for the Social Sciences*” (SPSS), versión 15.0 para Windows y “*Data Analysis and Statistical Software*” (STATA), versión 10.1 para Windows.

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

5.1.1 TAMAÑO Y DIAGRAMA DE FLUJO

Durante el periodo de inclusión se remitieron desde Atención Primaria 149 embarazadas en su primer trimestre de gestación para la realización de la primera entrevista. De ellas, 4 rechazaron participar y 2 fueron excluidas del estudio (una madre por toma de medicación y otra por patología de base que interferían en el metabolismo fosfocálcico). De las 143 embarazadas que iniciaron el estudio, 20 abortaron de manera espontánea durante el primer trimestre (14% de la muestra) y 13 decidieron abandonarlo en algún momento (4 cambiaron de domicilio y 9 alegaron cambio de opinión respecto a la participación por no querer someter a los recién nacidos a extracción analítica y/o estudio radiológico), por lo que el número de embarazadas seguidas durante la gestación fue de 110. Cinco pacientes finalizaron la gestación en un centro hospitalario diferente y no se obtuvieron datos perinatales y en 4 casos el parto fue pretérmino (< 37 semanas). Así, la muestra final del estudio está compuesta por 101 parejas de madres y recién nacidos (Figura 30).

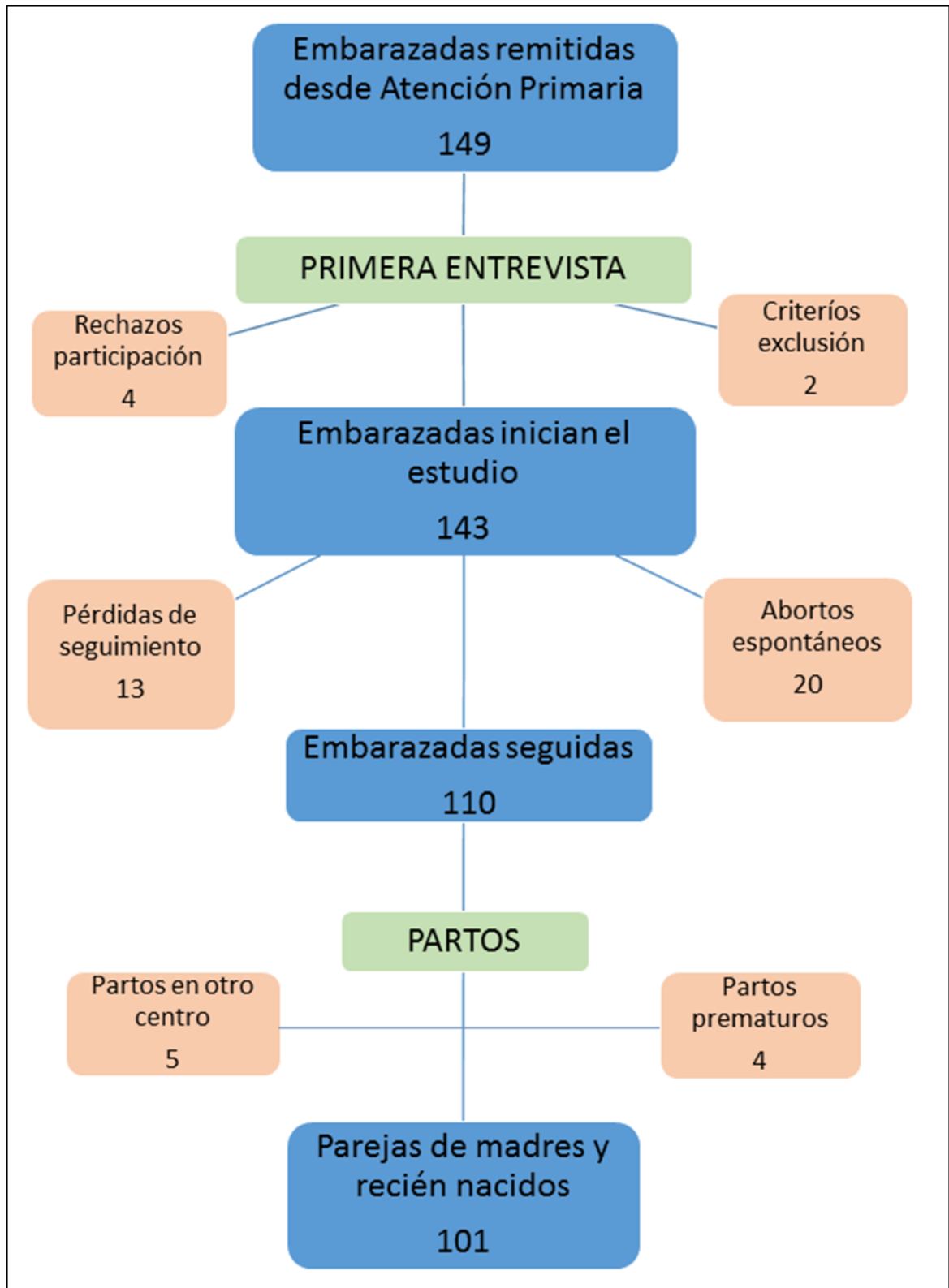


Figura 30. Diagrama de flujo. Recoge número de inclusiones, pérdidas y causas de estas

5.1.2 DATOS RELACIONADOS CON LA ESTACIONALIDAD

Debido a las variaciones estacionales en los niveles de VD, el periodo de inclusión de pacientes hasta reunir la muestra calculada ha sido de 1 año (desde el 1 de enero del 2014 al 31 de diciembre del 2014). La Figura 31 muestra la distribución por meses de las madres incluidas en el estudio.

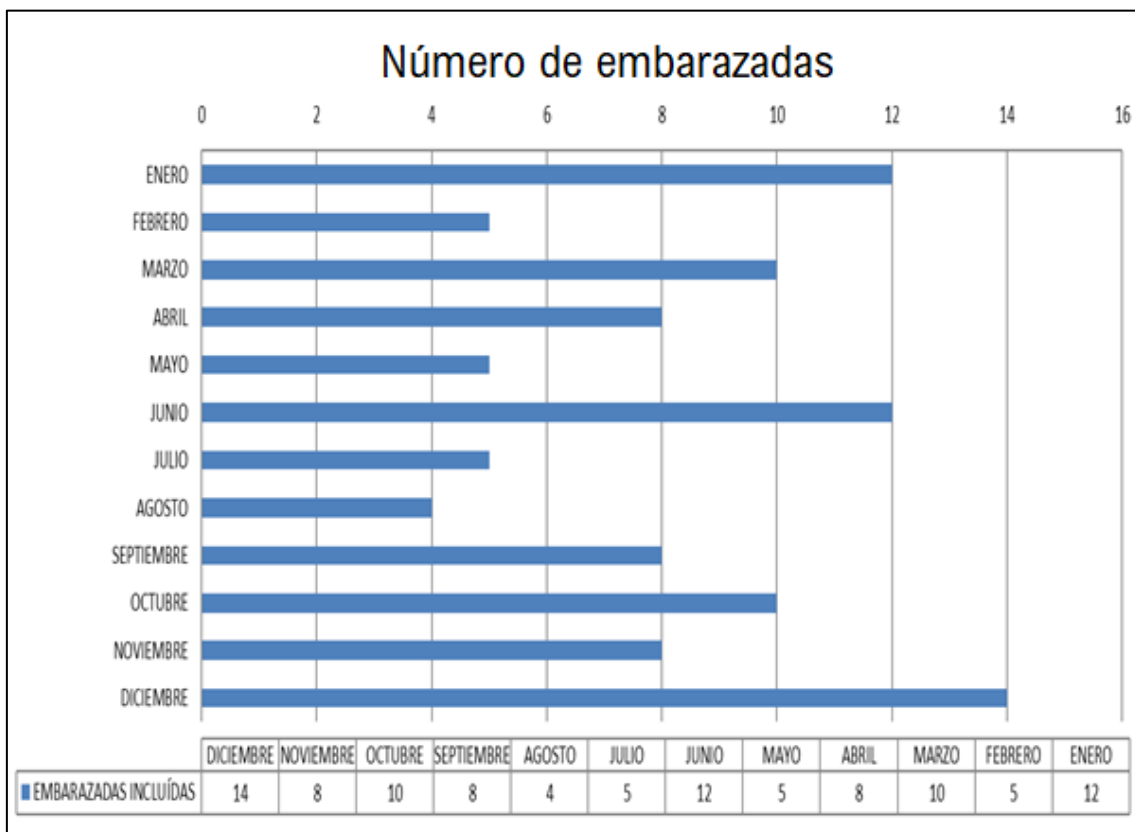


Figura 31. Distribución de las embarazadas según mes de inclusión

En la división anual por estaciones, 22 madres (21,8 %) fueron reclutadas durante la primavera (entre 20 de marzo y el 20 de junio), 22 (21,8 %) en verano (entre el 21 de junio y el 21 de septiembre), 24 (23,8 %) en otoño (entre el 22 de septiembre y el 20 de diciembre) y 33 (32,6 %) en invierno (del 21 de diciembre al 19 de marzo). La estación de nacimiento se ha agrupado en dos bloques teniendo en cuenta las horas potenciales de exposición solar durante el último trimestre de embarazo: verano-otoño (elevada exposición solar) / invierno-primavera (escasa exposición solar). Las Figuras 32 y 33 muestran la distribución en meses de la primera (A1; semana 23-26 de gestación) y la segunda (A2; parto) determinación analítica.

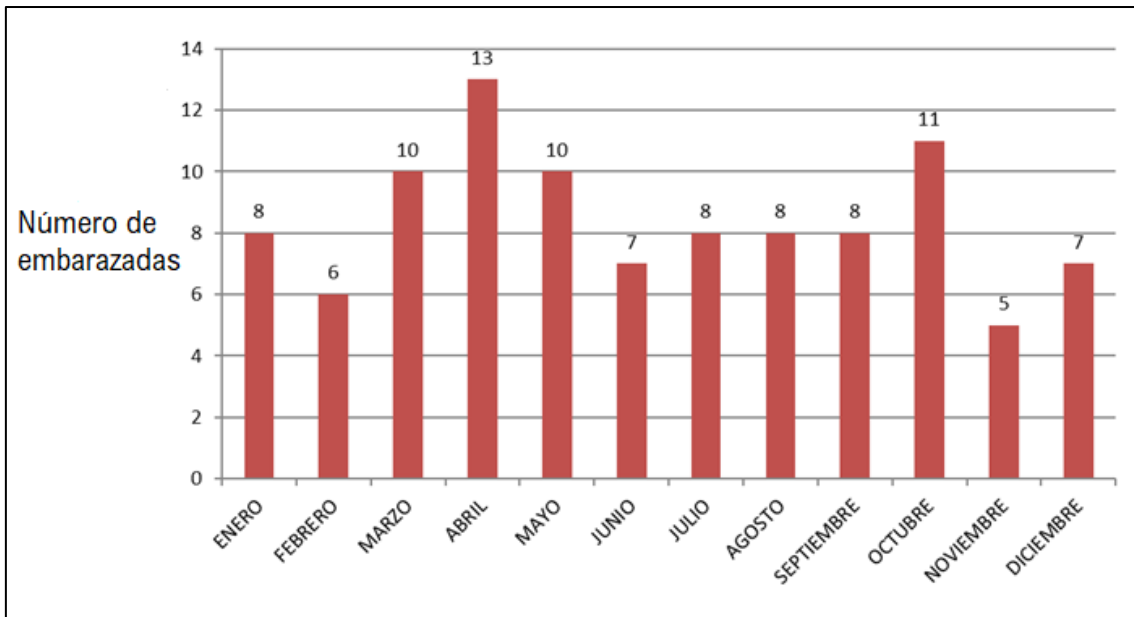


Figura 32. Distribución según el mes de realización de la primera determinación analítica (A1)

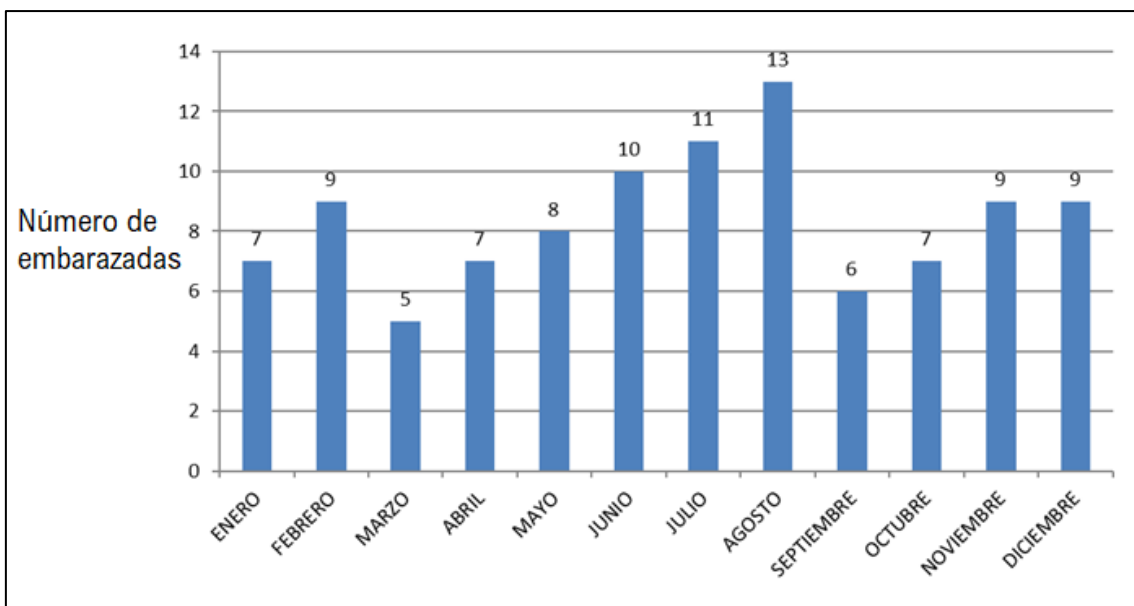


Figura 33. Distribución según el mes de parto y realización de la segunda determinación analítica (A2)

La tabla 22 muestra el número de embarazadas que realizaron la primera (A1) y segunda (A2) determinación analítica en las diferentes estaciones y semestres, así como la mediana de semanas anuales en las que se realizaron cada una de ellas. No se encontraron diferencias significativas entre el número de analíticas realizadas en cada periodo.

Tabla 22. Distribución estacional de las 2 analíticas maternas

	Primera determinación analítica (A1) N=98	Segunda determinación analítica (A2) N=77
PRIMAVERA*	30 (30,6%)	19 (24,7%)
VERANO*	24 (24,5%)	23 (29,8%)
OTOÑO*	21 (21,4%)	15 (19,5%)
INVIERNO*	23 (23,5%)	20 (26,0%)
SEMESTRE DE ELEVADA EXPOSICIÓN SOLAR (Verano/Otoño)**	45 (45,9%)	38 (49,3%)
SEMESTRE DE ESCASA EXPOSICIÓN SOLAR (Invierno/Primavera)**	53 (54,1%)	39 (50,7%)
Mediana de la semana del año	23,7 ± 14,4	25,3 ± 14,5

(A1) Analítica realizada durante el 2º trimestre de gestación (semana 23-26)

(A2) Analítica realizada en el momento del parto

(*) (Chi-cuadrado Bondad de Ajuste: $\chi^2=5,2$, $p = 0,157$ para A1 y $\chi^2=4,7$, $p = 0,326$ para A2)

(**) (Chi-cuadrado Bondad de Ajuste: $\chi^2=3,6$, $p = 0,546$ para A1 y $\chi^2=2,6$, $p = 0,708$ para A2)

5.1.3 DATOS DEMOGRÁFICOS DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO

5.1.3.1 MUNICIPIOS DE REMISIÓN

Un total de 9 Centros de Salud de distintos municipios del Área de Salud de La Ribera remitieron gestantes para ser incluidas en el estudio. La Tabla 23 resume el número inicial y final de embarazadas según el municipio de procedencia.

Tabla 23. Municipios de procedencia de las mujeres embarazadas participantes en el estudio

	EMBARAZADAS REMITIDAS N=149	EMBARAZADAS INCLUIDAS N=101
ALBALAT DE LA RIBERA	1 (0,7%)	1 (1,0%)
ALBERIC	27 (18,1%)	20 (19,8%)
ALCUDIA	1 (0,7%)	0 (0,0%)
ALGEMESÍ	42 (28,2%)	31 (30,7%)
ALZIRA	18 (12,1%)	12 (11,9%)
CARCAIXENT	32 (21,4%)	20 (19,8%)
CARLET	9 (6,0%)	5 (4,9%)
CULLERA	15 (10,1%)	9 (8,9%)
SUECA	4 (2,7%)	3 (3,0%)

5.1.3.2 VARIABLES DEMOGRÁFICAS DE LAS EMBARAZADAS

El promedio de edad de las madres es de 31,5 años (DE: 4,8) con una distribución normal (Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra $p = 0,76$). El IMC medio es de 24,2 kg/m²(DE: 5,6), aunque en este caso la muestra no sigue una distribución normal (Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra $p = 0,004$), por lo que se ha calculado la mediana y la distribución por cuartiles. La Tabla 24 resume el resto de las variables demográficas de las embarazadas incluidas en el estudio.

Tabla 24. Variables demográficas maternas.

	n	Porcentaje	Media \pm DE	Mediana Cuartiles
Edad madre	101		31,5 \pm 4,8 años	
IMC	101		24,2 \pm 5,6 Kg/m ²	22,7 Kg/m ² p25: 20,6 Kg/m ² p50: 22,7 Kg/m ² p75: 26,1 Kg/m ²
Nivel de estudios	2 21 45 33	Sin estudios 2,0% Primarios 20,2% Medios 44,5% Superiores 33,3%		
Hábito tabáquico	60 14 27	No 59,4% Previo 13,9% Sí 26,7%		
Etnia	93 5 1 2	Caucásicas 92,1% Árabes 4,9% Negras 1,0% Otras 2,0%		
Fototipo cutáneo	1 48 41 10 1	I 1,0% II 47,5% III 40,6% IV 9,9% V 1,0%		

Como indicador de nivel socioeconómico se empleó el nivel de estudios de las madres (Figura 34). Predominan los niveles medios-altos, con estudios secundarios o superiores, destacando que una tercera parte de las madres de la muestra tienen estudios universitarios.

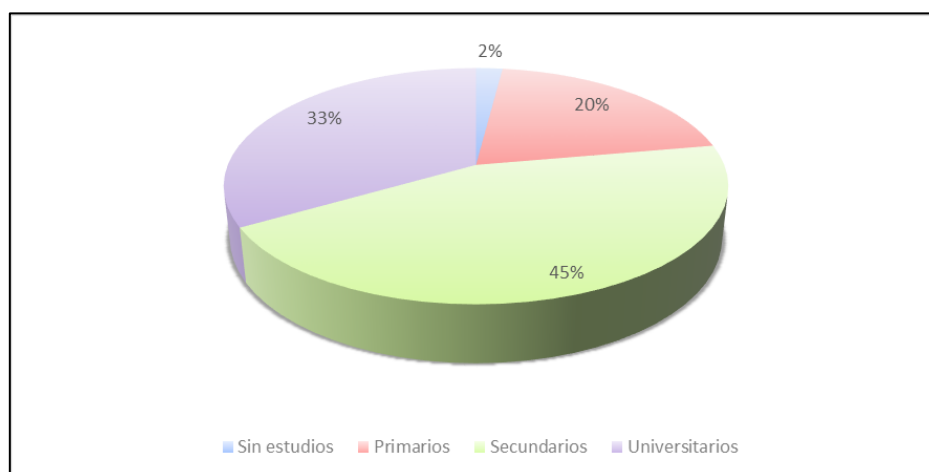


Figura 34. Nivel de estudios de las gestantes

En cuanto al tabaquismo, el 41 % de las embarazadas refieren ser fumadoras al inicio de la gestación; de ellas, aproximadamente la mitad dejó de fumar durante el embarazo (Figura 35). Tras realizar un ajuste según el nivel de estudios, se comprueba que el tabaquismo es significativamente mayor en los estratos sociales más bajos y que en el embarazo desciende algo más en las madres con mayor nivel de estudios (Figura 36).

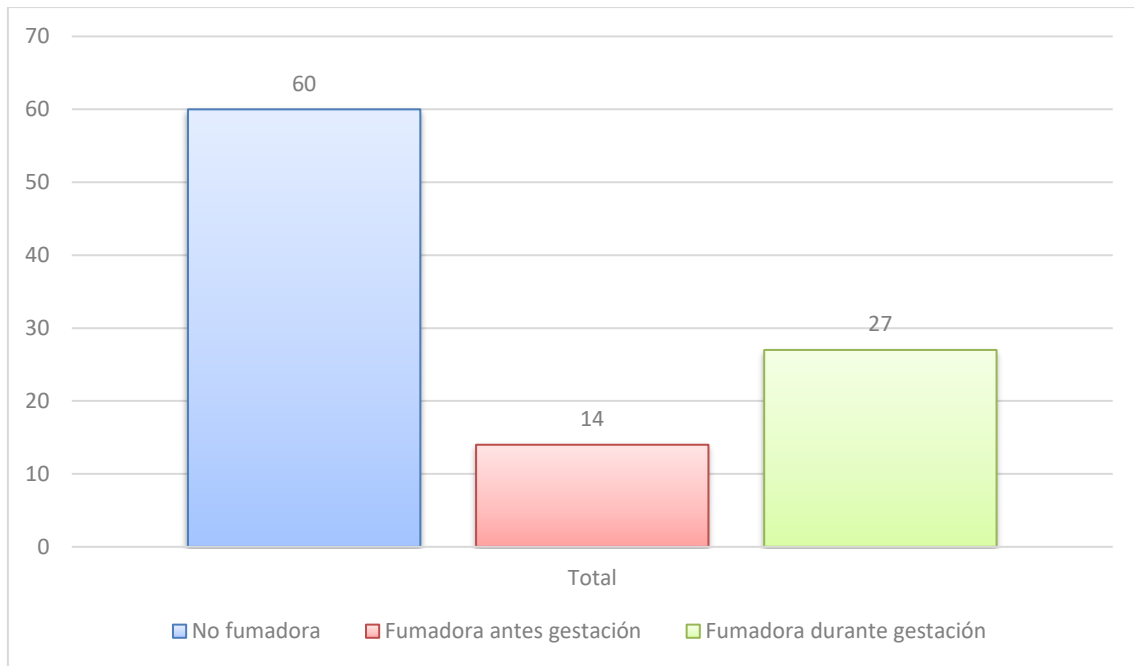


Figura 35. Hábito tabáquico

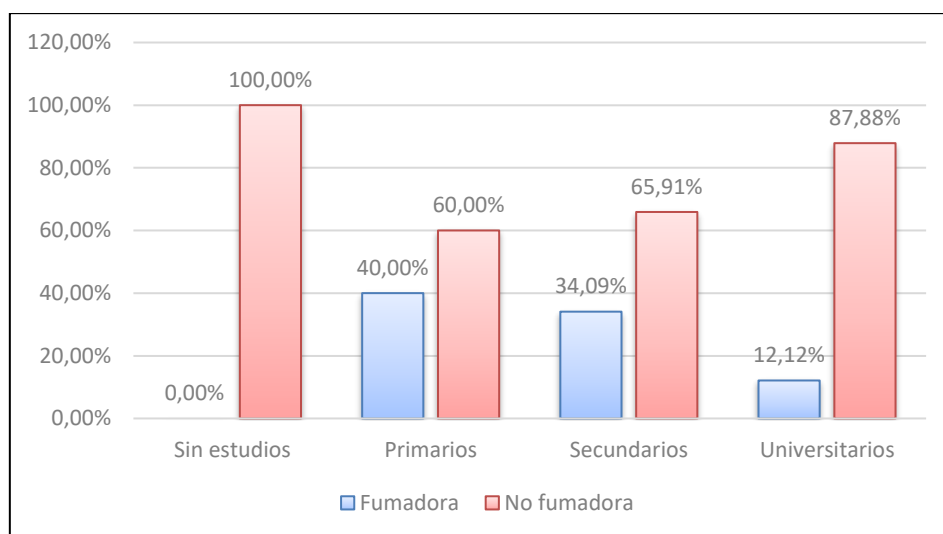


Figura 36. Tabaquismo según nivel socioeconómico

Respecto a la etnia y procedencia geográfica, la mayor parte de las embarazadas del estudio (92,1%) son de etnia caucásica, existiendo un 4,9% de mujeres árabes, un 1% de negras y un 2% de otras etnias (Figura 37).

Si clasificamos a las madres según el tipo de piel valorado mediante la escala de Fitzpatrick, los fototipos predominantes son el tipo II (46,5%) y el tipo III (40,6%), seguidos por el tipo IV (9,9%) (Figura 38).

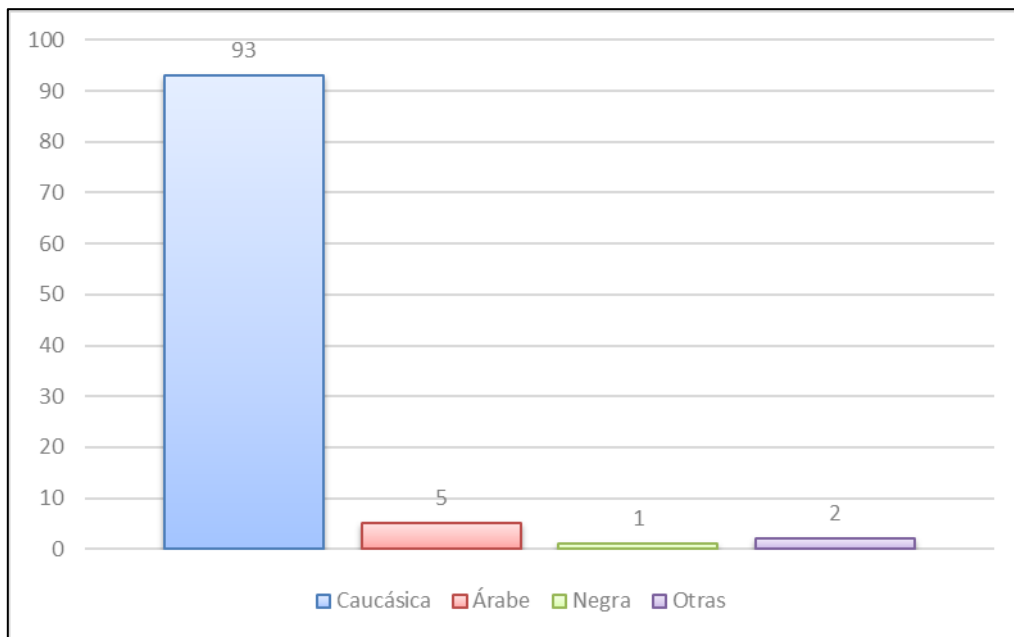


Figura 37. Etnia materna

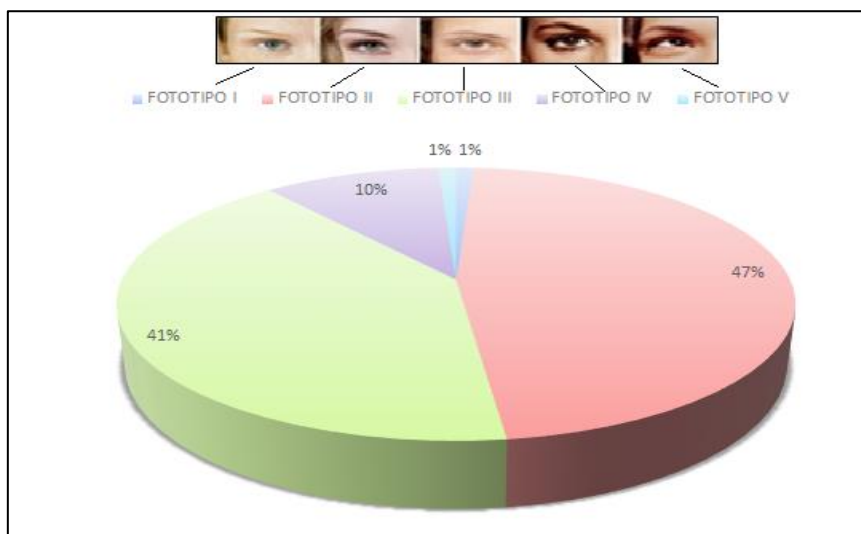


Figura 38. Fototipos cutáneos de Fitzpatrick

5.1.3.3 VARIABLES OBSTÉTRICAS Y COMPLICACIONES DURANTE EL EMBARAZO

La media de gestaciones incluyendo la actual fue de $1,92 \pm 0,87$ con una mediana de 1 y una moda de 1. Los embarazos fueron espontáneos en la gran mayoría de los casos (94,1%) y tan solo en 6 casos existía antecedente de alguna técnica de reproducción asistida. La Tabla 25 resume las variables obstétricas.

Tabla 25. Variables obstétricas de las embarazadas del estudio

	n = 101		Porcentaje
Paridad	38	G1	37,6%
	36	G2	35,6%
	25	G3	24,8%
	1	G4	1,0%
	1	G5	1,0%
Tipo de gestación	95	Espontánea	94,1%
	6	Asistida	5,9%
Diabetes gestacional	97	No	96,0%
	4	Sí	4,0%
Preeclampsia	99	No	98,0%
	2	Sí	2,0%
Hipotiroidismo	92	No	91,1%
	9	Sí	8,9%

Un 14,9 % de los partos sufrió algún tipo de complicación durante su desarrollo, existiendo 4 casos de diabetes gestacional (DG) (en ninguno se requirió tratamiento con insulina), 2 casos de preeclampsia y 9 de hipotiroidismo subclínico (TSH > 2,5 mU/L en el primer trimestre) diagnosticado por primera vez durante el embarazo y que recibieron tratamiento hormonal sustitutivo. No existieron gestantes con comorbilidad asociada. En ninguno de los casos la patología materna condicionó la actitud obstétrica más allá de los controles y seguimientos habituales.

5.1.3.4 DATOS PERINATALES

El inicio del trabajo de parto fue espontáneo en el 80,2% de los casos, con un porcentaje de inducciones del 17,8% y un 2% de cesáreas electivas. El 66,3% de los embarazos finalizaron de

manera eutócica, el 19,8% precisaron algún tipo de instrumentación y se produjeron un 13,9% de cesáreas (Figura 39).

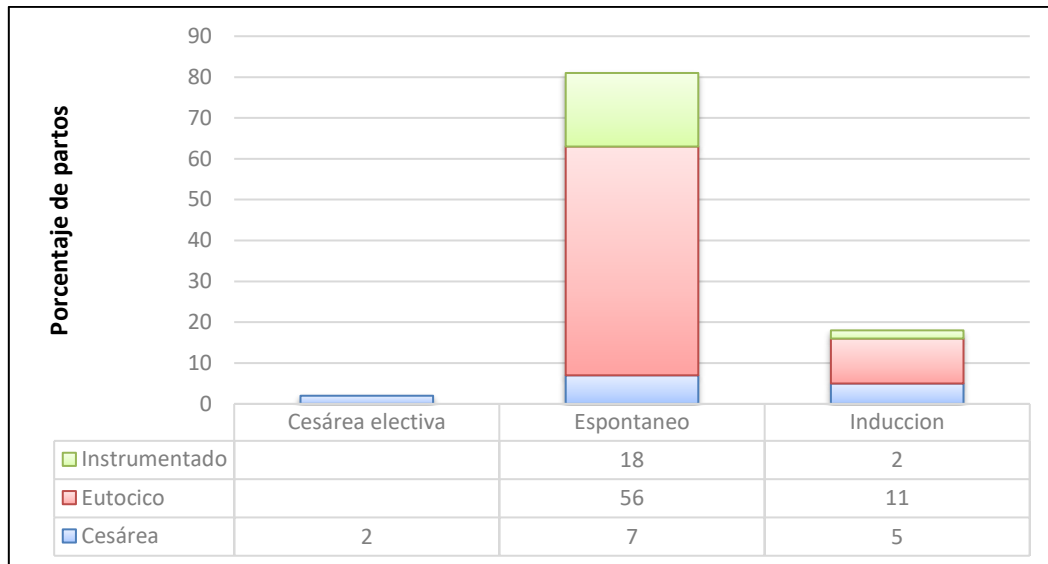


Figura 39. Relación entre la finalización del embarazo en relación con el tipo de inicio de parto

En la mayoría de los partos (89,1%) se empleó algún tipo de anestesia durante el trabajo de parto, siendo la anestesia epidural la más utilizada (75 casos). La Figura 40 muestra el tipo de anestesia empleada durante el parto de las embarazadas incluidas en el estudio.

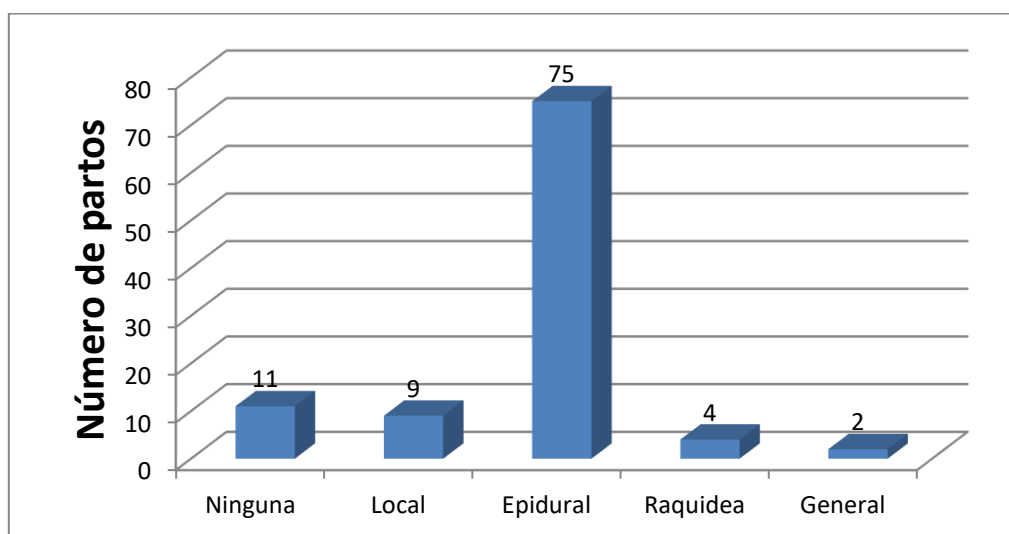


Figura 40. Empleo de anestesia durante el parto

En 17 casos (16,8% de la muestra) se indicó profilaxis antibiótica durante el parto, siendo el motivo principal de esta indicación la prevención de transmisión vertical en madres portadoras de estreptococo del grupo B (9 casos), seguido de la rotura prolongada de membranas (6 casos) y la sospecha clínica de corioamnionitis (2 casos). La media de horas de bolsa rota fue de 7,7 (DE 7,5) y el “valor medio” de pH de la muestra sangre venosa de cordón fue 7,25 (DE 0,09). Se registraron 4 casos (4,0 % de la muestra) de recién nacidos con valores de pH inferiores a 7,10 (2 de ellos ingresaron para observación en la Unidad Neonatal) y en otros 3 recién nacidos la puntuación del test de Apgar al minuto fue igual o inferior a 5, aunque todos ellos obtuvieron una puntuación igual o superior a 8 a los 5 minutos de vida. Las características de estos 7 recién nacidos aparecen resumidas en la Tabla 26. No existen variaciones significativas en los valores medios de peso y edad gestacional de este subgrupo de pacientes respecto al resto de la muestra, ninguno de ellos presentó alteraciones metabólicas o renales relevantes ni cumplió criterios clínicos de encefalopatía hipóxico-isquémica, por lo que sus datos analíticos han sido incluidos en el estudio.

Tabla 26. Características de los recién nacidos con acidosis en sangre de cordón y/o depresión neonatal

CASO	pH cordón	Apgar 1 minuto	Apgar 5 minutos	Días de gestación (*)	PN (g) (**)	Reanimación	Ingreso y fluidos intravenosos	Horas vida al alta (***)	Ca / P cordón (mg/dl)	Ca / P recién nacido (mg/dl)
1	7,02	10	10	272,5	3110	NO	NO	44,7	11,9 / 5,8	8,4 / 6,4
2	7,05	8	10	285,0	4205	NO	NO	57,4	10,3 / 6,2	7,8 / 6,5
3	7,01	8	10	292,0	2880	NO	SI	59,3	NR	9,2 / 7,4
4	7,02	7	10	269,6	3940	VPPI 30 segundos	SI	44,2	10,4 / 5,2	9,7 / 7,8
5	7,27	5	10	273,3	2890	VPPI 90 segundos	SI	50,0	NR	9,0 / 7,6
6	7,27	5	9	275,5	2320	VPPI 30 segundos	SI	95,8	NR	9,0 / 5,6
7	7,12	5	9	269,5	2680	VPPI 60 segundos	NO	45,0	NR	NR

PN: Peso nacimiento. NR: No realizado. VPPI: Ventilación presión positiva intermitente

(*) p = 0,59 (**) p = 0,51 (***) p = 0,75 (t Student al comparar valores medios con los del resto de la muestra)

5.1.3.5 ANTROPOMETRÍA Y ALIMENTACIÓN DE LOS RECIÉN NACIDOS

La edad gestacional media de los recién nacidos es 39,9 semanas (DE: 1,4) con un promedio de peso de 3245 g (DE: 470), longitud de 49,6 cm (DE: 2,1) y perímetro craneal de 34,0 cm (DE: 1,4). Tomando como referencia el *Estudio Transversal Español de Crecimiento 2010* (Carrascosa, 2011), la media de los percentiles de peso y longitud fue de 44,7 (DE: 29,4) y 42,7 (DE: 29,0) respectivamente. Cuatro de los 101 recién nacidos fueron pequeños para la edad gestacional (PEG) (percentil de peso igual inferior a p3 o -2DE) y de ellos 2 cumplían criterio de PEG disarmónicos (Índice ponderal [IP = (peso (g) / longitud³ (cm)) x 100] inferior al p10 para su edad gestacional). En cuanto a la distribución por sexos, el 55,4 % de los recién nacidos son varones. No existen diferencias significativas en la edad gestacional de ambos sexos, pero sí en los valores de peso, longitud y perímetro craneal al nacimiento (Tabla 27). Los hijos de madres con sobrepeso (IMC ≥ 25) tenían un peso al nacimiento significativamente mayor que los de las madres con normopeso (3494 g vs 3140 g, t Student muestras independientes p < 0,01).

Tabla 27. Distribución según sexo

	Global Media (DE) [intervalo]	Varones Media (DE) [intervalo]	Mujeres Media (DE) [intervalo]	p
Edad gestacional (semanas)	39,9 (1,4) [35,3-42,1]	40,1 (1,3) [36,7-42,1]	39,7 (1,5) [35,3-42,1]	0,2
Peso al nacimiento (g)	3245 (470) [1850-4400]	3346 (422) [2340-4400]	3119 (501) [1850-4035]	0,01
Longitud al nacimiento (cm)	49,6 (2,1) [42,5-55,0]	50,1 (1,8) [45,8-55,0]	48,9 (2,3) [42,5-53,5]	0,01
Perímetro craneal al nacimiento (cm)	34,0 (1,4) [30,0-37,5]	34,3 (1,4) [31,5-37,5]	33,7 (1,3) [30,0-36,0]	0,02

Los recién nacidos del estudio fueron dados de alta con una edad media de 56,1 ± 19,8 horas (rango 28,6 – 193,7 horas), momento en el que se les realizó la segunda determinación analítica. Dos recién nacidos fueron dados de alta con más de 96 horas de vida debido a su situación de bajo peso que prolongó que la estancia hospitalaria, pero sin presentar otros problemas perinatales añadidos durante el ingreso. El tipo de alimentación mayoritario al alta fue la lactancia materna (65 de los 101 recién nacidos), 31 recibieron lactancia artificial y en 5 niños se

pautó una lactancia mixta (Figura 41). La pérdida ponderal media respecto al peso al nacimiento es de 151 ± 93 g, con un promedio de porcentaje de pérdida del 4,6% (DE 2,8), siguiendo en ambos casos una distribución normal.

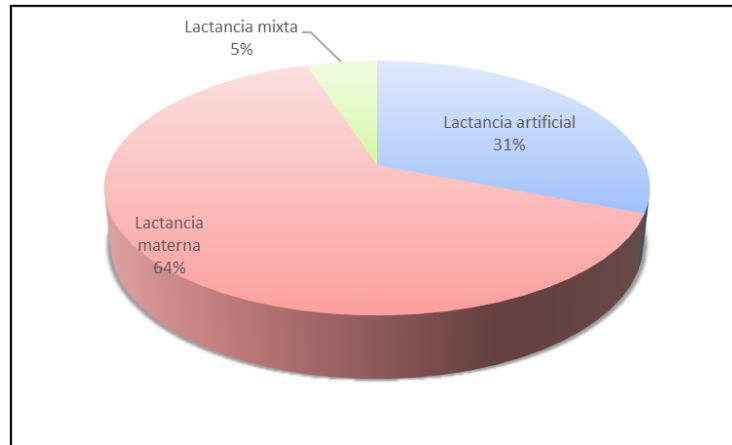


Figura 41. Alimentación de los recién nacidos al alta

Si analizamos la variación de peso en relación con el tipo de alimentación, se observa que, aunque no existen diferencias entre la media de horas de vida al alta entre los 3 tipos de alimentación, tanto la pérdida absoluta (g) como el porcentaje relativo es significativamente menor en los lactantes que reciben alimentación artificial (Figura 42 y Tabla 28).

Tabla 28. Pérdida absoluta de peso y porcentaje relativo de peso de los recién nacidos según tipo de alimentación

	Alimentación	N	Media	DE	p
Horas de vida al alta (horas)	Lactancia materna	65	58,4	22,9	0,08
	Lactancia artificial	31	50,6	9,7	
	Total	96*	56,1	19,7	
Diferencia peso (g)	Lactancia materna	65	-176	90	<0,01
	Lactancia artificial	31	-95	80	
	Total	96*	-151	93	
Porcentaje pérdida peso (%)	Lactancia materna	65	-5,2	2,8	<0,01
	Lactancia artificial	31	-2,9	2,3	
	Total	96*	4,6	2,8	

(*)El recuento no incluye a los 5 recién nacidos con lactancia mixta al alta

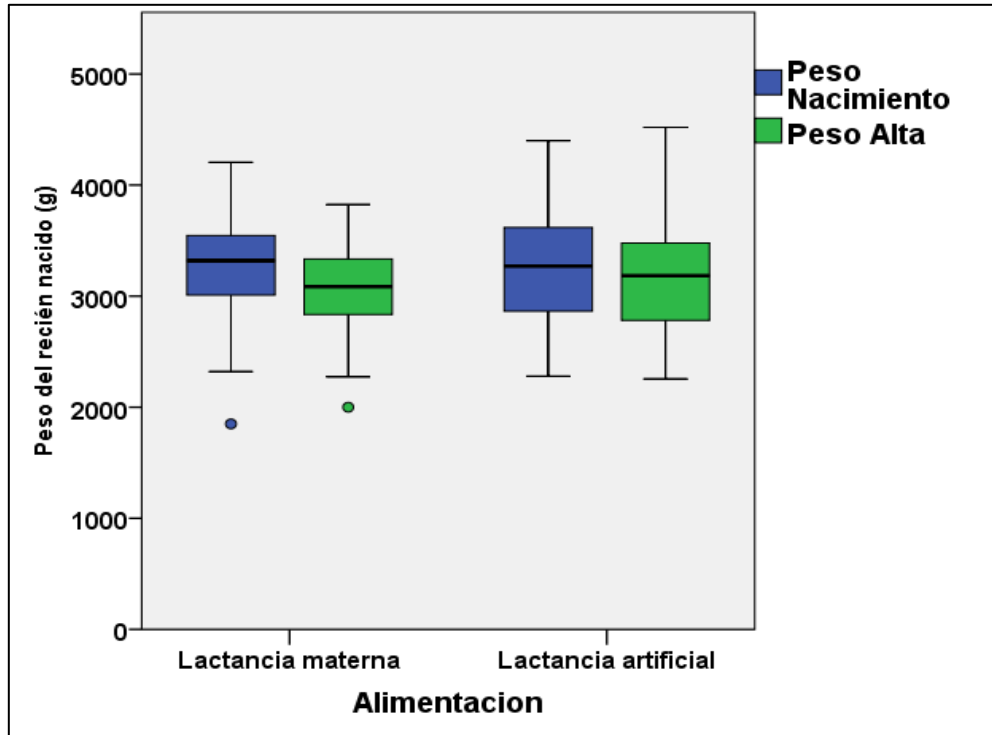


Figura 42. Peso al nacimiento y al alta de los recién nacidos según tipo de alimentación

5.1.3.6 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ÁRABE

Aunque el número de las mujeres árabes es muy escaso, consideramos oportuno realizar un análisis comparativo de este subgrupo respecto al de las madres caucásicas, pues todas ellas profesaban la religión musulmana y poseían hábitos nutricionales y de vestido (empleo de velo y cobertura corporal amplia) que limitan de forma significativa la síntesis endógena de VD. No se han encontrado diferencias significativas entre ambos grupos respecto a la edad materna, la edad gestacional, el sexo o el peso al nacimiento de los recién nacidos, pero las madres de origen árabe tienen un IMC significativamente mayor (Tabla 29).

Tabla 29. Distribución por etnia según edad de la madre, índice de masa corporal, peso al nacimiento, edad gestacional y sexo. Mediana [percentil 25 – percentil 75]

	Global	Árabes N=5	Resto de Caucásicas N=94	
Edad materna (años)	32,1 [28,0-35,0]	29,2 [25,9-34,6]	32,2 [28,1-34,9]	0,44 NS
IMC materno (Kg/m ²)	22,7 [20,6-26,1]	26,5 [25,8-31,5]	22,3 [20,4-25,1]	0,01
Edad gestacional (semanas)	39,9 [39,0-41,0]	40,7 [39,7-40,9]	39,8 [39,0-41,0]	0,44 NS
Peso al nacimiento (g)	3280 [2897-3582]	3615 [3362-3912]	3275[2890-3535]	0,05 NS
Sexo varón (%)	55,4%	60%	54,8%	0,6 NS

NS: No significativo

5.1.4 CUESTIONARIOS MATERNOS: ESTILO DE VIDA Y DIETA DE LAS EMBARAZADAS

5.1.4.1 GRADO DE CUMPLIMENTACIÓN

Destacar que el grado de colaboración basado en la cumplimentación de los cuestionarios entregados ha sido alto. De las 101 mujeres incluidas en seguimiento, 94 han cumplimentado y entregado alguno de los 2 cuestionarios (semana 20-24 de embarazo o a partir de la semana 34).

5.1.4.2 ACTIVIDAD FÍSICA

El 70,9 % de las embarazadas realiza algún tipo de actividad física reglada, siendo de intensidad ligera (<3 horas semanales) en la mayoría de los casos.

5.1.4.3 EXPOSICIÓN SOLAR Y EMPLEO DE CREMA PROTECTORA

El 73,3 % de las gestantes realiza una exposición solar suficiente (establecida como exposición solar diaria de 2 zonas corporales distintas durante al menos 20 minutos) y de ellas, casi la mitad (47,6%) emplea protección solar durante la exposición solar. El cuestionario sobre hábitos de vida fue cumplimentado por 4 de las 5 gestantes árabes, así como por la única de raza negra; destaca el hecho de que ninguna de ellas realizaba una exposición solar suficiente.

5.1.4.4 APORTE DIETÉTICO DE VITAMINA D Y CALCIO

Los consumos medios de VD y calcio recogidos en cada trimestre mediante los dos tipos de registros quedan resumidos en la Tabla 30. El registro de 3 días fue cumplimentado por 91 embarazadas en el segundo trimestre y por 52 en el tercero (51 embarazadas han cumplimentado ambos y 92 alguno de los dos). En cuanto al cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA), se obtuvieron datos de 79 gestantes en la primera visita y de 39 en la segunda, de manera que un total de 33 mujeres aportaron datos mediante CFCA en dos momentos del embarazo y 85 en alguno de ellos. Dado que el cálculo del valor medio aritmético de aporte nutricional sólo pudo realizarse en un número reducido de embarazadas que tenían dos determinaciones, hemos calculado el “valor promedio” de aporte de calcio y VD durante el embarazo que se obtiene a partir del valor medio de ingesta de calcio/VD de las madres que han entregado dos cuestionarios y del registro único de las que sólo aportan uno, por lo que no se trata de una media aritmética. Este es el valor que se ha empleado en el análisis de correlación entre los diferentes instrumentos de medición con el objetivo de aumentar el tamaño muestral.

Tabla 30. Ingesta diaria de VD y calcio durante el embarazo según método de registro y trimestre de gestación (media \pm desviación estándar).

		2º TRIMESTRE		3º TRIMESTRE		APORTE MEDIO*		VALORES PROMEDIOS**	
		CFCA N=79	Registro 3 días N=91	CFCA N=39	Registro 3 días N=52	CFCA N=33	Registro 3 días N=51	CFCA N=85	Registro 3 días N=92
VD (UI/día)	Media	185	165	210	124	210	148	187	150
	DE	114	207	108	156	101	159	102	158
Calcio (mg/día)	Media	947	1240	1024	1201	1057	1244	939	1216
	DE	379	672	360	774	323	604	340	598

(*) Media aritmética de los aportes dietéticos de las embarazadas que cumplimentan 2 cuestionarios

(**) Calculado con el valor medio de las madres que aportan registros cumplimentados en dos momentos diferentes del embarazo o con el valor único referido en aquellas madres con un único registro cumplimentado

Los datos reportados por las embarazadas sobre ingesta de VD y calcio no experimentaron variaciones significativas a lo largo del embarazo (ANOVA de medidas repetidas $F_{1,29} = 0,84$; $p = 0,37$ para la VD y $F_{1,29} = 0,1$; $p = 0,73$ para el calcio), aunque sí se observaron diferencia en función del tipo de encuesta empleado para su valoración (ANOVA de medidas repetidas $F_{1,29} = 12,9$; $p = 0,01$ para la VD y $F_{1,29} = 8,1$; $p = 0,08$ para el calcio).

Al analizar los 85 casos con valor promedio para los dos tipos de cuestionario, se observa una escasa correlación entre los datos de consumo dietético de VD aportados mediante registro de 3 días y el CFCA (Correlación de Pearson $r = 0,20$; $p = 0,06$) (Figura 43). En el caso del calcio, la correlación es similar, aunque en este caso alcanza la significación estadística (Correlación de Pearson $r = 0,30$; $p < 0,01$) (Figura 44).

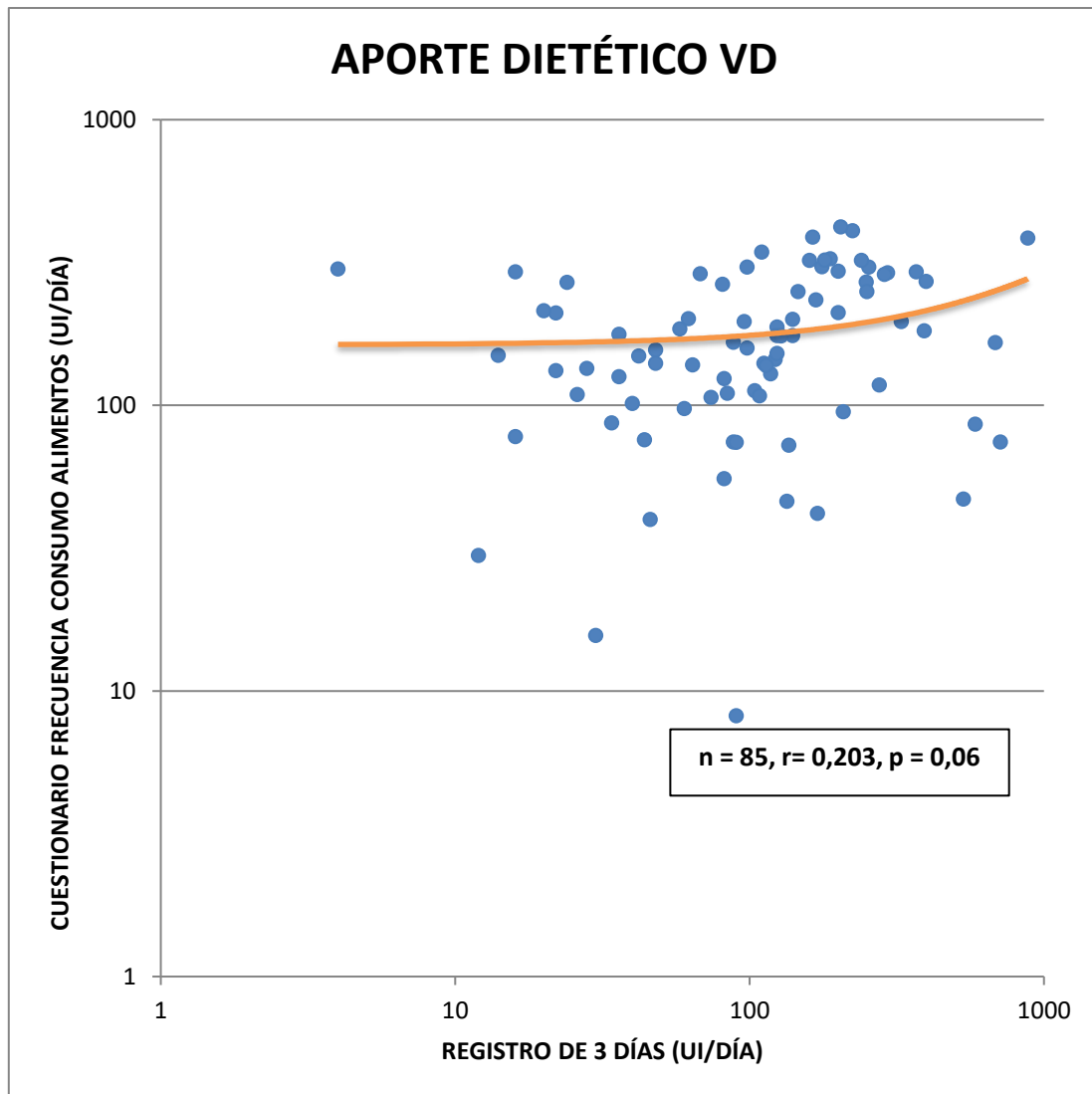


Figura 43. Relación aporte dietético de VD mediante registro de 3 días y CFC

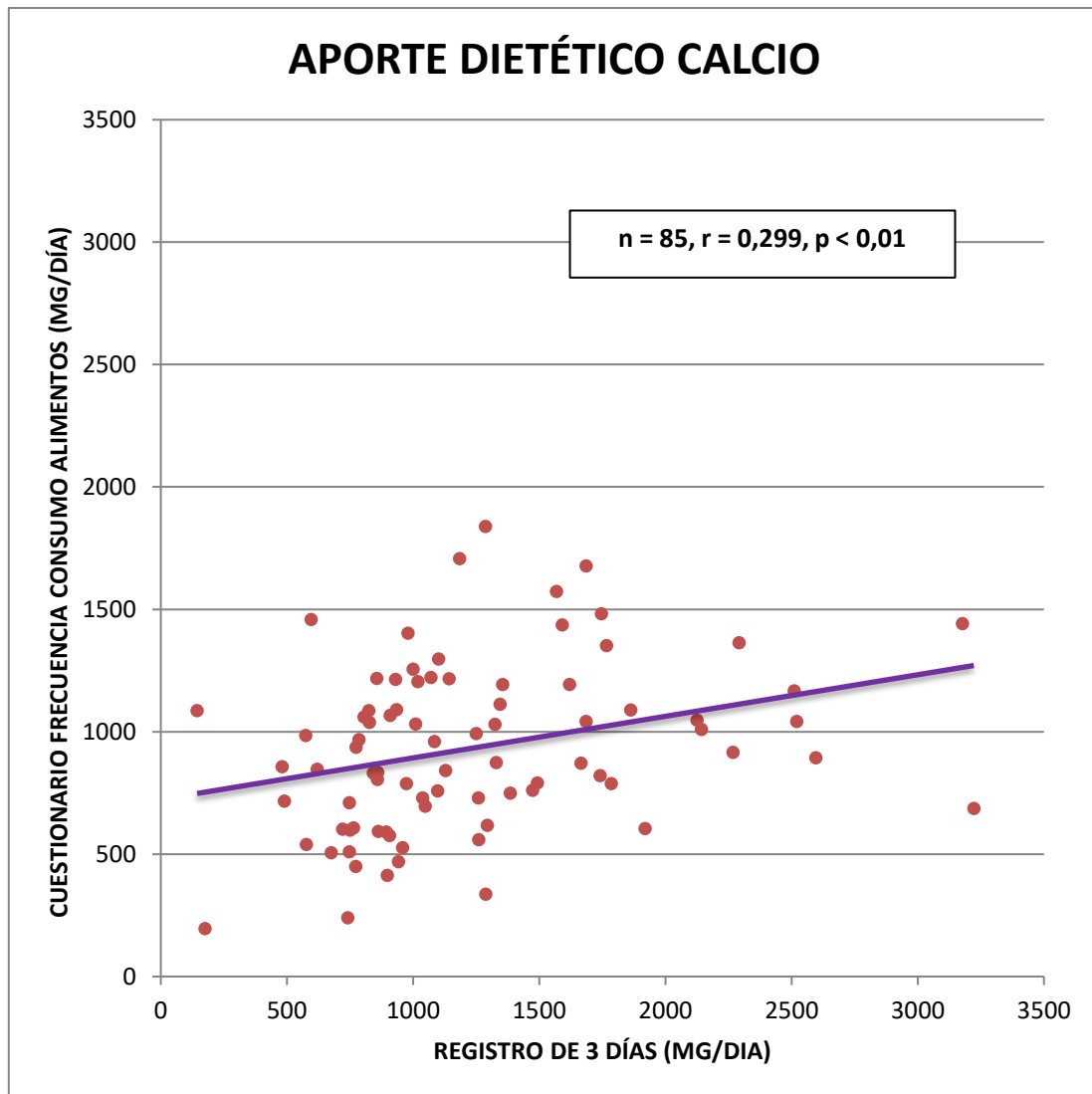


Figura 44. Relación aporte dietético de calcio calculado mediante registro de 3 días y CFCA

Si tomamos como referencia los valores promedios en el registro 3 días, el 94,6% de las embarazadas de la muestra refieren un aporte nutricional de VD insuficiente durante el embarazo (inferior al 80% del RDA 600 UI/día), mientras que en el aporte de calcio es suficiente en el 77,2% de los casos (RDA 1000 mg/día) (Ross, 2011). 20 de las 92 madres con datos nutricionales (21,7%) presentaron déficit combinado de ambos nutrientes y tan solo 4 gestantes refirieron un aporte suficiente de ambos.

5.1.4.5 EMPLEO DE SUPLEMENTACIÓN DE VD

Se recogieron datos sobre empleo o no de suplementación en 85 gestantes con un porcentaje global de consumo del 57,6%. Mostraron un menor porcentaje de suplementación la población no caucásica (20,0%), menor de 25 años (33,3%) y con menor nivel de estudios (42,1%), aunque sin alcanzar la significación estadística por el escaso número de embarazadas en los subgrupos de estudio.

Se obtuvieron datos conjuntos sobre suplementación y valor promedio de aporte dietético de VD y calcio en el registro de 3 días en 82 gestantes. Si tenemos en cuenta el aporte de VD que supone la toma de suplementación (200 UI para la mayor parte de compuestos), 72 de estas 82 gestantes (87,8 %) siguieron realizando una ingesta insuficiente de VD y en 17 gestantes (20,7%) el déficit de VD se asociaba a un aporte de calcio inferior a los 800 mg/día. La distribución por grupos de población del aporte nutricional total de VD (incluyendo suplementación) y calcio aparece resumida en la tabla 31. No se han encontrado diferencias significativas en el aporte total (conjunto de dieta y suplementación) de VD y calcio entre los diferentes grupos de población (Figuras 45 y 46), probablemente por el escaso número de sujetos en alguna de las categorías a estudio. No obstante, sí que se observó que el aporte total de VD (suma de dieta y suplementación) era significativamente mayor en las madres que tomaban suplemento (367 ± 162 UI/día) respecto a las que no lo hacían (132 ± 161 UI/día) (t Student muestras independientes $t = 6,5$; $p < 0,01$).

Tabla 31. Distribución de los porcentajes de deficiencia/suficiencia aislada y combinada de aporte de calcio y VD en los diferentes grupos de embarazadas

APORTE DIETÉTICO TOTAL*	TOTAL	EDAD		ETNIA		NIVEL EDUCACIONAL	
		<25 años	≥ 25 años	Caucásica	No Caucásica	Bajo	Medio Alto
n	82	6	76	77	5	20	62
Déficit combinado calcio y VD	17 (20,7%)	0	17	16	1	4	12
Déficit aislado de VD	55 (67,1%)	6	49	52	3	15	41
Déficit aislado de calcio	2 (2,4%)	0	2	1	1	0	2
Suficiencia de ambos nutrientes	8 (9,8%)	0	8	8	0	1	7

(*) Incluyendo aportes de la suplementación vitamínica

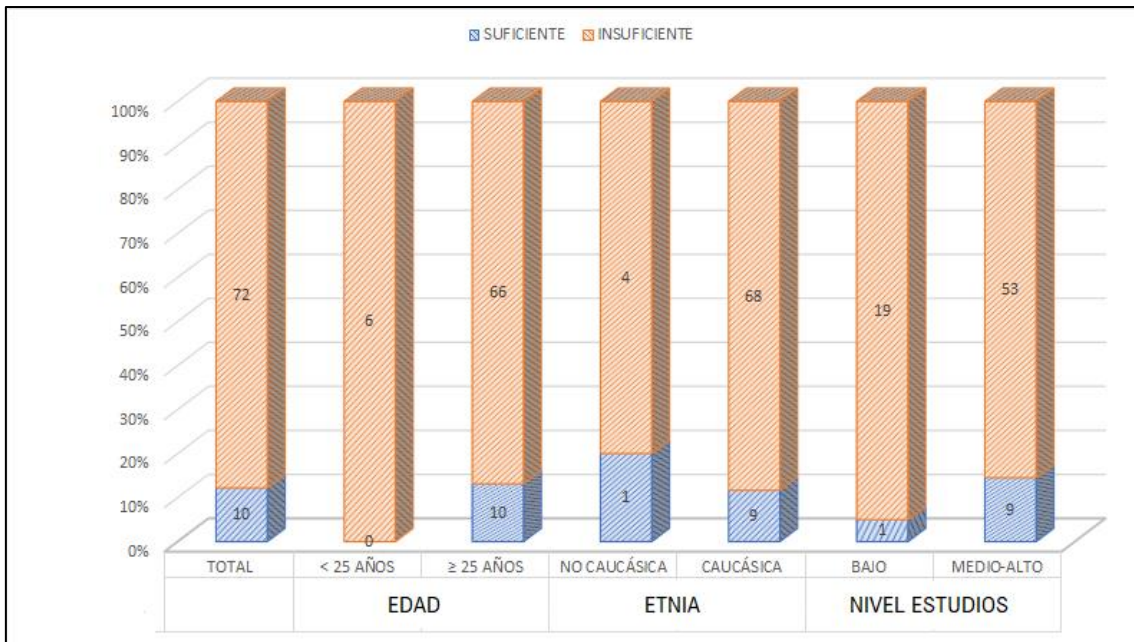


Figura 45. Porcentaje de suficiencia del aporte dietético total de VD obtenido mediante registro de 3 días en diferentes grupos de población.

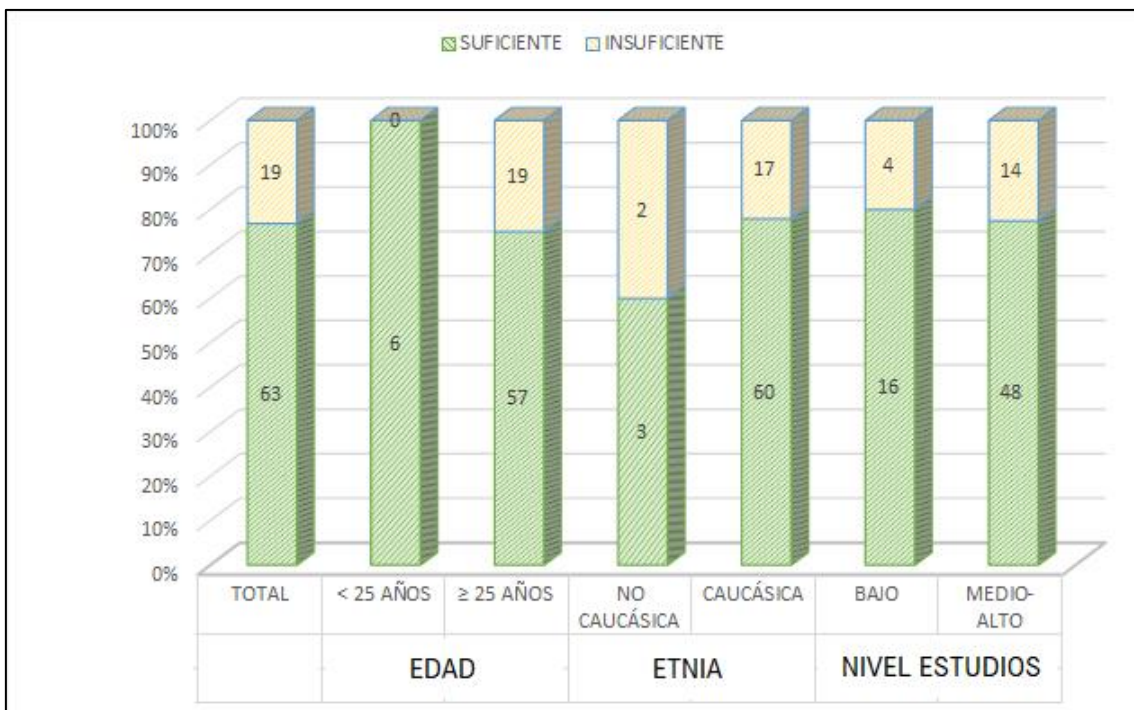


Figura 46. Porcentaje de suficiencia del aporte dietético de calcio obtenido mediante registro de 3 días en diferentes grupos de población.

5.2 ANÁLISIS POR OBJETIVOS

5.2.1 HORMONAS CALCITROPAS Y MARCADORES BIOQUÍMICOS DE MINERALIZACIÓN ÓSEA DURANTE EL EMBARAZO

Los valores de los parámetros analíticos bioquímicos y hormonales relacionados con el metabolismo fosfocálcico materno durante el segundo trimestre de gestación (A1) y en el momento del parto (A2) aparecen resumidos en la tabla 32. Se obtuvieron muestras sanguíneas válidas en 98 gestantes para la A1 y en 73 gestantes para la A2 (4 muestras de las 77 iniciales fueron desestimadas por presentar valores anómalos atribuidos a un error de procesamiento en el laboratorio). No existen diferencias en el mes de realización de ambas determinaciones [$6,34 \pm 3,34$ (mediana 6) y $6,73 \pm 3,35$ (mediana 7) respectivamente].

Tabla 32. Resumen descriptivo de los valores maternos de hormonas calciotropas y parámetros bioquímicos asociados a la homeostasis mineral.

	25(OH)VD (ng/ml)		PTH (pg/ml) *		Calcio (mg/dl)		Calcio corregido (mg/dl) **		Fósforo (mg/dl)		Fosfatasa Alcalina (UI/L)		Proteínas Totales (g/dl)		Albúmina (g/dl)	
	A1 N=98	A2 N=73	A1 N=96	A2 N=69	A1 N=98	A2 N=73	A1 N=98	A2 N=73	A1 N=98	A2 N=73	A1 N=98	A2 N=73	A1 N=98	A2 N=73	A1 N=98	A2 N=73
Media	17,0	16,9	28,5	35,9	8,8	8,8	8,9	9,2	3,0	3,3	70,3	172,1	6,2	6,0	3,8	3,5
Mediana	17,0	17,0	24,0	28,0	8,8	8,9	8,9	9,2	3,0	3,2	65,5	160,0	6,2	6,1	3,8	3,5
DE	8,4	8,8	17,2	25,1	0,3	0,6	0,3	0,4	0,5	0,6	23,5	56,0	0,3	0,7	0,2	0,4
Mínimo	4,2	4,2	5	8	7,9	6,7	8,3	7,7	1,9	2,1	28	67	5,2	3,8	3,2	2,2
Máximo	41,3	38,5	87	125	9,6	10,0	9,6	10,2	4,2	4,9	159	360	7,3	7,3	4,5	4,4

(*) Las muestras analíticas no fueron óptimas para el procesamiento (transporte en tubo frío) en 2 de las embarazadas de A1 y en 4 de A2, por lo que el número final de determinaciones de PTH fue de 96 y 69 respectivamente

(**) Calcemia (mg/dl) + [4-Albúmina (g/dl)] x 0,8

5.2.1.1 CAMBIOS EN LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DURANTE EL EMBARAZO

La comparación de medias para muestras apareadas en las 71 madres con determinación analítica en el segundo trimestre de embarazo y en el momento del parto no mostró variaciones significativas en los valores de calcio ($p = 0,80$), pero si en los de fósforo ($p = 0,01$) y PTH ($p = 0,03$), que se incrementaron de manera significativa. En cuanto a los niveles de calcio corregido, sus valores son significativamente mayores que los del calcio medido tanto en A1 como en A2 (t Student muestras apareadas $t_{97} = -10,9$; $p < 0,001$ y $t_{71} = -9,1$, $p < 0,001$) y, además, sus valores experimentaron un aumento significativo entre ambas determinaciones condicionado por el descenso en las concentraciones de albúmina de las embarazadas (t Student muestras apareadas $t_{69} = -4,5$; $p < 0,001$).

Entre las modificaciones acontecidas a lo largo del embarazo destaca un incremento esperado en los valores de fosfatasa alcalina ($70,3 \pm 23,5$ UI/L en A1 vs $172,1$ UI/L $\pm 56,0$ UI/L en A2; t Student para muestras apareadas $p < 0,01$) y una disminución en la cifra de proteínas totales ($6,2 \pm 0,3$ g/dl en A1 vs $5,8 \pm 1,0$ g/dl en A2; t Student para muestras apareadas $p < 0,01$) (Figuras 47 y 48), mientras que los valores de albúmina, aunque también disminuyeron, no alcanzaron la significación estadística (Figura 49).

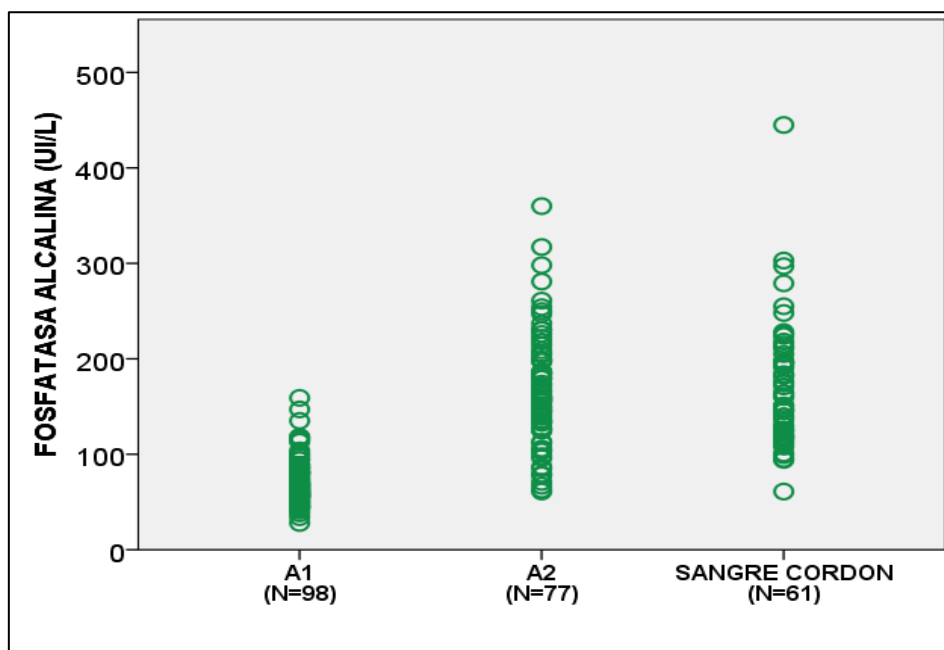


Figura 47. Modificación de los niveles de Fosfatasa Alcalina (UI/L) durante el embarazo

Los valores maternos de FA no variaron en relación con la actividad física, hábito tabáquico, aporte total de VD o semestre de realización de la determinación analítica. En cambio, sí que se observó que en las madres con sobrepeso (IMC > 25) el nivel de FA durante el segundo trimestre de gestación fue significativamente mayor (t Student muestras independientes $t_{9,5} = 2,8$, $p = 0,006$).

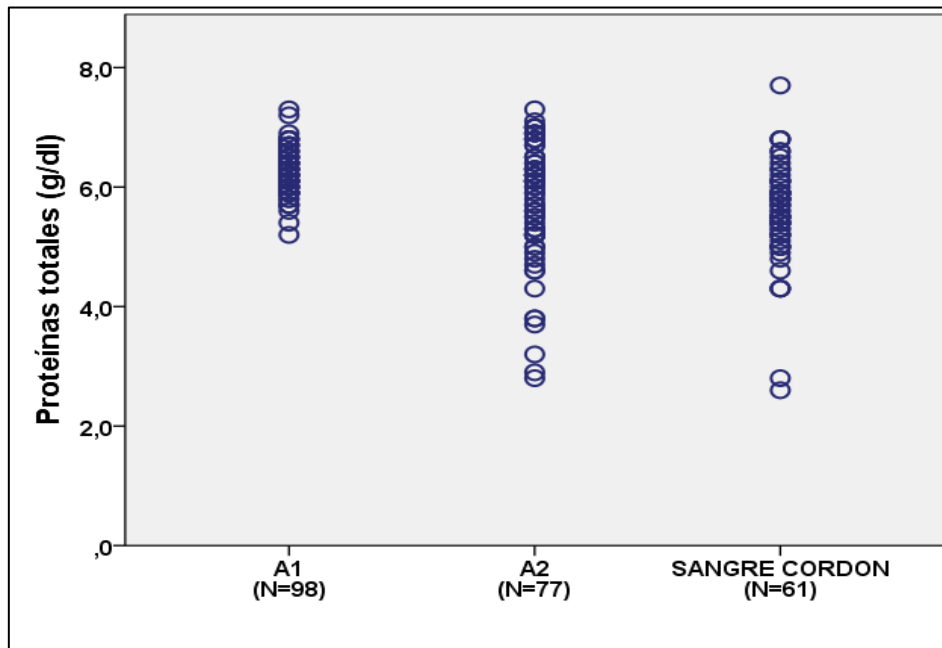


Figura 48. Modificación de los niveles de Proteínas Totales (g/dl) durante el embarazo

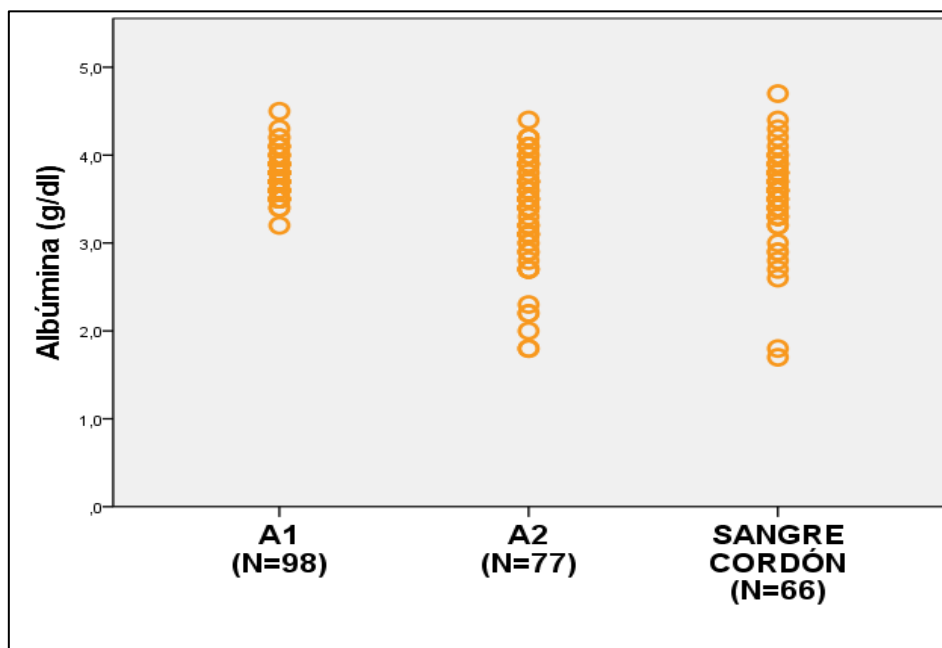


Figura 49. Modificación de los niveles de Albúmina (g/dl) durante el embarazo

5.2.1.2 ESTACIONALIDAD DE LOS NIVELES MATERNOS DE CALCIDIOL

El valor medio de 25(OH)VD es de 17,0 ng/ml (DE 8,4 ng/ml) en el segundo trimestre (A1) y de 17,5 ng/ml (DE 9,1 ng/ml) en el momento del parto (A2). Los valores de 25(OH)VD maternos en el momento del parto muestran una distribución normal (Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra: $p = 0,2$) (Figura 50). Las Figuras 51 y 52 muestran las variaciones en los distintos meses del año que experimentan los valores medios de 25(OH)VD de las embarazadas incluidas en el estudio, alcanzándose los niveles más altos durante los meses estivales y de principios de otoño.

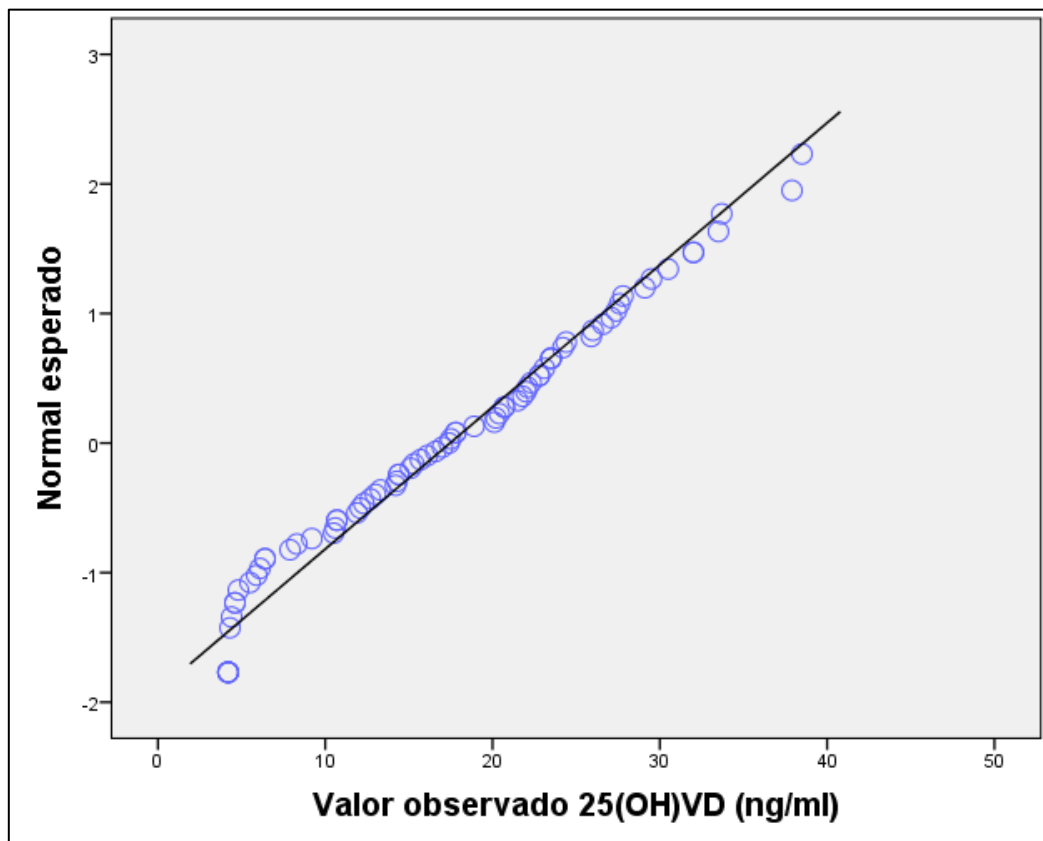


Figura 50. Gráfico Q-Q que muestra la distribución de datos de los valores maternos de 25(OH)VD en el momento del parto (A2) sobre la distribución normal

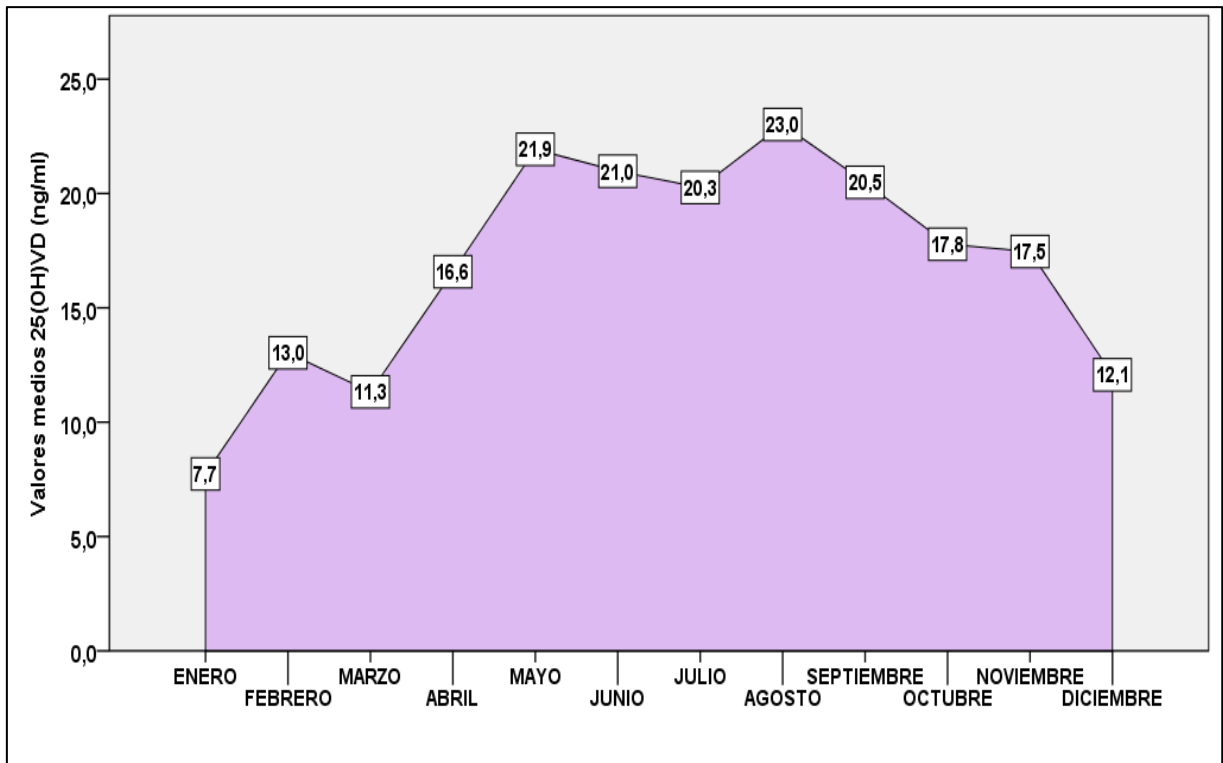


Figura 51. Distribución mensual de los valores medios de 25(OH)VD de la primera determinación analítica materna (A1)

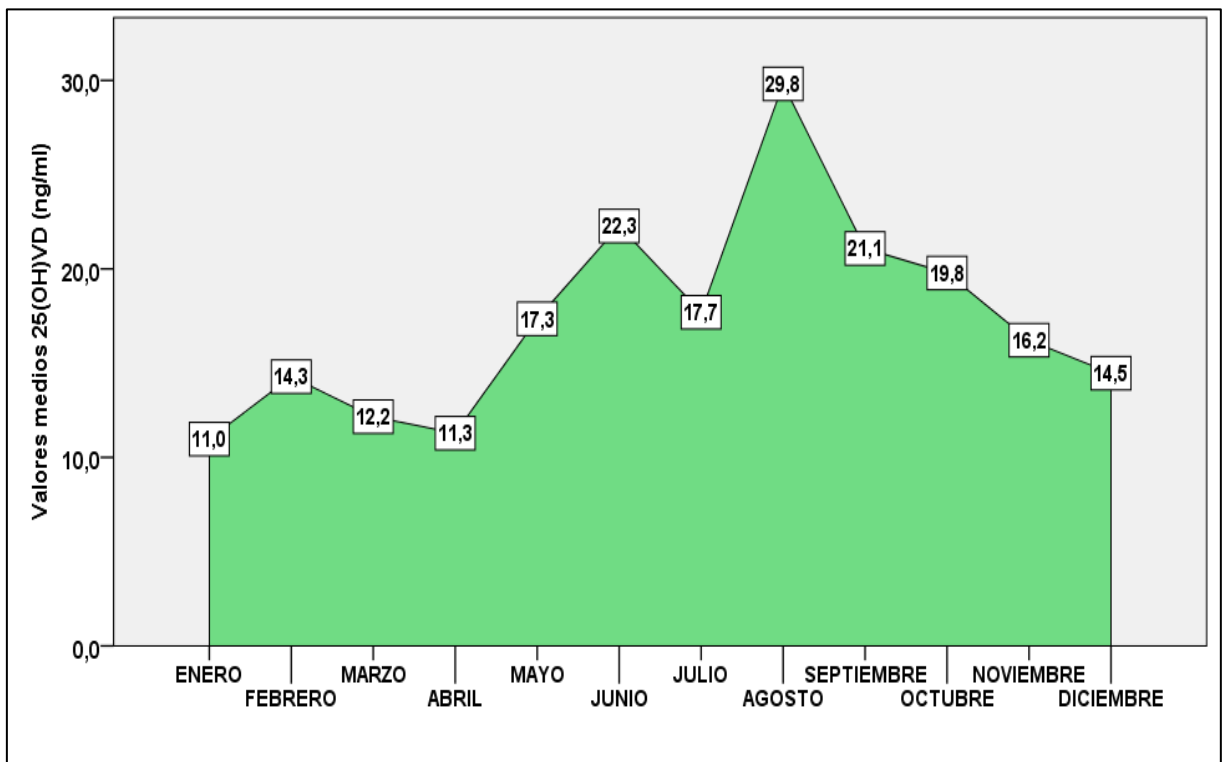


Figura 52. Distribución mensual de los valores medios de 25(OH)VD de la segunda determinación analítica materna (A2)

5.2.1.3 EVOLUCIÓN DE LOS NIVELES DE CALCIDIOL DURANTE EL EMBARAZO

En términos generales, los valores individuales de VD no variaron de forma significativa a lo largo de la gestación de modo que, en una misma embarazada, la determinación analítica en el momento del parto muestra datos similares a los obtenidos en el segundo trimestre (Ver apartado 5.2.2.1). Así pues, con el objetivo de minimizar la pérdida de casos, en el estudio de la asociación entre los valores maternos de 25(OH)VD y el grado de mineralización ósea del recién nacido se ha empleado el valor medio de 25(OH)VD de aquellas madres en las que existen dos determinaciones analíticas o cualquiera de los dos valores en aquellos casos en los que sólo existe una muestra analítica.

No obstante, sí que se observaron diferencias significativas en las variaciones de los niveles de calcidiol que experimenta el grupo de las madres que tomaron algún tipo suplementación con VD durante el embarazo (incremento medio de $3,0 \pm 9,8$ ng/ml) y las que no lo hicieron (descenso medio de $3,3 \pm 9,1$ ng/ml) (ANOVA medidas repetidas modelo mixto $F_{1,63} = 7,1$; $p = 0,01$) (Figura 53).

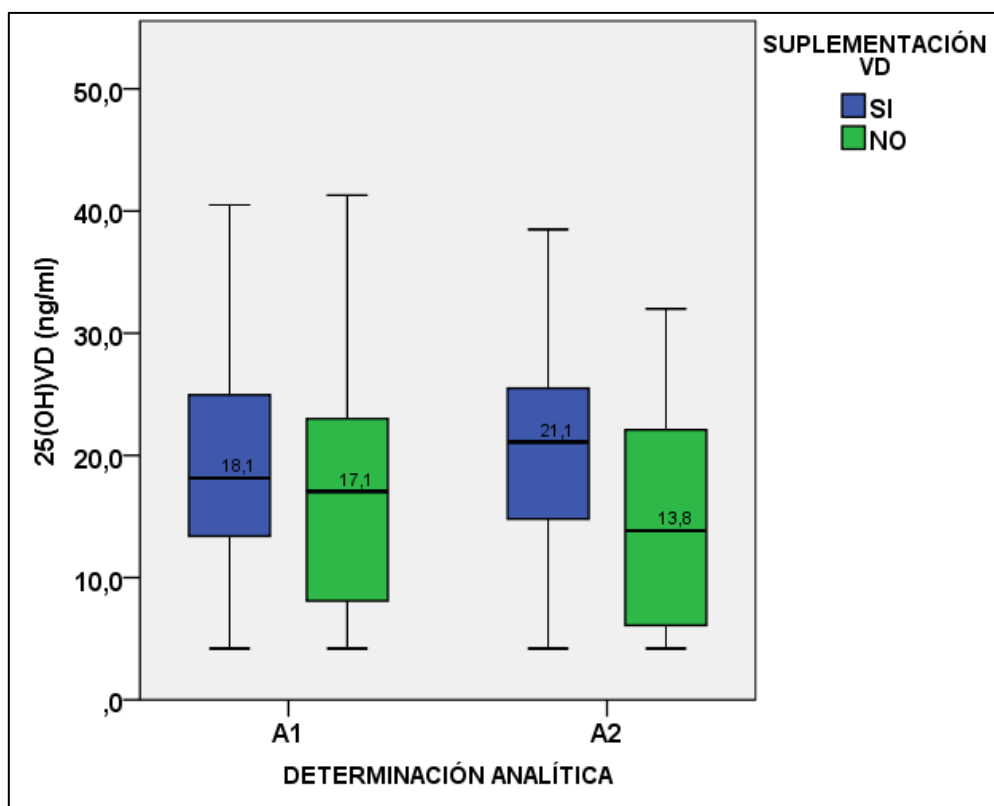


Figura 53. Modificación en los valores medios de 25(OH)VD en relación con el empleo de suplementación.

5.2.1.4 CORRELACIÓN ENTRE LOS VALORES DE 25(OH)VD Y EL RESTO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HORMONALES DE LAS MUJERES GESTANTES

Las relaciones entre los valores de hormonas calciotropas maternas y las distintas determinaciones séricas simultáneas de calcio y fósforo aparecen resumidas en la tabla 33. Tan solo se obtuvo significación estadística entre los valores de calcio y PTH del segundo trimestre de gestación y los de fósforo y VD del momento del parto, aunque el coeficiente de correlación fue débil.

Tabla 33. Relación entre los valores maternos de hormonas calciotropas y las determinaciones séricas simultáneas de iones totales

	Asociación	Coefficiente correlación Pearson	p
ANALÍTICA SEGUNDO TRIMESTRE (A1)	PTH - Calcio	-0,260	0,01
	PTH - Fósforo	-0,011	0,92
	VD - Calcio	0,028	0,78
	VD - Fósforo	0,087	0,39
ANALÍTICA PARTO (A2)	PTH - Calcio	0,027	0,82
	PTH - Fósforo	0,226	0,05
	VD - Calcio	-0,193	0,39
	VD - Fósforo	-0,288	0,01

En cuanto a la relación entre el calcidiol y la PTH, se observa una débil correlación lineal negativa tanto en el segundo trimestre como en la del momento del parto (coeficiente de correlación $r = -0,34$; $p = 0,001$ y $r = -0,35$; $p = 0,002$ respectivamente) (Figura 54 y 55).

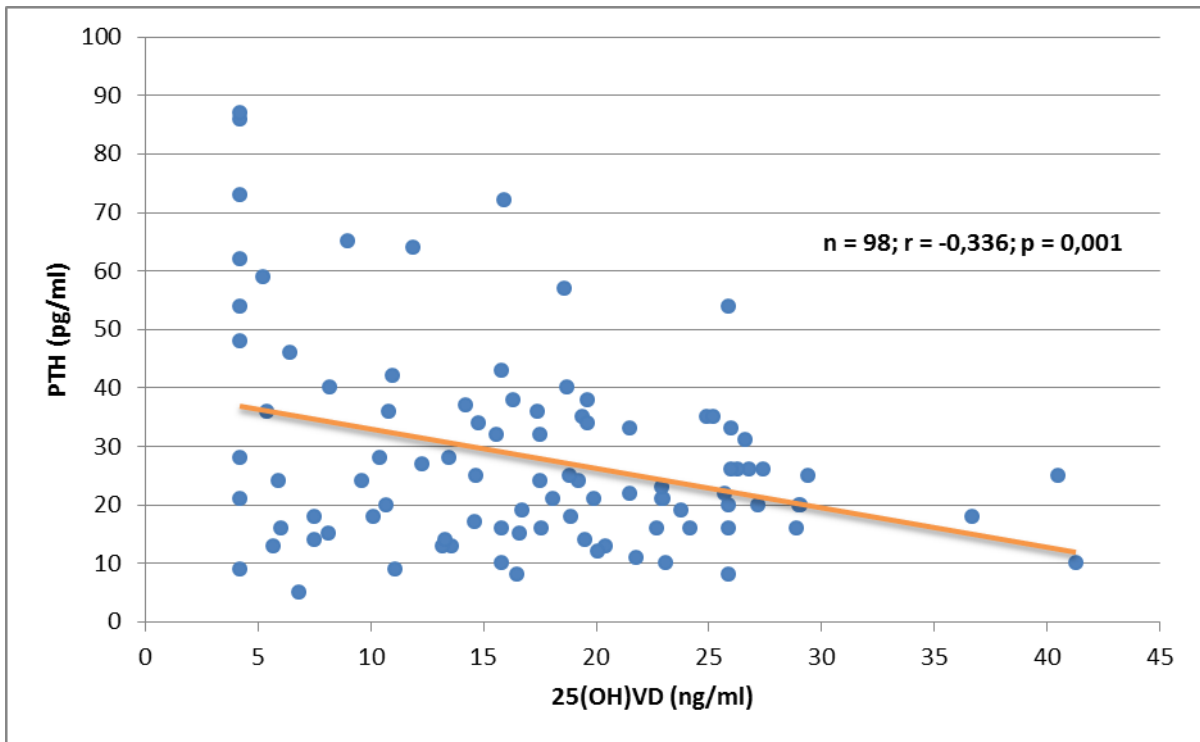


Figura 54. Relación entre los valores maternos de 25(OH)VD (ng/ml) y PTH (pg/ml) en el segundo trimestre

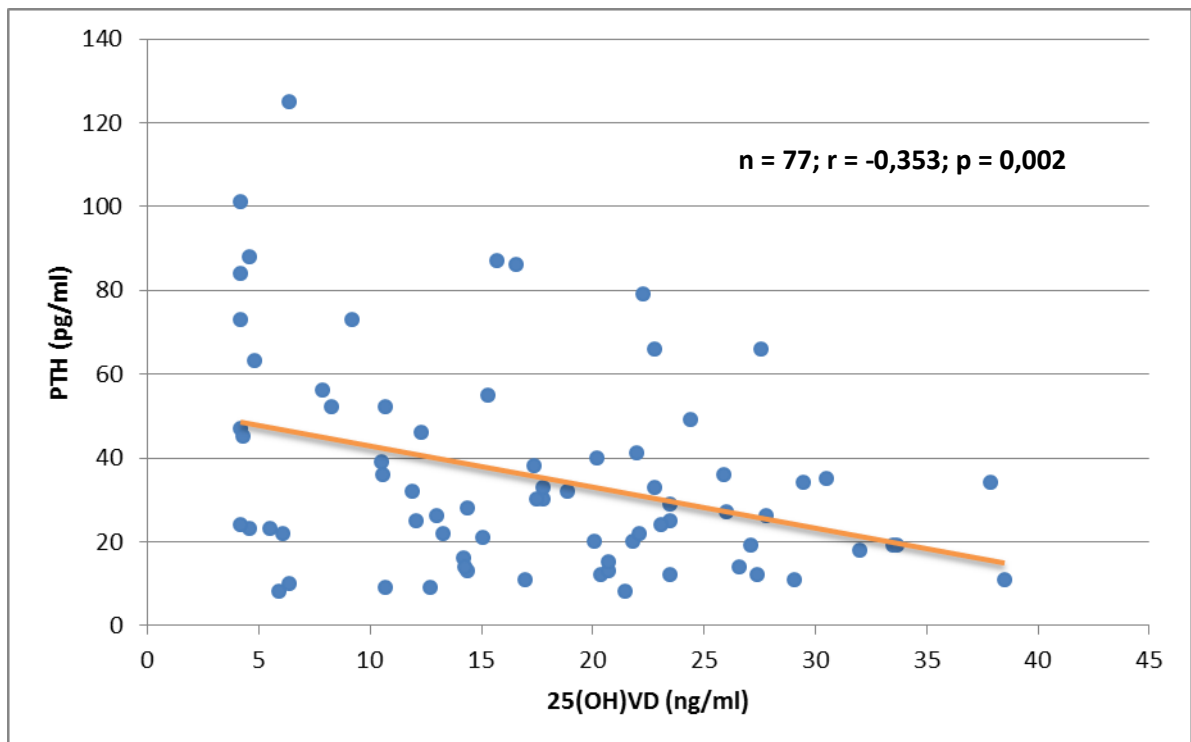


Figura 55. Relación entre los valores maternos de 25(OH)VD (ng/ml) y PTH (pg/ml) en el momento del parto

Respecto al marcador bioquímico materno de recambio óseo (FA), no se encontró correlación significativa entre su concentración y los valores maternos simultáneos de calcidiol o PTH en el segundo trimestre de la gestación o en el momento del parto ni con el estado materno de suficiencia o insuficiencia de VD.

5.2.2 DÉFICIT DE VITAMINA D DURANTE EL EMBARAZO

5.2.2.1 *PREVALENCIA DEL DÉFICIT DE VD DURANTE EL EMBARAZO*

La Tabla 34 muestra la distribución del estado de VD en cada momento de la toma de las muestras maternas. La prevalencia de déficit de VD (valores inferiores a 20 ng/ml) ha sido del 66,3% (IC del 95% 55,1 – 73,7 %) en la primera determinación analítica y del 57,5% (IC del 95% 48,7 – 67,2%) en el momento del parto, lo que supone una reducción significativa del porcentaje de embarazadas con déficit de VD a lo largo de la gestación (Chi-cuadrado Bondad de Ajuste $\chi^2 = 18,6$, $p < 0,01$).

Tabla 34. Distribución del estatus de VD en cada momento temporal de las muestras maternas

25(OH)VD (ng/ml)	Estado de VD	A1: Segundo trimestre	A2: Parto*	Valor promedio**
N		98	73	101
<20	Deficiente	65 (66,3%)	42 (57,5%)	68 (68,0%)
20-29	Insuficiente	30 (30,6%)	25 (34,2%)	28 (28,0%)
≥ 30	Suficiente	3 (3,1%)	6 (8,3%)	4 (4,0%)
Media (DE)		17,0 (8,4)	16,9 (8,8)	16,8 (7,5)
Intervalo		4,2 – 41,3	4,2 – 38,5	4,2 – 36,6

(*) El estado de VD materno no varió a lo largo del embarazo

(**) Valor medio de las concentraciones de VD maternas en el segundo trimestre y el parto o registro único cuando sólo se realizó una analítica

5.2.2.2 *ANÁLISIS BIVARIABLE DE LOS FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL DÉFICIT DE VD EN LAS EMBARAZADAS*

Cada una de las variables a estudio fue analizada de manera independiente para valorar su influencia sobre la aparición de déficit de VD en la mujer embarazada definido como valor medio de 25(OH)VD durante el embarazo inferior a 20 ng/ml. Dado que no se produjeron variaciones

significativas en los valores de 25(OH)VD a lo largo del embarazo (t Student muestras apareadas $p = 0,81$), se ha empleado para el cálculo del porcentaje de madres deficitarias en cada grupo la media aritmética de ambas determinaciones (A1 y A2) o el registro único cuando sólo se realizó una analítica, a excepción de la estacionalidad y la toma de suplementación durante el embarazo, en las que únicamente fueron valoradas las madres con analítica en el momento del parto ($n = 73$).

La estación en la que se produce el parto (estival con respecto al resto) y la actividad física actúan como factores de protección frente a la aparición de déficit de VD, mientras que el IMC materno actúa como factor de riesgo (Tabla 35). En cuanto a los aportes dietéticos totales de VD, los datos obtenidos mediante CFCA reportaron valores medios diferentes entre ambos grupos (242 ± 138 UI/día en insuficientes vs 350 ± 148 UI/día en suficientes) con un buen grado de correlación entre el aporte dietético total registrado mediante esta herramienta y los niveles de 25(OH)VD ($r = 0,36$; $p < 0,001$). El registro de 3 días no objetivó esta correlación.

Tabla 35. Factores de riesgo para el déficit de VD en la mujer embarazada

		Deficiencia VD	Suficiencia VD	
	n			p
Años de la madre (media ± DE)	101	31,9 ± 4,3 (n=68)	30,7 ± 5,6 (n=32)	0,26
IMC (media ± DE)	101	25,2 ± 5,5 (n=68)	21,9 ± 5,1 (n=32)	0,004
Etnia materna (%)	101			0,31
Caucásica	93	65,6%	34,4%	
Negra	1	100,0%	0,0%	
Árabe	5	100,0%	0,0%	
Otras	2	100,0%	0,0%	
Caucásicas (%)	101			0,06
Sí	93	65,6%	34,4%	
No	8	100,0%	0,0%	
Tipología de piel (%)	101			0,68
I	1	100,0%	0,0%	
II	48	61,7%	38,3%	
III	41	70,7%	29,3%	
IV	10	77,8%	22,2%	
V	1	100,0%	0%	
Fototipos oscuros	101			0,38
No (I.II.III)	90	66,3%	33,7%	
Sí (IV. V)	11	80,0%	20,0%	
Nivel de estudios (%)	101			0,42
Sin estudios	2	100,0%	0,0%	
Básicos	21	60,0%	40,0%	
Medios	45	75,0%	25,0%	
Superiores	33	60,6%	39,4%	
Fumadoras (%)	101			0,92
No	60	67,2%	32,8%	
Previo a la gestación	14	64,3%	35,7%	
Durante la gestación	27	70,4%	29,6%	
Gestaciones (media ± DE)	101	1,96 ± 0,82 (n=68)	1,75 ± 0,80 (n=32)	0,24
Tipo de gestación (%)	101			0,08
Espontanea	95	70,2%	29,8%	
Asistida	6	33,3%	66,7%	
Estación del parto (%)	73*			0,04
Primavera	19	68,4 %	31,6%	
Verano	21	33,3 %	66,7%	
Otoño	14	57,1 %	42,9%	
Invierno	19	73,7%	26,3%	
Semestre Parto (%)	73*			0,01
Verano/Otoño	35	42,9%	57,1%	
Invierno/Primavera	38	71,1%	28,9%	
Actividad física (%)	85**			0,04
Sí	61	57,4%	42,6%	
No	24	79,2%	20,8%	
Exposición solar (%)	85**			0,09
Suficiente	62	58,1%	41,9%	
Insuficiente	23	78,3%	21,7%	
Empleo crema protectora (%)	85**			0,39
No	36	60,0%	40,0%	
Sí	49	65,3%	34,7%	
Aportes dietéticos (media ± DE)				
Calcio (registro 3 días)	92	1146 ± 548	1301 ± 163	0,23
Calcio (CFCA)	85	857 ± 306	1081 ± 358	0,003
VD (registro 3 días)	92	141 ± 143	169 ± 186	0,43
VD (CFCA)	85	166 ± 99	225 ± 98	0,01
Toma de suplementación (%)	85**			0,06
No	36	65,4%	34,6%	
Sí	49	41,7%	58,3%	
Aporte total VD (media ± DE)	82			
Registro 3 días		263 ± 216 (n = 31)	284 ± 206 (n = 30)	0,71
CFCA		242 ± 138 (n = 32)	350 ± 148 (n = 30)	0,004

(*) Valoración de las 73 madres con segunda determinación analítica válida. (**) Valoración de las 85 madres que cumplimentan cuestionario sobre estilo de vida.

En un análisis más detallado de los datos se compararon los diferentes valores medios de 25(OH)VD en los distintos grupos de riesgo estudiados, con independencia de que cumplieran o no el criterio de suficiencia (Tabla 36).

Tabla 36. Valores medios de 25(OH)VD por subgrupos maternos

25(OH)VD (ng/ml)	ETNIA MATERNA				FOTOTIPO CUTANEO		ACTIVIDAD FÍSICA		EXPOSICIÓN SOLAR		TOMA SUPLEMENTACIÓN	
	Caucásica	Negra	Árabe	Otras	Claro (I,II,III)	Oscuro (IV,V,VI)	SI	NO	SI	NO	SI	NO
N	93	1	5	2	90	11	61	24	62	23	48	35
Media	17,7	6,6	5,9	15,9	17,4	13,2	18,2	17,2	18,8	15,7	19,1	15,9
DE	7,4		2,3		7,6	7,6	8,3	5,0	7,9	5,9	7,1	7,8

Cabe destacar que, aunque la totalidad de las madres no caucásicas incluidas en el estudio (n=7) presentaron déficit de VD, no se alcanzó la significación estadística en el porcentaje de madres deficitarias debido al escaso número de registros. En cambio, al analizar el efecto de las diferentes etnias sobre los valores medios de VD sí se observaron diferencias significativas entre los grupos (ANOVA de 1 factor $F_{3,96} = 4,83$; $p = 0,004$) (Tabla 36; Figura 56.A).

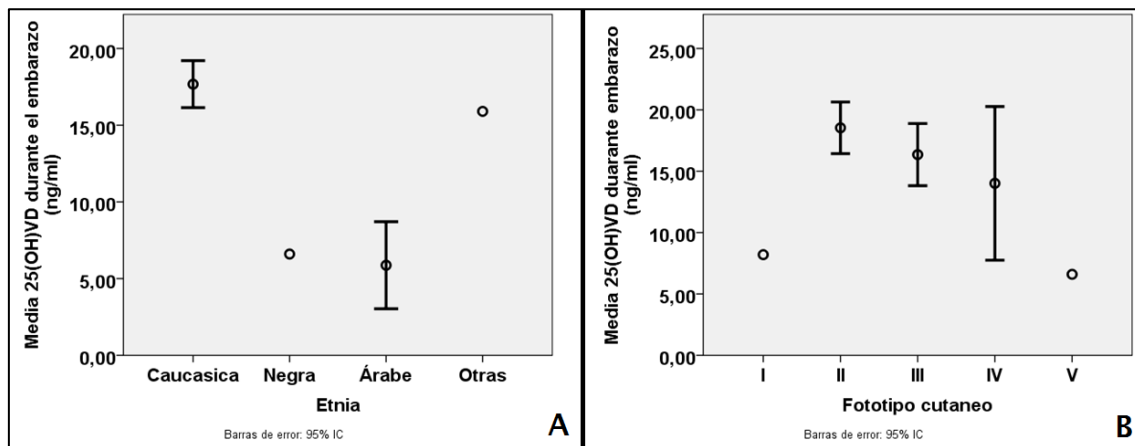


Figura 56. Valores medios de 25(OH)VD en diferentes grupos de mujeres embarazadas agrupadas en función de (A) etnia y (B) Fototipo cutáneo

De forma similar, se observan valores medios de VD inferiores en las madres con fototipos de piel más oscuros, aunque sin alcanzar la significación estadística (t Student para muestras independientes $p = 0,11$) (Tabla 35; Figura 52.B).

Al comparar los valores de calcidiol del segundo análisis de las mujeres que acumulaban un mayor número de horas de sol al final de la gestación (parto en verano/otoño) con las que lo hacían en invierno/primavera, se observó un efecto significativo del semestre de parto (ANOVA multifactorial $F_{1,59} = 7,9$, $p = 0,007$), aunque no relacionado con la exposición solar suficiente (ANOVA multifactorial $F_{1,59} = 1,8$, $p = 0,10$) ni con su interacción. No obstante, al analizar los efectos principales simples de cada variable, se observa que el incremento que se produce en los valores medios de calcidiol en el “semestre favorable” (final del verano) sólo resulta significativo para aquellas madres que refieren una exposición solar adecuada (Figura 57). El empleo de crema solar protectora no modificó el porcentaje de gestantes con déficit de VD ($p = 0,39$).

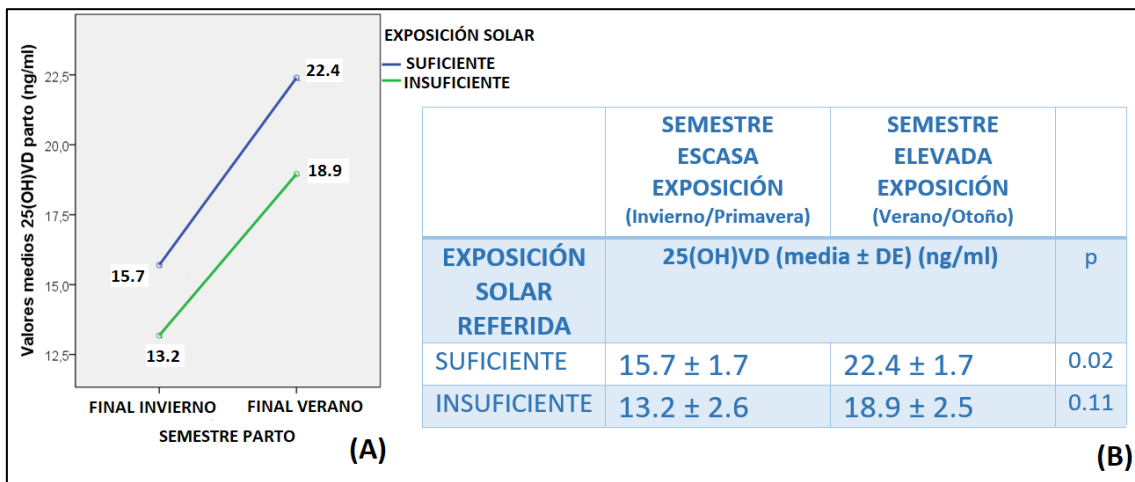


Figura 57. Niveles de 25(OH)VD de las embarazadas en el momento del parto en relación con el semestre y a la exposición solar referida en la encuesta.

5.2.2.3 MODELO MULTIVARIABLE DEL DÉFICIT DE VD DURANTE EL EMBARAZO

Las variables correspondientes a cada uno de los factores de riesgo fueron de nuevo introducidas en el programa estadístico para la construcción de un modelo multivariante con finalidad predictiva mediante regresión logística binaria. Nuestro modelo de regresión múltiple explicaría el 46,5% de la varianza en el déficit de VD. La tabla 37 resume las variables incluidas en el modelo.

Tabla 37. Factores asociados al déficit de VD durante el embarazo. Análisis multivariante mediante modelo de regresión logística binaria

	Odd Ratio	IC 95%	p
Realización de actividad física	0,2	0,05 - 0,8	0,02
Fototipo oscuro	1,8	0,2 - 15,8	0,60
IMC materno > 25	19,5	2,2 - 176,0	0,01
Semestre de escasa exposición solar	5,5	1,7 - 17,4	0,01
Aporte total de VD	1,0	0,9 – 1,01	0,44

El sobrepeso materno (definido como IMC mayor de 25) y el periodo invernal actuaron como factores de riesgo para el déficit de VD, mientras que la realización de actividad física regular actuó como factor protector. Ninguna de las variables relacionadas con el aporte exógeno de VD (dieta y/o empleo de suplementación o aporte total de VD) se perfiló como relevante en el modelo para padecer déficit de VD durante el embarazo. Tampoco se observó un efecto independiente de la tonalidad de piel sobre el riesgo de padecer déficit de VD en el embarazo.

La figura 58 refleja mediante un “forest plot” el papel de cada uno de los factores de riesgo analizados

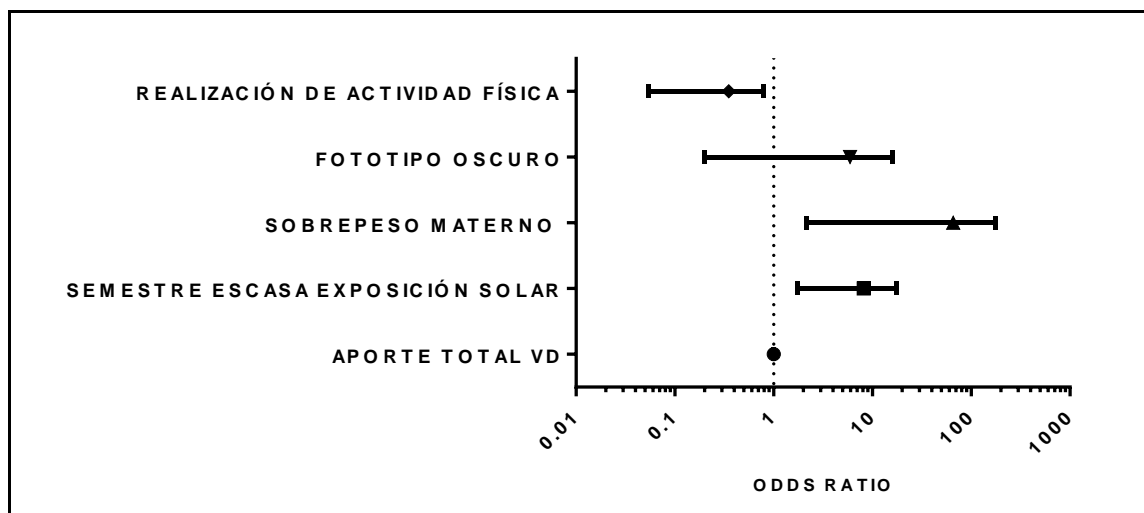


Figura 58. Papel de los distintos factores de riesgo de déficit de VD en la mujer embarazada

5.2.2.4 PATOLOGÍA MATERNA ASOCIADA AL DÉFICIT DE VD

Los valores medios de 25(OH)VD de nuestra serie no han presentado variaciones estadísticamente significativas entre las madres con patología obstétrica y aquellas que no presentaron ningún tipo de complicación durante el embarazo (ANOVA de un factor $F_3 = 1,5$; $p = 0,15$). Si comparamos los valores medios de calcidiol entre los diferentes grupos (Figura 59) podemos observar que, en las dos madres con preeclampsia, estos se encuentran muy disminuidos (8,7 ng/ml), pero en la comparación con el valor medio de 25(OH)VD de las gestantes sin patología asociada (15,8 ng/ml) no se alcanza la significación estadística (t Student para muestras independientes $t_{85} = 1,5$; $p = 0,15$).

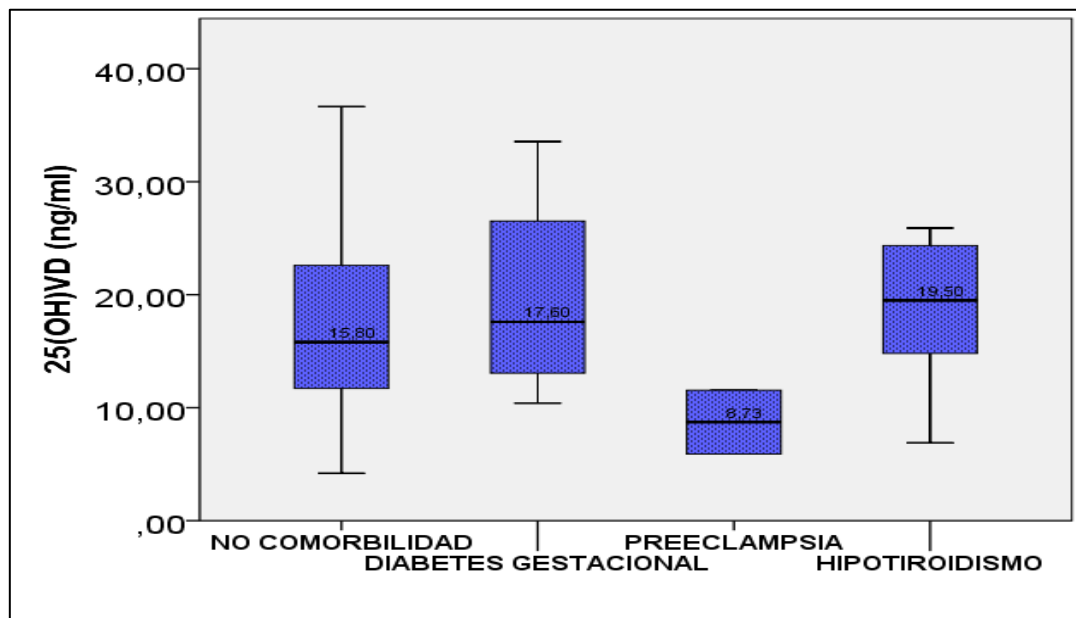


Figura 59. Valores medios de 25(OH)VD durante el embarazo en relación con la comorbilidad gestacional asociada

5.2.2.5 TIPO DE PARTO Y NIVELES DE 25(OH)VD

No se observaron variaciones significativas en el tipo de inicio del parto ni en la finalización de este en relación con los niveles maternos de 25(OH)VD, sin observarse un incremento del riesgo de cesárea frente al parto vaginal en las madres deficitarias de nuestra muestra [OR = 1,01; IC 95% (0,93 – 1,08)].

5.2.2.6 ANTROPOMETRÍA DE LOS RECIÉN NACIDOS Y NIVELES MATERNOS DE 25(OH)VD

En nuestro estudio no hemos encontrado asociación entre los valores maternos medios de VD o en el momento del parto y los diferentes parámetros de somatometría analizados en el recién nacido (peso, longitud y perímetro craneal al nacimiento), tanto en valores absolutos como en los Z-scores correspondientes a la edad gestacional) (Tabla 38).

Tabla 38. Correlación bivariada entre valores maternos de 25(OH)VD y somatometría de los recién nacidos

	Asociación	Coefficiente correlación Pearson	p
VALORES MATERNOS PARTO	25(OH)VD - Peso nacimiento	-0,10	0,42
	25(OH)VD - Longitud nacimiento	-0,20	0,08
	25(OH)VD – Perímetro craneal nacimiento	-0,12	0,31
	25(OH)VD – Z-score (peso)	-0,02	0,85
	25(OH)VD – Z-score (longitud)	-0,14	0,24
	25(OH)VD – Z-score (perímetro craneal)	-0,11	0,37
MEDIA DE LOS VALORES MATERNOS	25(OH)VD - Peso nacimiento	-0,02	0,83
	25(OH)VD - Longitud nacimiento	-0,10	0,39
	25(OH)VD – Perímetro craneal nacimiento	-0,05	0,66
	25(OH)VD – Z-score (peso)	0,01	0,96
	25(OH)VD – Z-score (longitud)	-0,04	0,73
	25(OH)VD – Z-score (perímetro craneal)	-0,07	0,56

Si valoramos el estado de suficiencia de VD durante el embarazo, los valores medios de peso, longitud y perímetro craneal no difieren entre ambos grupos, ni tampoco se observa un

incremento significativo de la incidencia de recién nacidos con bajo peso para la edad gestacional en el subgrupo de madres con deficiencia (25(OH)VD < 20 ng/ml); de hecho, en nuestra serie, el porcentaje de recién nacidos con un peso inferior al percentil 10 es mayor entre las madres suficientes (29,0%) que entre las insuficientes (11,9%) (Tabla 39).

Tabla 39. Comparación entre los valores medios de somatometría de los recién nacidos y el estado de suficiencia o insuficiencia materna de VD

		Deficiencia VD Parto	Suficiencia VD Parto	p
	n	42	31	
	%	57,5%	42,5%	
	\bar{x}	10,7 ± 5,0 ng/ml	25,4 ± 5,0 ng/ml	
Peso nacimiento (media ± DE)		3234 ± 408	3142 ± 537	0,41
Longitud nacimiento (media ± DE)		49,8 ± 2,0	48,9 ± 2,3	0,08
PC nacimiento (media ± DE)		34,0 ± 1,4	33,7 ± 1,4	0,41
Bajo peso Edad Gestacional (%)		5 (11,9%)	9 (29,0%)	0,08

El peso al nacimiento de los hijos de madres con IMC > 25 ha sido significativamente mayor y, a su vez, el sobrepeso materno se ha demostrado como un factor de riesgo en el déficit de VD, de modo es que posible que se haya producido una anulación del efecto que ejercen ambos factores sobre el peso al nacimiento de los recién nacidos. Para averiguarlo, se realizó un estudio multifactorial de ambos sobre la variable resultado peso al nacimiento que demostró la ausencia de interacción (ANOVA multifactorial $F_{96,1} = 0,24$; $p = 0,62$), de modo que los hijos de madres con sobrepeso tienen un mayor peso al nacimiento con independencia de la situación materna de VD (Figura 60).

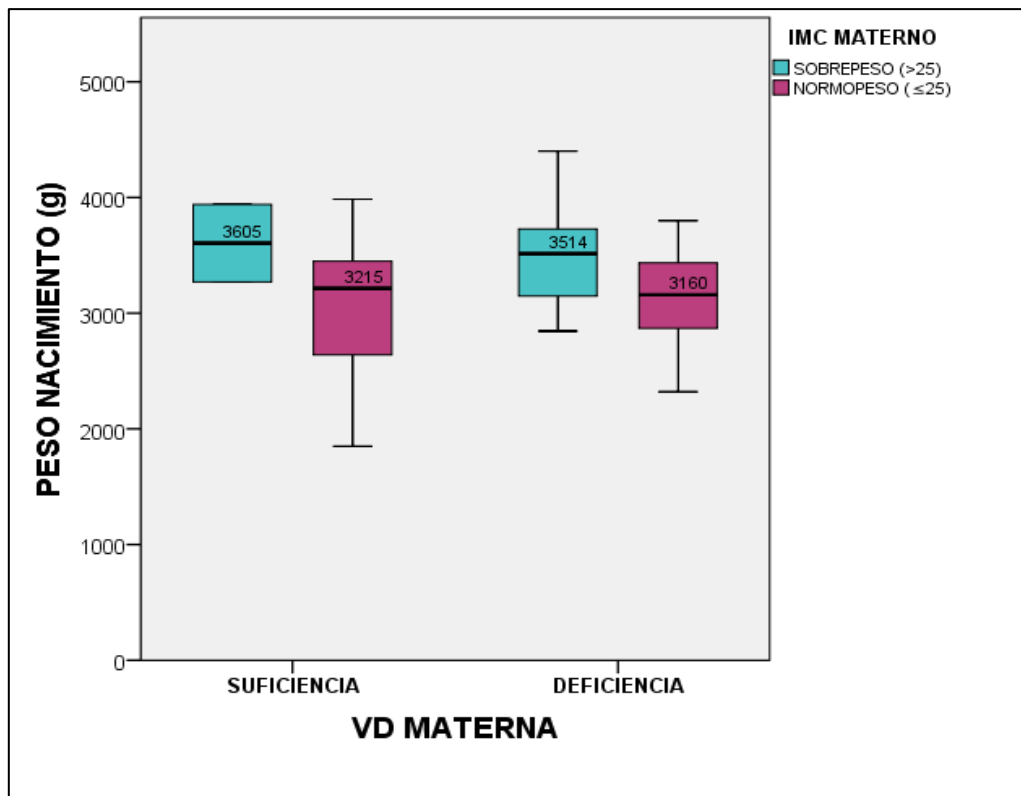


Figura 60. Peso al nacimiento en relación con el IMC pregestacional y estado materno de VD durante el embarazo

5.2.3 NIVELES EN LOS RECIÉN NACIDOS DE LAS HORMONAS CALCIOTROPAS Y DE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS DE MINERALIZACIÓN ÓSEA

Tras el parto, 65 muestras de sangre de cordón fueron aptas para su procesado y en 86 neonatos se obtuvo muestra sanguínea en el momento del alta, con una media de $56,1 \pm 19,7$ horas de vida. Se desestimaron para el estudio estadístico los valores bioquímicos y hormonales de las muestras de cordón de los hijos de madres en la que la determinación en el momento del parto ofreció dudas de procesado (ver apartado 5.2.1), por lo que finalmente los valores medios en sangre de cordón están referidos a $n = 59$. Los distintos parámetros bioquímicos y hormonales en el recién nacido aparecen resumidos en la Tabla 40.

Tabla 40. Resumen descriptivo de los valores de hormonas calciotropas y parámetros bioquímicos asociados a la homeostasis mineral del recién nacido en sangre de cordón y analítica de las primeras horas de vida

	25(OH)VD (ng/ml)		PTH (pg/ml)		Calcio (mg/dl)		Calcio corregido* (mg/dl)		Fósforo (mg/dl)		Fosfatasa Alcalina (UI/L)		Proteínas Totales (g/dl)		Albúmina (g/dl)	
	SANGRE CORDÓN N=59	RECIÉN NACIDO N=86	SANGRE CORDÓN N=59	RECIÉN NACIDO N=62	SANGRE CORDÓN N=59	RECIÉN NACIDO N=86	SANGRE CORDÓN N=59	RECIÉN NACIDO N=86	SANGRE CORDÓN N=59	RECIÉN NACIDO N=86	SANGRE CORDÓN N=56	RECIÉN NACIDO N=86	SANGRE CORDÓN N=59	RECIÉN NACIDO N=86	SANGRE CORDÓN N=59	RECIÉN NACIDO N=86
Media	19,7	15,7	Cifras indetectables en 55 determinaciones Intervalo de los valores determinados [3-21] pg/ml	44,7	10,2	9,5	10,4	9,6	5,2	6,7	170,0	184,0	5,6	6,2	3,6	3,9
Median a	18,1	15,2		38,0	10,4	9,4	10,6	9,6	5,2	6,6	160,5	178,0	5,7	6,1	3,6	3,9
DE	10,4	8,5		29,4	1,0	0,7	1,0	0,6	0,7	1,0	61,1	48,2	0,7	0,5	0,4	0,3
Mínimo	4,2	4,2		3	5,1	7,8	6,1	8,0	2,8	3,7	94	102	2,6	5,1	1,7	3,2
Máximo	43,9	42,1		126	12,3	11,0	12,1	11,4	7,2	9,3	445	328	7,7	7,4	4,7	4,6

(*) Calcemia (mg/dl) + [4-Albúmina (g/dl)] x 0,8

Entre los cambios que se observan en las determinaciones analíticas de sangre de cordón y las del recién nacido destaca un descenso en los valores de calcio y calcidiol, un incremento de la fosfatemia y de las concentraciones proteicas y valores de PTH detectables. El recién nacido presenta en sangre de cordón unos valores proteicos (tanto de proteínas totales como de albúmina) similares a los simultáneos maternos en el momento del parto, aunque el coeficiente de linealidad no alcanza la significación estadística (Figura 60). Tras el nacimiento, se produce una pérdida de agua orgánica -que se estima es de aproximadamente un 10% en estos recién nacidos- y proporcionalmente se produce una hemoconcentración que puede ser estimada por el incremento de concentración proteica (que pasa de $5,6 \pm 0,7$ g/dl a $6,2 \pm 0,5$ g/dl de proteínas totales y de $3,6 \pm 0,4$ g/dl a $3,9 \pm 0,3$ g/dl de albúmina). Esta hemoconcentración contrarresta parcialmente el descenso de 25(OH)VD y de calcio (que probablemente es más acentuado que el observado) e incrementa el aumento de fosfatemia. El aparente ligero aumento de la cifra de FA posiblemente se deba a la disminución de la volemia y no a un incremento real de este parámetro.

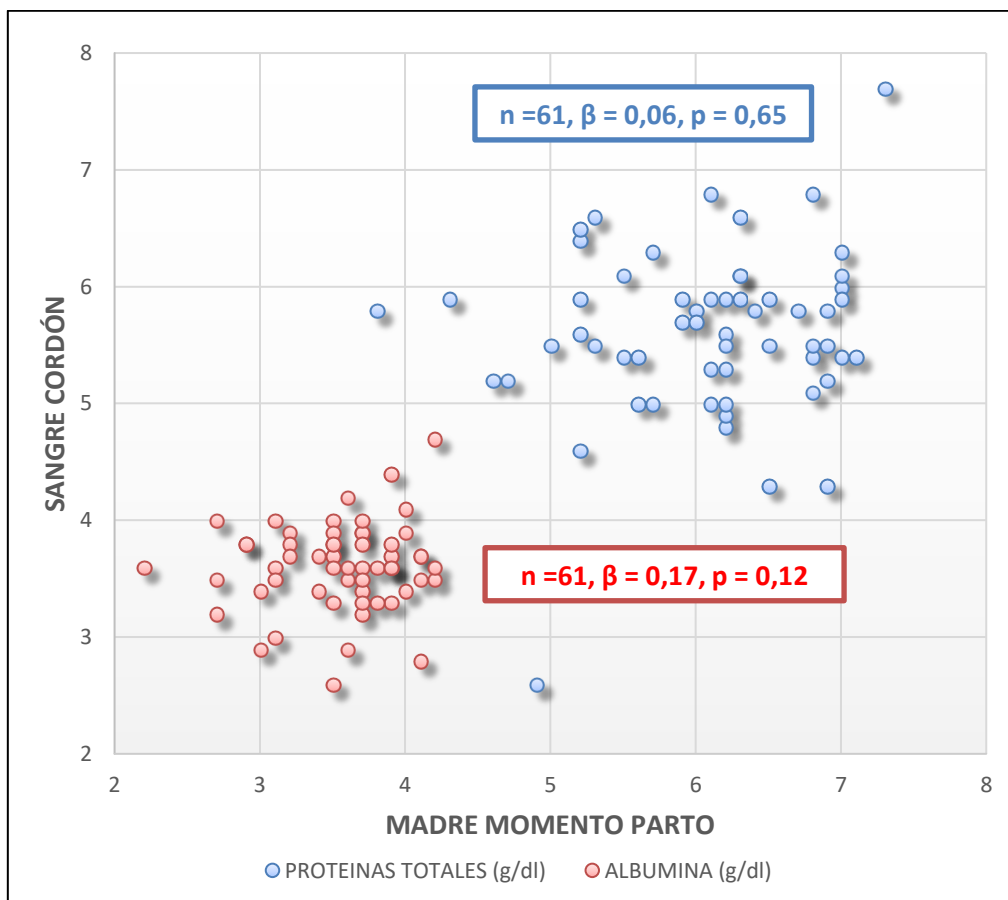


Figura 61. Correlación entre valores maternos y en sangre del cordón del recién nacido de proteínas totales y albúmina

5.2.3.1 CORRELACIÓN CON LOS VALORES MATERNOS Y EVOLUCIÓN TEMPORAL

5.2.3.1.1 Calcio, Fósforo y PTH

Los valores medios de calcio ($10,2 \pm 1,0$ mg/dl) y fósforo ($5,2 \pm 0,7$ mg/dl) en sangre de cordón son significativamente mayores a los valores maternos en el momento del parto, como corresponde a la situación de transporte activo transplacentario de ambos minerales (Ohata, 2016). La PTH no cruza la placenta y la existencia de una situación de “hipercalcemia fetal relativa” condiciona la inhibición de la glándula paratiroidea fetal, tal y como lo demuestra el hecho de que en la mayoría de las muestras de sangre de cordón (55 de 59) existían valores indetectables ($< 2,5$ pg/ml) de esta hormona y, en el resto, las determinaciones fueron inferiores a 25 pg/ml.

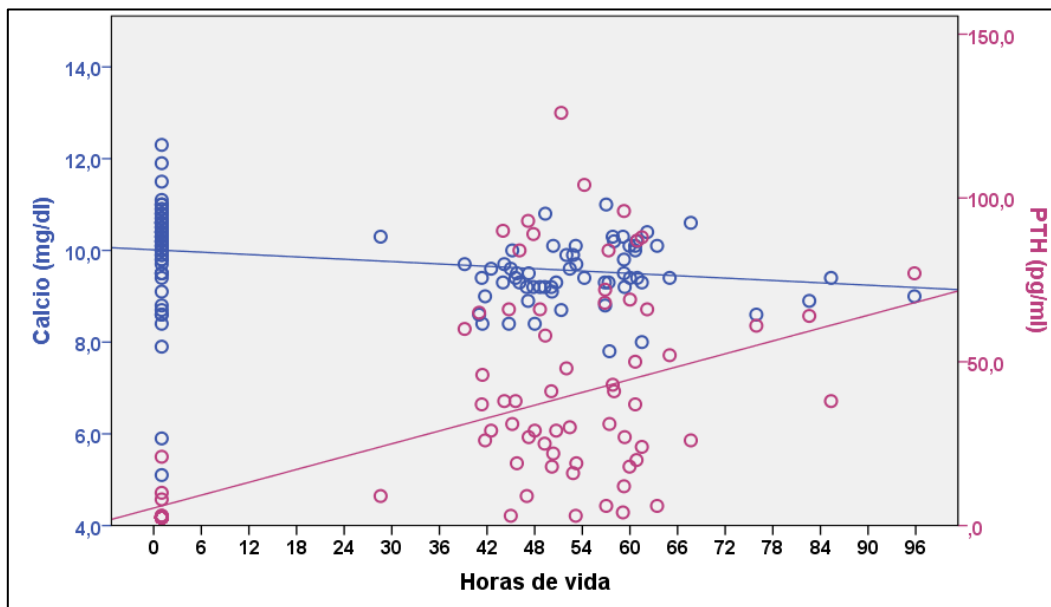


Figura 62. Evolución en los valores de calcio y hormona paratiroidea de los recién nacidos según horas de vida.

Tras el nacimiento, se interrumpe el transporte activo transplacentario de calcio, lo que condiciona una disminución progresiva de sus niveles (nadir 24-48 horas) a la que acompaña una elevación en los niveles de hormona paratiroidea con el fin de mantener estables los niveles séricos de calcio (Figura 62). En nuestra muestra de recién nacidos, el valor medio de calcio disminuyó hasta 9,5 (DE 0,7) mg/dl con un registro mínimo de 7,8 mg/dl y el valor medio simultáneo de la PTH se situó en 44,7 (DE 29,4) pg/ml. De hecho, se objetivó una correlación

lineal negativa significativa entre la concentración de calcio en el recién nacido y los niveles simultáneos de PTH (Correlación de Pearson $r = -0,42$; $p < 0,01$) (Figura 63).

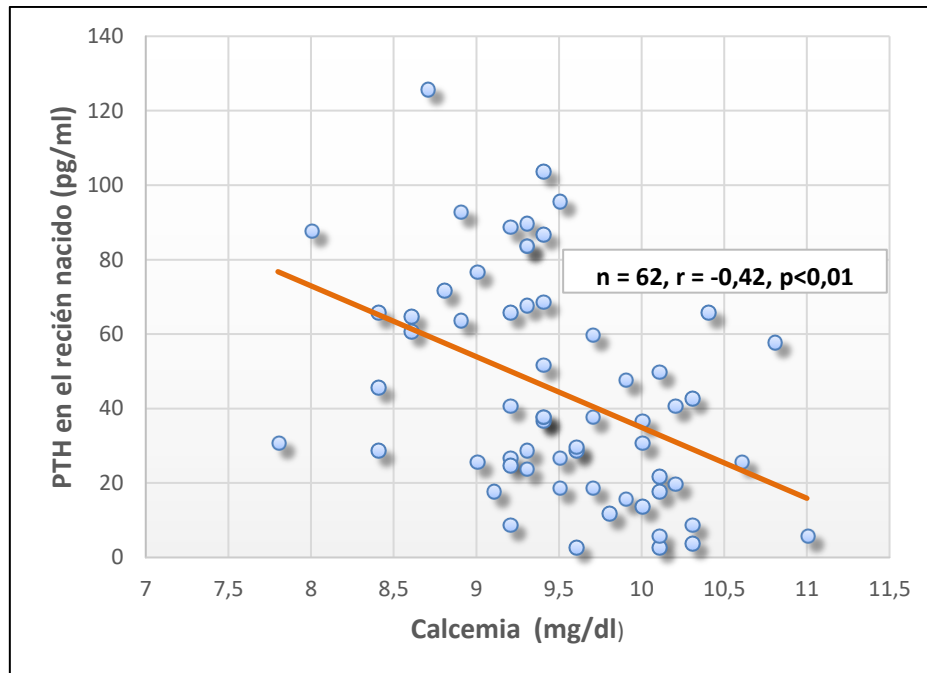


Figura 63. Niveles de calcio (mg/dl) y PTH (pg/ml) en los recién nacidos tras el parto

Por otra parte, los valores de fósforo en el recién nacido también experimentaron una discreta elevación durante las primeras horas de vida y pasaron de $5,2 \pm 1,0$ mg/dl a $6,7 \pm 0,7$ mg/dl, favorecida por el incremento de la PTH y por la coexistencia de diversos procesos adaptativos (inicio de la gluconeogénesis, disminución de la tasa de filtrado glomerular o incremento de la hemólisis) (Namgung, 2011).

5.2.3.1.2 Fosfatasa alcalina

El valor medio de FA en el recién nacido en sangre de cordón fue de $170,0 \pm 61,1$ UI/L que, pese a ser un valor muy similar a la media de las determinaciones maternas en el momento del parto ($172,1 \pm 56,0$ UI/L), no demostró una correlación lineal significativa con este último ($n = 60$; $r = 0,02$; $p = 0,86$). El valor medio FA del recién nacido experimentó una elevación significativa a las 48-72 horas de vida con un valor medio de $184,0$ UI/L (DE: $48,2$), existiendo una correlación lineal entre ambos ($r = 0,58$; $r^2 = 0,34$; $p < 0,01$). No se demostró relación entre ninguno de los 2

valores neonatales de FA y el déficit materno de VD o nivel de PTH; tampoco existieron diferencias significativas en los valores de FA neonatal en relación con el género o tipo de parto.

5.2.3.1.3 Vitamina D

En cuanto a los valores de VD en el recién nacido, el valor medio de calcidiol en sangre de cordón ha sido de 19,7 ng/ml (DE 10,4), lo que supone un incremento del 16,6% respecto al materno. Se observa una correlación entre los valores maternos en el momento del parto y los de la sangre del cordón (coeficiente de correlación $r = 0,868$; $r^2 = 0,764$; $p < 0,001$) (Figura 64). En nuestra muestra el hábito tabáquico materno no pareció influir sobre el transporte transplacentario de VD y no se observaron diferencias significativas entre los valores medios de calcidiol en sangre de cordón de los hijos de madres fumadoras y los de madres no fumadoras durante el embarazo (t Student muestras independientes $t = -0,76$; $p = 0,45$).

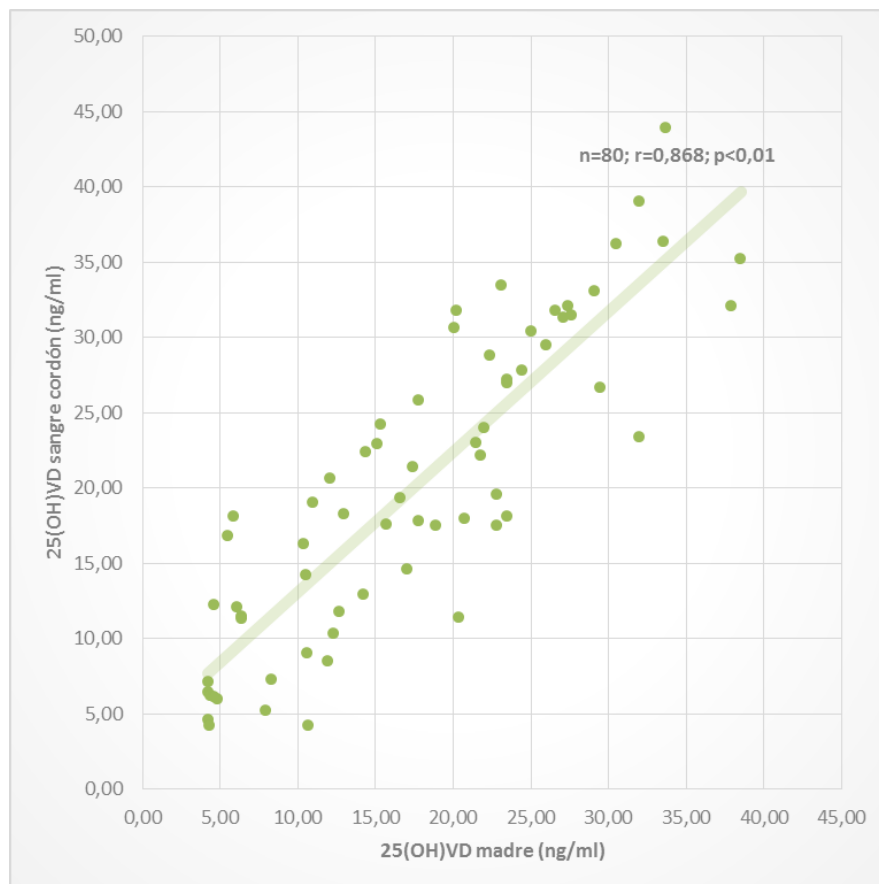


Figura 64. Correlación entre los valores de 25(OH)VD maternos en el momento del parto y los de la sangre de cordón

En relación con la evolución de los valores de 25(OH)VD, se objetiva un descenso del 22,3% en el momento del alta respecto a los de sangre de cordón (valor medio de $15,7 \pm 8,5$) (Figura 65).

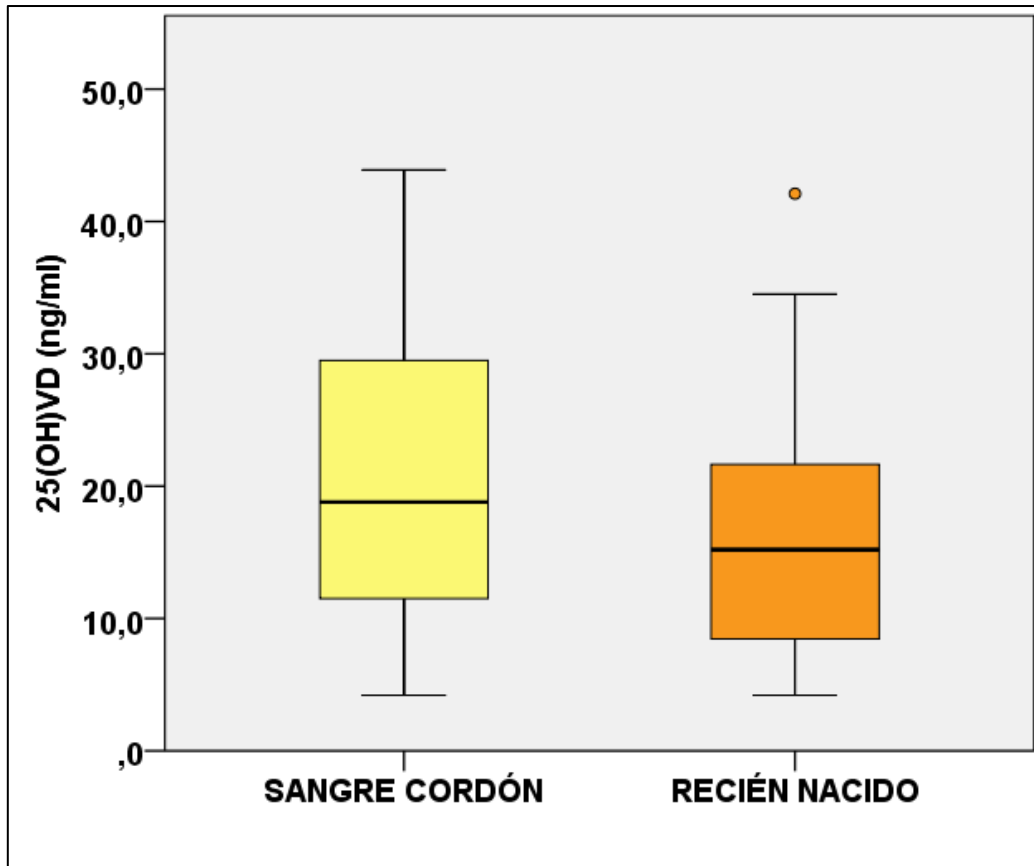


Figura 65. Descenso en los valores de 25(OH)VD de los recién nacidos durante las primeras horas de vida

5.2.3.2 INFLUENCIA DEL ESTADO MATERNO DE VD SOBRE EL RESTO DE LOS PARÁMETOS BIOQUÍMICOS DEL METABOLISMO MINERAL DEL RECIÉN NACIDO

No guardaron correlación significativa los valores de VD en sangre materna en el momento del parto ni los del recién nacido a partir de las 48 hora de vida con ningún otro parámetro bioquímico del metabolismo mineral en el recién nacido (Tabla 41).

Tabla 41. Correlación entre los valores de 25(OH)VD en las madres en el momento del parto y en los recién nacidos por encima de las 48 horas de vida y los niveles de calcio, fósforo y fosfatasa alcalina del recién nacido

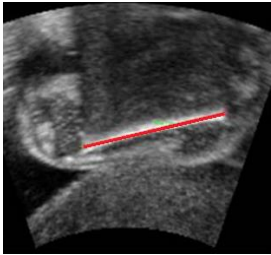

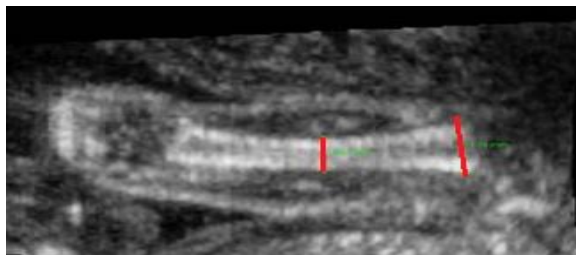
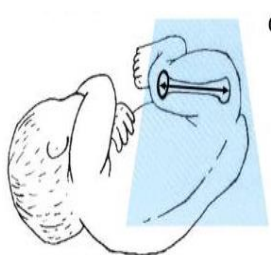
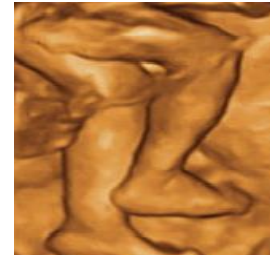
		SANGRE DE CORDÓN			RECIÉN NACIDO > 48 HORAS DE VIDA		
		Calcio (mg/dl)	Fósforo (mg/dl)	FA (UI/L)	Calcio (mg/dl)	Fósforo (mg/dl)	FA (UI/L)
25(OH)VD MADRE PARTO (ng/dl)	r	0,08	-0,09	-0,09	0,11	0,16	-0,21
	p	0,54	0,50	0,50	0,40	0,21	0,09
25(OH)VD RECIÉN NACIDO > 48 HORAS (ng/dl)	r	-0,01	-0,13	-0,11	-0,10	0,05	-0,19
	p	0,91	0,33	0,44	0,36	0,63	0,05

5.2.4 ESTUDIO MEDIANTE IMAGEN DE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA FETAL Y EN LOS RECIÉN NACIDOS

5.2.4.1 ESTUDIO ECOGRÁFICO FETAL

Se emplearon distintas mediciones ecográficas, tanto absolutas como relativas, del fémur fetal como indicadores indirectos del grado de mineralización (Tabla 42). Se comprobó la distribución normal de todos los parámetros y en el cálculo del volumen femoral (VF) se aplicó una transformación logarítmica (\log_{10}) para que la siguiese. Tras la reconstrucción tridimensional de las imágenes obtenidas, se logró la obtención de mediciones óptimas en 83 gestantes en la semana 20 y en 63 en la semana 34; en 55 embarazadas se obtuvieron datos en ambos estudios, permitiendo el análisis de la evolución temporal de los parámetros.

Tabla 42. Medidas ecográficas fetales de las extremidades distales en la semana 20 y 34 de embarazo

	LONGITUD FEMORAL (LF) cm		ÁREA METAFISARIA DISTAL (AMD) cm ²		DIÁMETRO FEMORAL MEDIO (DFM) mm		DIÁMETRO METAFISARIO PROXIMAL (DMP) mm		ÍNDICE DE ENSANCHAMIENTO (IE) $IE = AMD/LF$ cm ² /cm		VOLUMEN FEMORAL (VF) $VF = \frac{1}{3} * \pi * LF * (\frac{DFM^2}{2} + \frac{DMP^2}{4})$ ml	
												
	ECOGRAFÍA SEMANA 20 n=83	ECOGRAFÍA SEMANA 34 n=63	ECOGRAFÍA SEMANA 20 n=83	ECOGRAFÍA SEMANA 34 n=63	ECOGRAFÍA SEMANA 20 n=83	ECOGRAFÍA SEMANA 34 n=63	ECOGRAFÍA SEMANA 20 n=83	ECOGRAFÍA SEMANA 34 n=63	ECOGRAFÍA SEMANA 20 n=83	ECOGRAFÍA SEMANA 34 n=63	ECOGRAFÍA SEMANA 20 n=83	ECOGRAFÍA SEMANA 34 n=63
MEDIA	3,27	6,25	0,217	0,468	4,94	7,67	7,39	13,86	0,067	0,075	0,92	5,17
DE	0,27	0,30	0,087	0,171	0,97	1,25	1,02	1,60	0,027	0,027	0,28	1,21
RANGO	2,8 – 4,7	5,6 – 6,9	0,08 – 0,53	0,14 – 1,06	2,8 – 7,6	5,5 - 11,7	4,8 – 9,4	11,2 - 17,5	0,02–0,16	0,02-0,17	0,30 – 1,84	3,14 - 7,82
p*	< 0,01		< 0,01		< 0,01		< 0,01		0,03		< 0,01	

(*) Prueba t Student para muestras apareadas entre las mediciones ecográficas realizadas en la semana 20 y 34 de gestación

Todos los parámetros experimentaron variaciones significativas entre ambas mediciones. El valor medio de la longitud femoral [IC 95%] se incrementó desde 3,27 [3,21 – 3,33] cm en la semana 20 a 6,25 [6,18 – 6,33] cm en la semana 34; con unos valores medios asociados del área de la sección transversa metafisaria distal de 0,217 [0,198 – 0,236] cm² y 0,468 [0,425 – 0,511] cm² respectivamente, lo que supone doblar sus valores a lo largo de este periodo de 14 semanas. En cuanto al índice de ensanchamiento femoral (IE) se pasó de 0,067 [0,061 – 0,073] cm²/cm a las 20 semanas a 0,075 [0,068 – 0,081] cm²/cm a las 34 semanas, lo que supuso un incremento significativo en términos relativos (t Student para muestras apareadas p = 0,03), aunque no tan importante como en el resto de los parámetros. El VF (calculado a partir de las mediciones de la LF, DFM y DMP) se incrementó desde 0,92 [0,86 – 0,98] ml en la semana 20 a 5,18 [4,87 – 5,48] ml en la semana 34.

5.2.4.1.1 Correlación bivariada entre los indicadores ecográficos y factores demográficos de las embarazadas y los recién nacidos

Todas las mediciones realizadas fueron similares en ambos sexos tanto en la ecografía de la semana 20 como en la de la 34. Las Tablas 43 y 44 resumen el grado de correlación bivariada entre las medidas ecográficas y distintas variables independientes maternas y neonatales. En el estudio ecográfico de la semana 20 existe una asociación significativa entre la mayoría de las mediciones y el peso y longitud de los recién nacidos. En cambio, esta correlación no se observa en las mediciones posteriores llevadas a cabo en la semana 34. La antropometría materna (peso, altura e IMC) no parece guardar relación con los indicadores ecográficos de crecimiento y mineralización fetal y tampoco encontramos asociación entre el número de partos previos o el hábito tabáquico materno.

Tabla 43. Relación entre las mediciones ecográficas de la semana 20 de gestación y variables maternas y del recién nacido

	LF		AMD		IE		DMP		DFM		logVF	
	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r
Edad materna	0,37	0,10	0,22	0,14	0,30	0,12	0,82	0,03	0,98	-0,01	0,76	0,03
Altura	0,83	0,02	0,55	-0,07	0,56	-0,06	0,64	-0,05	0,95	-0,01	0,78	0,03
Peso	0,81	-0,03	0,93	0,01	0,90	0,01	0,67	-0,05	0,35	0,11	0,71	0,04
IMC	0,71	-0,04	0,73	0,04	0,66	0,05	0,71	-0,04	0,42	0,09	0,74	0,04
Paridad ^(a)	0,77		0,97		0,88		0,75		0,70		0,84	
Hábito tabáquico ^(a)	0,66		0,05		0,07		0,13		0,81		0,66	
Edad Gestacional	0,10	-0,19	0,89	-0,02	0,82	0,02	0,61	-0,06	0,04	-0,23	0,09	-0,19
Sexo RN ^(a)	0,51		0,09		0,09		0,71		0,99		0,74	
Peso RN	0,16	0,15	0,006	0,30	0,01	0,27	0,04	0,23	0,15	0,16	0,03	0,25
Longitud RN	0,20	0,14	0,01	0,28	0,03	0,24	0,11	0,18	0,28	0,12	0,08	0,20

La significación estadística (p) y el coeficiente de correlación de Pearson se derivaron del análisis de regresión lineal. Para las variables categóricas (a), el valor de p deriva de la prueba t Student para muestras independientes. Todas las mediciones ecográficas se realizaron durante la semana 20 de gestación, por lo que no han sido ajustadas a la EG.

Tabla 44. Relación entre las mediciones ecográficas de la semana 34 de gestación y variables maternas y del recién nacido

	LF		AMD		IE		DMP		DFM		logVF	
	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r
Edad materna	0,35	0,12	0,14	0,19	0,16	0,18	0,04	-0,27	0,12	0,37	-0,08	0,54
Altura	0,08	-0,23	0,78	0,03	0,56	0,08	0,48	-0,09	0,30	0,13	0,80	-0,03
Peso	0,16	0,18	0,34	0,12	0,44	0,10	0,44	-0,10	0,97	-0,01	0,82	-0,03
IMC	0,05	0,25	0,46	0,10	0,64	0,06	0,59	-0,07	0,65	-0,06	0,85	-0,02
Paridad^(a)	0,72		0,12		0,12		0,65		0,47		0,47	
Hábito tabáquico^(a)	0,74		0,91		0,89		0,20		0,45		0,29	
Edad Gestacional	0,63	-0,06	0,93	-0,01	0,93	-0,01	0,29	0,14	0,71	-0,05	0,02	0,85
Sexo RN^(a)	0,28		0,88		0,98		0,82		0,76		0,94	
Peso RN	0,21	0,16	0,61	0,07	0,81	0,03	0,21	0,16	0,06	0,63	0,16	0,21
Longitud RN	0,44	0,10	0,56	0,08	0,71	0,05	0,13	0,20	0,04	0,76	0,15	0,25

La significación estadística (p) y el coeficiente de correlación de Pearson se derivaron del análisis de regresión lineal. Para las variables categóricas (a) el valor de p deriva de la prueba t Student para muestras independientes. Todas las mediciones ecográficas se realizaron durante la semana 34 de gestación, por lo que no han sido ajustadas a la EG.

5.2.4.1.2 Influencia del estado materno de VD e ingesta dietética de calcio sobre las mediciones ecográficas fetales

No se encontró una correlación significativa entre los valores ecográficos de LF en la semana 20 o 34 los niveles maternos de 25(OH)VD de las analíticas más recientes (A1: $n = 60$; $p = 0,37$; $r = -0,12$ y A2: $n = 45$; $p = 0,84$; $r = -0,03$). Tampoco se encontró una asociación significativa con ninguno de los índices ecográficos relativos (IE y VF) ni en la semana 20 (Figura 66 y 67) ni en la 34 (Figuras 68 y 69).

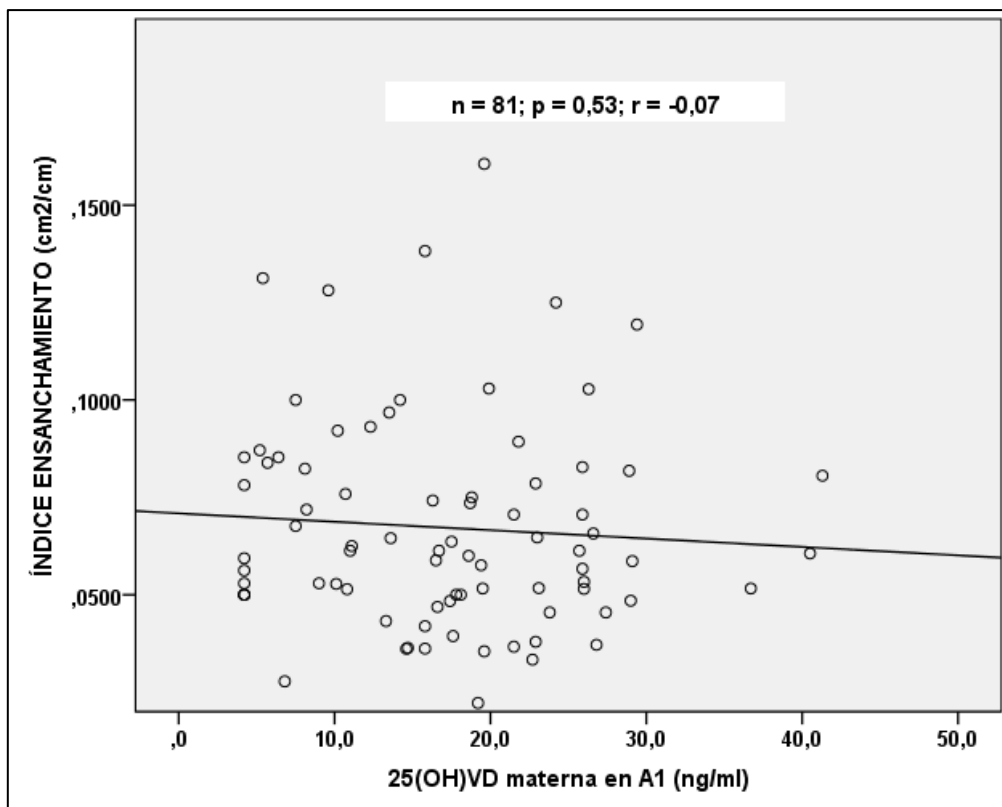


Figura 66. Correlación entre el índice de ensanchamiento femoral fetal en la ecografía de la semana 20 y el valor materno de 25(OH)VD en A1 (semana 23-26 de gestación).

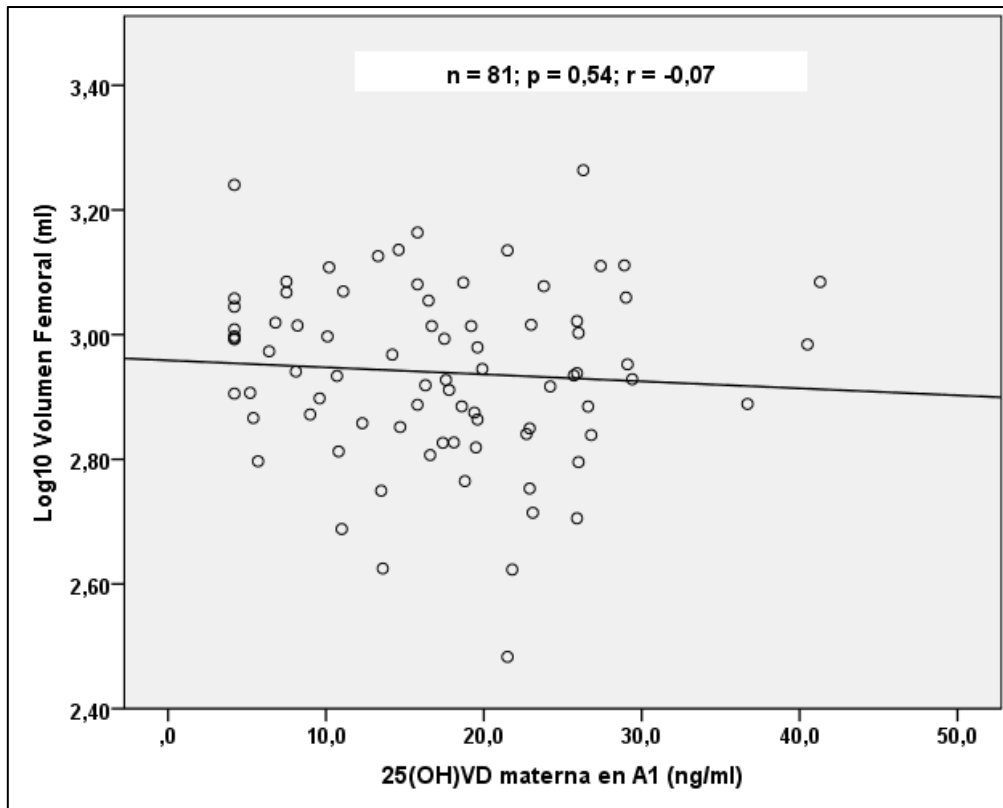


Figura 67. Correlación entre el volumen femoral fetal en la ecografía de la semana 20 y el valor materno de 25(OH)VD en A1 (semana 23-26 de gestación).

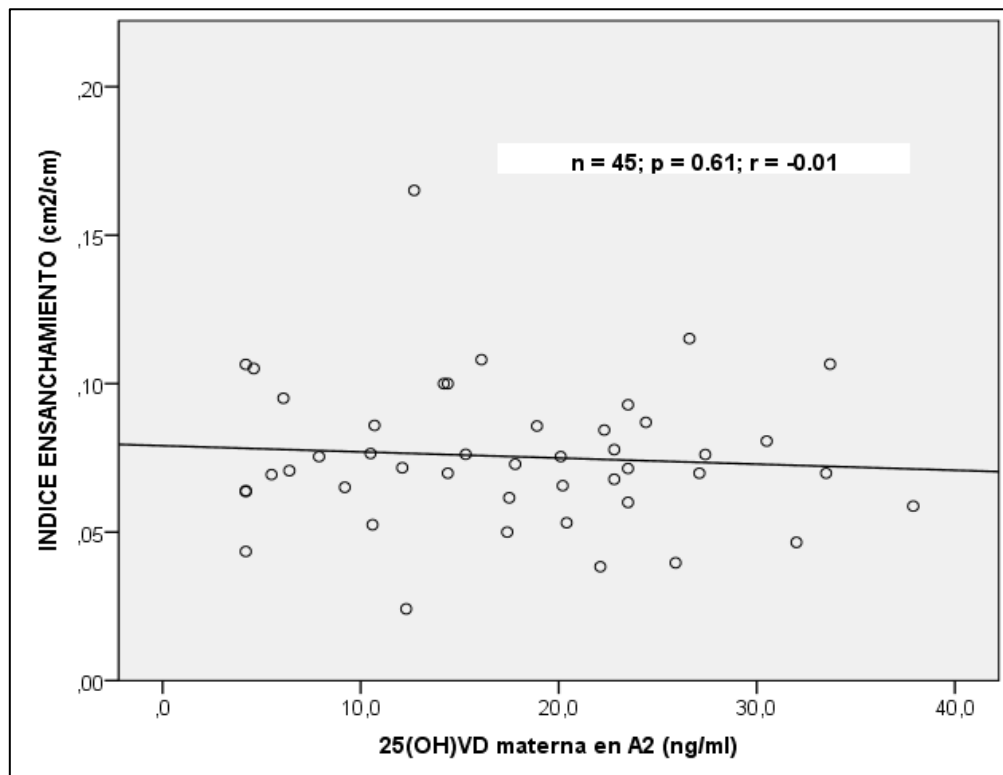


Figura 68. Correlación entre el índice de ensanchamiento en la ecografía de la semana 34 y el valor materno de 25(OH)VD en A2 (parto).

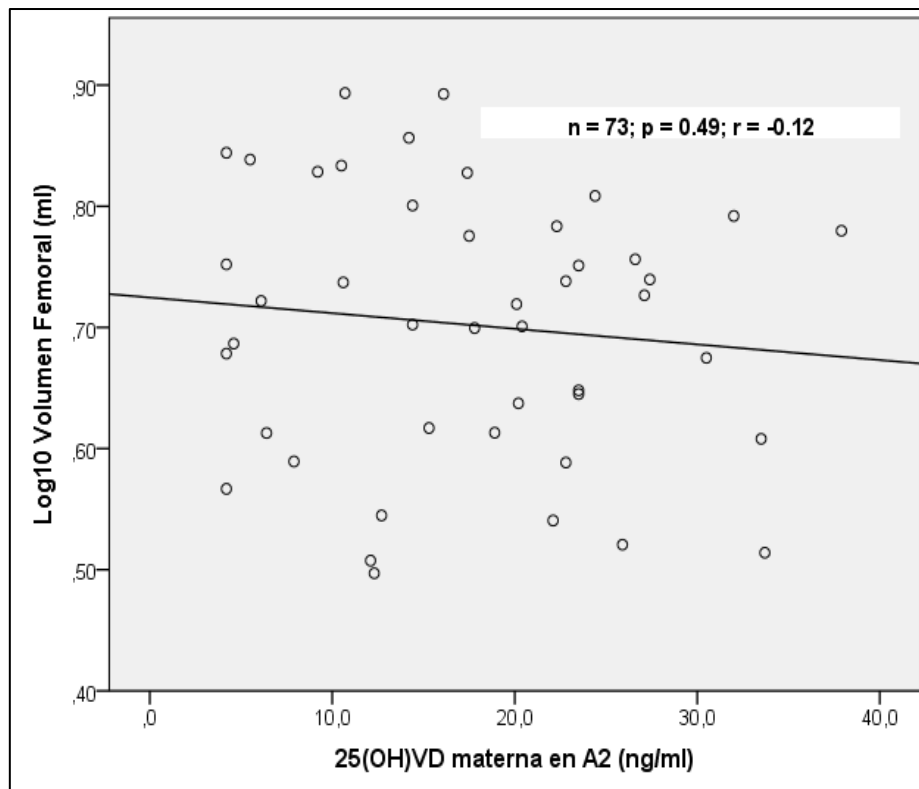


Figura 69. Correlación entre el volumen femoral fetal en la ecografía de la semana 34 y el valor materno de 25(OH)VD en A2 (parto).

Se trató de analizar la interacción del aporte dietético de calcio y los niveles maternos de VD sobre los indicadores ecográficos de crecimiento fetal. De forma similar a lo que posteriormente se observa en el estudio de la DMO (ver apartado 5.2.4.6), el análisis ANOVA factorial apunta hacia un posible efecto sinérgico de ambos factores de modo que, en el caso de la LF en la semana 20, el análisis independiente de los factores muestra escasa relevancia mientras que la interacción de ambos aumenta el estadístico de asociación, aunque sin alcanzar significación. Así, en el grupo de madres que refieren aporte dietético de calcio inferior a los 800 mg/día la LF pasa de 3,22 cm en el grupo de mujeres con déficit de VD a 3,32 cm en las que tienen niveles superiores a los 20 ng/ml (efecto principal sencillo $F = 2,4$; $p = 0,12$). Una tendencia similar también se intuye en el VF de la semana 34, aunque en sentido contrario (efecto principal sencillo del aporte de calcio superior a 800 mg/día en el grupo de mujeres con suficiencia de VD $F = 1,83$; $p = 0,182$). La Figura 70 resume de forma gráfica esta relación.

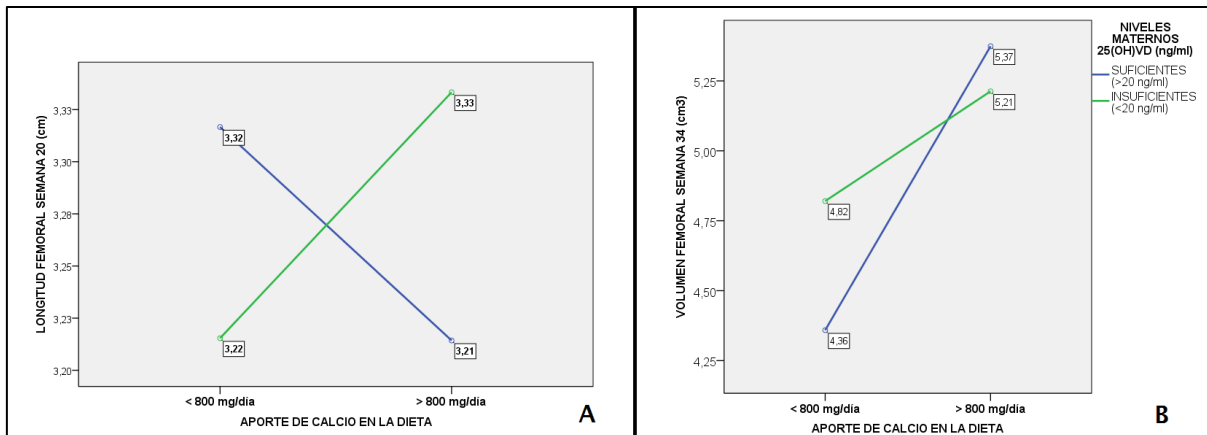


Figura 70. Interacción entre los valores maternos de 25(OH)VD y el aporte de calcio dietético referido en el estudio ecográfico de longitud femoral en la semana 20 (A) y volumen femoral en la semana 34 (B).

Con el objetivo de ahondar más en esta interacción entre el calcio dietético y los valores maternos de 25(OH)VD, dividimos a las madres del estudio en 3 grupos: suficiencia de VD, insuficiencia de VD con aporte dietético de calcio adecuado e insuficiencia de VD con aporte de calcio inadecuado. La comparación de medias para muestras independientes no mostró diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los parámetros estudiados.

5.2.4.2 VALORES NEONATALES DE DMO OBTENIDOS MEDIANTE DEXA

En los 95 estudios de DEXA realizados tras el nacimiento se obtuvo un valor medio de DMO (L1-L4) de $0,259 \text{ g/cm}^2$ (DE $0,052$) con un rango de valores comprendidos entre $0,129 - 0,360 \text{ g/cm}^2$. La mediana de días de vida en el momento de la realización del estudio es de 10 días. Los datos absolutos no mostraron variaciones de la DMO en los recién nacidos en relación con el sexo (t Student para muestras independientes $p = 0,89$). La tabla 45 resume los percentiles de DMO (g/cm^2) de los recién nacidos del estudio que sigue una distribución normal (Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra $p = 0,2$) (Figura 71).

Tabla 45. Valores medios \pm DE y percentiles de DMO (g/cm^2) en el estudio de columna lumbar (L1-L4) de los recién nacidos del estudio

	VARONES	MUJERES
n	52	43
Media \pm DE (g/cm^2)	0,258 \pm 0,048	0,260 \pm 0,058
Mediana (g/cm^2)	0,262	0,260
Rango (g/cm^2)	0,148 – 0,358	0,129 – 0,360
P3 (g/cm^2)	0,157	0,136
P10 (g/cm^2)	0,192	0,164
P25 (g/cm^2)	0,228	0,219
P50 (g/cm^2)	0,262	0,260
P75 (g/cm^2)	0,286	0,309
P90 (g/cm^2)	0,325	0,333
P97 (g/cm^2)	0,357	0,359

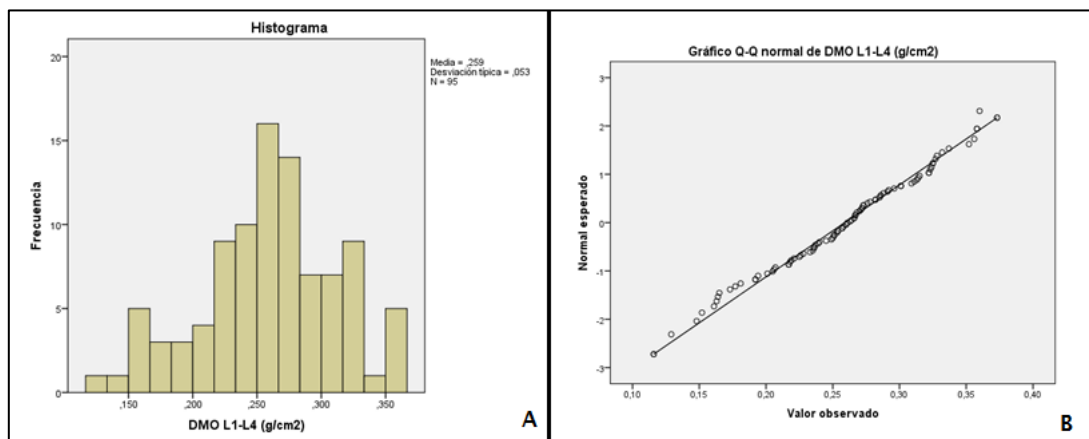


Figura 71(A) Histograma y (B) Gráfico Q-Q que muestran la distribución normal de las determinaciones de DMO (g/cm^2) mediante DEXA de los recién nacidos del estudio.

5.2.4.3 **CORRELACIÓN ENTRE LOS ÍNDICES ECOGRÁFICOS FETALES Y EL ESTUDIO DE DMO NEONATAL**

Para establecer comparaciones entre las medidas ecográficas y el valor de DMO obtenido tras el nacimiento hemos empleado los dos indicadores relativos por entender que aportan una mayor información sobre la fisiología ósea fetal. En el caso del índice de ensanchamiento (IE) traduce un estado de aumento del área metafisaria distal respecto a la longitud femoral total de forma similar a los cambios óseos observados en los casos de raquitismo carencial, donde el déficit de mineralización genera abombamiento metafisario. En el caso del volumen femoral (VF) o de su transformación logarítmica (logVF), el cálculo tridimensional derivado de 3 mediciones bidimensionales diferentes permite estimar, de forma más precisa, el crecimiento óseo fetal.

No se halló correlación lineal significativa entre el IE o el VF en la ecografía de la semana 20 o 34 de gestación y el valor de DMO a nivel lumbar (g/cm^2) de los lactantes determinado por densitometría tras el nacimiento (Tabla 46).

Tabla 46. Correlación entre el índice de ensanchamiento y el volumen femoral en las ecografías fetales de la semana 20 y 34 y el estudio de DMO a nivel lumbar de los recién nacidos

	ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL	ÍNDICE ENSANCHAMIENTO		VOLUMEN FEMORAL(Log10)	
		SEMANA 20 n = 78	SEMANA 34 n = 59	SEMANA 20 n = 78	SEMANA 34 n = 59
DMO nacimiento (g/cm^2)	p	0,40	0,73	0,65	0,34
	R	0,1	0,05	0,05	-0,13
	R ²	0,01	0,01	0,01	0,02

5.2.4.4 **CORRELACIÓN ENTRE LOS INDICADORES BIOQUÍMICOS Y HORMONALES Y EL GRADO DE MINERALIZACIÓN**

El análisis de correlación de Pearson no mostró una asociación significativa entre los valores de DMO neonatal y la concentración de FA a nivel de sangre de cordón ($r = 0,03$; $p = 0,82$) o en muestra sanguínea de los recién nacidos ($r = -0,17$; $p = 0,13$).

En cuanto a los niveles de VD, tampoco se demostró que los valores medios de DMO de los recién nacidos fuesen diferentes en relación con el estado materno en el momento del parto (0,251 g/cm² en las suficientes vs 0,261 g/cm² en las deficientes; t Student muestras independientes $p = 0,42$). La correlación entre DMO y los valores de calcidiol en las embarazadas fue muy escasa y no significativa ($r = 0,03$; $p = 0,78$).

5.2.4.5 INFLUENCIA DEL PESO DEL RECIÉN NACIDO SOBRE LOS RESULTADOS DE DMO AREAL

Sabemos que la propia técnica de absorciometría dual de rayos X para la obtención de los valores de DMO areal (en 2 planos) condiciona que el tamaño de hueso estudiado (y, por consiguiente, el peso de los recién nacidos) determine de forma importante el valor obtenido, llevando incluso a una interpretación errónea de los resultados (ver apartado en 1.1.5.1). Si se realiza un análisis estratificado del estudio de mineralización en relación con el percentil de peso al nacimiento, se observa una tendencia ascendente en los valores de DMOa a medida que aumenta el peso. Las diferencias entre los valores medios de todos los grupos no fueron estadísticamente significativas (ANOVA de 1 factor $F_{3,91} = 0,36$; $p = 0,78$), aunque sí cuando se compararon los valores medios de DMOa de los recién nacidos pertenecientes al 1º y 4º cuartil (t Student muestras independientes $p = 0,04$) (Tabla 47).

Tabla 47. Medias y DE de los valores de DMO a nivel lumbar en los recién nacidos incluidos en el estudio distribuidos por cuartiles de peso al nacimiento

CUARTIL DE PESO AL NACIMIENTO	N	Media DMO (g/cm ²)	DE
1 (PN < 2897 g)	25	0,246	0,067
2 (PN 2987 g – 3280 g)	23	0,260	0,066
3 (PN 3280 g – 3582 g)	25	0,261	0,037
4 (PN > 3582 g)	22	0,271	0,052

Diagrama de anotación: Una línea amarilla conecta un recuadro con $p = 0,04$ a un recuadro con $p = 0,78$, que a su vez apunta a las filas de los cuartiles 1 y 4 de la tabla.

Por ello, se realizó un segundo análisis con los valores maternos de calcidiol tras dividir a la muestra en cuartiles de peso al nacimiento. Como se observa en la figura 72 y la tabla 48, dentro de un mismo cuartil de peso, el estado materno de déficit de VD no influyó sobre el valor de DMO (L1-L4) del recién nacido (ANOVA multifactorial $F_{1,7}= 1,3$; $p = 0,23$).

Tabla 48. Valores de DMO L1-L4 de los recién nacidos en relación con el cuartil de peso al nacimiento y estado materno de suficiencia o deficiencia de VD (media \pm DE)

DMO L1-L4 (g/cm ²)	Cuartil de peso del recién nacido							
	1 (PN < 2897 g)		2 (PN 2987 g – 3280 g)		3 (PN 3280 g – 3582 g)		4 (PN > 3582 g)	
	SUFICIENCIA	DEFICIENCIA	SUFICIENCIA	DEFICIENCIA	SUFICIENCIA	DEFICIENCIA	SUFICIENCIA	DEFICIENCIA
	0,213 \pm 0,072	0,270 \pm 0,063	0,269 \pm 0,043	0,256 \pm 0,063	0,252 \pm 0,043	0,261 \pm 0,043	0,249 \pm 0,011	0,276 \pm 0,039

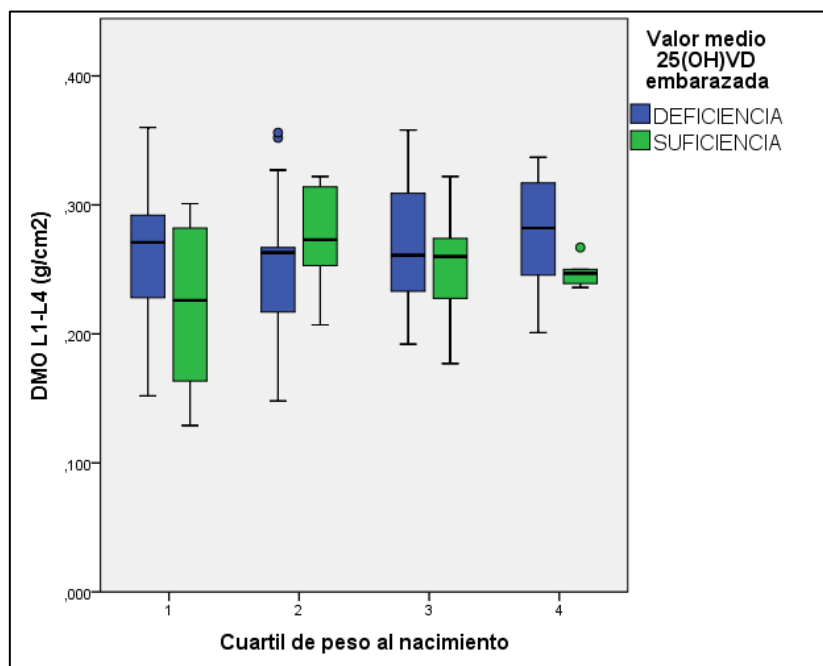


Figura 72. Valores de DMO (g/cm²) en los recién nacidos divididos según cuartil de peso al nacimiento en relación con el estado materno de suficiencia o insuficiencia de VD

La regresión lineal entre peso al nacimiento y DMO resulta significativa en la muestra total (n = 94; r = 0,24; p = 0,02) y al dividirla en dos grupos (suficiencia e insuficiencia materna de VD) se

objetiva un aumento del coeficiente de correlación en el grupo de las suficientes, aunque pierde la significación estadística por la reducción en el número de casos (Figura 73).

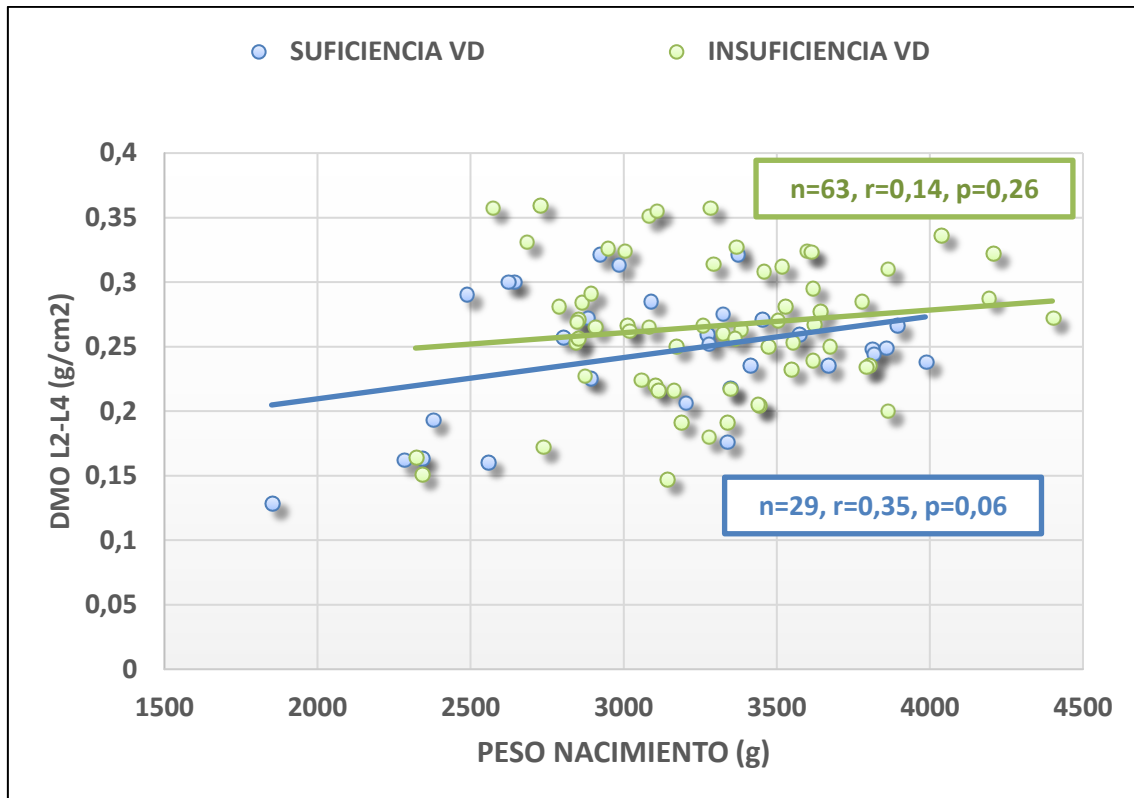


Figura 73. Regresión lineal entre peso de los recién nacidos y DMO lumbar en relación con el estado materno de VD

5.2.4.6 PAPEL DE LA DIETA MATERNA EN EL GRADO DE MINERALIZACIÓN DEL ESQUELETO FETAL

Basándonos en los resultados dietéticos de nuestra muestra de embarazadas y asumiendo que el elevado aporte de calcio de nuestra muestra ha podido minimizar los efectos del déficit de VD - pues en situaciones en las que predomina el alto aporte de calcio dietético la absorción intestinal se realiza por difusión pasiva sin necesidad de VD-, hemos tratado de estudiar el peso de esta asociación sobre el grado de mineralización fetal. Como se observa en la tabla 49 es la situación de suficiencia de ambos nutrientes la que proporciona un mayor grado de mineralización, aunque la comparación de medias entre los tres subgrupos no fue significativa (ANOVA de 1 factor $F = 1,69$; $p = 0,191$), ni tampoco el análisis entre la situación más favorable

(suficiencia de ambos nutrientes) y la más desfavorable (insuficiencia de ambos nutrientes), aunque en este caso casi se alcanzó la significación estadística ($p = 0,09$).

Tabla 49. Valores de DMO (g/cm^2) en relación con el déficit de calcio y/o VD

	N	DMO L1-L4 (g/cm^2)	ANOVA 1 Factor
DÉFICIT DE CALCIO Y VD	17 (22,7%)	0,253 ± 0,038	$p=0,191$
DÉFICIT AISLADO VD	57 (69,5%)	0,254 ± 0,053	
SUFICIENCIA DE CALCIO Y VD	8 (9,8%)	0,289 ± 0,062	

T Student muestras independientes

Finalmente, se trató de realizar una aproximación al papel que juega el aporte dietético de calcio sobre las madres con concentraciones deficitarias de 25(OH)VD durante el embarazo, ya que la mayor parte de los niveles de VD no depende del aporte nutricional, si no de la síntesis endógena. De nuevo, la combinación entre ambos factores da lugar a 4 posibilidades en las que los subgrupos con aporte dietético de calcio superior a las 800 UI/día son los que muestran mayores valores medios de DMO, sin parecer que el estado de suficiencia o deficiencia de VD juegue un papel determinante, ni tampoco su interacción con el aporte suficiente de calcio dietético. En concreto, si tomamos como referencia los valores promedios de 25(OH)VD para establecer la situación de déficit de VD durante el embarazo, se objetiva que el aporte suficiente de calcio obtiene mejores resultados en la DMO, aunque no significativos (ANOVA multifactorial $F_{1,3} = 2,6$; $p = 0,11$), mientras que el estado de VD no actúa como factor determinante (ANOVA multifactorial $F_{1,59} = 1,9$; $p = 0,17$), ni tampoco su interacción con el calcio (ANOVA multifactorial $F_{1,59} = 0,1$; $p = 0,82$) (Tabla 50).

Tabla 50. Grado de mineralización en relación con la situación materna de déficit de VD (basado en valores promedio de 25(OH)VD durante el embarazo) y el aporte de calcio dietético

		APORTE DIETÉTICO DE CALCIO (800 UI/día)	
		DEFICIENTE	SUFICIENTE
VALORES PROMEDIO ANALÍTICOS 25(OH)VD (ng/ml)	< 20 ng/ml	0,244 ± 0,047 (n = 15)	0,273 ± 0,053 (n = 44)
	≥ 20 ng/dl	0,226 ± 0,043 (n = 6)	0,248 ± 0,052 (n = 26)

Si realizamos esta misma comparación con los valores maternos de 25(OH)VD en el momento del parto, los resultados obtenidos son muy similares (ANOVA multifactorial $F_{1,3} = 2,9$; $p = 0,09$ para el aporte suficiente de calcio; $F_{1,3} = 0,2$; $p = 0,62$ para el déficit materno de VD y $F_{1,3} = 0,5$, $p = 0,48$ para la interacción de ambos factores) (Tabla 51)

Tabla 51. Grado de mineralización en relación con la situación materna de déficit de VD (basado en valores de 25(OH)VD en el parto) y el aporte de calcio dietético

		APORTE DIETÉTICO DE CALCIO (800 UI/día)	
		DEFICIENTE	SUFICIENTE
25(OH)VD EN EL MOMENTO DEL PARTO (A2) (ng/ml)	< 20 ng/ml	0,244 ± 0,047 (n = 15)	0,273 ± 0,053 (n = 44)
	≥ 20 ng/dl	0,226 ± 0,043 (n = 6)	0,248 ± 0,052 (n = 26)

5.2.5 FACTORES DETERMINANTES DEL DÉFICIT DE MINERALIZACIÓN NEONATAL

5.2.5.1 ANÁLISIS BIVARIABLE

Dado que no existen datos previos de referencia sobre DMO neonatal en nuestro entorno y la definición de un valor que defina el estado patológico en esta edad resulta controvertido por la ausencia del criterio clínico de fracturas asociadas, se ha establecido el valor medio de los 95 estudios realizados ($0,259 \text{ g/cm}^2$) como punto de corte para el análisis bivariado. Se analizaron por separado las distintas variables, empleando la prueba t Student para la comparación de medias entre ambos grupos y la prueba Chi-cuadrado para establecer diferencias entre porcentajes de las diferentes variables cualitativas.

Las madres de recién nacidos con valores de DMO lumbar inferiores a la media eran significativamente más jóvenes y poseían un menor IMC y porcentaje de sobrepeso, aunque en esta segunda asociación probablemente también esté influyendo el mayor peso al nacimiento de los hijos de madres con sobrepeso (ver apartado 5.1.3.5). En cambio, no se encontraron diferencias en cuanto al número de gestaciones, etnia materna, comorbilidad asociada o hábito tabáquico. Tampoco se observaron diferencias significativas en los aportes nutricionales de VD o calcio ni en los valores analíticos de 25(OH)VD ni PTH en el momento del parto (Tabla 52). En cuanto a la distribución estacional, el invierno fue la estación en la que existió un mayor porcentaje de recién nacidos con valores de DMO inferiores a la media (76,2%), siendo significativa esta diferencia cuando se compararon las diferentes estaciones entre sí (Chi cuadrado de Pearson $\chi^2= 11,6$; $p = 0,01$), pero no en la comparación agrupada por semestres (45,1% de los nacidos al final del verano tenían determinaciones inferiores a la media y el 50,0% de los nacidos al final del invierno, $p = 0,63$).

La tabla 52 también resume las diferentes características neonatales asociadas al déficit de mineralización ósea. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en relación con la edad gestacional, peso, longitud y perímetro craneal de los recién nacidos. No obstante, en el grupo de recién nacidos con bajo peso (<2500 g) el porcentaje de recién nacidos con DMO inferior a la media fue significativamente superior (85,7% vs 44,3% en los mayores de 2500 g; $p = 0,03$).

Tabla 52. Factores de riesgo del déficit de mineralización ósea neonatal

		DMO neonatal (L1-L4) (g/cm ²)		p
		Inferior a la media (DMO ≤ 0,259)	Superior a la media (DMO > 0,259)	
	%	47,4%	52,6%	
	\bar{x}	0,215	0,298	
	n	45	50	
Años madre (media ± DE)	95	30,3 ± 5,4 (n=45)	32,2 ± 4,0 (n = 50)	0,05
Madres menores 25 años (%)	95			0,01
Menores 25 años	9	88,9%	11,1%	
Mayores 25 años	86	43,0%	57,0%	
IMC (media ± DE)	95	22,7 ± 4,1 (n=45)	24,8 ± 5,2 (n = 50)	0,03
Sobrepeso materno (%)	95			0,03
IMC ≥ 25	27	29,6%	70,4%	
IMC < 25	68	54,4%	45,6%	
Etnia materna (%)	95			0,51
Caucásica	88	46,6%	53,4%	
Negra	1	100,0%	0,0%	
Árabe	5	40,0%	60,0%	
Otras	1	100,0%	0,0%	
Caucásicas (%)	95			0,59
Sí	88	46,6%	53,4%	
No	7	57,1%	42,9%	
Fumadoras (%)	95			0,95
No	55	45,5%	54,5%	
Previo a la gestación	14	50,0%	50,0%	
Durante la gestación	25	48,0%	52,0%	
Gestaciones (media ± DE)		1,91 ± 0,95 (n = 45)	1,86 ± 0,81 (n = 50)	0,78
Comorbilidad embarazo (%)	95			0,76
No	81	48,1%	51,9%	
Diabetes Gestacional	3	66,7%	33,3%	
Hipotiroidismo	9	33,3%	66,7%	
Preeclamsia	2	50,0%	50,0%	
Estación del parto (%)	95			0,01
Primavera	23	26,1%	73,4%	
Verano	31	48,4%	51,6%	
Otoño	20	40,0%	60,0%	
Invierno	21	76,2%	23,8%	
Semestre Parto (%)	95			0,63
Final de verano	51	45,1%	54,9%	
Final de invierno	44	50,0%	50,0%	
Aporte total VD (media ± DE)	77	246,2 ± 161,5 (n = 36)	279,0 ± 195,6 (n = 41)	0,43
Aporte suficiente de VD (%)	77			0,88
Insuficiente	68	47,1%	52,9%	
Suficiente	9	44,4%	55,6%	
Aporte calcio diario (media ± DE)	87	1297,3 ± 723,1 (n = 41)	1195,6 ± 455,4 (n = 46)	0,43
Aporte suficiente de Ca (%)	87			0,98
Insuficiente	19	47,4%	52,6%	
Suficiente	68	47,1%	52,9%	
Valor medio de 25(OH)VD materno (ng/ml) (media ± DE)	72	17,7 ± 7,4 (n = 33)	16,8 ± 7,5 (n = 39)	0,61
PTH parto (pg/ml) (media ± DE)	70	36,6 ± 23,4 (n = 31)	36,2 ± 26,9 (n = 39)	0,94
Edad Gestacional (días)	95	278,1 ± 11,3 (n = 45)	280,2 ± 8,4 (n = 50)	0,29
Sexo RN (%)	95			0,79
Varón	52	46,2%	53,8%	
Mujer	43	48,8%	51,2%	
Peso del RN (g) (media ± DE)	95	3188 ± 500 (n = 45)	3265 ± 451 (n = 50)	0,43
Bajo peso nacimiento (%)	95			0,03
Si (<2500 g)	7	85,7%	14,3%	
No (≥2500 g)	88	44,3%	55,7%	
Longitud del RN (cm) (media ± DE)	95	49,4 ± 2,1 (n = 45)	49,7 ± 2,2 (n = 50)	0,56
Perímetro craneal del RN (cm)	95	33,9 ± 1,4 (n = 45)	34,1 ± 1,4 (n = 50)	0,51

5.2.5.2 ANÁLISIS MULTIVARIABLE

En el análisis multivariante del estado de mineralización ósea se realizó a partir de un modelo de regresión logística bivariable estableciendo el estado de mineralización subóptima o deficitaria en aquellos valores de DMO lumbar inferiores al percentil 25 de nuestra muestra ($\leq 0,188 \text{ g/cm}^2$). Nuestro modelo de regresión múltiple explicaría el 25,5 % de la varianza en la mineralización deficitaria neonatal. La tabla 53 resume las variables incluidas en el modelo.

Tabla 53. Factores responsables del estado de mineralización ósea del recién nacido. Análisis multivariante

	Odd Ratio	IC 95%	p
Sobrepeso materno	0,38	0,07- 1,97	0,25
Edad materna ≤ 25 años	2,51	0,38 – 16,46	0,34
25(OH)VD en el momento del parto	0,90	0,82 – 1,00	0,04
Sexo del recién nacido	0,42	0,09 – 1,85	0,25
Bajo peso al nacimiento (<2500 g)	78,04	5,33 – 1141,61	0,01

El bajo peso de los recién nacidos fue el factor que más determinó la DMO a nivel de la columna lumbar, de forma que los recién nacidos con un peso inferior a 2500 g presentaron 78 veces más riesgo de que su valor de DMO lumbar fuese inferior al percentil 25. El valor de calcidiol de la madre en el momento del parto actuó como factor de protección débil para el déficit de mineralización de los recién nacidos (RR 0,9; IC 95% 0,8 – 1,0): por cada incremento de 1 ng/dl en el valor medio materno de VD se redujo en un 1% la probabilidad de que el valor de DMO fuese inferior al percentil 25. En cambio, las 2 características maternas vinculados a valores de DMO superiores en el análisis bivariable (sobrepeso y edad materna superior a los 25 años) no obtuvieron significación estadística en el modelo predictivo.

La Figura 74 resume de mediante un gráfico “forest plot” el riesgo relativo que representa cada uno de los dos factores analizados.

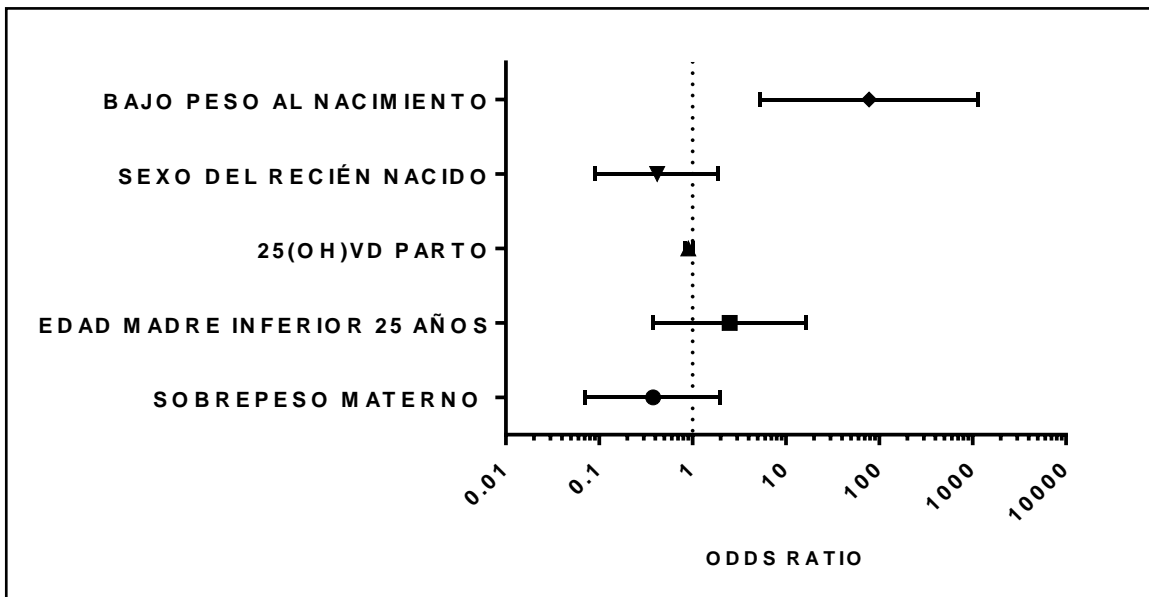


Figura 74. Factores de riesgo para el estado de mineralización subóptimo (inferior a p25) en el recién nacido.

6 DISCUSIÓN

Este es el primer estudio prospectivo llevado a cabo en nuestro país sobre prevalencia y factores de riesgo de déficit de VD en las embarazadas y su relación con la mineralización del esqueleto neonatal estudiado mediante densitometría. A nuestro juicio, el diagnóstico de osteopenia neonatal es más preciso de este modo, si se compara con el establecido mediante valoración clínica, analítica o a través de otros métodos de imagen.

6.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

La muestra de embarazadas estudiada no ha sido sometida a aleatorización, por lo que pudiera plantearse la existencia de algún tipo de sesgo de selección. No obstante, si comparamos las características de nuestra muestra con estadísticas poblacionales de nuestro entorno, no existen datos diferenciales especialmente llamativos.

6.1.1 DISTRIBUCIÓN TEMPORAL Y RECLUTAMIENTO

La distribución temporal de reclutamiento y, por consiguiente, la distribución estacional de los partos de nuestro estudio no sigue el patrón habitual de la Comunidad Valenciana. En nuestro caso, los meses centrales (estación estival) son los que han concentrado un mayor número de nacimientos, mientras que los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) en nuestra Comunidad para el año 2014 (<http://www.ine.es>) muestran un aumento del número de nacimientos durante los meses de Diciembre – Enero (Figura 75).

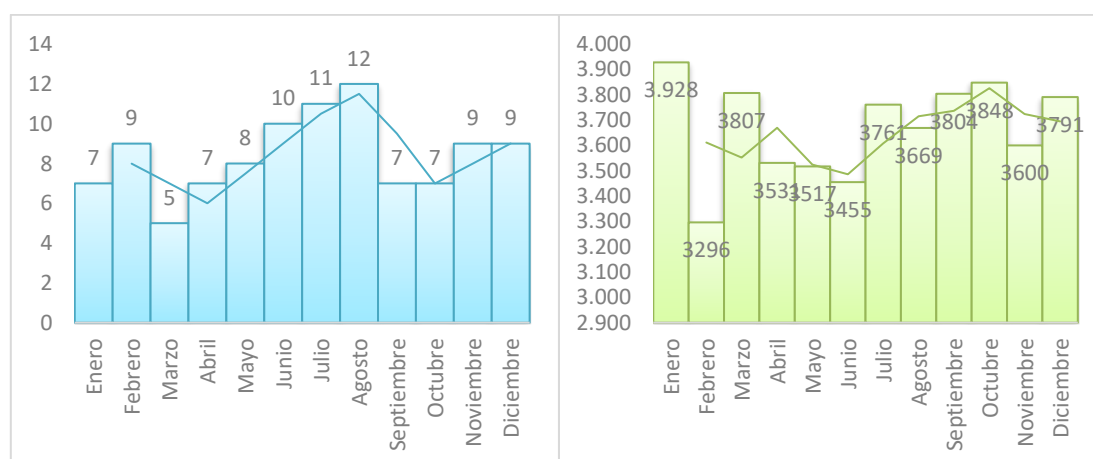


Figura 75. Comparación de la distribución mensual del número de partos de nuestro estudio (diagrama azul) y los datos del INE en la Comunidad Valenciana durante el año 2014 (diagrama verde)

6.1.2 DATOS DEMOGRÁFICOS

Según los datos publicados en el año 2013 por la Agencia Europea Euro-Peristat (European Perinatal Health Report) referentes al año 2010 (Zeitlin, 2013), la edad media al parto de las madres españolas es de 31,7 años, con un 29,5% de mujeres con una edad en el momento del parto igual o superior a los 35 años, siendo este porcentaje del 24,7% en nuestra muestra y la edad media al parto $31,5 \pm 4,8$ años.

Asimismo, y a pesar de que las gestantes de nuestro estudio han sido incluidas en base al ofrecimiento de participación realizado por las matronas de los diferentes centros de Salud, tampoco existen diferencias reseñables en los porcentajes de nivel de estudios. Según los datos del INE del año 2011, el porcentaje de mujeres españolas entre 25 y 34 años con estudios superiores alcanza el 47,5%, el 23,7% han completado estudios de secundaria y el 28,8% refieren estudios básicos. De este modo, cabe pensar que el nivel socioeconómico de nuestra muestra (con un 33% de las madres con estudios universitarios y un 45% con estudios de secundaria) no ha sufrido sesgo de selección.

Respecto al hábito tabáquico, nuestro estudio presenta un porcentaje de madres fumadoras del 27%, frente al 14% referido por el Euro-Peristat Health Report (Zeitlin, 2013), pero dado que, como luego comentaremos, no ha existido asociación de este factor con los niveles maternos de 25(OH)VD, no consideramos relevante esta diferencia.

6.1.3 DATOS OBSTÉTRICOS

En España, el 53% de las embarazadas son nulíparas, frente al 48% de nuestro trabajo. El informe sobre nacimientos del INE 2011 refiere, en el caso de los partos atendidos en Centros Hospitalarios de carácter público, un 63% de partos vaginales no instrumentados, un 14% de partos vaginales instrumentados y un 22% de cesáreas. En nuestros datos, el porcentaje de partos eutócicos es muy similar (66%), pero existe una reducción importante en el número de cesáreas (14%), que conlleva un aumento del porcentaje de partos instrumentados (20%). El menor número de cesáreas probablemente se deba en parte a los criterios de selección del estudio. Tampoco existen diferencias destacables en los valores medios de edad gestacional.

El porcentaje de madres de etnia no caucásica de nuestro estudio (7,9%) -y, por extensión, la presencia de fototipos de piel oscuros- es inferior al porcentaje de mujeres inmigrantes en edad

fértil que existen en las comarcas del estudio (aproximadamente un 10%) y al porcentaje de partos en madres extranjeras (de diferente nacionalidad o etnia) acontecidos en España y que se sitúa en un 24% (Zeitlin, 2013). Este hecho se debe a la ausencia de aleatorización para la obtención de la muestra de embarazadas, que eran derivadas por las matronas desde los Centros de Atención Primaria tras ofrecer la participación en el estudio. Es posible que las dificultades idiomáticas, de transporte y la mayor demora en la atención sanitaria gestacional de las mujeres inmigrantes hayan dificultado su inclusión y ser motivo de sesgo. Por ser la población árabe la que constituye el grueso de las mujeres de etnia no caucásica (5/7) se estudiaron sus características frente al resto de embarazadas caucásicas. Como ya se ha referido en trabajos previos, la somatometría de estos recién nacidos no difiere de forma significativa de la del resto de recién nacidos del estudio (García-García, 2008), aunque el peso al nacimiento de los recién nacidos árabes fue mayor (3615 g vs 3280 g, $p = 0,05$). A diferencia de otros trabajos llevados a cabo en embarazadas extranjeras en España (Domingo, 2008; García-García, 2008; Valverde, 2015), no hemos encontrado que la edad media de estas madres sea inferior a la de las caucásicas ni que sus recién nacidos presenten diferencias en cuanto a la edad gestacional. En cambio, sí que resulta llamativo el hecho de que el IMC de las embarazadas árabes sea superior al del resto de las madres.

6.1.4 ANTROPOMETRÍA Y ALIMENTACIÓN DE LOS RECIÉN NACIDOS

En general, no hemos encontrado diferencias importantes respecto a la somatometría de los recién nacidos de nuestro trabajo y los diferentes registros poblacionales. El peso y la longitud de nuestros recién nacidos son muy similares a los referidos en el Informe Salud de la Comunidad Valenciana para el año 2014 (3236 \pm 488 g y 49,3 \pm 2,4 cm respectivamente) y, de hecho, la media de los percentiles de ambos parámetros tomando como referencia el *Estudio Transversal Español de Crecimiento 2010* (Carrascosa, 2011) presenta un valor cercano al percentil 50. Según este mismo informe, en el 2014, el 3,8 % de los recién nacidos fueron pequeños para la edad gestacional, un porcentaje muy similar al obtenido en nuestro trabajo (4%). En el ámbito nacional, para el año 2015 el INE aporta un porcentaje de recién nacidos con un peso menor de 2500 g en el grupo de 37 o más semanas del 5,5% (6,9% en nuestro caso).

La realización del estudio de DMO mediante DEXA dentro de los primeros 14 días de vida (mediana 10 días) permite considerar que el tipo de alimentación de los recién nacidos no ha jugado un papel importante en los resultados obtenidos, aunque nuestro porcentaje de

lactancia materna exclusiva al alta (64%) haya sido inferior al de otros centros hospitalarios de nuestro entorno (Rius, 2014).

6.1.5 ESTUDIO NUTRICIONAL: DATOS APORTADOS SOBRE CONSUMO DE VD Y CALCIO. EMPLEO DE SUPLEMENTACIÓN

Existen diversos métodos para estudiar la ingesta individual de alimentos, aunque ninguno está universalmente aceptado. La mayoría de los trabajos toman como referencia los diarios dietéticos o registros de 24 horas (que suelen realizarse durante 3-5 días), pues reflejan de forma más ajustada a la realidad el consumo individual de nutrientes, aunque la obtención de datos fiables depende en gran medida de la calidad del registro y de la extrapolación adecuada a los programas dietéticos informáticos.

En cambio, los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) permiten la aproximación a los hábitos nutricionales poblacionales, pero no siempre aportan datos fiables sobre la ingesta individual de un determinado nutriente, pues en las respuestas subjetivas se tiende a sobrestimar el consumo de aquellos nutrientes que el individuo encuestado percibe como “beneficiosos para la salud”. Su ventaja principal radica en la sencillez y en alto grado de cumplimentación.

En nuestro trabajo, la correlación entre ambos procedimientos de recogida de datos para el consumo nutricional de VD fue escasa. En cambio, en el estudio llevado a cabo por Hacker-Thompson en el año 2011 en una muestra de mujeres postmenopáusicas del Norte de California, sí que se observó una buena correlación entre el CFCA y el registro de 3 días ($r = 0,43$; $p = 0,001$), aunque, al igual que en nuestro caso, el CFCA reportó datos de consumo de VD superiores a los obtenidos mediante el registro de 3 días (179 ± 112 UI/día vs 97 ± 77 UI/día; $p < 0,001$).

En el estudio del perfil nutricional resulta fundamental considerar el aporte exógeno que supone la toma de suplementación (cuyo porcentaje alcanza el 57,1% en nuestra muestra), de modo que en el estudio del déficit materno de VD nos referiremos al aporte diario total de VD, incluyendo, en las gestantes que los toman, las 200 UI/día que aportan la mayoría de los complejos vitamínicos. El porcentaje de suplementación durante el embarazo varía en función de la población estudiada y, en general, aumenta entre las mujeres que no realizan un aporte dietético suficiente. En la mayoría de los trabajos realizados en Norteamérica o Europa el porcentaje se sitúa, al igual que en nuestro caso, por encima del 50%: 80% en la serie finlandesa

de Viljakainen del año 2010 y 97% entre las gestantes canadienses con restricción en el aporte de leche o 54% en el resto (Mannion, 2006). En cambio, en otros países, el porcentaje es muy inferior: 12% y 36% en estudios llevados a cabo en los Emiratos Árabes e Irán respectivamente (Hussein, 2016; Sabour, 2006).

En nuestros datos del registro de 3 días destacan unas ingestas de calcio (1216 ± 598 mg/día) que superan a las recomendadas (RDA 1000 mg/día), pero deficientes en VD (150 ± 158 UI/día exclusivamente dietéticas y 367 ± 162 UI/día totales). En nuestro estudio, un 67,1% de embarazadas tenían aportes totales de VD inferiores al 80% del RDA de 600 UI/día y en el 20,7% ($n = 17$) el déficit de VD se asoció con un aporte de calcio inadecuado (< 800 mg/día). Estos datos son muy similares a los reportado por nuestro país al proyecto internacional "OPTIFORD: Towards a strategy for optimal vitamin D fortification" en mujeres adolescentes y de edad avanzada (Rodríguez, 2010), pero difieren en lo relativo al calcio del informe de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) para el año 2011 en el subgrupo de mujeres entre 25 y 44 años (851 ± 299 mg/día de calcio y 141 ± 136 UI/día de VD).

Dado que las gestantes pueden presentar patrones nutricionales diferentes a los de la población general, hemos comparado nuestros resultados con los de trabajos que hayan valorado el aporte de VD y calcio durante el embarazo. La mayoría describen aportes totales de VD similares a los nuestros (369 ± 224 UI/día en el estudio danés de Jensen, 2012) o discretamente superiores: 316 UI/día en las gestantes con aporte lácteo insuficiente y 524 UI/día en resto en la serie de Mannion y cols. y 412 ± 4 UI/día en el Estudio Camden llevado a cabo en New Jersey (2001-2006; $n = 2,251$) (Scholl, 2008). En ambos casos, el porcentaje de madres que cumplían las recomendaciones también fue muy bajo y se estableció el aporte total de VD como predictor significativo del peso al nacimiento ajustado por edad gestacional (dicha asociación no ha sido demostrada en nuestro caso). El trabajo de Viljakainen del año 2010 es el que refiere los valores más altos de aporte total de VD (572 ± 232 UI/día), probablemente condicionado por haberse realizado en Finlandia. En un estudio reciente del Hospital del Mar en Barcelona sobre la frecuencia de consumo semanal de alimentos que contienen calcio y VD, calculan, mediante el empleo de la Encuesta Nutricional de Garabédian (Manzano, 2017), que el aporte exclusivamente dietético de VD en las embarazadas de etnia caucásica es 148 ± 70 UI/día - muy similar al de nuestro trabajo-, con un coeficiente de correlación entre la ingesta de VD y los valores de 25(OH)VD en sangre de cordón débil pero significativo ($r = 0,29$; $p < 0,005$). En cambio, el aporte de calcio es inferior al nuestro (759 ± 361 mg/día).

De hecho, uno de los aspectos que más llama la atención de nuestros resultados es el elevado consumo medio de calcio, también observado en otros estudios en los que las mujeres embarazadas refieren una ingesta de calcio superior a la del resto de población. Así, en el trabajo de Ortiz-Andrellucchi realizado en el año 2009 en las Islas Canarias sobre una muestra de 103 gestantes de 18-40 años, la ingesta media diaria de calcio fue de 2056 ± 756 mg/día -incluso por encima de la de nuestro estudio- y el porcentaje de madres con una ingesta inadecuada fue muy similar al nuestro (21%). De igual forma, diversos trabajos en países desarrollados que emplearon el CFCA aportan cifras de consumo de calcio durante el embarazo que se encuentran en el intervalo normal-alto: 950 ± 275 mg/día en Reino Unido (Leary, 2005), 1298 ± 582 mg/día en EEUU (Lagiou, 2005), o 1256 ± 577 mg/día en Canadá (Waiters, 1999). Asimismo, se ha demostrado que, dentro de una misma población, las mujeres embarazadas reportan un mayor aporte dietético de calcio que los controles emparejados por edad (1600 ± 51 mg/día vs 839 ± 44 mg/día) (Cross, 1995).

Consideramos que el elevado aporte de calcio de las gestantes del estudio ha podido actuar como “factor neutralizador” y minimizar los efectos del nivel bajo de calcidiol. La VD favorece la absorción de calcio en aquellos casos en los que la ingesta dietética se encuentra en el intervalo normal-bajo, mediante la activación de los mecanismos de transporte transcelular. En nuestra muestra es posible que el transporte mediante difusión pasiva, paracelular, que es un mecanismo independiente de la VD, haya sido importante, lográndose alcanzar unos niveles óptimos de calcemia en las embarazadas, un transporte transplacentario suficiente y una adecuada mineralización del esqueleto fetal. Este efecto protector de la ingesta elevada de calcio ha sido apuntado recientemente por un trabajo llevado a cabo en Irlanda (O’Brien, 2018). Se trata de un estudio prospectivo de 205 mujeres. En comparación con las gestaciones estivales, durante el invierno las embarazadas presentaron unos valores de VD significativamente menores y un incremento de los marcadores de resorción ósea (excreción urinaria del *extremo N-terminal de los telopéptidos del colágeno de tipo I*, NTXu). En esta relación, la ingesta de calcio actuó como factor protector de manera que, en comparación con la ingesta de calcio referida ≥ 1000 mg/día, la < 1000 mg/día se asocia con un mayor incremento en el NTXu (41,8 vs 0,9%), mientras que el calcio dietético adicional se asocia con una reducción de la resorción ósea en el final del embarazo, con un mayor efecto observado en invierno.

A la vista de estos resultados, consideramos que las 17 embarazadas de nuestro estudio que, a pesar de tener en cuenta aportes totales, presentaban un déficit combinado de ambos nutrientes debían ser estudiadas de forma individualizada en el análisis posterior de los efectos que ocasiona sobre el metabolismo fosfo-cálcico y la mineralización ósea.

6.2 EVOLUCIÓN DURANTE EL EMBARAZO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HORMONAS CALCITROPAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO FOSFOCALCICO

Durante el embarazo y la lactancia, si se mantiene un aporte dietético adecuado, se producen una serie de cambios adaptativos en el metabolismo mineral de la gestante que la proveen de los minerales necesarios para afrontar los procesos de crecimiento fetal y producción de leche sin requerir suplementación mineral ni comprometer la salud del hueso materno a largo plazo.

6.2.1 NIVELES DE CALCIO Y FÓSFORO

Al contrario de lo descrito en la literatura (Reddy, 1983; Ardawi, 1997), no observamos una disminución significativa en los valores de calcio y fósforo a lo largo de la gestación, posiblemente porque la primera determinación se realizó más allá de la primera mitad del embarazo y la segunda sólo 12-15 semanas después. No obstante, en algunos trabajos tampoco se observa este descenso (Saggese, 1991; Zsimevich, 2017).

Aunque el conjunto de procesos metabólicos acontecidos durante el embarazo y destinados a la formación de los tejidos fetales harían esperar un descenso marcado en los niveles séricos del calcio materno, los estudios descriptivos han mostrado que la disminución significativa de calcemia que se produce durante la primera mitad del embarazo se recupera parcialmente en la segunda mitad (Figura 76.A) y que los niveles plasmáticos del fósforo sérico siguen un patrón similar (Figura 76.B) (de Toro, 1999; Cross 1995).

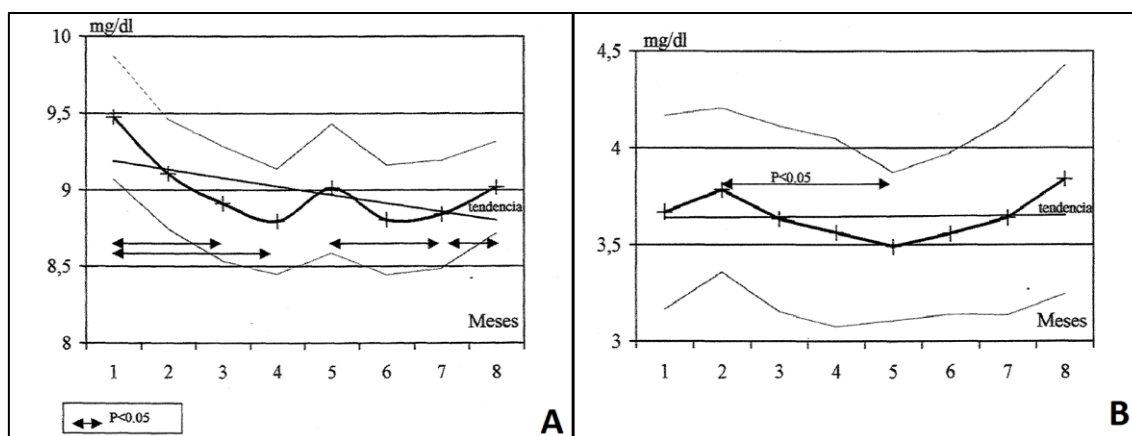


Figura 76. Evolución durante la gestación, el parto y el postparto normales del calcio (A) y del fósforo (B) (media \pm DE). Se representan los valores cuyas diferencias son estadísticamente significativas. Tomado de: de Toro A et al ⁽¹²³⁾.

Es importante tener en cuenta que, en la mayoría de los trabajos, lo que se determina es el calcio total en sangre materna sin diferenciar entre el calcio iónico y el calcio unido a las proteínas sanguíneas, sobre todo a la albúmina. Estas proteínas experimentan un descenso durante el embarazo y es precisamente esta situación de hipoalbuminemia gestacional la que parece ser la responsable en gran medida, si no de forma completa, del descenso en la calcemia (de hecho, en nuestro caso, el valor del calcio corregido experimentó incluso un discreto aumento desde 8,9 mg/dl en A1 a 9,2 mg/dl en A2). Así, diversos autores apuntan que los niveles de calcio en la gestante dependen más de los cambios generales metabólicos que se producen durante este período (aumento de la volemia, del FGR, del anabolismo proteico, etc.) que de alteraciones propias en el metabolismo del catión (Reitz, 1977; Reynolds, 1981). Sus trabajos demuestran que el calcio iónico no sufre prácticamente variaciones en la gestación, mientras que el calcio total desciende de manera paralela a la albúmina. Nuestro trabajo presenta la limitación de no haber determinado los valores de calcio iónico para corroborar este aspecto, pero el mantenimiento del nivel de la calcemia corregida apunta en este sentido.

6.2.2 FOSFATASA ALCALINA

El aumento de valores maternos de FA que muestra nuestro estudio es un hecho ampliamente descrito y que se debe, por una parte, a la síntesis placentaria de FA y, por otra, al incremento de la actividad osteoblástica durante el embarazo, secundaria a las fluctuaciones en el volumen

óseo esponjoso: en las semanas inmediatamente posteriores a la concepción se produce una pérdida de hueso trabecular que se encuentra totalmente restaurado al término del embarazo (Shahtaheri, 1999).

El estudio finlandés de Viljakainen (n = 125) es uno de los pocos trabajos en el que se empleó, para el estudio del metabolismo óseo durante el embarazo, marcadores bioquímicos específicos de remodelado. Se determinó en dos momentos del embarazo y en sangre de cordón la concentración de *fosfatasa alcalina ósea* (BALP) y de la *isoforma 5b de la fosfatasa ácida resistente al tartrato* (TRAP5b) como indicadores de la actividad de los osteoblastos y osteoclastos respectivamente. Se observa que ambos marcadores se incrementan durante el embarazo y que también se encuentran elevados en sangre del cordón. Existe una correlación significativa entre ellos en las tres determinaciones, apuntando hacia un equilibrio entre formación y resorción ósea. No obstante, el patrón en sangre de cordón se intuyó diferente al de las madres, con un incremento relativo de los marcadores de formación con respecto a los de resorción, por lo que en el trabajo no queda bien establecido qué relación existe entre el recambio óseo materno y el fetal. En este estudio no se demostró una asociación entre la condición materna de VD o PTH y los parámetros bioquímicos de remodelado óseo, salvo que la ingesta total materna de VD se correlacionó de manera negativa con la concentración umbilical de TRAP5b ($r = -0,25$; $p < 0,05$).

En nuestro caso, existe una limitación en el estudio del metabolismo óseo a través de los marcadores bioquímicos ya que tan sólo ha sido valorada la fosfatasa alcalina total. Se confirma, al igual que en la cohorte finlandesa, un aumento significativo en los valores de FA entre los 2 momentos gestacionales estudiados.

6.2.3 VITAMINA D

6.2.3.1 MODIFICACIONES INDIVIDUALES DURANTE LA GESTACIÓN

En general, no existen razones fisiológicas que justifiquen variaciones relevantes en los niveles de calcidiol durante el embarazo, más allá de la estacionalidad o las modificaciones en el estilo de vida vinculadas a la propia gestación (ver tabla 13 del apartado 1.3.1).

En nuestro caso los valores de calcidiol no experimentaron modificaciones significativas durante la gestación entre las 12-15 semanas que separaron ambas determinaciones analíticas. En

estudios que han reportado varias determinaciones durante el embarazo, si se suprime el factor de la estacionalidad, la tendencia observada es similar, lo que hace que, en términos generales, se acepte el empleo del valor medio de 25(OH)VD para el estudio de aquellos factores de riesgo vinculados al déficit de VD.

En una serie europea se recogieron muestras coincidiendo con los primeros meses del año y en el segundo día postparto (octubre-diciembre). Los valores fueron de 16 ng/ml y 18 ng/ml respectivamente, lo que implicó solo un discreto incremento (Viljakainen, 2010). En otro estudio llevado a cabo en Oslo, se demostró que, tras controlar el efecto de la estacionalidad, los valores medios de 25(OH)VD no experimentaron variaciones significativas entre la determinación analítica de la semana 15 (20 ± 11 ng/ml) y la de la semana 28 de gestación (24 ± 12 ng/ml) (Eggemoen, 2016). Finalmente, un trabajo polaco en 37 mujeres tampoco mostró variaciones significativas en los niveles de 25(OH)VD entre el primer trimestre de embarazo (21 ± 9 ng/ml), segundo trimestre (24 ± 11 ng/ml), tercer trimestre (22 ± 11 ng/ml) o en el momento del parto (22 ± 9 ng/ml). Los niveles medios de VD durante la estación estival (abril-septiembre) fueron significativamente mayores en el primer ($p < 0,01$) y segundo trimestre ($p < 0,05$), pero no en el tercero (Zasimovich, 2017).

6.2.3.2 ESTACIONALIDAD Y EXPOSICIÓN SOLAR

En nuestra casuística, el factor que más influyó en la variación de los niveles de 25(OH)VD fue la estacionalidad de modo que, las determinaciones realizadas en verano u otoño (precedidas de meses con un número elevado de horas diarias de sol) fueron significativamente mayores que las de invierno o primavera. Con la inclusión mensual aleatoria de las madres en el estudio se ha conseguido obtener una muestra representativa en ambos semestres, permitiendo así establecer el peso de la estacionalidad como factor de riesgo para el déficit de VD (ver apartado 6.3.2.1). De forma similar, diversos estudios muestran variaciones significativas en los valores interanuales de calcidiol. Así, en el estudio de Javaid y cols. en 596 embarazadas del Reino Unido, la determinación de 25(OH)VD en el tercer trimestre mostró que los valores más elevados se alcanzaban durante el verano (30 ng/ml), seguidos por los de otoño (21 ng/ml), primavera (14 ng/ml) e invierno (14 ng/ml).

La cohorte RAISE de Perth (hemisferio sur) también demostró la existencia de un patrón estacional en los niveles de calcidiol de las embarazadas relacionado con la exposición a

radiación. El pico de calcidiol fue el 11 de febrero y el punto más bajo el 13 de agosto, lo que supone una demora de 43 días respecto al máximo nivel y al nadir estimado de radiación UV (Figura 77.A y 77.B). Este periodo temporal se empleó para medir la correlación entre la exposición UV causante de eritema y los niveles maternos de 25(OH)VD y se encontró una asociación significativa, aunque débil ($r = 0,33$; IC 95% = 0,27–0,39; $p < 0,001$) (Figura 77.C).

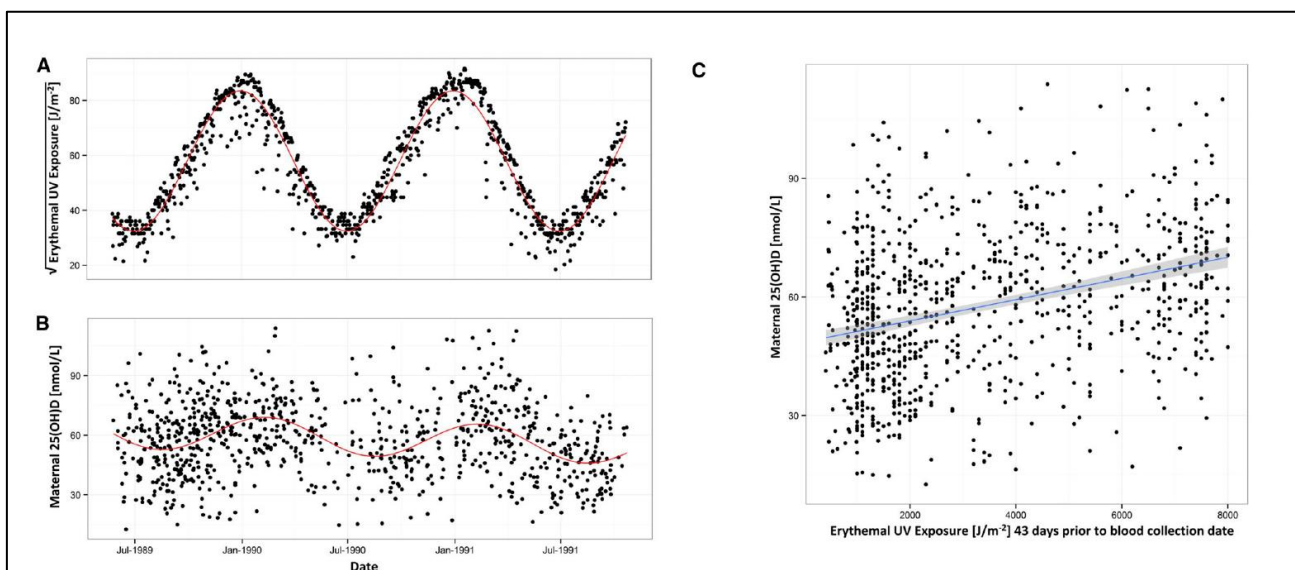


Figura 77. (A) Raíz cuadrada de la exposición UV causante de eritema y (B) niveles séricos de 25(OH)VD en 871 mujeres embarazadas a las 18 semanas de gestación enfrentado a las fechas de extracción analítica, obteniéndose un componente estacional significativo en los modelos cosinor que aparece representado mediante una línea sólida. En (C) se correlacionó la exposición UV con los niveles maternos de 25(OH)VD durante los 43 días previos a la extracción sanguínea. Tomado de: Hart PH et al ⁽¹⁹⁸⁾.

Cabría pensar que la estacionalidad sólo afecta a aquellas madres que refieren una exposición solar adecuada (superior a los 20 minutos en 2 zonas corporales), pero en nuestro caso el incremento en los valores de VD observado en el semestre de verano-otoño resulta independiente de ella y también se observa, aunque en menor grado, en aquellas madres que en la encuesta de hábitos refieren una exposición solar inadecuada. Entendemos que la falta de instrumentos objetivos de medición de exposición solar en nuestro trabajo puede haber imposibilitado que se evidencie la esperada relación.

El AusD Study (*Quantitative Assessment of Solar UV [ultraviolet] Exposure for Vitamin D Synthesis in Australian Adults*) es un estudio poblacional amplio ($n = 1002$) en el que se valora la exposición solar mediante dosímetro de polisulfuro (Kimlin, 2014). El modelo final de regresión

múltiple demostró una gran diferencia estacional entre el verano y el invierno para las concentraciones de calcidiol, las cuales también se relacionaron con el nivel de exposición a la radiación UV valorado mediante dosímetro, pero no con los minutos al aire libre. La concentración de 25(OH)VD se incrementó en 0,8 ng/ml por cada 10% de aumento en la exposición a radiación UV y descendió en 0,2 ng/ml por cada incremento del 1% de la cobertura de ropa. Los factores que explicaron la varianza mayoritaria en este estudio fueron la cobertura de ropa (27%), localización geográfica (20%), estación (17%) y la exposición a radiación UV mediada con dosímetro (8%). En cambio, los minutos de exposición solar referida por el sujeto contribuyeron de forma muy escasa, demostrando que esta apreciación no es fiel reflejo de la exposición solar real.

Si tratamos de buscar datos de nuestro entorno, nos encontramos con el “Estudio de los Cinco Países”, dentro del proyecto europeo OPTIFORD (*Towards a strategy for optimal vitamin D fortification*) (Rodríguez, 2010) en el que se midió el nivel de VD en mujeres adolescentes y de edad avanzada de cinco países europeos. En este caso, se empleó un dosímetro UV VioSpor para cuantificar el nivel de exposición a las radiaciones UV que se complementó con un cuestionario estandarizado de exposición solar. La exposición solar media de las adolescentes en el verano de 2002 fue de $1519 \pm 832 \text{ J/m}^2$ ($6 \pm 3 \text{ MED}$) y el tiempo medio que pasaron al aire libre fue de $4,7 \pm 1,6$ horas/día. Se observa una relación entre la exposición solar y el número de horas al aire libre, aunque no significativa. Tal y como cabría esperar, los niveles de 25(OH)VD fueron más altos en verano que en invierno (25 ng/ml y 18 ng/ml respectivamente) (Figura 74.A). No obstante, al dividir a la población de estudio en 2 grupos (niveles $>50 \text{ nmol/L}$ o 20 ng/ml) no se observaron diferencias significativas ni en el tiempo al aire libre ni en la exposición individual a radiación UV, si bien es cierto que el escaso tamaño muestral de los grupos (en verano $n \leq 50$) pudo limitar la potencia del trabajo (Figura 78.B).

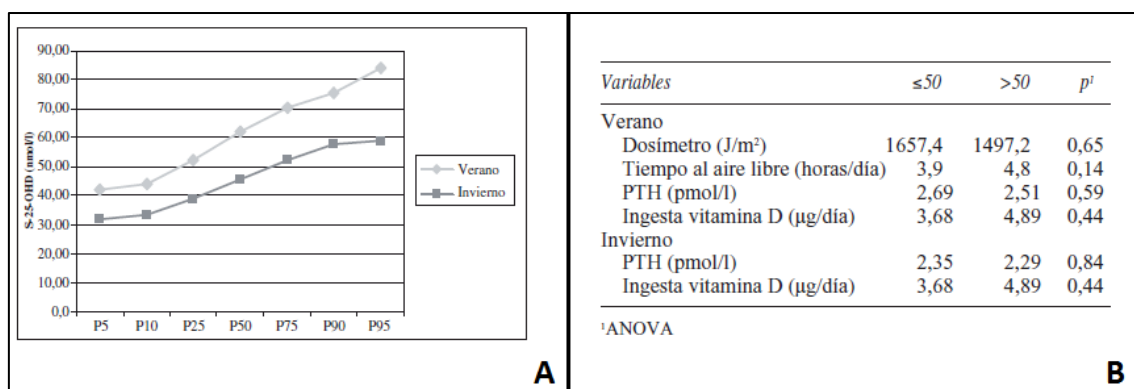


Figura 78. (A) Distribución de la concentración de 25(OH)VD (nmol/L). **(B)** Influencia de distintas variables en las concentraciones de 25(OH)VD. Tomado de: Rodríguez M et al⁽⁴³⁹⁾.

Ya que el grado de exposición solar resulta en ocasiones difícil de valorar, diversos trabajos llevados a cabo en embarazadas han tratado de estimar de forma indirecta el peso de la exposición solar sobre los niveles de 25(OH)VD basándose en la comparación de grupos de población según sus costumbres o tipo de vivienda. Así, en el estudio de Sachan realizado en la India en el año 2005 las embarazadas fueron divididas según procedieran de un ámbito urbano o rural. La exposición solar era calculada multiplicando las horas diarias de exposición durante los últimos 3 meses de gestación por el porcentaje de superficie corporal expuesta. Se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (4,1 en las urbanas y 9,7 en las rurales), aunque estas diferencias no se tradujeron en una variación en los valores medios de 25(OH)VD (14,0 vs 14,1 ng/ml) ni en el porcentaje de madres deficitarias de ambos grupos (84% vs 84%). En cambio, el estudio de Salek en Isfahan (Irán) demostró que los niveles de 25(OH)VD de las embarazadas eran significativamente mayores en aquellas que vivían en un domicilio con patio.

En otros casos, la comparativa se ha establecido en función del tipo de trabajo realizado. Así, en el estudio de Bodekaer y cols. los granjeros varones poseían unos mayores índices de exposición crónica a radiación UV, pero sus niveles de VD no difirieron de los del resto de miembros de una misma familia. Asimismo, al final del verano, el 16% de los participantes eran insuficientes en VD y el porcentaje aumentó hasta el 61% al finalizar el invierno. En este trabajo algunas de las variables de exposición a radiación UV se correlacionaron de forma positiva, aunque débil, con los niveles de VD.

Así pues, y pese a que conocemos de la importancia que tiene contabilizar la exposición solar en cualquier estudio que analice la VD, debemos tener en cuenta que los datos obtenidos mediante el estilo de vida o los minutos de exposición solar reportados por los participantes presentan serias limitaciones. En ausencia de instrumentos de medición adecuados, la influencia de la

exposición solar sobre la síntesis de 25(OH)VD puede ser confusa. Es posible que la percepción subjetiva de exposición solar no sea un método fiable de valoración o que durante los meses de primavera-verano la capacidad de síntesis cutánea de VD se incremente por exposición solar “inadvertida” durante la realización de las actividades cotidianas que las encuestadas no han contabilizado.

6.2.4 HORMONA PARATIROIDEA. INTERACCIÓN CON LOS NIVELES DE VD

En nuestra serie, los valores medios de PTH de las embarazadas experimentaron un aumento significativo durante las 12-15 semanas que separaron ambas determinaciones. En los diferentes estudios se muestran datos contradictorios, aunque, en general, la mayoría apuntan a que, durante el embarazo, los niveles de PTH intacta y del fragmento medio no experimentan variaciones significativas ni son diferentes a los de no embarazadas emparejadas por edad (Saggese, 1991). En el estudio prospectivo de Cross del año 1995, 10 mujeres fueron seguidas de forma seriada para determinar el efecto de los diferentes estadios reproductivos sobre el metabolismo fosfocálcico y óseo. Se observó que las concentraciones de PTH intacta no se modificaron durante el embarazo ni tampoco al compararlas con la situación preconcepcional y tan solo fue significativa la elevación que se produjo tras el cese de la lactancia. En cambio, uno de los trabajos que aporta datos semejantes a los nuestros es el de Ardawi del año 1997: en una muestra de 40 embarazadas saudís las concentraciones de PTH intacta se incrementaron desde $1,3 \pm 0,2$ pmol/L en el primer trimestre a $2,3 \pm 0,4$ pmol/L en el segundo, aunque luego disminuyeron de nuevo a los valores del primer trimestre para aumentar de forma significativa tras el parto ($4,0 \pm 0,4$ pmol/L).

En general, se acepta que existe una relación inversa entre los niveles de calcidiol y PTH y se ha acordado una “zona de seguridad” alrededor de los 15-30 ng/ml de 25(OH)VD por debajo de la cual la PTH aumenta de forma lineal (Heaney, 2005; Saliba 2011). No obstante, esta interacción depende de numerosos factores y no está totalmente demostrada en las mujeres embarazadas. En nuestro caso, la regresión lineal entre los valores de 25(OH)VD y PTH muestra una correlación significativa, aunque débil, entre ambos parámetros que no experimenta variaciones relevantes en el intervalo estudiado ($r = -0,34$ en la primera determinación analítica y $r = -0,35$ en la segunda). La pendiente de recta muestra que, aproximadamente, por cada 1 ng/ml que disminuye el calcidiol, la PTH aumenta entre 0,7 y 1,1 pg/ml. Estos valores son similares a los de

otros trabajos. En la serie de Viljakainen el coeficiente de correlación lineal en el momento del parto fue de $r = -0,28$; $p = 0,006$; valores muy parecidos a los del estudio de Sachan con unas cifras de prevalencia de déficit de VD superiores al 80% ($r = -0,35$; $p < 0,001$), a los de la serie francesa de Zeghoud ($r = -0,27$; $p < 0,03$) o a los del estudio de Nicolaidou en Grecia ($r = -0,28$; $p = 0,008$).

El análisis de los valores deficitarios extremos de 25(OH)VD también demuestra la ausencia de homogeneidad en esta interacción hormonal: en el momento del parto, de las 17 embarazadas con déficit severo de VD (< 10 ng/ml) el 29,4% ($n=5$) presentaron cifras normales simultaneas de PTH (inferiores a 65 pg/ml, que es el límite superior aceptado para el valor normal de hormona intacta). Estos datos son similares a los que aporta el estudio de Datta y cols. del año 2002 llevado a cabo en mujeres de grupos étnicos minoritarios del Reino Unido. En este caso, el 50% de las 160 embarazadas incluidas en el estudio presentaron un déficit grave (< 8 ng/ml) y, a pesar de esto, en 65 los niveles de PTH eran normales. Todos estos datos ponen de relieve la débil asociación que existe entre los niveles de VD y PTH durante el embarazo, al igual que ocurre en otros grupos de población tales como lactantes y niños (Cranney, 2007; Alonso A, 2011) o en pacientes con insuficiencia renal crónica (Pavlovic, 2015).

En cambio, la interpretación inversa sí que permite establecer en nuestro trabajo cierto dintel de seguridad para los niveles de VD superiores a los 20 ng/ml: en las 4 embarazadas con valores de PTH superiores a los 65 pg/ml durante el segundo trimestre, la cifra de 25(OH)VD fue indetectable en 3 de ellas y de 15,9 ng/ml en la restante y, en el momento del parto, el hiperparatiroidismo secundario estaba presente en 10 mujeres de las cuales el 80% poseían valores de calcidiol inferiores a 20 ng/ml.

6.2.5 INTEGRACIÓN DE LAS MODIFICACIONES EN EL METABOLISMO FOSFOCÁLCICO ACONTECIDAS DURANTE EL EMBARAZO

Para que se produzca un aporte suficiente de calcio transplacentario sin una repercusión excesiva en el equilibrio mineral de las gestantes debe aumentar la fracción de absorción intestinal de calcio, lo que depende, a su vez, de varios factores. Por una parte, sabemos que la ingesta dietética elevada de calcio que muestran las embarazadas pueden influir sobre la fracción de absorción y sobre el mecanismo principal de transporte intestinal (ver apartado 6.1.5). Y por otra, la existencia de cambios adaptativos durante la gestación que favorecen este

fenómeno. El más aceptado es el incremento de la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ (no medida en nuestro estudio), favorecida por un aumento de la actividad de la 1α -hidroxilasa renal materna no mediada por la PTH. Posiblemente en este aumento de la actividad de hidroxilación renal también actúe como coadyuvante el incremento en los niveles de estrógenos que se producen durante el segundo y tercer trimestre y que, a su vez, también favorecen la síntesis de calcitriol como consecuencia de un incremento en la PTH materna (Saarem 1987; Somjen, 2007), que sí ha sido demostrada en nuestro trabajo.

El marcado carácter estacional que muestra la $25(\text{OH})\text{VD}$ hace difícil interpretar las modificaciones que se producen a lo largo de la gestación y que, por otra parte, también dependen de los valores de VDBP, que aumentan durante el embarazo en respuesta al incremento de estrógenos y a los cambios paralelos en la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$.

Finalmente, los estudios en animales han demostrado que la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ no resulta imprescindible para la absorción de calcio durante el embarazo ya que ésta también se incrementó en las ratas gestantes con déficit de VD en comparación a su situación pregestacional (Halloran, 1981). Otros trabajos llevados a cabo en ratas y corderas gestantes señalan que la prolactina estimula, a través de la hipertrofia del tracto intestinal, la absorción de calcio (Barlet, 1985).

6.3 DÉFICIT DE VITAMINA D DURANTE EL EMBARAZO.

6.3.1 PREVALENCIA. COMPARACIÓN CON ESTUDIOS PREVIOS

En el presente estudio se constata la elevada prevalencia de déficit de VD en las mujeres embarazadas, lo que coincide con lo reflejado publicaciones previas (Johnson, 2011; Nicolaidou, 2006; Zeghoud, 1997). Tomando como referencia el punto de corte más ampliamente aceptado de 20 ng/ml, el 66,3% de las embarazadas de nuestro estudio presentaron déficit de VD durante el segundo trimestre y el 57,5% en el momento del parto, porcentajes discretamente superiores a los que obtienen otros estudios poblacionales amplios.

Tabla 54. Cifras de prevalencia y valores medios de 25(OH)VD reportados por estudios realizados en embarazadas

	País	N	[25(OH)VD] (ng/ml)	% DEFICIENCIA*
Lee CL 2017	Malasia	575		21,0%
Richard 2017	Suiza	204	Deficientes: 10,5 Suficientes: 26,1	63%
Kilicaslan 2017	Turquía	100	11,4	53% ⁽²⁾
Somigliana 2016	Italia	73	21,2	47%
Hussein 2016	Emiratos Árabes	266	10,5	69% ⁽¹⁾
Pena 2015	Brasil	175		14,9%
Pérez-Ferré 2012	España	266		59,0%
Johnson 2011	Carolina Sur (EEUU)	494	Afroamericanas 15,5 Hispanas 24,1 Caucásicas 29,0	41,0%
Li W 2011	Canadá	336	26,8	24,0%
Hossain 2011	Pakistán	75		73%
Viljakainen 2010	Finlandia	125	17,0	70,7%
Mahon 2010	Reino Unido	424		30,7%
Salek 2008	Irán	88	52,2	5,7%
Javaid 2006	Reino Unido	596	Invierno: 14,1 Primavera: 14,2 Verano: 30,5 Otoño: 20,8	49,0%
Nicolaidou 2006	Grecia	123	16,4	19,5% ⁽²⁾
Sachan 2005	India	207	14,0	84,0%
Weiler 2005	Canadá	50	Deficientes: 11,4 Suficientes: 24,6	46,0% ⁽³⁾
Estudio INMA 2003-2008 (Morales, 2015)	España	2358	29,4	19,6%
The Amsterdam Born Children and their Development Study (ABCD) (Leffelaar, 2010)	Holanda	3730	21,8	44,4%
Achkar 2002-2010	Canadá	2144	20,9	46,0%
Zeghoud 1997	Francia	80	14,4	46,0% ⁽¹⁾
The Epidemiology of Vitamin D (EVITA) Study 1997-2001 (Bodnar, 2015)	EEUU	2327		21,4%
Western Australian Pregnancy Cohort [RAINE] Study 1989-1991 (Hart, 2015)	Australia	901	23,2	36,0%
Taha 1984	Arabia Saudí	100		95% ⁽²⁾

*Cuando no se indica lo contrario se considera como valor de corte 20 ng/ml. Para un punto de corte de (1) 12 ng/ml; (2) 10 ng/ml; (3) 15 ng/ml

Como se observa en la tabla 54, existe una gran variabilidad en los valores de 25(OH)VD y en los porcentajes de deficiencia durante el embarazo. Probablemente una parte importante de esta variabilidad esté determinada por la localización geográfica, nivel de desarrollo y costumbres étnicas o religiosas de las diferentes poblaciones estudiadas. Así, mientras que los países de latitudes tropicales como Irán o Brasil presentan menor deficiencia, la mayoría de los trabajos realizados en Europa y Norte de América refieren cifras de prevalencia entre el 20 y el 50% y son los estudios de los países nórdicos los que aportan los niveles más bajos de 25(OH)VD y unas cifras de prevalencia superiores al 60%. Asimismo, en países de mayoría musulmana (Kilicaslan, 2017; Hussein, 2016; Hossain, 2011; Taha, 1984), donde los hábitos de vestido dificultan la exposición solar y existe escaso aporte de VD en la dieta, también se reportan cifras muy elevadas de déficit de VD durante el embarazo. Este hecho, junto con la variación en el punto de corte para definir el estado de suficiencia y las diferencias de medición observadas entre los distintos laboratorios, genera dificultades a la hora de establecer comparaciones.

Respecto a los trabajos realizados en nuestro país, disponemos de los datos del estudio INMA (INfancia y Medio Ambiente), un estudio prospectivo de cohortes de base poblacional ($n = 2358$) llevado a cabo entre los años 2003 y 2008 (Morales, 2015). La concentración media de 25(OH)VD₃ durante el embarazo fue de 29 ng/ml (RIC 22 – 37 ng/ml) con un porcentaje de deficiencia (<20 ng/ml) y de insuficiencia (valores comprendidos entre 20-30 ng/ml) del 20% y el 32% respectivamente. Llama la atención que se trata de unos porcentajes muy inferiores a los de nuestro estudio y también a los del resto de trabajos en embarazadas del sur de Europa: 46% en embarazadas francesas empleando punto de corte 10 ng/ml (Zeghoud, 1997) y 19% en gestantes griegas para valores inferiores a 12 ng/ml (Nicolaidou, 2006). De hecho, y aunque no se trate de embarazadas, los datos de otros trabajos llevados a cabo en España aportan porcentajes de déficit mucho más parecidos a los de nuestra población. Así, el estudio transversal de Calatayud realizado en el 2009 en población joven y sana española reportó un 27% de déficit y un trabajo sobre niveles de vitaminas liposolubles en donantes sanguíneos en nuestro país mostró unos valores medios de calcidiol de 15 ± 9 ng/ml y una prevalencia de niveles deficitarios del 65% en el subgrupo de mujeres (Mata-Granados, 2008).

6.3.2 FACTORES DE RIESGO

Hemos considerado de especial interés averiguar qué factores pueden determinar los valores de calcidiol en la mujer embarazada, por ser estos factores sobre los que se debería incidir en el ámbito de la prevención sanitaria.

6.3.2.1 ESTACIONALIDAD

Al igual que ocurre en nuestro trabajo, la gran influencia de la estacionalidad se mantiene en los diferentes trabajos que analizan en déficit de VD durante el embarazo y, como hemos visto, no siempre en relación con los niveles de exposición a radiación solar referidos y/o cuantificados.

En el estudio griego de Nicolaidou y cols. del año 2006, las madres que dieron a luz durante el invierno y la primavera tuvieron niveles más bajos de 25(OH)VD (15 ng/ml) y mayor prevalencia de hipovitaminosis D (24%) que aquellas que lo hicieron durante el verano o el otoño (19 ng/ml y 15% de hipovitaminosis) ($p = 0,006$). En otro estudio europeo con datos de todo un año (Javaid, 2006) se observó un patrón estacional en los valores medios de 25(OH)VD de las embarazadas: 14 ng/ml en invierno, 14 ng/ml en primavera, 30 ng/ml en verano y 21 ng/ml durante el otoño; siendo múltiples los estudios en los que la estación del año es un factor determinante del nivel de VD durante el embarazo (Li, 2011; Leffelaar, 2010; Weiler, 2005).

6.3.2.2 FACTORES DEMOGRÁFICOS MATERNOS

6.3.2.2.1 Índice de masa corporal

El IMC ha sido el único factor materno que en nuestro estudio ha demostrado estar asociado al déficit de VD durante el embarazo, tanto en el análisis bivariado como en el modelo de regresión logística, donde es el factor con mayor peso específico: las madres con sobrepeso (IMC > 25 kg/m²) poseen un riesgo casi 20 veces superior de presentar déficit de VD. Este hecho se repite de forma constante en los diferentes estudios tanto en la población general como en gestantes.

La obesidad es un factor de riesgo conocido para la deficiencia de VD. La etiología de esta asociación es confusa y se han planteado diversas hipótesis. Existen estudios que demuestran que la obesidad se asocia a una disminución de la biodisponibilidad de la VD procedente de la dieta y/o de la síntesis cutánea y esto podría deberse al secuestro de la VD (de naturaleza liposoluble) dentro de una mayor reserva de tejido adiposo.

Diversas cohortes poblacionales demuestran esta asociación (Arunabh, 2003; Need, 2005). Entre los estudios en embarazadas, destaca el llevado a cabo por Bodnar en el año 2007a cuyo objetivo era establecer el efecto del IMC pregestacional sobre las concentraciones maternas y neonatales de 25(OH)VD. Se estudiaron las concentraciones de calcidiol entre las 4-21 semanas en 200 gestantes blancas y 200 negras en el momento del parto y en sangre de cordón de los recién nacidos. Se empleó un modelo de regresión logística multivariable que demostró que en comparación con las madres delgadas ($IMC < 20 \text{ kg/m}^2$), las mujeres con obesidad pregestacional ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) poseían unas concentraciones medias más bajas a las 4-22 semanas (22,6 vs 25,1 ng/dl; $p < 0,05$) y una mayor prevalencia de déficit de VD (61 vs 36%; $p < 0,01$). Posteriormente, otros estudios también han vinculado los IMC elevados con el riesgo de presentar déficit de VD durante la gestación (Pena, 2015; Hossain, 2011; Leffelaar, 2010). El trabajo de Johnson del año 2011 es uno de los pocos que no corrobora esta asociación. En este caso se establece el IMC de 30 Kg/m^2 para dividir a la cohorte en dos grupos (obesas/no obesas) que no presentan diferencias en el porcentaje de deficiencia de VD. Probablemente, el punto de corte empleado para la clasificación en este estudio, en el que se obvian los estados de sobrepeso grado I ($IMC 25-26,9 \text{ kg/m}^2$) y grado II ($IMC 27-29,9 \text{ kg/m}^2$), haya hecho más difícil la obtención de resultados significativos.

Resulta importante tener en cuenta que esta asociación entre obesidad y disminución en los niveles de VD puede verse influenciada por diferentes factores de confusión, como el hecho de que las personas obesas presentan hábitos dietéticos menos saludables (y posiblemente una ingesta reducida de los alimentos ricos en VD), menor nivel de actividad física (que favorece la síntesis de VD) y, en general, menor número de horas de exposición solar. Además, la obesidad podría no afectar al estatus de VD en todas las razas por igual. En un estudio llevado a cabo a partir de la III Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición (*National Health and Nutrition Examination Survey*, NHANES III 1988-1994) se demostró que la correlación negativa entre VD y porcentaje de grasa corporal era significativamente mayor en las mujeres blancas de una misma franja de edad y, dentro de la misma raza, la correlación también fue mayor en las mujeres jóvenes (Looker, 2005). En cambio, en el trabajo de Jacobs y cols. del año 2008, la conclusión alcanzada fue la inversa. En este estudio transversal en el que participaron 637 personas del sur

de Arizona se observó que, en general, en los que tenían los niveles más altos de 25(OH)VD el IMC era menor. No obstante, el modelo predictivo de los niveles séricos de 25(OH)VD por raza/etnia apuntó hacia una mayor influencia del factor de obesidad en el grupo de hispanos o negros que en el de blancos.

6.3.2.2.2 Paridad

Si tenemos en cuenta que la mayoría de los estudios no establecen la edad como factor de riesgo independiente para el déficit de VD y que la gestación tampoco parece afectar la síntesis cutánea o absorción dietética de la provitamina (Mulligan, 2010; Ardawi, 1997), resulta lógico pensar que, al igual que en nuestro trabajo, el número de gestaciones no afecte a la situación materna de déficit de VD. Así, en la mayoría de los estudios no se ha demostrado que exista asociación estadística entre el número de embarazos y el déficit de VD (Richard, 2017; Lee, 2017; Hussein 2016; Mahon, 2010; Salek, 2008).

6.3.2.2.3 Etnia y fototipo cutáneo

Respecto al resto de factores que sí han demostrado asociación con el déficit de VD durante el embarazo en otros trabajos, tales como la etnia no caucásica y los fototipos de piel oscuros, hemos observado una tendencia a presentarse como factores de riesgo predisponentes al déficit de VD, aunque sin alcanzar significación estadística. Debemos tener en cuenta que el tamaño muestral de los grupos es pequeño (7 madres no caucásicas y 10 con fototipos cutáneos oscuros). De hecho, sí que se observa un incremento en el porcentaje de madres deficitarias (100% de las madres no caucásicas y 80% de las de fototipo oscuro) y una clara disminución en los valores medios de calcidiol en ambos grupos ($5,9 \pm 2,3$ ng/ml y $13,2 \pm 7,6$ ng/ml respectivamente). Por ello, consideramos que estos dos factores deben tenerse en cuenta en la práctica clínica diaria para identificar aquellas mujeres con mayor riesgo de déficit de VD durante el embarazo, ya que los trabajos con un mayor tamaño muestral sí que consiguen establecerlos.

Son diversos los estudios en los que la etnia materna aparece como un factor relevante. Uno de los más potente es el de Johnson y cols. llevado a cabo en Carolina del Sur y publicado en el 2011. En él se incluyeron 154 embarazadas afroamericanas, 194 hispanas y 146 caucásicas. Los valores medios de 25(OH)VD durante el primer trimestre de embarazo difirieron de forma

significativa entre los grupos (15 ± 7 ng/ml, 24 ± 9 ng/ml y 29 ± 8 ng/ml respectivamente) y en los modelos de regresión logística la etnia fue el factor de riesgo más importante para la deficiencia y/o insuficiencia de VD. Tras controlar por los potenciales factores de confusión (edad materna, paridad, IMC ≥ 30 kg/m² y reclutamiento durante los meses de verano), las mujeres afroamericanas e hispanas mantenían un riesgo más elevado de presentar deficiencia y/o insuficiencia de VD respecto al de las caucásicas (OR 54,9 y 5,2 respectivamente) (Figura 79).

Variable	Vitamin D Group	Odds Ratio	95% CI	p Value
Age <25 y	<20	1.38	0.62–3.06	0.43
	20–31	0.86	0.41–1.81	0.70
	32+	1.00 (ref)	—	—
Primigravida	<20	2.17	0.95–4.97	0.07
	20–31	3.18	1.56–6.49	0.001
	32+	1.00 (ref)	—	—
Black (versus white)	<20	54.98	16.37–184.62	<0.0001
	20–31	3.24	1.04–10.07	0.04
	32+	1.00 (ref)	—	—
Hispanic (versus white)	<20	5.25	2.10–13.17	0.004
	20–31	2.06	1.03–4.11	0.04
	32+	1.00 (ref)	—	—
Obese (BMI ≥ 30)	<20	1.87	0.81–4.28	0.14
	20–31	1.66	0.78–3.52	0.19
	32+	1.00 (ref)	—	—
Summer months	<20	0.80	0.39–1.61	0.52
	20–31	0.94	0.51–1.73	0.83
	32+	1.00 (ref)	—	—

Figura 79. Modelo de regresión logística multinomial para los niveles de VD. Tomado de: Johnson DD et al ⁽²⁴⁹⁾.

En otras ocasiones, algunos trabajos se han limitado al estudio de subgrupos étnicos con el objetivo de valorar la utilidad de la suplementación en ciertas poblaciones. El estudio de Datta del año 2002 incluyó a 160 embarazadas pertenecientes a una población no europea minoritaria en el Sur de Gales en las que 80 iniciaron un tratamiento con VD oral (800 UI/día) por presentar déficit severo (< 8 ng/ml). Los valores de 25(OH)VD fueron determinados de nuevo en el momento del parto en 58 de estas 80 mujeres y el valor medio había aumentado de 6 a 11 ng/ml y se había normalizado en 35 de las 58. De forma similar, en un estudio en Holanda (van de Meer, 2006) se pudo observar que las concentraciones séricas medias en las mujeres turcas ($6,1 \pm 4,8$ ng/ml), marroquíes ($8,0 \pm 5,4$ ng/ml) y otras no caucásicas ($10,5 \pm 10,4$ ng/ml) fueron significativamente inferiores a los de las gestantes occidentales ($21,1 \pm 8,6$ ng/ml; $p < 0.001$). El 84% de las turcas, 81% de las marroquíes y 59% del resto de no caucásicas presentaron déficit de VD; de hecho, los valores se encontraban por debajo del límite de detección en el 22% de las

mujeres turcas. Se estudió que las diferencias entre grupos étnicos no eran atribuidas a factores de confusión tales como la edad, estatus socioeconómico o paridad.

Con el objetivo de cuantificar la influencia del tono de piel sobre los niveles de VD, se empleó la cohorte *The Epidemiology of Vitamin D Study Of Pittsburgh* (Pennsylvania, 1997-2001) para obtener datos sobre una muestra de 200 embarazadas blancas y 200 embarazadas negras nulíparas, con gestaciones y partos normales, observándose que, tanto en la semana 20 como en el momento del parto, el porcentaje de embarazadas con VD < 15ng/ml fue superior entre las mujeres de raza negra (45% y 29%) que entre las de raza blanca (2% y 5%) respectivamente. Asimismo, también se observaron variaciones en los valores medios de calcidiol: en mujeres negras 16 ng/ml y en las blancas 23 ng/ml en el segundo trimestre y 32 vs 20 ng/ml en el momento del parto. En ambos grupos raciales, las concentraciones de 25(OH)VD fueron más altas en verano y menores en invierno y primavera. La amplitud de la diferencia estuvo influenciada por la etnia. Así, tras ajustar por edad gestacional, IMC pregestacional y empleo de suplementación, las mujeres negras presentaron menor variación en comparación a las blancas entre invierno-verano ($6,4 \pm 1,3$ ng/ml vs $11,0 \pm 1,5$ ng/ml) y entre primavera-verano ($5,3 \pm 1,2$ ng vs $11,4 \pm 1,9$ ng/ml) demostrando una asociación significativa en la interacción raza-estacionalidad ($p = 0,01$) (Bodnar, 2007c) (Figura 80.A y 80.B).

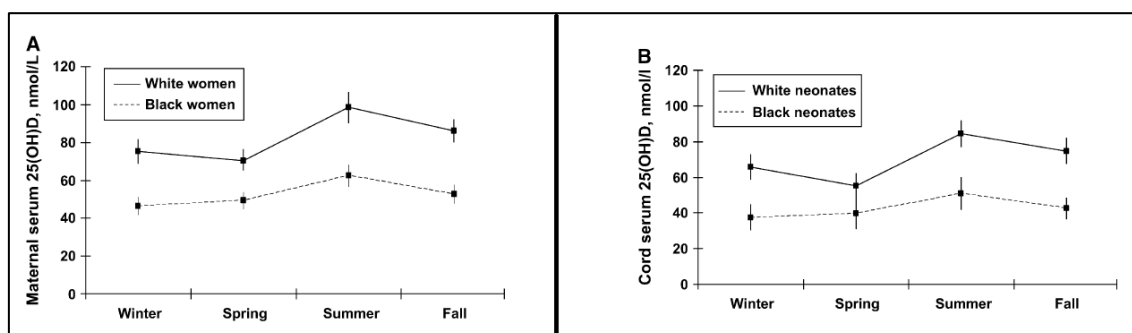


Figura 80. Concentraciones de 25(OH)VD por estaciones en 200 embarazadas blancas y 200 embarazadas negras (A) y en sangre de cordón de los recién nacidos (B). Todos los valores están ajustados por IMC pregestacional, empleo de suplementación y edad gestacional. Tomado de: Bodnar LM et al ⁽⁵⁵⁾.

Finalmente, el estudio transversal de Nicolaidou y cols. en el que participaron 123 madres griegas que no tomaban suplementación demostró que, en el momento del parto, las embarazadas con fototipos cutáneos más oscuros tenían niveles de 25(OH)VD más bajos (16

ng/ml y 14 ng/ml para los fototipos II y III respectivamente) que aquellas con fototipos más claros (19 ng/ml para el I) (Corrección de Bonferroni I vs III $p = 0,023$).

Con todos estos datos y, aunque en nuestro caso la tendencia observada no alcanza significación estadística, entendemos que está suficientemente demostrado que existe una asociación entre los valores de VD y el grupo étnico/racial y que las mujeres no caucásicas pueden ser especialmente susceptibles a padecer déficit de VD durante el embarazo. Por una parte, la piel con mayor contenido en melanina en altitudes alejadas del ecuador (donde este tipo de piel protege frente a los efectos nocivos de la radiación solar) dificulta la síntesis cutánea de VD. Y, por otra parte, coexisten en estos grupos de población diversos aspectos (hábitos de vestido, de exposición solar, escaso empleo de suplementación exógena, tipo de dieta...) que suponen una dificultad añadida para mantener unas reservas adecuadas de calcidiol. Sirve como ejemplo un estudio llevado a cabo en Turquía en el que se demostró que, dentro de una misma población, las mujeres que empleaban el velo tenían niveles más bajos de 25(OH)VD (Guzel, 2001). También se ha observado que las mujeres árabes que viven en Estados Unidos y no siguen los preceptos religiosos de cobertura corporal y, por lo tanto, presentan una mayor exposición a la radiación UV tienen unos valores medios de 25(OH)VD superiores (Hobbs, 2009; Dawodu, 2011).

6.3.2.3 ESTILO DE VIDA

6.3.2.3.1 Tabaquismo materno

Diversos trabajos han reportado niveles más bajos de 25(OH)VD en adultos fumadores (Jorde, 2005; Hermann, 2010). La explicación a este fenómeno la podríamos encontrar, además de en los menores aportes dietéticos de VD de los fumadores, en una disminución de la síntesis cutánea y en un incremento de la actividad de enzimas hepáticas que favorecen el catabolismo de la 25(OH)VD. No obstante, en nuestro estudio no hemos encontrado una asociación significativa entre el hábito tabáquico y el riesgo de padecer déficit de VD y, al parecer, esta asociación resulta controvertida durante la gestación. En un estudio español, las embarazadas fumadoras tenían mayores concentraciones de 25(OH)VD que las no fumadoras (30,1 vs 26,8 ng/ml) (Pérez-López, 2011). Otro estudio llevado a cabo en nuestro país comparó las mujeres que fumaron hasta el conocimiento de la gestación con aquellas que continuaron consumiendo tabaco y encontró una mayor prevalencia de déficit de VD entre aquellas que abandonaron el

hábito tabáquico (15,9% vs 5,7%) (Pérez-Ferré, 2012). Otros autores encontraron concentraciones similares de 25(OH)VD entre las embarazadas fumadoras y no fumadoras a la edad gestacional de 30-32 semanas, pero la diferencia se incrementó hacia el final del embarazo (semanas 38-40), con un descenso de la concentración en las fumadoras hasta 24 ng/ml, siendo de 30 ng/ml en las no fumadoras ($p = 0,58$) (Díaz-Gómez, 2007). En este mismo estudio, la VD de los recién nacidos hijos de madres fumadoras era significativamente menor. Este hecho, atribuido en la literatura a una menor capacidad del transporte placentario de calcidiol de las embarazadas fumadoras, no se aprecia en nuestras gestantes.

6.3.2.3.2 Actividad física y exposición solar

Nuestro estudio muestra que la actividad física, aun siendo de baja intensidad, actúa como factor protector del déficit de VD, de manera que aquellas embarazadas que refieren una actividad mínima de 3 horas semanales (caminar en la mayoría de los casos) presentan un menor porcentaje de déficit de VD (57%) frente a las embarazadas sedentarias (79%; $p = 0,04$). Esta asociación mantuvo la significación estadística en el modelo de regresión logística binaria para el déficit de VD. Cabría esperar que la protección que aporta la actividad física está en relación con la mayor exposición solar. De hecho, de las 61 madres que refieren hábitos físicos regulares el 79% referían una exposición solar adecuada (62% en el total de la muestra) pero, como hemos visto previamente (Apartado 6.2.3.2), el estudio de la relación entre el déficit de VD y el grado exposición solar aporta datos variables.

La asociación entre ejercicio físico y niveles de VD es un hecho demostrado en estudios amplios llevados a cabo en adolescentes (Gracia-Marco, 2012), aunque se debe tener en cuenta como posibles factores de confusión la mayor exposición solar de aquellos que realizan actividades al aire libre (Vierucci, 2014) y la reducción de tejido graso que produce el ejercicio físico regular (Dong, 2010).

En cuanto a la población de embarazadas, la mayoría de los trabajos en los que se han estudiado el impacto de la actividad física sobre los niveles de 25(OH)VD apoyan el efecto beneficioso de éste, si bien es cierto que la forma de medir el grado de actividad física varía mucho y que la mayoría no han podido probar que se trate de un factor protector independiente. Un estudio de cohortes llevado a cabo en Catar en el que participaron 1873 mujeres -población con un escaso grado de exposición solar (61% de la muestra refirió una ausencia total)- demostró que la prevalencia de déficit de VD era mayor entre las embarazadas que no realizaban ningún tipo

de actividad física diaria (64% vs 59%; $p = 0,05$) (Bener, 2013). Otro estudio en el que se compararon 1635 mujeres embarazadas canadienses determinó que existía una diferencia en las concentraciones de VD entre los subgrupos de mayor y menor actividad física de más de 3,8 ng/ml (IC 95% 1,2 – 6,4) (Woolcott, 2016). Del mismo modo, la actividad física ha demostrado actuar como factor de protección frente al déficit de VD en estudios recientes en embarazadas de nuestro entorno (Rodríguez A, 2016; Petersen, 2015; Moon, 2015).

6.3.2.4 APORTE DIETÉTICO Y EMPLEO DE SUPLEMENTACIÓN

Nuestro grado de concordancia entre el aporte de los diferentes nutrientes (calcio y VD) mediante los dos métodos de registro (registro de 3 días y CFCA) ha sido escasa (ver apartado 6.1.5). Es probable que este hecho se deba a omisiones u errores en el registro de 3 días cuya cumplimentación, por no estar dirigida, depende en gran medida del grado de interés e implicación de los sujetos de la muestra a estudio. Pero también es posible que, tal y como se ha comentado previamente, el CFCA tienda a “sobrestimar” el consumo real de un nutriente que las embarazadas perciben como beneficioso.

Hemos obtenidos datos dispares en la relación entre el aporte total de VD (suma de dieta y suplementación) y el déficit materno de calcidiol. No se encontró relación entre el aporte total de VD estimado mediante el registro de 3 días y el déficit de VD, aunque sí cuando se valoró mediante CFCA. Encontramos, al igual que en el trabajo de Viljakainen y cols., una correlación lineal significativa entre el aporte total de VD obtenido mediante CFCA y la concentración de 25(OH)VD ($r = 0,42$; $p = 0,01$ vs $r = 0,36$; $p < 0,001$).

Una revisión reciente de la Cochrane concluyó que el empleo de suplementos de VD durante el embarazo mejora las concentraciones de calcidiol en el momento del parto. No obstante, los autores establecen que el significado clínico de este hallazgo debe de ser todavía determinado, ya que no existe suficiente evidencia en relación con los efectos clínicos de la suplementación con VD durante el embarazo (De-Regil, 2016). De este modo, observamos que mientras que la toma de suplementos no protege por si solo del déficit materno de VD, cuando se une a un estilo de vida saludable con ingestas adecuadas de VD sí que puede actuar como factor protector. En la mayoría de los trabajos, al igual que en nuestro caso, el aporte “extra” de VD incrementa de forma discreta los valores de 25(OH)VD en la mujer embarazada, pero no parece proveer una protección completa frente al déficit de VD. En este sentido, resultan bastante relevantes los

datos aportados por el estudio de Li del año 2011 en el que, a pesar de que un elevado porcentaje de embarazadas del estudio tomaban suplementación (80%) y con unos aportes totales superiores a 600 UI/día en más de la mitad de la muestra, la prevalencia de déficit de VD no disminuyó. En este mismo trabajo se demostró, mediante el empleo de un CFCA, que los valores medios de 25(OH)VD eran menores en aquellas embarazadas con un aporte total inferior a las 200 UI/día y también en las que no tomaban suplementación o lo hacían con un aporte inferior a las 400 UI/día. En cambio, en otro estudio llevado a cabo en Canadá (Vieth, 2001) - donde está generalizada la práctica de la fortificación de la leche de vaca y la margarina comerciales- la ingesta media total de VD en las mujeres embarazadas (valorada mediante el recuerdo de alimentos de las 24 horas previas) fue de 149 ± 145 UI/día en el grupo de las deficientes y de 242 ± 218 UI/día en el de las suficientes, pero sin alcanzar la significación estadística. Asimismo, este estudio demostró que el déficit de VD puede persistir a pesar de aportes totales superiores a las 200 UI/día (en nuestro caso, el aporte medio total de VD en el subgrupo de mujeres con déficit de VD fue de 263 ± 216 UI/día en el registro de 3 días y de 242 ± 138 UI/día en el CFCA).

Con todo ello, podemos concluir que resulta difícil establecer el aporte dietético de VD dado que los diferentes métodos de cuantificación presentan limitaciones y pueden no reflejar la ingesta real. Los estudios apuntan a que las ingestas totales cercanas a la RDA (600 UI/día) pueden actuar como factor de protección frente al déficit de VD, pero solo son alcanzadas por una pequeña parte de la población de embarazadas a pesar del empleo de suplementos. Por otra parte, la suplementación nutricional durante el embarazo por debajo de las 400 UI/día puede no ser suficiente en aquellas mujeres que no realizan una dieta adecuada.

6.3.3 CONSECUENCIAS OBSTÉTRICAS Y PERINATALES DEL DÉFICIT DE VITAMINA D DURANTE EL EMBARAZO

Un estudio reciente llevado a cabo en una muestra amplia ($n = 575$) mostró que no existía asociación significativa entre la situación materna de VD y los diferentes eventos maternos (paridad, diabetes gestacional, hipertensión, preeclampsia, retraso de crecimiento intrauterino, trabajo prematuro de parto, infección antenatal, vaginosis bacteriana y anemia) o alteraciones neonatales (recién nacidos de bajo peso o ingreso en unidad de cuidados intensivos) estudiadas entre los grupos con suficiencia, insuficiencia o deficiencia de VD (Lee, 2017). No obstante,

hemos podido observar que el análisis independiente de cada uno de estos eventos sí que apoya la existencia de algún tipo de relación en algunos casos.

6.3.3.1 PATOLOGÍA MATERNA ASOCIADA AL DÉFICIT DE VD

6.3.3.1.1 Preeclampsia

Son muchos los trabajos que vinculan el déficit de VD con el desarrollo de preeclampsia. El mecanismo por el que el déficit de VD conduce al desarrollo de preeclampsia no está bien establecido. La participación de la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ en la regulación del sistema inmune lleva a pensar que su deficiencia puede constituir un factor de riesgo de enfermedades inflamatorias, entre ellas la preeclampsia. Las propiedades inmunomoduladoras de la forma activa de la VD pueden ser esenciales durante la implantación trofoblástica, de manera que el déficit de VD al inicio del embarazo puede conllevar una respuesta inmune materna exacerbada (con incremento de las citoquinas proinflamatorias) que permita únicamente una implantación superficial, conduciendo hacia una menor tolerancia de la madre hacia el feto y el subsiguiente desarrollo de preeclampsia.

En nuestro estudio, dicha asociación no ha podido ser corroborada, probablemente por el escaso número de embarazadas que desarrollaron el cuadro. Únicamente dos de las 101 embarazadas incluidas en nuestro trabajo tuvieron preeclampsia. Dicho porcentaje es muy similar al de otros estudios españoles (Cortés, 2009), pero representa un número absoluto muy escaso. Aun así, nos parece relevante el hecho de que la concentración de $25(\text{OH})\text{VD}$ en la determinación analítica materna inicial era muy baja en ambos casos (5,9 y 16,7 ng/ml).

Así, son los estudios de caso-control los que han conseguido demostrar esta asociación. El trabajo de Achkar del año 2015 es un estudio anidado caso-control desarrollado para determinar la asociación entre el estado materno en VD en fases precoces del embarazo y el subsiguiente desarrollo de preeclampsia. A la edad gestacional media de 14 semanas, el valor de $25(\text{OH})\text{VD}$ era significativamente menor en el grupo de mujeres que desarrollaron preeclampsia (19 ± 7 ng/ml vs 21 ± 7 ng/ml) y en estas embarazadas existía una mayor proporción de valores de calcidiol inferiores a 12 ng/ml. El nivel de VD < 12 ng/ml se asoció con un odd-ratio del doble para el desarrollo de preeclampsia en comparación a las concentraciones de más de 20 ng/ml. Esta relación fue significativa tanto antes como después del ajuste por otros factores de riesgo

para el desarrollo de preeclampsia y/o déficit de VD, incluyendo edad materna, nuliparidad, estación e IMC pregestacional. Robinson (2013) y Baker (2010) también demostraron que la prevalencia de déficit de VD en mujeres americanas con preeclampsias severas (54% y 26% respectivamente) era superior a la de las mujeres sin esta patología. Finalmente, otro trabajo secuencial caso-control combinó los dos factores de riesgo en estudio (preeclampsia y obesidad) para construir 4 grupos de estudio (Pena, 2015). Las madres con preeclampsia presentaron un mayor porcentaje de déficit de VD (48% en las que también eran obesas y 52% en las que sólo padecían preeclampsia), mientras que la obesidad también pareció aumentar el déficit de VD, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística.

6.3.3.1.2 Diabetes gestacional

En el caso de la diabetes gestacional (DG), la evidencia no resulta tan homogénea. En nuestro caso, el número de madres incluidas en el estudio que desarrollaron DG ($n = 3$) vuelve a ser muy bajo, por lo que los resultados son muy poco valorables, si bien es cierto que el valor de VD de este subgrupo (17,8 ng/ml) es incluso superior al de las madres sin morbilidad gestacional (15,8 ng/ml).

La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha muestran que niveles bajos de VD durante el embarazo se asocian con elevación de distintos marcadores de intolerancia a la glucosa (Pérez-Ferré, 2012) y a un mayor riesgo de padecer DG (Cho, 2013; Clifton-Bligh, 2008; Zhang C, 2008), aunque también hay otros en los que esta relación no ha podido ser demostrada (Makgoba, 2011; Baker, 2012). Es importante tener en cuenta la coexistencia de múltiples factores de confusión (obesidad, realización de ejercicio físico, hábitos dietéticos saludables, etc.) y que tampoco existe una explicación razonable de por qué el déficit de VD favorecería el desarrollo de DG, por lo que entendemos que son necesarios estudios de cohortes amplios para esclarecer esta relación, especialmente en poblaciones con niveles más bajos de VD.

6.3.3.2 TIPO DE PARTO

En nuestro trabajo, en línea con lo descrito por la mayor parte de la bibliografía, el déficit materno de VD no supuso un aumento en el porcentaje de instrumentación y/o cesáreas (Bowyer, 2009; Fernandez-Alonso, 2012; Sebastian, 2015; Gernand, 2015). Estos resultados

contradicen a los del estudio observacional llevado a cabo por Merewood (2009), que mostró un riesgo cuatro veces superior para la realización de cesáreas entre las madres con déficit más severo (< 15 ng/ml). En este trabajo este efecto se atribuye, por una parte, al discreto descenso en los niveles de calcio sérico que ocasiona el déficit de VD -ya que se ha visto que los niveles de calcio son significativamente mayores en las mujeres embarazadas en el momento del parto vaginal en comparación con las embarazadas a término sin trabajo de parto (Papandreou, 2004) - y, por otra, a la asociación establecida entre los valores adecuados de calcidiol y la fortaleza tanto del músculo liso como del esquelético (Bischoff-Ferrari, 2012). No obstante, al tratarse de un estudio observacional es posible que no se hayan podido controlar diversos factores de confusión vinculados también al déficit de VD, tales como la mayor incidencia de preeclampsia (ver apartado 6.3.3.1) o de presentaciones de nalgas en el grupo de las cesáreas.

6.3.3.3 SOMATOMETRÍA DE LOS RECIÉN NACIDOS

Nuestro estudio no establece ningún tipo de relación entre los valores maternos de calcidiol y: peso y longitud al nacimiento, valores relativos o percentiles según edad gestacional o porcentaje de neonatos con bajo peso. De hecho, en el análisis bivariable la longitud muestra un valor medio superior en los hijos de madres con déficit de VD, aunque sin alcanzar la significación estadística.

En la bibliografía el análisis de esta asociación aporta resultados variables y no totalmente exentos de sesgos.

Un amplio estudio de cohortes multicéntrico encontró que el nivel materno en VD durante el primer trimestre de embarazo estaba inversamente correlacionada con el riesgo de bajo peso para la edad gestacional y que los hijos de madres con déficit de VD en el primer trimestre desarrollaban un crecimiento acelerado de peso y longitud en el periodo neonatal, que se consideró como un efecto rebote postnatal debido a la suplementación con VD (Leffelaar, 2010). Un mayor riesgo de desarrollar bajo peso para la edad gestacional también ha sido descrito en las madres con concentraciones bajas de VD durante el segundo trimestre de embarazo (Gernand, 2014). Asimismo, los niveles bajos de VD entre las semanas 28-32 de gestación se han relacionado con una disminución en la distancia rodilla-tobillo al nacimiento, pero no con el peso o la longitud de los recién nacidos (Morley, 2006). Otros estudios sugieren una asociación

bimodal entre los niveles maternos de VD y el estado de bajo peso al nacimiento que afectaría a las mujeres blancas, aunque no a las negras (Bodnar, 2010).

En cambio, en otros trabajos no se ha demostrado asociación entre las concentraciones maternas de VD y los datos somatométricos del recién nacido (al igual que el nuestro) o el crecimiento (Hanieh, 2014; Farrant, 2009;). El estudio publicado por Javaid y cols. en el año 2006 es un estudio longitudinal prospectivo en 198 niños nacidos en Reino Unido que encontró que el nivel materno de VD en el tercer trimestre de gestación no se relacionaba con el peso al nacimiento ($p = 0,24$), la longitud al nacimiento ($p = 0,07$) o el peso de la placenta ($p = 0,43$). No obstante, no se ofrecen datos sobre la edad gestacional de los recién nacidos ni resultados estratificados por sexo.

Mientras que la asociación entre la concentración materna de VD y la somatometría al nacimiento o crecimiento postnatal es incierto, es posible que la suplementación con VD durante el embarazo pueda mejorarlos. En el año 1980, Brooke y cols. intentaron demostrar que la suplementación con VD durante el tercer trimestre disminuía el riesgo de PEG al nacimiento y, aunque la incidencia de estado de PEG en el grupo control fue de casi dos veces superior, el resultado no fue estadísticamente significativo. Tampoco pudo demostrarse en el trabajo de Hollis y cols. del año 2011 ninguna asociación entre la suplementación con VD iniciada durante el segundo trimestre y el peso o incidencia de PEG al nacimiento. Entre los trabajos que sí que demuestran el efecto que tiene la suplementación materna con VD sobre el crecimiento fetal encontramos el de Kilicaslan (2017) llevado a cabo en Turquía (mayor peso, perímetro craneal y circunferencia torácica), Roth (2013) (mayor Z-score de longitud al año de vida) y Kalra y cols. (2012) (mayor peso y longitud al nacimiento). Uno de los trabajos más recientes es un ensayo clínico randomizado con altas dosis de suplementación antenatal con VD en madres deficientes o insuficientes frente a los cuidados estándar que demostró un peso, longitud y perímetro craneal significativamente mayor con la suplementación (Hashemipour, 2014).

Entre los factores que contribuyen a la variabilidad de resultados observados para la asociación entre el estado materno de VD o la suplementación antenatal y la somatometría de los recién nacidos se incluyen, entre otros, diferencias en las poblaciones de estudio (por ejemplo, de raza/etnia), empleo de indicadores absolutos de tamaño al nacimiento o relativos a la edad gestacional, tipos de estudios (transversales, controles randomizados, ensayos clínicos), momento y forma de valoración de los niveles de VD, momento de la suplementación, dosis administrada o población objetivo de dicha suplementación. Pero, además, el genotipo materno y/o fetal pueden también jugar un papel importante en esta interacción, ya que las diferentes

variantes alélicas pueden influir de forma relevante sobre el crecimiento intrauterino, postnatal temprano y de la adolescencia (Morley, 2009; Zmuda, 2000).

6.4 VALORES ANALÍTICOS NEONATALES RELACIONADOS CON LA MINERALIZACIÓN ÓSEA

6.4.1 CAMBIOS EN EL EQUILIBRIO MINERAL ACONTECIDOS TRAS EL PARTO

Como describen la mayoría de los trabajos (Nicolaidou, 2006; Briana, 2008), los valores que obtuvimos de calcio y fósforo en el cordón umbilical fueron significativamente mayores que los medidos en sangre materna en el momento del parto, poniendo de manifiesto la existencia de un transporte activo placentario. Se acepta que el descenso del calcio sérico que se produce durante las primeras horas de vida debido al cese del aporte placentario genera la activación de las glándulas paratiroides del recién nacido – que se encontraban inhibidas hasta ese momento – y un incremento significativo en los valores de PTH neonatal respecto a los de la sangre de cordón que permite la normalización de la calcemia. Este proceso fisiológico queda bien reflejado en los resultados de nuestro estudio, en el que se describe un descenso significativo de los valores calcio asociado a la elevación de los valores de PTH en todos los recién nacidos del estudio en la segunda determinación analítica (mientras que esta hormona se encontraba suprimida en el 93,2% de las muestras de sangre del cordón).

La ausencia de determinaciones seriadas impide que conozcamos el punto de máxima expresión de estos fenómenos. Si tenemos en cuenta que nuestra muestra está constituida por recién nacidos a término sin patología perinatal relevante es de esperar que, en el momento de la segunda determinación analítica (rango 28,6 – 193,7 horas y con el 90% de las determinaciones por encima de las 42 horas de vida), ya se haya superado el momento de máximo descenso del calcio y de elevación de la PTH y que se estima, según las series, entre las 24-36 y las 24-48 horas de vida respectivamente (Saggese, 1991; Briana, 2008) (Figura 81). De todos modos, no hay en la bibliografía un acuerdo unánime sobre la capacidad de respuesta de la glándula paratiroidea al descenso fisiológico de calcio neonatal precoz. Aunque muchos estudios han descrito un rápido y marcado incremento en los niveles de PTH (Romagnoli, 1987), otras investigaciones reportan una ausencia de respuesta de la glándula paratiroidea en algunos casos

(Hillman, 1977; Schedewie, 1979), siendo ésta una de las causas de hipocalcemia neonatal precoz. Entendemos que estas diferencias en los niveles de PTH podrían depender, al menos en parte, del empleo de distintos tipos de antisuero en la determinación de PTH intacta por inmunoanálisis y a la variabilidad en la selección de los pacientes estudiados (edad postnatal, edad gestacional, enfermos o sanos), pero que en el recién nacido a término “sano” el funcionamiento adecuado de las glándulas paratiroideas propicia una elevación “suficiente” en los niveles de PTH durante las primeras horas de vida en respuesta al descenso relativo del calcio neonatal, como lo demuestran los resultados de nuestro estudio.

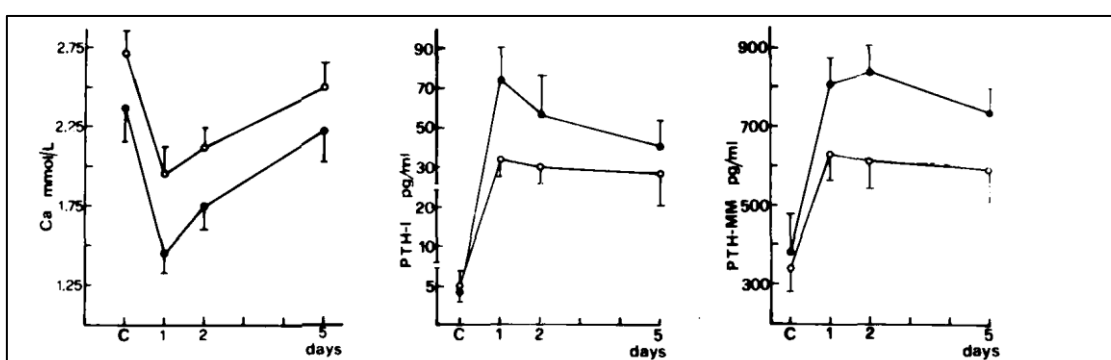


Figura 81. Niveles séricos de Calcio (Ca), PTH intacta (PTH-I) y fragmento medio de la molécula de PTH (PTH-MM) en recién nacidos sanos a término (o) y prematuros hipocalcémicos (●) durante los primeros cinco días de vida (C = sangre de cordón umbilical). Tomado de Saggese G et al ⁽⁴⁵³⁾.

6.4.2 FOSFATASA ALCALINA

Los valores medios de FA en sangre de cordón y en la muestra del recién nacido tomada a los 2-3 días de vida (170 ± 61 UI/L y 184 ± 48 UI/L) son muy similares a los que se observan en otras series (Sachan, 2005; Briana, 2008). En nuestro caso, el valor en sangre de cordón es muy similar al materno en el momento del parto (172 ± 56 UI/L), a diferencia de otros estudios en los que los valores en sangre de cordón se encuentran significativamente aumentados respecto a los de las embarazadas (Yamaga, 1999; Uemura, 2002; Briana, 2008). No obstante, a pesar de la similitud de medias, no existe correlación entre los valores madre-cordón, lo que confirma la hipótesis de que no existe paso transplacentario de FA mediante difusión (Nouwen, 1986). Así, se considera que el remodelado óseo fetal es independiente del materno y que los valores

neonatales de FA al nacimiento dependen de la actividad osteoblástica fetal y no guardan relación con el metabolismo mineral materno (Briana, 2008, Högler, 2003; Sachan, 2005).

En cambio, los valores de FA en sangre del cordón sí que presentan una correlación lineal con los del recién nacido, aunque estos son significativamente mayores, lo que es una constante descrita por la mayoría de los estudios (Högler, 2003; Sachan, 2005). Este incremento se atribuye generalmente a la respuesta compensadora de las glándulas paratiroides que aumenta la resorción mineral con el fin de corregir la tendencia hipocalcémica inicial de los recién nacidos (Briana, 2008; Högler, 2003; Sachan, 2005). Pero también deberían tenerse en cuenta la coexistencia de otros factores en el proceso de adaptación a la vida extrauterina tales como la disminución en la volemia, el incremento de la actividad muscular o el inicio de alimentación oral. De hecho, si tenemos en cuenta la pérdida de agua orgánica de nuestra muestra (calculada a partir del incremento de concentración proteica en aproximadamente un 10%), el discreto aumento que se observa en los niveles de FA durante los primeros días de vida (pasando de 170 UI/L a sólo 184 UI/L), probablemente no sea tal.

El estudio de Briana y cols. del año 2008 tenía como objetivo establecer las diferencias que existen entre los marcadores de formación (BALP) y resorción (NTX) ósea entre los recién nacidos adecuados a la edad gestacional (AEG) y aquellos que cumplían el criterio de retraso del crecimiento intrauterino (RCIU) mediante la determinación de sus valores en 4 puntos temporales: sangre materna, sangre de cordón umbilical y recién nacido el 1º y 4º día de vida. Los niveles de BALP se modificaron de forma significativa en las 4 determinaciones. En el grupo de los recién nacidos a término AEG los valores en las embarazadas eran significativamente menores a los que presentaban los recién nacidos. Al igual que en nuestro caso, este trabajo también demostró la existencia de una correlación entre los valores de la sangre del cordón y los del día 1 y 4 postnatal ($r = 0,74$; $p < 0,001$ y $r = 0,53$; $p = 0,02$ respectivamente), aunque los niveles de FA total fueron significativamente mayores el día 4 que en el día 1 ($p = 0,011$) (Figura 82). En ambos grupos, el efecto sobre los niveles de FA total del género, el tipo de parto o la paridad no fue significativo, hecho que también pudimos corroborar en nuestra serie.

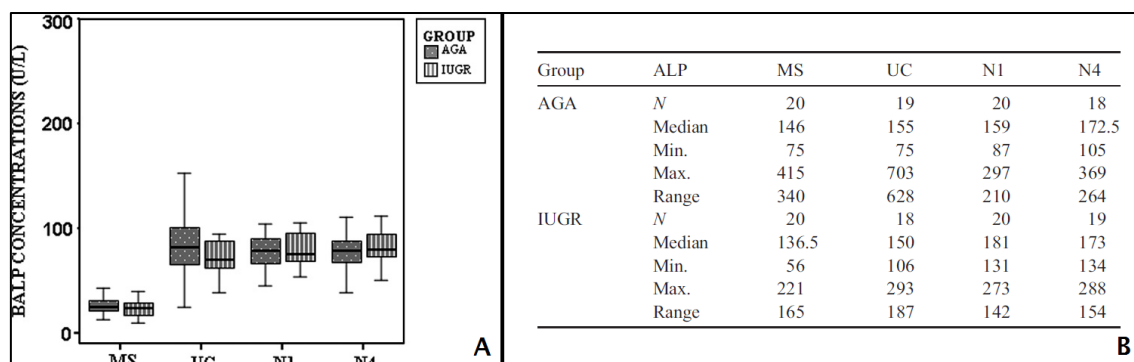


Figura 82. (A) Diagrama de cajas de los valores medios de FA ósea en sangre materna en el momento del parto (MS), fetal en sangre del cordón (UC) y recién nacidos en los días 1 (N1) y 4 (N4) de las muestras séricas de los grupos de apropiados para la edad gestacional (AGA) y crecimiento intrauterino restringido (IUGR). Cada caja representa la concentración media con el rango intercuartílico (percentiles 25 y 75). **(B)** Niveles medios (rango) de Fosfatasa Alcalina (FA) en sangre materna en el momento del parto (MS), fetal en sangre del cordón (UC) y recién nacidos en los días 1 (N1) y 4 (N4) de las muestras séricas de los grupos de apropiados para la edad gestacional (AGA) y crecimiento intrauterino restringido (IUGR). Tomado de: Briana DD et al ⁽⁷³⁾.

En esta misma línea, en el estudio de Höglér y cols. (2003) las concentraciones de los marcadores de remodelado óseo (PICP, osteocalcina y BALP) en el cordón y al nacimiento eran similares a las de las muestras de los 2 días de vida y no guardaban relación con las simultáneas maternas.

6.4.3 VITAMINA D

6.4.3.1 VALORES EN SANGRE DE CORDÓN Y CORRELACIÓN CON LOS VALORES MATERNOS

Nuestro estudio aporta un valor medio de VD en sangre del cordón de $19,7 \pm 10,4$ ng/ml, lo que supone un incremento del 16,6% respecto al simultáneo valor materno, siendo en el 53 % de las determinaciones inferiores a 20 ng/ml.

En un trabajo muy reciente llevado a cabo en el Hospital del Mar en Barcelona ($n = 103$) el valor medio de 25(OH)VD en sangre de cordón fue bastante inferior al nuestro ($12,4 \pm 7,2$ ng/ml), con un 83% de valores por debajo de 20 ng/ml. En el estudio no se detalla el protocolo de inclusión de las madres, pero presenta un gran porcentaje de mujeres no caucásicas (55%) que justifican, a nuestro parecer, que los valores se encuentren por debajo de los de nuestra muestra. De

hecho, en este trabajo se observó una correlación estadísticamente significativa entre los niveles bajos de VD y la etnia, presentando el valor más alto la etnia caucásica ($17,9 \pm 5,8$ ng/ml, un valor muy similar al de nuestro estudio) y el menor la etnia indo pakistaní ($6,7 \pm 4,2$ ng/ml) (Manzano, 2017). El trabajo no determina los niveles de calcidiol en la embarazada, por lo que, aunque asume que existe una correlación entre los valores maternos y los de la sangre del cordón, no prueba la existencia de esta relación.

Existen diversos estudios que han correlacionado los niveles maternos de 25(OH)VD en la mujer embarazada en el momento del parto y los que presenta en sangre del cordón el recién nacido. En la mayoría de los casos se observa una buena correlación lineal positiva entre ambos, con unos coeficientes de correlación (r) que se sitúan entre el 0,6 y el 0,9, siendo el de nuestro trabajo ($r = 0,868$) uno de los más altos. Esto avalaría la tesis de que la 25(OH)VD atraviesa libremente la placenta (ver apartado 1.3.3.2) y que existe una dependencia de los recién nacidos de las reservas maternas de VD (Hossain, 2011; Sachan, 2005). No obstante, el sentido de esta correlación no se mantiene constante. En la mayoría de los trabajos los valores en el recién nacido son inferiores y suponen entre el 60-80% de los maternos (Vieth S, 2013; Waiters, 1999; Zeghoud, 1997). En cambio, existen algunos trabajos en los que, como en nuestro caso, los valores reportados en sangre del cordón son superiores a los maternos (Viljakainen 2010; Nicolaidou, 2006), lo que se traduce en que los valores medios de calcidiol en los recién nacidos ($19,7 \pm 10,4$ ng/ml en nuestro caso) sean discretamente superiores a los descritos hasta ahora en la literatura (Camargo, 2010; Camargo, 2011). La Tabla 55 resume los principales trabajos que han estudiado esta correlación, así como la relación que existe entre ambos.

Tabla 55. Grado de correlación lineal reportados en los diferentes estudios entre los valores de calcidiol de las embarazadas y los simultáneos en sangre fetal en muestra de cordón umbilical y comparación entre ambas concentraciones

ESTUDIO	N	COEFICIENTE CORRELACIÓN LINEAL	25(OH)VD madre	25(OH)VD sangre cordón	Relación entre valor materno y el de sangre de cordón
Kilicaslan, 2017	100	0,86	11,4	8,0	Madre > RN
Vieth S, 2013	107	0,83	29,3	17,3	Madre >> RN
Hossain, 2011	75	0,68	NR	NR	Madre << RN
Viljakainen, 2010	125	NR	18,0	20,3	Madre < RN
Salek, 2008	88	0,79	20,9	11,5	Madre >> RN
Nicolaidou, 2006	123	0,63	16,4	20,4	Madre << RN
Sachan, 2005	207	0,79	14,0	8,4	Madre >> RN
Zeghoud,1997	80	0,81	NR	NR	Madre > RN

NR: No referido

Un estudio descriptivo previo llevado a cabo en nuestro centro durante el mes de marzo del 2012 en una muestra de 87 parejas de embarazadas y recién nacidos mostró unos valores medios de VD de $19,5 \pm 7,6$ ng/ml y $19,9 \pm 9,3$ ng/ml respectivamente con un 53% de recién nacidos deficitarios y una correlación entre los valores maternos de VD y los de sangre del cordón muy similar a la actual ($r = 0,83$; $p < 0,001$).

6.4.3.2 EVOLUCIÓN TEMPORAL

El descenso en torno al 20% en los valores de calcidiol que experimenta nuestra muestra de recién nacidos durante las primeras horas de vida (pasando de 19,7 ng/ml en sangre de cordón a 15,7 ng/ml en el momento del alta) resulta más destacable si se tiene en cuenta el fenómeno de la hemoconcentración y también ha sido demostrado por otros estudios que han realizado determinaciones seriadas en el recién nacido. Uno de los primeros trabajos que estudió el metabolismo fetomaterno de la VD objetivó que los valores de calcidiol de los recién nacidos a las 24 horas de vida sufrían un descenso con respecto a los de la sangre de cordón, tanto en verano ($18,9 \pm 8,4$ ng/ml y $16,6 \pm 6,4$ ng/ml) como en invierno ($8,8 \pm 3,4$ ng/ml y $7,7 \pm 3,2$ ng/ml) (Kuroda, 1981). En otro trabajo más reciente desarrollado en Italia se demostró un descenso significativo en la concentración sérica de 25(OH)VD que pasó de $21,4 \pm 11$ ng/ml en sangre de

cordón a $14,9 \pm 7$ ng/ml en la determinación realizada durante los primeros 3 días de vida coincidiendo con el screening metabólico (Cadario, 2013).

Tras el nacimiento, el incremento de concentración de PTH en el recién nacido propiciado por la caída en los niveles de calcio estimula, mediante la activación de la 1α -hidroxilasa renal, la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ a partir de las reservas fetales de calcidiol, lo que ocasionará un descenso de sus niveles (dependientes de los maternos a través del transporte transplacentario) hasta que el recién nacido sea capaz de generar sus propios depósitos, bien a través de la síntesis cutánea o mediante el aporte exógeno en forma de fórmulas adaptadas o suplementos vitamínicos.

6.4.3.3 INTERACCIÓN CON EL RESTO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

En nuestro estudio, los niveles de VD maternos no condicionaron los valores del resto de parámetros del recién nacido vinculados al proceso de mineralización, lo que supone una constante en la mayoría de los trabajos. En el estudio de Salek del año 2008 llevado a cabo en Isfahán (Irán) no se halló una correlación significativa entre el déficit materno de VD y los niveles de calcio ($p = 0,9$), fósforo ($p = 0,1$), PTH ($p = 0,7$) o FA ($p = 0,1$) de los recién nacidos.

A la vista de estos resultados podríamos concluir que la situación materna de VD – al menos en la determinación actual basada en los niveles de $25(\text{OH})\text{VD}$ total- no va a determinar un “ambiente metabólico” desfavorable para que continúe el proceso de mineralización del esqueleto neonatal, hecho que ya había sido apuntado por los primeros estudios que abordaron el estudio de la fisiología mineral del recién nacido. En el trabajo de Hillman del año 1977 se realizaron determinaciones seriada de calcio, magnesio, PTH y $25(\text{OH})\text{VD}$ de recién nacidos prematuros y a término en sangre de cordón, a las 48 horas y a los 7 días de vida postnatal. Al igual que en nuestro trabajo, se encontró una correlación negativa entre los valores de calcio en sangre de cordón y la concentración de PTH a las 48 horas de vida ($r = -0,53$; $p < 0,01$), pero los valores de calcidiol en sangre de cordón no se asociaron con ninguno de los parámetros estudiados. En esta misma línea, un estudio posterior también demostró una correlación inversa altamente significativa entre el calcio neonatal y la concentración de PTH, pero una ausencia de correlación entre los valores maternos o neonatales de calcidiol y el calcio sérico (Okonofua, 1986). El único estudio que apunta hacia un cierto papel del calcidiol materno en la regulación de la concentración de calcio en el recién nacido fue el publicado por Zeghoud en Francia en el

año 1997. La concentración de calcio de los recién nacidos a los 3-6 días de vida osciló entre 6,9 – 10,9 mg/dl. No se demostraron diferencias significativas en los niveles de calcio de los hijos de madres que habían recibido suplementación con VD ($10,1 \pm 0,3$ mg/dl) y aquellos cuyas madres no habían tomado suplemento pero presentaban unos valores de calcidiol superiores a 12 ng/ml ($10,1 \pm 0,4$ mg/dl). Por el contrario, las concentraciones eran significativamente inferiores en los recién nacidos de madres no suplementadas y con concentraciones de 25(OH)VD inferiores a 6,5 ng/ml ($9,7 \pm 0,8$ mg/dl) o entre 6,5 – 12 ng/ml ($9,8 \pm 0,8$ mg/dl). Dos de los recién nacidos con concentraciones maternas de calcidiol inferiores a 6,5 ng/ml y uno de los que se encontraban entre 6,5 – 12 ng/ml estuvieron afectados de hipocalcemia. Las concentraciones de fósforo y los valores de FA de los recién nacidos no fueron significativamente diferentes con relación al estado materno de VD (Zeghoud, 1997). Resulta importante advertir que los puntos de corte empleados en este trabajo para definir la situación de deficiencia/insuficiencia materna de VD se encuentran muy por debajo de las actuales recomendaciones.

6.5 VALORACIÓN ECOGRÁFICA DEL HUESO FETAL

Hasta la actualidad los controles ecográficos de la embarazada habituales solo incluyen alguna medida longitudinal de huesos largos. Aspectos morfológicos del hueso y de su mineralización no suele ser estudiados. No obstante, el desarrollo durante los últimos años de técnicas ultrasonográficas tridimensionales de alta resolución, han permitido una mejor evaluación intrauterina del hueso. Aprovechando estas nuevas tecnologías, hemos valorado la utilidad de diferentes medidas ecográficas a nivel femoral como indicadores indirectos del grado de mineralización.

6.5.1 NIVEL DE CORRELACIÓN CON VALORES DE REFERENCIA

Hasta ahora, la medición de la longitud femoral (LF) mediante ecografía era el marcador ecográfico más comúnmente empleado en la biometría fetal. Una LF corta es también un posible marcador de anomalías cromosómicas (Smith-Bindman, 2001) y de restricción del crecimiento fetal (Papageorghiou, 2008). Los valores de LF de nuestro estudio se encuentran en línea con los datos recientemente publicados por la OMS (disponible en <https://intergrowth21.tghn.org/articles/intergrowth-21st-fetal-growth-standards/>) en los que

el percentil 50 es de 3,13 cm en la semana 20 ($3,27 \pm 0,27$ cm en nuestro estudio) y 6,31 cm en la 34 ($6,25 \pm 0,30$ cm). Es cierto que la LF es una de las mediciones empleadas habitualmente para el cálculo de la longitud fetal y la estimación del peso al nacimiento junto con otras mediciones entre las que se incluyen el diámetro biparietal y la circunferencia abdominal (Chitty, 1994; Hadlock, 1984b), pero el grado de correlación directa entre ambos parámetros no está del todo establecido. Así, en nuestro caso, no se obtuvo una correlación significativa entre la LF de la semana 20 o 34 y el peso o longitud de los recién nacidos. Trabajos clásicos de obstetricia han demostrado que la LF fetal guarda una fuerte correlación con la longitud craneocaudal fetal del primer trimestre de gestación (Hadlock, 1984a; Ott, 1985) y que el acortamiento de la LF entre las semanas 19-41 de gestación se asocia con un mayor riesgo de PEG y RCIU (Goetzinger, 2012), bajo peso al nacimiento y prematuridad (Mailath-Pokorny, 2015; Ozlu, 2013). Asimismo, también existen trabajos que han demostrado la existencia de una correlación significativa entre la LF y el peso (Firoozabadi, 2007) o la longitud ($r = 0,712$) (Melamed, 2012) de los recién nacidos.

Hay que destacar que, con excepción de la LF, el resto de las mediciones ecográficas de nuestro estudio no suelen realizarse de modo habitual, por lo que no existen datos de series amplias con los que poder comparar nuestros resultados. La Tabla 56 muestra una comparación entre nuestros resultados y los obtenidos en otros estudios similares. Como puede observarse, los valores son muy similares en todos los casos, lo que avala la validez de nuestras mediciones.

Llama la atención que, en nuestra casuística, el valor del área metafisaria distal (AMD) de la semana 34 es significativamente inferior al referido por el trabajo de Mahon – a pesar de que en la semana 20 los resultados obtenidos eran prácticamente idénticos- lo que se traduce en la existencia de un aumento significativo del índice de ensanchamiento ($IE = AMD/LF$) en su serie, mientras que en nuestro caso este índice relativo permanece más estable.

Tabla 56. Comparación entre los resultados de distintas medidas ecográficas a nivel femoral de nuestro estudio y valores referidos en trabajos similares. Los resultados se expresan como media \pm DE o valor de mediana [RIC]

		SEMANA 20		SEMANA 34	
		Otros estudios	Nuestra serie	Otros estudios	Nuestra serie
LF (cm)	Ioannou, 2012 n = 357		3,27 \pm 0,27	6,43 \pm 0,36	6,25 \pm 0,30
	Mahon, 2010 n = 424	2,92 [2,90-2,94]		6,36 [6,33-6,39]	
AMD (cm ²)	Mahon, 2010 n = 424	0,222 [0,217-0,226]	0,217 \pm 0,087	0,765 [0,748-0,783]	0,468 \pm 0,171
DFM (mm)	Ioannou, 2012 n = 357		4,94 \pm 0,97	7,00 \pm 1,1	7,67 \pm 1,25
DMP (mm)	Ioannou, 2012 n = 357		7,39 \pm 1,02	13,6 \pm 1,8	13,8 \pm 1,6
IE (cm ² /cm)	Mahon, 2010 n = 424	0,076 (0,075-0,078)	0,067 \pm 0,027	0,120 [0,118-0,123]	0,075 \pm 0,027
VF (ml)	Ioannou, 2012 n = 357		0,92 \pm 0,28	4,86 \pm 1,21	5,17 \pm 1,21
	Chang CH, 2007 n = 346	1,02 [0,79-1,25]		3,82 [3,31-4,33]	

AMD: Área metafisaria distal; DFM: Diámetro femoral medio; DMP: Diáfisis metafisaria proximal; IE: Índice Ensanchamiento; LF: Longitud femoral; VF: Volumen femoral; DE: Desviación estándar; RIC: Rango intercuartílico

6.5.2 ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES MATERNOS DE CALCIDIOL E INGESTA DE CALCIO Y LOS INDICADORES ECOGRÁFICOS DE MINERALIZACIÓN FETAL

En nuestro estudio, ninguna de las mediciones ecográficas primarias (LF) o secundarias (IE o VF) mostró asociación significativa con los valores de VD de las gestantes. De hecho, todos los coeficientes de correlación de Pearson (r) obtenidos entre las distintas mediciones y la concentración de 25(OH)VD más cercana al estudio ecográfico (A1 para la ecografía de la semana 20 y A2 para la de la semana 34) fueron inferiores a 0,15. Creemos de interés resaltar que algunas de las mediciones no se valoran en el seguimiento ecográfico habitual, por lo que existen muy pocos estudios que hayan valorado esta asociación. En una revisión sistemática publicada en el año 2014 con el objetivo de relacionar los niveles maternos de 25(OH)VD y los

indicadores ecográficos de crecimiento fetal (Galthen-Sorensen, 2014) se identificaron inicialmente 750 publicaciones, de las que se descartaron 741 por el título o resumen al entender que no aportaban información relativa al objeto de la revisión. De los 9 estudios que se evaluaron de forma completa, 3 fueron excluidos por no aportar datos originales o adaptarse a la estrategia PICOS (*participants, interventions, comparators, outcomes and study design*) definida y en 1 no se pudo recuperar el texto completo, por lo que finalmente 5 estudios observacionales fueron seleccionados para su inclusión en la revisión (Figura 83) y de ellos sólo podemos establecer comparación con 4, ya que las mediciones aportadas por el otro no coinciden con las de nuestro estudio (Fernandez-Alonso, 2011).

Characteristic	Mabon (2010) ⁴⁰	Fernandez-Alonso (2011) ⁴¹	Ioannou (2012) ⁴²	Young (2012) ⁴³	Walsh (2013) ⁴⁴
Design	Observational	Observational	Observational	Observational	Observational
Population size	424	498	357	171	60
Location (latitude)	Southampton, UK (51°N)	Almeria, Spain (36°N)	Southampton, UK (51°N)	Baltimore, US (37°N) Rochester, US (43°N)	Dublin, Ireland (53°N)
Age (mean or median)	31.7 years	30 years	31.6 years	17.1 years	31.7 years
BMI (mean or median)	23.9 kg/m ²	23.9 kg/m ²	23.7 kg/m ²	24.7 kg/m ²	26.6 kg/m ²
Maternal weight gain (mean)	N/A	N/A	N/A	16.8 kg	N/A
Alcohol intake* (% of participants)	N/A	N/A	25.2%	N/A	N/A
Smoking (% of participants)	14%	17.9%	13.6%	10%	3.33%
Ethnicity	Caucasian: 97.4%	Caucasian: 83.5%; Arabic: 9.6%	N/A	African American: 66.7%; White: 33.3%	Caucasian: 100%
Parity (% nulliparous)	59.4%	52.4%	59.1%	91.8%	N/A
Vitamin D intake (mean)	N/A	N/A	N/A	5.4 µg/day	2.8 µg/day
Calcium intake (mean)	N/A	N/A	N/A	917 mg/day	N/A
25(OH)D measurement method	Diasorin RIA	Roche Modular E 170 analyzer	Diasorin RIA	Diasorin RIA	Immunodiagnostic Systems
25(OH)D (mean or median)	61 nmol/L (34 wks)	68.4 nmol/L (11–14 wks)	63 nmol/L (34 wks)	54.7 nmol/L (At delivery)	45.6 nmol/L (14 wks); 54.4 nmol/L (28 wks); 31.8 nmol/L (cord blood)
GA at fetal growth exam	19, 34 wks	11–14 wks	19, 34 wks	34 wks	20, 34 wks
Fetal growth parameters	FL, FDM-CSA, femoral splaying index	CRL	FL, PMD, MSD, FV	Femur and humerus Z-score	HC, BPD, AC, EFW

Only the first author of each study is given. *Alcohol consumption of ≥ 4 units/week. 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D; AC, abdominal circumference; BPD, biparietal diameter; CRL, crown-rump length; EFW, estimated fetal weight; FDM-CSA, femoral distal metaphyseal cross-sectional area; FL, femur length; FV, femoral volume; HC, head circumference; MSD, femoral midshaft diameter; N/A, not available; PMD, femoral proximal diameter; RIA, radioimmunoassay; wks, gestational weeks.

Figura 83. Características de los estudios incluidos en la revisión sistemática para establecer el papel de los niveles maternos de VD en el crecimiento del hueso fetal. Tomado de: Galthen-Sorensen M et al (163).

En cuanto a la LF, en el estudio de Mahon no se pudo demostrar una asociación entre la LF y la concentración de 25(OH)VD de las embarazadas mientras que Walsh en el año 2013 sí encontró una correlación positiva entre los niveles de 25(OH)VD en la semana 28 y la LF a las 34 semanas en el subgrupo de embarazo durante el invierno. En un estudio llevado a cabo en adolescentes, Young y cols. demostraron que los niveles de 25(OH)VD superiores a 20 ng/ml en el momento del parto se correspondían con unos mayores Z-scores de LF y longitud humeral (LH) en la ecografía realizada en la semana 34. Los análisis de interacción mostraron que los Z-scores de LF y LH solo se asociaban con los niveles de 25(OH)VD cuando la ingesta de calcio era inferior a 1100 mg/día (punto de corte establecido en este trabajo para la suficiencia de calcio dietético).

En el análisis multivariable, tanto el Z-score de LH como el de LF eran mayores en mujeres con ingesta de calcio > 1100 mg/día y/o niveles de 25(OH)VD > 20 ng/ml en comparación con el grupo con doble déficit (bajas concentraciones de VD y aporte de calcio inadecuado). Esta asociación entre ambos factores también parece intuirse en los resultados de nuestro trabajo, aunque sin alcanzar significación estadística. Así, son las madres con ingestas bajas de calcio en las que el déficit de VD tiene una mayor repercusión, mientras que un aporte suficiente de calcio en la dieta de las gestantes parece aportar cierta protección al hueso fetal en crecimiento. El aporte dietético de calcio se demostró también como factor determinante en un estudio retrospectivo que incluyó a 1120 gestantes afroamericanas adolescentes (≤ 17 años) entre 1990-2000 (Chang SC, 2003). En el modelo lineal generalizado de regresión múltiple la ingesta elevada de calcio al inicio de los cuidados prenatales se asoció con un crecimiento de la LF significativamente mayor tras ajustarlo por edad gestacional, edad materna, IMC pregestacional y diámetro biparietal fetal. En el trabajo no se aportan datos dietéticos ni analíticos de VD.

En la serie de Ioannou y cols. (n = 357) se obtuvieron valores de 25(OH)VD en las gestantes, diámetro femoral medio (DFM), diámetro metafisario proximal (DMP) y LF a las 34 semanas y se calculó el volumen femoral (VF) (ver apartado 4.3.3.7). Los niveles de 25(OH)VD se correlacionaron de manera significativa con el logVF ($r = 0,147$; $p = 0,006$) y con el DMP ($r = 0,176$; $p = 0,001$). En la regresión múltiple el efecto de la 25(OH)VD sobre el VF fue atenuado, pero persistió significativo para el DMP.

Finalmente, el IE -resultado del cociente entre el AMD y la LF- es el parámetro sugerido por el grupo de Mahon para identificar los cambios sobre la arquitectura ósea que puede producir el déficit de VD de las embarazadas (n = 424). En la semana 19 de embarazo se demostró la existencia de correlación entre los valores de 25(OH)VD y el AMD (cm^2) en la sección transversa ($r = 0,16$; IC 95% 0,25 – 0,06) y el IE (cm^2/cm) ($r = 0,17$; IC 95% 0,26 – 0,07). En comparación con los fetos cuyas madres eran suficientes en VD, el AMD era un 5% mayor en las insuficientes y un 14% mayor en las deficientes. La morfología femoral también siguió esta tendencia, de modo que el IE en la semana 19 fue 0,074 (IC 95% 0,072–0,076) cm^2/cm en los hijos de madres con niveles de 25(OH)VD > 20 ng/ml y 0,078 (IC 95% 0,075–0,081) y 0,084 (IC 95% 0,076–0,093) cm^2/cm en aquellos cuyas madres presentaban valores entre 20 – 30 ng/ml o inferiores a 20 ng/ml respectivamente. No se objetivaron diferencias en cuanto al sexo en esta asociación y tampoco se demostró que otras variables demográficas maternas o la estacionalidad influyeran en esta relación. En cuanto a la valoración de la semana 34, se mantuvieron estas relaciones, aunque la asociación estadística fue un poco más débil ($r = -0,10$; IC 95% 0,20 - 0,00 para el AMD y $r = 0,11$; IC 95% 0,21 - 0,01 para el IE).

6.6 VALORES DE DENSIDAD MINERAL ÓSEA EN LOS RECIÉN NACIDOS

Hemos empleado el estudio de DEXA a nivel de columna lumbar como método para establecer el grado de mineralización del esqueleto neonatal por ser esta localización la que recomiendan las Sociedades Científicas en el caso de los niños menores de 5 años (Kalkwarf, 2014). Está bien establecido que el grado de recambio óseo del esqueleto es mucho más rápido en el hueso trabecular que en el cortical. Además, el hueso trabecular es más sensible a los cambios metabólicos (Seeman, 1982). Por este motivo, la mayor parte de la literatura aboga por estudiar los cambios en la mineralización ósea del esqueleto a través de la densitometría de rayos X de doble energía a nivel lumbar (L2-L4), ya que se trata de estructuras compuestas principalmente por hueso trabecular. Además, el cálculo de los valores del contenido mineral óseo (CMO) y de la densidad mineral ósea (DMO), a nivel lumbar, se obtiene generalmente de manera fácil sin sedación, incluso en los recién nacidos, y permite una rápida evaluación con una baja irradiación, buena exactitud y reproductibilidad cuando se compara con las antiguas mediciones obtenidas mediante rayo-lápiz (Godang, 2010). El CMO vertebral no sólo depende de la cantidad del depósito de minerales en la matriz ósea, sino también del tamaño vertebral, de modo que para la obtención de un indicador relativo que permita expresar los cambios en la mineralización ósea debemos dividir su valor (g) entre el volumen vertebral (cm^3). Sin embargo, el cálculo de este volumen, que permitiría obtener el valor de la DMO_v , resulta técnicamente difícil e impreciso (Katzman, 1991), aunque con los actuales equipos de medición se está tratando de solventar esta limitación. Por este motivo, los valores de CMO (g) obtenidos en las poblaciones pediátricas suelen ser referidos al área ósea proyectada (cm^2) y expresados como valores de DMO_a (g/cm^2) que proporcionará una medida bidimensional de una estructura tridimensional: el hueso. Por este motivo, y como ya se ha expuesto previamente, la DMO_a también se encuentra influenciada por la longitud/profundidad del hueso (ver apartado 1.1.5.1) y, consecuentemente, por la altura del sujeto estudiado que, en el caso de los recién nacidos, suele guardar una estrecha relación con el peso al nacimiento (ver apartado 6.8.5).

La valoración de la DMO del esqueleto neonatal mediante DEXA ha sido previamente evaluada por otros grupos de investigadores, aunque la mayoría han utilizado dispositivos técnicos distintos al empleado por nuestro grupo. En el presente trabajo aportamos 95 determinaciones de DMO lumbar neonatal obtenidos mediante un densitómetro Lunar DPX-L (*General Electrics*). Se trata de una de las series más amplias realizadas con este equipo en recién nacidos a término

sanos. La serie de Godang y cols. aportó los datos de DMO corporal total de 207 neonatos ($0,348 \pm 0,043 \text{ g/cm}^2$ en niños y $0,338 \pm 0,044 \text{ g/cm}^2$ en niñas) empleando el densitómetro Lunar Prodigy, un dispositivo con rayo de luz en abanico muy similar al DPX-L, existiendo un elevado grado de correlación entre las mediciones de ambos (Huffman, 2005). También mediante el empleo del dispositivo Lunar Prodigy, el estudio más reciente del que tenemos constancia (Manousaki, 2016) proporcionó datos normativos de CMO, DMO areal y DMO volumétrica a nivel de L2-L4 de una población infantil canadiense menor de 5 años (Figura 84). Los datos referentes a la población neonatal incluyen a 30 recién nacidos (15 varones) entre los 15 y los 30 días de vida y el valor de DMOa obtenido ($0,30 \pm 0,04 \text{ g/cm}^2$) es discretamente superior al de nuestro estudio ($0,259 \pm 0,052 \text{ g/cm}^2$), aunque debemos tener en cuenta la mayor edad de sus recién nacidos.

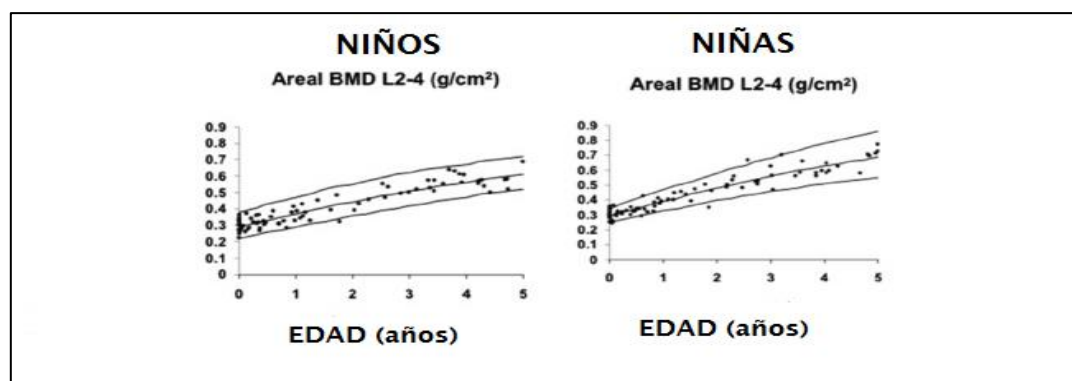


Figura 84. Valores de DMO areal (L2-L4) en relación con la edad en niños menores de 5 años obtenida mediante densitómetro Lunar Prodigy (GE). Tomado de: Manousaki D et al ⁽³²⁴⁾.

En nuestra serie, al igual que en otras, los valores de DMO son similares en ambos sexos, cuando las alturas son similares.

6.7 CORRELACIÓN ENTRE DMO Y OTROS MARCADORES INDIRECTOS DE MINERALIZACIÓN

6.7.1 CORRELACIÓN ENTRE DMO Y PARÁMETROS BIOQUÍMICOS: FOSFATASAS ALCALINAS

En nuestro trabajo no se demostró correlación entre la concentración de FA y el valor de DMO.

Existen pocos trabajos que hayan estudiado la relación de los marcadores bioquímicos de formación/resorción con estudios de imagen de mineralización en población neonatal. En uno de ellos, el CMO corporal total de los recién nacidos coreanos se correlacionó de forma inversa con el telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I (ICTP) ($r = -0,333$; $p = 0,008$) y con el propéptido C-terminal del procolágeno de tipo I (PICP) ($r = -0,250$; $p = 0,04$) (Namgung, 1998). Posteriormente, un estudio llevado a cabo en California en 80 embarazadas y sus recién nacidos demostró que las FA en sangre de cordón estaban inversamente correlacionadas con el CMO corporal total obtenido mediante DEXA en los recién nacidos entre los 8-21 días de vida ($r = -0,26$; $p = 0,02$). En el modelo de regresión multivariable, el peso del recién nacido en el momento de la prueba fue el predictor más contundente del valor no ajustado de CMO corporal ($p < 0,0001$), mientras que tanto la PTH como la FA ósea contribuyeron de forma modesta, aunque significativa, al modelo ($p = 0,006$ y $p = 0,03$ respectivamente) (Dror, 2012). En ambos estudios la asociación con los marcadores bioquímicos de formación/resorción ósea es discreta y se obtiene para los valores de CMO corporal total y no de DMO que ha sido el parámetro evaluado en nuestro trabajo. Además, en un estudio llevado a cabo en RNPT (edad gestacional media 29 ± 2 semanas, peso medio 1129 ± 279 g) tampoco se consiguió demostrar la asociación entre el CMO de los recién nacidos a las 40 semanas de edad gestacional corregida y los valores medios de FA ($p = 0,8$) o valor “pico” de FA ($p = 0,5$) (Faerk, 2002).

6.7.2 CORRELACIÓN ENTRE DMO Y EL ESTUDIO ECOGRÁFICO DE MINERALIZACIÓN FETAL

Se trata de una asociación poco estudiada y de la que resulta difícil obtener conclusiones, dado el escaso número de estudios que la han valorado. En nuestro caso, ni el IE (empleado como teórico indicador de una deformidad ósea similar a la del raquitismo) ni el cálculo del VF obtenido mediante ecuación mostraron ningún tipo de asociación con los valores de DMO de los recién nacidos del estudio.

El estudio de Ioannou y cols. demostró la existencia de una correlación positiva entre logVF y el CMO de los recién nacidos ($r = 0,257$; $p < 0,001$) que persistió en el análisis de regresión múltiple tras controlar el efecto de la edad materna, altura y hábito tabáquico. No obstante, esta relación, al igual que en nuestro estudio, no pudo demostrarse para la DMO ($r = -0,052$; $p = 0,461$). El único estudio en el que hemos encontrado la medición del IE (Mahon, 2010) no aporta datos de densitometría en los recién nacidos.

6.7.3 CORRELACIÓN ENTRE DMO Y LOS NIVELES DE VD

En nuestra serie no se ha demostrado la existencia de una asociación significativa entre los valores maternos y/o fetales de 25(OH)VD en el momento del parto y el grado de mineralización (cuantificado como DMO (g/cm^2) a nivel de la columna lumbar) de los recién nacidos.

La mayoría de los estudios que han probado esta asociación, no han empleado los datos obtenidos en el periodo perinatal inmediato – que son los que mejor reflejan la influencia de la situación materna sobre la homeostasis mineral del feto-, sino que se basan en estudios realizados a lo largo de la infancia o de la adolescencia. Así, en la cohorte de RAINE (Zhu K, 2014) el déficit materno de VD a las 18 semanas de gestación se asoció con un menor pico de masa ósea de sus hijos a la edad de 20 años. Específicamente, se demostró una reducción del 2,7% en el CMO corporal total y una disminución del 1,7% en la DMO en los hijos de madres deficientes en VD tras ajustar los resultados a la estación de recogida de la muestra y otros factores maternos y neonatales. Un trabajo previo llevado a cabo en el Reino Unido también estableció una asociación significativa entre las concentraciones maternas de 25(OH)VD al final del embarazo y el CMO corporal total ($r = 0,21$; $p = 0,01$) y en columna lumbar ($r = 0,17$; $p = 0,03$) de los niños a los 9 años, aunque en ambos casos el coeficiente de correlación fue bajo (Javaid, 2006). En este estudio, la reducción en la concentración venosa de calcio a nivel umbilical también fue un predictor de masa ósea disminuida durante la infancia.

Hemos encontrado 4 estudios que valoran los niveles de VD y el grado de mineralización en edades tempranas, aunque emplean diferentes técnicas de imagen y parámetros para su estudio (Tabla 57). Ninguno de ellos ha demostrado asociación significativa entre los valores maternos y/o en sangre de cordón del recién nacido y la DMO lumbar estudiada mediante DEXA. Si se han reportado algunas asociaciones de valores maternos y/o neonatales de calcidiol y CMO de diversas localizaciones (Viljakainen, 2010; Weiler, 2005).

Tabla 57. Estudios que han valorado el grado de mineralización de los recién nacidos en relación con las concentraciones de calcidiol maternas y/o en sangre de cordón

	TÉCNICA ESTUDIO MINERALIZACIÓN	N	EDAD	DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS
Dror, 2012	DEXA corporal total	80	8-21 días	No establece asociación entre valores de 25(OH)VD en sangre cordón y CMO de los recién nacidos (no aporta datos de DMO)
Viljakainen, 2010	pQTC tibial	125	10 días	Los hijos de madres con niveles de 25(OH)VD superiores a la media (17,0 ng/ml) mostraron valores superiores de CMO, pero no de DMO
Akcakus, 2006	DEXA corporal total	100	24 horas	No asociación entre los valores de 25(OH)VD en la madre o el recién nacido y el CMO o DMO neonatal
Weiler, 2005	DEXA femoral, lumbar y corporal total	50	15 días	En los hijos de madres con 25(OH)VD > 15 ng/ml se obtuvieron valores superiores de CMO/Kg (g/Kg) en las 3 localizaciones. No se encontró correlación con la DMO.

CMO: Contenido mineral óseo; DMO: Densidad mineral ósea; DEX: Densitometría dual de rayos X; pQTC: Tomografía Computarizada Cuantitativa periférica; NS: No significativo

Además, en el estudio Weiler y cols. se construyó un modelo predictivo mediante un análisis de regresión según el cual el CMO corporal dependía de 4 variables cuya ecuación final fue $CMO = -178,8 + 4,305(EG \text{ [semanas]}) + 0,021(PN \text{ [g]}) + 0,332(VD \text{ del RN [nmol/L]}) - 0,139(VD \text{ materna [nmol/L]})$ $R = 0,859$; $p < 0,001$ para edad gestacional y peso y $p < 0,03$ para las determinaciones de VD. Así, los valores mayores de edad gestacional, peso al nacimiento y VD en el recién nacido estaban asociados a un mayor CMO, pero tras ajustar por la VD del recién nacido, la VD de la madre se asoció de forma negativa con el CMO. El estudio concluye que los niños más grandes poseen mayor CMO corporal total solo si sus niveles de VD son adecuados, pero no ofrece una explicación razonable para la asociación inversa que se obtiene con el valor materno de calcidiol.

A la vista de los resultados de nuestro estudio y de los datos publicados en trabajos similares, creemos que no existe evidencia suficiente para afirmar que los niveles de VD de las mujeres embarazadas – y su traducción con la correlación de los valores neonatales en sangre de cordón– resulten determinantes en el grado de mineralización del esqueleto neonatal. Este resultado corroboraría las tesis de diversos autores según las cuales el transporte activo de calcio a través de la placenta se preserva con independencia de los niveles maternos de VD y que el déficit de

esta vitamina no condiciona la adecuada mineralización del esqueleto del feto en desarrollo (Glorieux, 2014; Kovacs 2008). Con respecto a la importancia que se le concede a la VD en la mineralización ósea, no deja de sorprender el ínfimo contenido en esta vitamina de la leche materna ($\approx 0,1$ mcg/100ml), especialmente la producida durante los primeros días tras el parto, precisamente en un periodo de rápida mineralización. Este dato, junto con la escasa repercusión que sobre la mineralización ósea tiene el déficit de VD observada en distintos trabajos, incluido el nuestro, hace pensar que, en la primera época de la vida, en la que la ingesta de calcio es elevada, la VD tiene en cuanto a la mineralización ósea menor (o incluso escasa) importancia.

Pero también es posible que se deba redefinir el concepto de déficit de VD, teniendo en cuenta no únicamente la concentración total de 25(OH)VD, sino también su fracción libre y biodisponible, los niveles de DBP y sus fenotipos (Holick, 2013), en especial en aquellas situaciones biológicas que, como el embarazo, puedan alterar la concentración de las proteínas transportadoras (Schwartz JB, 2014). Basándose en la hipótesis de la “fracción hormonal libre” demostrada en otras hormonas esteroideas lipofílicas, diversos autores defienden que esta fracción libre es la responsable directa de las acciones biológicas atribuidas a la VD (Alonso MA, 2015; Bringhurst, 2012) por ser la disponible para la unión con los receptores celulares y, en el caso de la 25(OH)VD, transformación en el metabolito activo. Hasta hace muy poco, la determinación sérica de la fracción libre de la 25(OH)VD era una tarea ardua basada en técnicas de unión proteica mediante equilibrio por diálisis o estimaciones indirectas a través de ecuaciones inferenciales (Bikle, 1986; Vermeulen, 1999). En los últimos años, se han desarrollado técnicas de inmunoensayo mediante ELISA que permiten la determinación directa de la fracción libre de esta hormona (Future Diagnostics B.V., Wijchen, The Netherlands, <http://www.future-diagnostics.nl/>), facilitando una estimación más precisa (Schwartz JB, 2014). Del mismo modo, existe un interés creciente por la búsqueda de nuevos marcadores de metabolismo óseo vinculados al déficit de VD más específicos que la PTH y la FA. Entre ellos, el FGF23 que es una proteína sintetizada por osteocitos y osteoblastos que inhibe la reabsorción proximal de fósforo, promueve la disminución de los niveles de calcitriol al inhibir la 1- α -hidroxilasa renal y bloquea la síntesis/liberación de PTH intacta (Shimada, 2004) (ver apartado 1.1.4.2.5). Sus valores se incrementan en la enfermedad renal crónica como respuesta a la sobrecarga de fosfato y existen datos que avalan una fuerte correlación negativa entre los valores de FGF23 y las fracciones libres de VD (Chao, 2015).

Otra posibilidad para tener en cuenta es que, tal y como se apunta en algunos estudios observacionales y en el nuestro propio, los niveles de 25(OH)VD pueden afectar al crecimiento del hueso fetal bajo ciertas circunstancias, especialmente en los casos de bajo aporte de calcio simultáneo (ver apartado 6.8.2). Demostrar este extremo requeriría plantear nuevos estudios de carácter experimental.

6.8 DETERMINANTES DEL GRADO DE MINERALIZACIÓN DE LOS RECIÉN NACIDOS

Ante la ausencia de estudios amplios en población neonatal sobre el grado de mineralización y valores normales de DMO, no hemos podido establecer un valor que defina un estado de mineralización subóptimo. Por ello, y basándonos en las implicaciones más clínicas del estudio, centradas de la búsqueda de aquellos recién nacidos especialmente susceptibles, decidimos tomar, como punto de referencia para el análisis estadístico bivariable el valor medio de nuestra muestra para realizar una primera aproximación a los factores maternos y/o neonatales que pudieran estar más relacionados con el proceso de mineralización subóptima. En el análisis multivariable hemos tratado de aproximarnos más al estado patológico de mineralización, analizando los riesgos relativos de los diferentes factores para que el resultado del estudio de DMO lumbar se encontrara por debajo del percentil 25 de nuestra muestra.

6.8.1 RELACIÓN ENTRE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA Y LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS EMBARAZADAS

La comparación de la edad media y el valor de IMC de las embarazadas mostraron diferencias significativas en el análisis bivariable, aunque en el análisis multivariable ninguno de estos factores fue determinante.

En un amplio estudio poblacional llevado a cabo en China sobre una muestra de 11,898 niños sanos de 0-3 años el análisis de regresión linear multivariable indicó una asociación positiva significativa entre la DMO lumbar y la ganancia de peso materna durante el embarazo (Xu, 2013). En otro estudio de cohortes (*The Avon Longitudinal Study of Parents and Children*) el análisis de regresión multivariable demostró que el IMC materno pregestacional se asociaba de

forma positiva con el CMO y la DMO lumbar y corporal total, excepto cabeza, de los hijos a los 9 años (Macdonald-Wallis, 2010). En otros casos, al igual que en nuestro estudio, la asociación entre el sobrepeso materno y el CMO y/o DMO que se observa en las asociaciones bivariadas pierde significación en los modelos multivariantes (Dror, 2012; Ay, 2011; Viljakainen, 2010). Es posible que el “efecto protector” que aparentemente supone el mayor IMC materno sobre el grado de mineralización del esqueleto fetal se trate en realidad de un sesgo favorecido por el hecho demostrado, y que también se comprueba en nuestro estudio, de que los hijos de madres con mayor IMC presentan un mayor peso al nacimiento (Shapiro, 2000).

Diversos estudios sugieren, al igual que en nuestro caso, que la edad materna avanzada puede actuar como factor de riesgo del déficit de mineralización de los recién nacidos, aunque en la mayoría la fuerza de dicha asociación es débil o vinculada a otros factores (Dror, 2012). Así, en la cohorte sueca estudiada por Rudang y cols. (n = 1009) se observó que la edad materna estaba inversamente correlacionada con la DMOa corporal total ($r = -0,07$; $p = 0,03$) y lumbar ($r = -0,09$; $p < 0,01$) de los recién nacidos y en el modelo de regresión lineal la edad se mantuvo como factor predictor independiente de la DMO lumbar ($\beta = -0,08$; $p < 0,01$) en los varones, aunque los coeficientes de correlación fueron muy discretos.

Nuestro estudio no estableció correlación entre el grado de mineralización a nivel de la columna lumbar de los recién nacidos y el resto de los factores demográficos maternos estudiados (paridad, etnia, tabaquismo y comorbilidad). Existen pocas referencias bibliográficas al respecto, ya que la mayoría de los estudios sobre el hueso de los recién nacidos han sido realizados en prematuros con el objetivo de evaluar la osteopenia de la prematuridad, estado nutricional y crecimiento de diferentes cohortes. Pero debemos tener en cuenta que en estos niños no se ha producido el pico de acreción mineral del tercer trimestre de gestación y su vida postnatal se encuentra a menudo complicada por diferentes procesos de enfermedad (Högler, 2003), por lo que su metabolismo óseo no es comparable con el de los recién nacidos a término. Así, existe muy poca información sobre los factores maternos o fetales que condicionan la mineralización ósea intrauterina de los recién nacidos.

En cuanto al tabaquismo, los diferentes estudios de cohortes poblacionales aportan resultados dispares. En algunos se muestra una débil asociación inversa entre el consumo de cigarrillos durante el embarazo y los parámetros de mineralización (CMO y/o DMO) estudiados en la infancia (Jones, 1999) o la adolescencia (Martinez-Mesa, 2014). Pero en contra de lo que hasta ahora se pensaba sobre la posible afectación de la masa ósea a través de la exposición fetal intrauterina al humo del tabaco, un reciente estudio de cohortes prospectivo demostró, en los

modelos ajustados por factores de confusión, que el tabaquismo durante la gestación se asociaba con un CMO 11,6 g superior (IC 95% 5,6 – 17,5) y una DMO 6,7 g/cm² mayor (IC 95% 2,4 – 11,0) a la edad de 6 años. En este trabajo se entiende que la mayor ganancia de peso que mostraban los hijos de madres fumadoras a esta edad era el principal factor determinante de esta asociación (Heppe, 2015). Finalmente, el *Avon Longitudinal Study of Parents and Children* comparó las asociaciones entre el hábito tabáquico materno y paterno durante el embarazo y el CMO y DMO lumbar y corporal total excepto cabeza de 7121 niños a los 10 años. El tabaquismo materno en cualquier trimestre se asoció con un incremento del CMO y DMO corporal total excepto cabeza en niñas, pero no en niños. Las asociaciones en el caso del tabaquismo paterno fueron similares, lo que sugiere que la asociación encontrada en niñas depende más de características familiares compartidas que de mecanismos intrauterinos. La asociación materna se incrementó tras ajustar los resultados por el peso y edad gestacional de los recién nacidos, pero se atenuó hasta perder la significación tras el ajuste por el peso y la talla actual (Macdonald-Wallis, 2011). En todos estos trabajos, las densitometrías fueron realizados mucho tiempo después del nacimiento, por lo que resulta complejo extraer conclusiones sobre la influencia que tiene el tabaquismo materno sobre la acreción mineral fetal. En una de las pocas series que aporta datos sobre mineralización durante el periodo neonatal, se demostró una reducción del CMO en los hijos de las madres fumadoras durante el embarazo, aunque sin diferencias en los valores de DMO (Godfrey, 2001). En este mismo trabajo, ninguno de los parámetros empelados para valorar la actividad física materna (velocidad de deambulación o realización de actividad física vigorosa) guardó relación con los indicadores de mineralización ósea.

En relación con el fototipo materno o procedencia de las madres parece que se confirma la ausencia de repercusión sobre el grado de mineralización en los recién nacidos que muestran los resultados de nuestro estudio. Un trabajo llevado a cabo en Oklahoma en 238 recién nacidos a término sanos no encontró diferencias significativas en el CMO y DMO del tercio distal del radio entre los diferentes grupos étnicos (Venkataraman, 1991). Asimismo, en una revisión del año 2000 del grupo de Namgung y cols. sobre factores intrauterinos que determinan el CMO de los recién nacidos, se concluyó que las diferencias raciales que se aprecian en los indicadores de mineralización ósea aparecen a partir del año de vida, momento en el que los lactantes negros tienen valores superiores de CMO (Li JY, 1989) y que estas diferencias entre los diferentes grupos étnicos no se encuentran en el momento del nacimiento (Steichen, 1976, Namgung, 1993).

Respecto a la morbilidad materna, se ha demostrado que los hijos de madres diabéticas poseen un CMO inferior al nacimiento y que el CMO neonatal muestra una correlación inversa con el

mal control metabólico materno, especialmente en el primer trimestre, y con la concentración capilar materna media de glucosa (Mimouni, 1988). La reducción del CMO en estos recién nacidos puede estar en relación con una disminución de la transferencia transplacentaria de minerales secundaria a vasculopatía. No hemos encontrado estudios que valoren la repercusión de la preeclampsia materna sobre el estado de salud ósea de los recién nacidos a término. Existe un trabajo que demuestra que la preeclampsia materna en los recién nacidos menores de 1500 g condiciona, en la edad adulta (18,5 – 2,1 años), un mayor Z-score en columna lumbar (-0,44 en los recién nacidos de muy bajo peso expuestos a preeclampsia en comparación a -1,07 en los no expuestos; $p = 0,002$), Z-score de cabeza femoral (-0,05 vs -0,53; $p = 0,003$) y Z-score corporal total (-0,14 vs -0,72; $p = 0,001$) de DMO. La explicación a esta asociación la encuentran en los mayores niveles de andrógenos e IMC de las embarazadas con preeclampsia (Miettola, 2013).

6.8.2 RELACIÓN ENTRE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA Y EL APORTE NUTRICIONAL DE LAS EMBARAZADAS

Está probado el efecto beneficioso que sobre el grado de mineralización del esqueleto fetal tiene el aporte dietético alto de calcio (Heppe, 2013; Ganpule, 2006; Tobias, 2005; Jones, 2000) y la suplementación de éste en poblaciones con ingestas reducidas (Jarjou, 2006; Dibba, 2000; Koo, 1999; Raman, 1978). No obstante, la evidencia del sinergismo entre la ingesta materna de calcio y los niveles de 25(OH)VD resulta más difícil de obtener. Nuestro estudio apunta a que el déficit materno de VD puede no ser determinante en situaciones de elevados aportes de calcio dietético en las que predomina el transporte intestinal pasivo de este elemento. Así, las embarazadas con un aporte suficiente de calcio en la dieta, mantendrían un adecuado grado de mineralización del esqueleto fetal con independencia del estado materno de VD. Algunos estudios de intervención sobre uso de suplementación con calcio y VD en el embarazo aportan datos que apoyan esta teoría. En el trabajo de Chan y cols. (2006), 72 gestantes adolescentes fueron randomizadas en 3 grupos: control, ingesta de 4 raciones diarias de zumo de naranja fortificado con calcio o ingesta de 4 raciones diarias de productos lácteos. En los 2 grupos de intervención se obtuvo un elevado aporte dietético de calcio (> 1200 mg/día), pero sólo en el de los productos lácteos también aumentaron de forma significativa los aportes dietéticos de VD (400 UI/día vs 124 y 68 UI/día) y los niveles de 25(OH)VD en el momento del parto (43 ng/ml vs 23 y 23 ng/ml). El contenido corporal total de calcio fue significativamente mayor en este grupo (en el que se objetivó un incremento del 17% en la mineralización ósea fetal corporal total),

mientras que no se demostraron diferencias significativas entre el grupo control y el suplementado exclusivamente con calcio.

En modelos de experimentación animal $VDR^{-/-}$ también se ha podido demostrar el efecto protector de los aportes elevados de calcio sobre el déficit de VD. Durante el embarazo, existe un aumento de transportador intestinal de calcio CaBP-D9k tanto en los ratones de fenotipo salvaje como en los $VDR^{-/-}$ (aunque en estos el incremento es un 40% inferior). Tras emparejar a una hembra $VDR^{-/-}$ con un macho de fenotipo salvaje, se observó que, en el día 18,5, los fetos $VDR^{+/+}$ tenían una mineralización defectuosa, un menor contenido de calcio corporal total y un incremento del número de células osteoclasticas en el hueso, así como un aumento de las concentraciones de calcio y $1,25(OH)_2D_3$. En cambio, si estas mismas ratas embarazadas $VDR^{-/-}$ eran alimentadas con una dieta de rescate con elevado contenido en calcio, fosfato y lactosa, se normalizaba la mineralización de sus fetos, el número de osteoclastos y las concentraciones plasmáticas de calcio y $1,25(OH)_2D_3$. Los autores interpretan estos resultados como una evidencia de que, para asegurar la mineralización adecuada del esqueleto fetal, la absorción intestinal materna de calcio dependiente de VD puede ser sustituida por una absorción intestinal pasiva favorecida por un aporte nutricional de calcio elevado (Rummens, 2003).

Estos resultados contradicen a los obtenidos en un ensayo clínico llevado a cabo en Brasil en el que se estudiaron a los recién nacidos de madres adolescentes según si habían recibido suplementación con calcio (600 mg/día) y colecalciferol (200 UI/día) ($n = 30$) o placebo ($n = 26$) desde la semana 26 hasta el momento del parto. A las 5 semanas postparto, no existían diferencias significativas entre los grupos en cuanto a los valores de CMO, área ósea o DMO. Aunque la asignación de tratamiento fue aleatorizada y doble ciego, en el grupo placebo la ingesta dietética de calcio en el registro de 3 días fue significativamente mayor (743 ± 457 vs 500 ± 276 ; $p = 0,02$), lo que, a nuestro parecer, influye de forma determinante sobre el efecto que tiene la suplementación y hace difícil la interpretación de los resultados obtenidos (Diogenes, 2013).

6.8.3 ESTACIÓN DEL PARTO Y GRADO DE MINERALIZACIÓN

En teoría, el metabolismo óseo fetal puede estar influenciado por la estación en la que se desarrolla el embarazo a través de los cambios en el metabolismo de la VD. En nuestro caso, el periodo de año en el que se produce el parto no ha resultado ser un factor determinante del

grado de mineralización del esqueleto fetal y las referencias bibliográficas recientes que han estudiado este aspecto empleando tecnología similar son muy escasas, aunque sí que apuntan hacia un cierto efecto de la estacionalidad sobre el CMO, no habiéndose demostrado en ningún caso variaciones estacionales significativas para la DMO.

En un trabajo de 1998 de Koo la estacionalidad no demostró ser un factor determinante en el desarrollo óseo postnatal durante el primer año de vida estudiado mediante DEXA en forma de CMO y DMO corporal total. En el caso de los estudios llevados a cabo por Namgung y cols. en la década de los 90 en EEUU y Corea, el valor de CMO corporal total de los recién nacidos varió entre estaciones, aunque no del mismo modo: mientras que en las series americanas el valor fue inferior en los nacidos en verano (Namgung 1992, 1993, 1994), los recién nacidos coreanos presentaron valores significativamente inferiores en el invierno (Namgung, 1998).

6.8.4 RELACIÓN ENTRE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA Y EL SEXO DEL RECIÉN NACIDO

En general, se acepta, y lo hemos podido comprobar en nuestro trabajo, que el sexo no modifica los parámetros de mineralización ósea valorada mediante DEXA, cuando los resultados se estratifican por edad y/o antropometría. En algunas series pediátricas (Kalkwarf, 2013; Rupich, 1996) se han encontrado valores de CMO lumbar superiores en los varones para los grupos de edad por debajo de los 3 meses, aunque se trata de trabajos con un tamaño muestral relativamente pequeño. En cambio, en las series más amplias como la de Manousaki en población pediátrica hasta los 5 años y en la que se incluyen 30 recién nacidos (50% varones) se demuestra que no existen diferencias significativas en la DMO lumbar entre niños de ambos sexos de la misma edad, hecho que también han corroborado otros estudios (Xu, 2013; Godang, 2010; Unal, 2000).

6.8.5 RELACIÓN ENTRE LA MINERALIZACIÓN ÓSEA Y LA SOMATOMETRÍA DE LOS RECIÉN NACIDOS

Las series pediátricas amplias iniciadas en el periodo neonatal demuestran la fuerte asociación que existe entre los diferentes parámetros de mineralización y la antropometría (Koo, 1998;

Gallo, 2013, Xu, 2013), de modo que en el seguimiento longitudinal durante la edad pediátrica se observa una correlación lineal estadísticamente significativa entre los valores de DMO y la edad ($R^2= 0,86$; $p < 0,0001$), peso ($R^2= 0,86$; $p < 0,0001$) y altura ($R^2= 0,85$; $p < 0,00019$) (Manousaki, 2016).

De forma similar, la mayoría de los estudios con poder estadístico suficiente llevados a cabo exclusivamente en población neonatal muestran que el principal determinante de la DMO y/o CMO es el peso (Dror, 2012; Viljakainen, 2010). Nuestros resultados apuntan en la misma dirección, ya que, aunque la media de los pesos no mostró diferencias entre el grupo de recién nacidos con DMO lumbar superior o inferior a la media en el análisis bivariable (3188 g vs 3265 g), sí que se observó una clara tendencia al aumento del valor de DMO según el cuartil de peso al nacimiento y la situación de bajo peso (< 2500 g) se identificó como el principal factor de riesgo de un estado de mineralización subóptimo en la regresión logística binaria.

El único estudio que aporta datos de DMO (g/cm^2) obtenidos mediante DEXA relacionados con el crecimiento fetal es el de Akcakus del año 2007 en el que se determinaron los valores de calcio, fósforo, FA y $25(\text{OH})\text{VD}$ en 30 neonatos PEG, 40 AGA y 30 GEG y en sus madres durante el invierno. La DMO y el CMO de los recién nacidos eran estudiados mediante DEXA durante las primeras 24 horas de vida. Al igual que ocurre en nuestro trabajo, los valores medios de DMO y CMO corporal total fueron mayores en los niños GEG ($0,442 \text{ g}/\text{cm}^2$ y $71,6 \text{ g}$ respectivamente), e inferiores en los PEG ($0,381 \text{ g}/\text{cm}^2$ y $29,1 \text{ g}$) en comparación con los AEG ($0,426 \text{ g}/\text{cm}^2$ y $53,7 \text{ g}$). Tanto el CMO como la DMO corporal total se correlacionaron de manera positiva con el peso al nacimiento ($r = 0,910$; $p < 0,05$) y con la edad gestacional ($r = 0,707$; $p < 0,05$), pero no con los niveles séricos de $25(\text{OH})\text{VD}$.

En el estudio de Dror (2012) el peso es el principal determinante del CMO corporal total en los recién nacidos, pero no se aportan datos de DMO. En otro trabajo, se demostró que los niños PEG tenían un menor CMO y disminución de los marcadores de formación ósea (osteocalcina) en comparación a los nacidos AEG incluso tras ser estratificados por variaciones estacionales (Namgung, 1993). Se postula que la reducción del flujo uteroplacentario en las situaciones de RCIU puede ocasionar una reducción en el aporte transplacentario de minerales y en la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$ mediada por la 1α -hidroxilasa placentaria, pues se demostró que la concentración de calcitriol en sangre de cordón de estos recién nacidos también se encontraba disminuida.

Únicamente hemos encontrado un estudio caso-control en el que la relación entre el grado de mineralización y el tamaño de los recién nacidos invierte el sentido de la asociación (Schushan-Eisen, 2015). Se establecieron 2 grupos de estudio: uno que incluyó a 20 recién nacidos AEG hijos de madres con DG y sus controles emparejados y otro con 20 recién nacidos macrosómicos (> 4000 g) y sus controles emparejados. La densidad ósea (obtenida en este estudio mediante ultrasonido cuantitativo a nivel de la tibia) en el grupo de los niños macrosómicos fue significativamente inferior que el grupo control (2,976 vs 3,120 m/s respectivamente, $p < 0,005$). No se objetivaron diferencias en la densidad ósea entre los hijos de madres diabéticas y sus controles (3,005 vs 3,043 m/s respectivamente; $p = 0,286$). El peso al nacimiento fue el único factor predictor de densidad ósea subóptima (por cada incremento de 100 g) (OR 1,15 [IC 1,01-1,30]; $p = 0,003$) y este hecho se atribuye en el estudio a la hipótesis de que la disminución en los movimientos fetales secundaria a la macrosomía reduciría la mineralización ósea. Es importante tener en cuenta que la población estudiada presenta peculiaridades propias y no es comparable a la de nuestro estudio, en la que sólo 2 embarazadas desarrollaron DG y fueron 4 los recién nacidos con peso al nacimiento > 4000 g.

7 CONCLUSIONES

1. Escasa influencia del nivel de Vitamina D₃ [valorado mediante el 25(OH)VD] como determinante del grado de mineralización esquelética del recién nacido.
2. El 68,0% de las mujeres embarazadas estudiadas tienen valores de 25(OH)VD deficitarios, inferiores a 20 ng/ml.
3. Los niveles de 25(OH)VD de las embarazadas son más bajos en los meses finales de invierno e inicio de primavera, lo que es acorde con la variación estacional referida por otros.
4. El sobrepeso materno actuó como factor de riesgo para el déficit de VD, mientras que la realización de actividad física regular fue un factor protector. Ninguna de las variables relacionadas con la generación endógena (tiempo de exposición solar) o el aporte de VD (dieta y/o empleo de suplementación) se perfilaron como relevantes para padecer déficit durante el embarazo. Las embarazadas no caucásicas y/o las de fototipo cutáneo oscuro presentaron valores inferiores de 25(OH)VD.
5. Existe un elevado grado de correlación entre los valores de 25(OH)VD de las embarazadas y los de la sangre de cordón de sus recién nacidos. En cambio, ninguno de los dos valores demostró relación con el resto de los marcadores bioquímicos de metabolismo óseo estudiados (PTH, fosfatasa alcalina, calcio y fósforo).
6. En sangre de cordón los niveles de calcio y fósforo fueron superiores a los maternos, siendo indetectable el valor de PTH. En las primeras horas de vida de los recién nacidos, se observó una disminución en los valores medios de calcio acompañada de un aumento en la concentración de PTH.
7. La valoración de la mineralización ósea en el recién nacido obteniendo la DMO mediante DEXA a nivel lumbar es factible, habiéndose estudiado una amplia muestra de recién nacidos sanos a término, cuyos valores pueden constituir una referencia.
8. De los factores estudiados, el peso al nacer fue el principal determinante del grado de mineralización esquelética neonatal y el bajo peso al nacimiento el principal factor de riesgo vinculado a un estado de mineralización subóptimo.

En nuestra serie no se ha podido demostrar el objetivo principal de la existencia de una asociación significativa entre los valores maternos y/o fetales de 25(OH)VD en el momento del parto y el grado de mineralización (cuantificado como DMO (g/cm^2) a nivel de la columna lumbar) de los recién nacidos. Es por ello que nuestro grupo de trabajo tiene previsto iniciar un segundo proyecto multicéntrico para determinar la prevalencia del déficit de VD mediante el estudio de la fracción libre y biodisponible de 25OH(VD) en las embarazadas y recién nacidos y estudiar la posible asociación entre las distintas fracciones de colecalciferol, el grado de mineralización ósea de los recién nacidos y su relación con los nuevos marcadores de metabolismo óseo vinculados al déficit de VD y, en concreto, con el FGF23.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Abu-Hasan NS, Sutcliffe RG. Placental alkaline phosphatase integrates via its carboxy-terminus into the microvillous membrane: its allotypes differ in conformation. *Placenta*. 1985;6(5):391-404.
2. Achkar M, Dodds L, Giguere Y, Forest JC, Armson BA, Woolcott C, et al. Vitamin D status in early pregnancy and risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;212(4): 511.e1-7.
3. Adams ND, Garthwaite TL, Gray RW, Hagen TC, Lemann J, Jr. The interrelationships among prolactin, 1,25-dihydroxyvitamin D, and parathyroid hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1979;49(4):628-30.
4. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). ENIDE. Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (2009-2010). Evaluación nutricional de la dieta española. II-Micronutrientes. 2011
5. Akcakus M, Koklu E, Budak N, Kula M, Kurtoglu S, Koklu S. The relationship between birthweight, 25-hydroxyvitamin D concentrations and bone mineral status in neonates. *Ann Trop Paediatr*. 2006;26(4):267-75.
6. Akcakus M, Kurtoglu S, Koklu E, Kula M, Koklu S. The relationship between birth weight leptin and bone mineral status in newborn infants. *Neonatology*. 2007;91(2):101-6.
7. Albanes D, Mondul AM, Yu K, Parisi D, Horst RL, Virtamo J, et al. Serum 25-hydroxy vitamin D and prostate cancer risk in a large nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(9):1850-60.
8. Albright F. Case 27461. *N Engl J Med*. 1941;225(20):789-91.
9. Alonso A, Rodríguez J, Carvajal I, Prieto MA, Rodríguez RM, Perez AM, et al. Prophylactic vitamin D in healthy infants: assessing the need. *Metabolism*. 2011;60(12):1719-25.
10. Alonso C, Ureta N, Pallás CR. Vitamina D profiláctica. *Pediatría Atención Primaria*. 2010;12:495-510.
11. Alonso MA, Pallavicini ZF, Rodríguez J, Avello N, Martínez-Cambor P, Santos F. Can vitamin D status be assessed by serum 25OHD in children? *Pediatr Nephrol*. 2015;30(2):327-32.
12. Andersen R, Molgaard C, Skovgaard LT, Brot C, Cashman KD, Chabros E, et al. Teenage girls and elderly women living in northern Europe have low winter vitamin D status. *Eur J Clin Nutr*. 2005;59(4):533-41.
13. Anderson JL, May HT, Horne BD, Bair TL, Hall NL, Carlquist JF, et al. Relation of vitamin D deficiency to cardiovascular risk factors, disease status, and incident events in a general healthcare population. *Am J Cardiol*. 2010;106(7):963-8.
14. Ardawi MS, Nasrat HA, HS BAA. Calcium-regulating hormones and parathyroid hormone-related peptide in normal human pregnancy and postpartum: a longitudinal study. *Eur J Endocrinol*. 1997;137(4):402-9.

15. Arunabh S, Pollack S, Yeh J, Aloia JF. Body fat content and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(1):157-61.
16. Ay L, Jaddoe VW, Hofman A, Moll HA, Raat H, Steegers EA, et al. Foetal and postnatal growth and bone mass at 6 months: the Generation R Study. *Clin Endocrinol.* 2011;74(2):181-90.
17. Ayus JC, Moritz ML. Bone disease as a new complication of hyponatremia: moving beyond brain injury. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(2):167-8.
18. Ayus JC, Negri AL, Kalantar-Zadeh K, Moritz ML. Is chronic hyponatremia a novel risk factor for hip fracture in the elderly? *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(10):3725-31.
19. Bacchetta J, Salusky IB, Hewison M. Beyond mineral metabolism, is there an interplay between FGF23 and vitamin D in innate immunity? *Pediatr Nephrol.* 2013;28(4):577-82.
20. Bachrach LK, Sills IN. Clinical report-bone densitometry in children and adolescents. *Pediatrics.* 2011;127(1):189-94.
21. Bagnoli F, Bruchi S, Garosi G, Pecciarini L, Bracci R. Relationship between mode of delivery and neonatal calcium homeostasis. *Eur J Pediatr.* 1990;149(11):800-3.
22. Bailie GR, Johnson CA. Comparative review of the pharmacokinetics of vitamin D analogues. *Semin Dial.* 2002;15(5):352-7.
23. Baim S, Binkley N, Bilezikian JP, Kendler DL, Hans DB, Lewiecki EM, et al. Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry and executive summary of the 2007 ISCD Position Development Conference. *J Clin Densitom.* 2008;11(1):75-91.
24. Baker AM, Haeri S, Camargo CA, Jr., Espinola JA, Stuebe AM. A nested case-control study of midgestation vitamin D deficiency and risk of severe preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(11):5105-9.
25. Baker AM, Haeri S, Camargo CA, Jr., Stuebe AM, Boggess KA. First-trimester maternal vitamin D status and risk for gestational diabetes (GDM) a nested case-control study. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012;28(2):164-8.
26. Balabanova S, Kruse B, Wolf AS. Calcitonin secretion by human placental tissue. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica.* 1987;66(4):323-6.
27. Baran DT, Milne ML. 1,25 Dihydroxyvitamin D increases hepatocyte cytosolic calcium levels. A potential regulator of vitamin D-25-hydroxylase. *J Clin Invest.* 1986;77(5):1622-6.
28. Barger-Lux MJ, Heaney RP. Effects of above average summer sun exposure on serum 25-hydroxyvitamin D and calcium absorption. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(11):4952-6.
29. Barlet JP. Prolactin and calcium metabolism in pregnant ewes. *J Endocrinol.* 1985;107(2):171-5.
30. Baroncelli GI, Federico G, Vignolo M, Valerio G, del Puente A, Maghnie M, et al. 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;39(1):159-73.
31. Barrett EJ, Barrett P. The Parathyroid Glands and Vitamin D. In: Boron WF, Boulpaep EL, editors. *Medical Physiology*. 52. Second Edition ed. Philadelphia: Elsevier; 2012: 1094-110.
 32. Bauer SR, Hankinson SE, Bertone-Johnson ER, Ding EL. Plasma vitamin D levels, menopause, and risk of breast cancer: dose-response meta-analysis of prospective studies. *Medicine (Baltimore)*. 2013;92(3):123-31.
 33. Belkacemi L, Bedard I, Simoneau L, Lafond J. Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: a review. *Cell Calcium*. 2005;37(1):1-8.
 34. Bener A, Al-Hamaq AO, Saleh NM. Association between vitamin D insufficiency and adverse pregnancy outcome: global comparisons. *Int J Womens Health*. 2013;5:523-31.
 35. Bertelloni S, Baroncelli GI, Pelletti A, Battini R, Saggese G. Parathyroid hormone-related protein in healthy pregnant women. *Calcif Tissue Int*. 1994;54(3):195-7.
 36. Biancuzzo RM, Clarke N, Reitz RE, Travison TG, Holick MF. Serum concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D₂ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in response to vitamin D₂ and vitamin D₃ supplementation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(3):973-9.
 37. Bianda T, Glatz Y, Bouillon R, Froesch ER, Schmid C. Effects of short-term insulin-like growth factor-I (IGF-I) or growth hormone (GH) treatment on bone metabolism and on production of 1,25-dihydroxycholecalciferol in GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(1):81-7.
 38. Bikle DD, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad JG. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986;63(4):954-9.
 39. Binkley N, Krueger DC, Morgan S, Wiebe D. Current status of clinical 25-hydroxyvitamin D measurement: an assessment of between-laboratory agreement. *Clin Chim Acta*. 2010;411(23-24):1976-82.
 40. Binkley N. Vitamin D and osteoporosis-related fracture. *Arch Biochem Biophys*. 2012;523(1):115-22.
 41. Binkley TL, Specker BL. Muscle-bone relationships in the lower leg of healthy pre-pubertal females and males. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2008;8(3):239-43.
 42. Binkovitz LA, Henwood MJ, Sparke P. Pediatric Dual-Energy X-ray Absorptiometry: Technique, Interpretation, and Clinical Applications. *Semin Nucl Med*. 2007;37(4):303-13.
 43. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Staehelin HB, Orav JE, Stuck AE, Theiler R, et al. Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*. 2009;339:b3692.

44. Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ, Dawson-Hughes B. Positive association between 25-hydroxy vitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *Am J Med.* 2004;116(9):634-9.
45. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Orav EJ, Lips P, Meunier PJ, Lyons RA, et al. A pooled analysis of vitamin D dose requirements for fracture prevention. *N Engl J Med.* 2012b;367(1):40-9.
46. Bischoff-Ferrari HA. Relevance of vitamin D in muscle health. *Rev Endocr Metab Disord.* 2012a;13(1):71-7.
47. Blake GM, Naeem M, Boutros M. Comparison of effective dose to children and adults from dual X-ray absorptiometry examinations. *Bone.* 2006;38(6):935-42.
48. Blau JE, Collins MT. The PTH-Vitamin D-FGF23 axis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2015;16(2):165-74.
49. Bodekaer M, Petersen B, Thieden E, Philipsen PA, Heydenreich J, Olsen P, et al. UVR exposure and vitamin D in a rural population. A study of outdoor working farmers, their spouses and children. *Photochem Photobiol Sci.* 2014;13(11):1598-606.
50. Bodnar LM, Catov JM, Roberts JM, Simhan HN. Prepregnancy obesity predicts poor vitamin D status in mothers and their neonates. *J Nutr.* 2007a;137(11):2437-42.
51. Bodnar LM, Catov JM, Simhan HN, Holick MF, Powers RW, Roberts JM. Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007b;92(9):3517-22.
52. Bodnar LM, Catov JM, Zmuda JM, Cooper ME, Parrott MS, Roberts JM, et al. Maternal serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with small-for-gestational age births in white women. *J Nutr.* 2010;140(5):999-1006.
53. Bodnar LM, Platt RW, Simhan HN. Early-pregnancy vitamin D deficiency and risk of preterm birth subtypes. *Obstet Gynecol.* 2015;125(2):439-47.
54. Bodnar LM, Simhan HN, Catov JM, Roberts JM, Platt RW, Diesel JC, et al. Maternal Vitamin D Status and the Risk of Mild and Severe Preeclampsia. *Epidemiology.* 2014;25(2):207-14.
55. 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.* 2007c;137(2):447-52.
56. Bogden JD, Thind IS, Kemp FW, Caterini H. Plasma concentrations of calcium, chromium, copper, iron, magnesium, and zinc in maternal and cord blood and their relationship to low birth weight. *J Lab Clin Med.* 1978;92(3):455-62.
57. Boonen S, Bischoff-Ferrari HA, Cooper C, Lips P, Ljunggren O, Meunier PJ, et al. Addressing the musculoskeletal components of fracture risk with calcium and vitamin D: a review of the evidence. *Calcif Tissue Int.* 2006;78(5):257-70.

58. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol*. 2001;167(9):4974-80.
59. Borrajo E. Importancia del calcio en patología endocrinológica. *An Esp Pediatr*. 2001;54 Suppl 1:45.
60. Bottcher J, Pfeil A, Schafer ML, Petrovitch A, Seidl BE, Mentzel HJ, et al. Normative data for digital X-ray radiogrammetry from a female and male German cohort. *J Clin Densitom*. 2006;9(3):341-50.
61. Bouillon R, Lieben L, Mathieu C, Verstuyf A, Carmeliet G. Vitamin D action: lessons from VDR and Cyp27b1 null mice. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2013;10 Suppl 2:354-66.
62. Bouillon R, Muls E, De Moor P. Influence of thyroid function on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980;51(4):793-7.
63. Bouillon R. The Vitamin D Binding Protein DBP. In: Feldman D, Pike JW, Adams JS, editors. *Vitamin D*. Third Edition ed. San Diego: Elsevier Inc; 2011:57-72.
64. Bouillon R. Vitamin D: from photosynthesis, metabolism, and action to clinical applications. In: Jameson JL, De Groot LJ, editors. *Endocrinology*. Sixth Edition ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier Inc; 2010. p. 1089-110.
65. Bourdeau A, Manganella G, Thil-Trubert CL, Sachs C, Cournot G. Bioactive parathyroid hormone in pregnant rats and fetuses. *Am J Physiol*. 1990;258(4): E549-54.
66. Bowden SJ, Emly JF, Hughes SV, Powell G, Ahmed A, Whittle MJ, et al. Parathyroid hormone-related protein in human term placenta and membranes. *J Endocrinol*. 1994;142(2):217-24.
67. Bowyer L, Catling-Paull C, Diamond T, Homer C, Davis G, Craig ME. Vitamin D, PTH and calcium levels in pregnant women and their neonates. *Clin Endocr*. 2009;70(3):372-7.
68. Braegger C, Campoy C, Colomb V, Decsi T, Domellof M, Fewtrell M, et al. Vitamin D in the healthy European paediatric population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;56(6):692-701.
69. Brailon PM, Buenerd A, Lapillonne A, Bouvier R. Skeletal and total body volumes of human fetuses: assessment of reference data by spiral CT. *Pediatr Radiol*. 2002;32(5):354-9.
70. Brandao-Burch A, Utting JC, Orriss IR, Arnett TR. Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization. *Calcif Tissue Int*. 2005;77(3):167-74.
71. Brehm JM, Schuemann B, Fuhlbrigge AL, Hollis BW, Strunk RC, Zeiger RS, et al. Serum vitamin D levels and severe asthma exacerbations in the Childhood Asthma Management Program study. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(1):52-8.e5.
72. Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Jehan F, Shinki T, Wakino S, Anazawa H, et al. Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(4):1387-91.

73. Briana DD, Gourgiotis D, Boutsikou M, Baka S, Hassiakos D, Vraila VM, et al. Perinatal bone turnover in term pregnancies: the influence of intrauterine growth restriction. *Bone*. 2008;42(2):307-13.
74. Bringhurst FR, Demay MB, Krane SM, Kronenberg HM. Metabolismo óseo y mineral en las personas sanas y enfermas. In: Longo DL, Kasper DE, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J, editors. *Harrison: Principios de Medicina Interna*. 2. 17ª Edición ed. Madrid: McGraw-Hill – Interamericana de España; 2012: 2365-76.
75. Brooke OG, Brown IR, Bone CD, Carter ND, Cleve HJ, Maxwell JD, et al. Vitamin D supplements in pregnant Asian women: effects on calcium status and fetal growth. *Br Med J*. 1980;280(6216):751-4.
76. OBrumbaugh PF, Haussler MR. Specific binding of 1alpha,25-dihydroxycholecalciferol to nuclear components of chick intestine. *J Biol Chem*. 1975;250(4):1588-94.
77. Brunette MG, Auger D, Lafond J. Effect of parathyroid hormone on PO₄ transport through the human placenta microvilli. *Pediatr Res*. 1989;25(1):15-8.
78. Bushinsky DA. Net calcium efflux from live bone during chronic metabolic, but not respiratory, acidosis. *Am J Physiol*. 1989;256(5): 836-42
79. Cabezuelo G, Vidal S, Abeledo A, Frontera P. 25-Hydroxyvitamin D levels in infants. Relation with breast-feeding. *An Pediatr*. 2007;66(5):491-5.
80. Cadario F, Savastio S, Pozzi E, Capelli A, Dondi E, Gatto M, et al. Vitamin D status in cord blood and newborns: ethnic differences. *Ital J Pediatr*. 2013;39:35.
81. Calatayud M, Jodar E, Sanchez R, Guadalix S, Hawkins F. Prevalence of deficient and insufficient vitamin D levels in a young healthy population. *Endocrinol Nutr*. 2009;56(4):164-9.
82. Camargo CA, Jr., Ingham T, Wickens K, Thadhani R, Silvers KM, Epton MJ, et al. Cord-blood 25-hydroxyvitamin D levels and risk of respiratory infection, wheezing, and asthma. *Pediatrics*. 2011;127(1):e180-7.
83. Camargo CA, Jr., Ingham T, Wickens K, Thadhani RI, Silvers KM, Epton MJ, et al. Vitamin D status of newborns in New Zealand. *Br J Nutr*. 2010;104(7):1051-7.
84. Carbajal A. Ingestas recomendadas de energía y nutrientes. In: García Arias MT, García Fernández MC, editors. *Nutrición y Dietética*. León: Universidad de León 2003:27-44.
85. Carbone LD, Cross JD, Raza SH, Bush AJ, Sepanski RJ, Dhawan S, et al. Fracture risk in men with congestive heart failure risk reduction with spironolactone. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(2):135-8.

86. Cargill J, Lucas RM, Gies P, King K, Swaminathan A, Allen MW, et al. Validation of brief questionnaire measures of sun exposure and skin pigmentation against detailed and objective measures including vitamin D status. *Photochem Photobiol.* 2013;89(1):219-26.
87. Carmeliet G, Van Cromphaut S, Maes C, Raemaekers T, Bouillon R. Rickets in transgenic animals. *Endocr Dev.* 2003;6:200-19.
88. Carrascosa A, Fernández JM, Ferrández A, López-Siguero JP, López D, Sánchez E, et al. Estudios españoles de crecimiento 2010. *Rev Esp Endocrinol Pediatr.* 2011;2(Suppl 1):59-62.
89. Carter GD, Carter CR, Gunter E, Jones J, Jones G, Makin HL, et al. Measurement of Vitamin D metabolites: an international perspective on methodology and clinical interpretation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;89-90(1-5):467-71.
90. Cashman KD, Dowling KG, Skrabakova Z, González-Gross M, Valtueña J, De Hensus S, et al. *Am J Clin Nutr.* 2016; 103: 1.033-1.044.
91. Ceccoli L, Ronconi V, Giovannini L, Marcheggiani M, Turchi F, Boscaro M, et al. Bone health and aldosterone excess. *Osteoporos Int.* 2013;24(11):2801-7.
92. Chan GM, McElligott K, McNaught T, Gill G. Effects of dietary calcium intervention on adolescent mothers and newborns: A randomized controlled trial. *Obstet Gynecol.* 2006;108(3 Pt 1):565-71.
93. Chang CH, Tsai PY, Yu CH, Ko HC, Chang FM. Prenatal detection of fetal growth restriction by fetal femur volume: efficacy assessment using three-dimensional ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 2007;33(3):335-41.
94. Chang SC, O'Brien KO, Nathanson MS, Caulfield LE, Mancini J, Witter FR. Fetal femur length is influenced by maternal dairy intake in pregnant African American adolescents. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(5):1248-54.
95. Chao CT, Lee SY, Yen CJ, Chiang CK, Huang JW, Hung KY. Serum free 1,25-dihydroxy-vitamin D is more closely associated with fibroblast growth factor 23 than other vitamin D forms in chronic dialysis patients. *Clin Chim Acta.* 2015;439:122-7.
96. Chen J, Olivares-Navarrete R, Wang Y, Herman TR, Boyan BD, Schwartz Z. Protein-disulfide isomerase-associated 3 (Pdia3) mediates the membrane response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2010;285(47):37041-50.
97. Chen M, Ashmeade T, Carver JD. Bone ultrasound velocity in small- versus appropriate-for-gestational age preterm infants. *J Perinatol.* 2007;27(8):485-9.
98. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation. *J Immunol.* 2007;179(3):1634-47.
99. Chen TC, Puschett JB. Evidence for an endogenous parathyroid hormone-sensitive adenylate cyclase activator. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981;100(4):1471-6.

100. Chen W, Melamed ML, Abramowitz MK. Serum bicarbonate and bone mineral density in US adults. *Am J Kidney Dis.* 2015;65(2):240-8.
101. Chen X, Macica C, Nasiri A, Judex S, Broadus AE. Mechanical regulation of PTHrP expression in entheses. *Bone.* 2007;41(5):752-9.
102. Chick DH. Study of rickets in Vienna 1919-1922. *Medical history.* 1976;20(1):41-51.
103. Chitty LS, Altman DG, Henderson A, Campbell S. Charts of fetal size: 4. Femur length. *BJOG.* 1994;101(2):132-5.
104. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5):820-5.
105. Cho GJ, Hong SC, Oh MJ, Kim HJ. Vitamin D deficiency in gestational diabetes mellitus and the role of the placenta. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;209(6):560.e1-8.
106. Christakos S, Lieben L, Masuyama R, Carmeliet G. Vitamin D endocrine system and the intestine. *Bonekey Rep.* 2014;3:496.
107. Chun RF, Liu PT, Modlin RL, Adams JS, Hewison M. Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Front Physiol.* 2014;5:151.
108. Cianferotti L, Cox M, Skoriya K, Demay MB. Vitamin D receptor is essential for normal keratinocyte stem cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(22):9428-33.
109. Clifton-Bligh RJ, McElduff P, McElduff A. Maternal vitamin D deficiency, ethnicity and gestational diabetes. *Diabet Med.* 2008;25(6):678-84.
110. Combe C, Aparicio M. Phosphorus and protein restriction and parathyroid function in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1994;46(5):1381-6.
111. Cortés Pérez S, Pérez Milán F, Gobernado Tejedor JA, Mora Cepeda P. Epidemiología de los estados hipertensivos del embarazo. *Clin Invest Ginecol Obstet.* 2009;36(4):132-9.
112. Cramer CF, McMillan J. Phosphorus adaptation in rats in absence of vitamin D or parathyroid glands. *Am J Physiol.* 1980;239(4):G261-g5.
113. Cranney A, Horsley T, O'Donnell S, Weiler H, Puil L, Ooi D, et al. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep).* 2007(158):1-235.
114. Cranney A, Weiler HA, O'Donnell S, Puil L. Summary of evidence-based review on vitamin D efficacy and safety in relation to bone health. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(2):513s-9s.
115. Cross NA, Hillman LS, Allen SH, Krause GF, Vieira NE. Calcium homeostasis and bone metabolism during pregnancy, lactation, and postweaning: a longitudinal study. *Am J Clin Nutr.* 1995;61(3):514-23.
116. Daly JA, Ertingshausen G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "CentrifChem". *Clin Chem.* 1972;18(3):263-5.

117. Damilakis J, Solomou G, Manios GE, Karantanis A. Pediatric radiation dose and risk from bone density measurements using a GE Lunar Prodigy scanner. *Osteoporos Int.* 2013;24(7):2025-31.
118. Datta S, Alfaham M, Davies DP, Dunstan F, Woodhead S, Evans J, et al. Vitamin D deficiency in pregnant women from a non-European ethnic minority population--an interventional study. *BJOG.* 2002;109(8):905-8.
119. David L, Anast CS. Calcium metabolism in newborn infants. The interrelationship of parathyroid function and calcium, magnesium, and phosphorus metabolism in normal, "sick," and hypocalcemic newborns. *J Clin Invest.* 1974;54(2):287-96.
120. Dawodu A, Kochiyil J, Altaye N. Pilot study of sunlight exposure and vitamin D status in Arab women of childbearing age. *East Mediterr Health J.* 2011;17(7):570-4.
121. Dawodu A, Wagner CL. Mother-child vitamin D deficiency: an international perspective. *Archives of disease in childhood.* 2007;92(9):737-40.
122. de la Feutrie TL. *Traité du rakis ou l'art de redresser les enfants contrefaits: chez Lacombe, libraire; 1772.*
123. de Toro A, Duenas J, Lopez J, de Jaime E. Total calcium levels during normal pregnancy, the delivery and breast feeding. A longitudinal study. *Prog Obstet Gynecol.* 1999;42(10):703-8.
124. DeLuca HF. 25-Hydroxycholecalciferol, the probable metabolically active form of vitamin D. Isolation, identification, and subcellular location. *Am J Clin Nutr.* 1969;22(4):412-24.
125. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(6):1689s-96s.
126. Demay MB, Kiernan MS, DeLuca HF, Kronenberg HM. Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(17):8097-101.
127. De-Regil LM, Palacios C, Lombardo LK, Pena-Rosas JP. Vitamin D supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016(1):Cd008873.
128. Diaz-Gomez NM, Mendoza C, Gonzalez-Gonzalez NL, Barroso F, Jimenez-Sosa A, Domenech E, et al. Maternal smoking and the vitamin D-parathyroid hormone system during the perinatal period. *J Pediatr.* 2007;151(6):618-23.
129. Dibba B, Prentice A, Ceesay M, Mendy M, Darboe S, Stirling DM, et al. Bone mineral contents and plasma osteocalcin concentrations of Gambian children 12 and 24 mo after the withdrawal of a calcium supplement. *Am J Clin Nutr.* 2002;76(3):681-6.
130. Diffey BL, Gibson CJ, Haylock R, McKinlay AF. Outdoor ultraviolet exposure of children and adolescents. *Br J Dermatol.* 1996b;134(6):1030-4.

131. Diffey BL. Modelling the seasonal variation of vitamin D due to sun exposure. *Br J Dermatol*. 2010;162(6):1342-8.
132. Diffey BL. Ultraviolet film badges for personal exposure studies. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1996a;12(5):224.
133. Dijkstra SH, van Beek A, Janssen JW, de Vleeschouwer LH, Huysman WA, van den Akker EL. High prevalence of vitamin D deficiency in newborn infants of high-risk mothers. *Arch Dis Child*. 2007;92(9):750-3.
134. Diogenes ME, Bezerra FF, Rezende EP, Taveira MF, Pinhal I, Donangelo CM. Effect of calcium plus vitamin D supplementation during pregnancy in Brazilian adolescent mothers: a randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2013;98(1):82-91.
135. Domingo M, Figaró C, Loverdos I, Costa J, Badia J. Gestante inmigrante y morbilidad neonatal. *An Pediatr*. 2008;68(6):596-601.
136. Donahue HJ. Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation. *Bone*. 2000;26(5):417-22.
137. Dong Y, Pollock N, Stallmann-Jorgensen IS, Gutin B, Lan L, Chen TC, et al. Low 25-hydroxyvitamin D levels in adolescents: race, season, adiposity, physical activity, and fitness. *Pediatrics*. 2010;125(6):1104-11.
138. Doroudi M, Boyan BD, Schwartz Z. Rapid 1 α ,25(OH)₂D₃ membrane-mediated activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in growth plate chondrocytes requires Pdia3, PLAA and caveolae. *Connect Tissue Res*. 2014;55 Suppl 1:125-8.
139. Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta*. 1971;31(1):87-96.
140. Drinkwater BL, Chesnut CH, 3rd. Bone density changes during pregnancy and lactation in active women: a longitudinal study. *Bone Miner*. 1991;14(2):153-60.
141. Dror DK, King JC, Fung EB, Van Loan MD, Gertz ER, Allen LH. Evidence of associations between fetomaternal vitamin D status, cord parathyroid hormone and bone-specific alkaline phosphatase, and newborn whole body bone mineral content. *Nutrients*. 2012;4(2):68-77.
142. Du X, Greenfield H, Fraser DR, Ge K, Trube A, Wang Y. Vitamin D deficiency and associated factors in adolescent girls in Beijing. *Am J Clin Nutr*. 2001;74(4):494-500.
143. Eggemoen AR, Falk RS, Knutsen KV, Lagerlov P, Sletner L, Birkeland KI, et al. Vitamin D deficiency and supplementation in pregnancy in a multiethnic population-based cohort. *BMC pregnancy and childbirth*. 2016;16:7.

144. Erben RG, Soegiarto DW, Weber K, Zeitz U, Lieberherr M, Gniadecki R, et al. Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Mol Endocrinol.* 2002;16(7):1524-37.
145. 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 Ed.* 2002;87(2):F133-6.
146. Farr JN, Blew RM, Lee VR, Lohman TG, Going SB. Associations of physical activity duration, frequency, and load with volumetric BMD, geometry, and bone strength in young girls. *Osteoporos Int.* 2011;22(5):1419-30.
147. Farrant HJ, Krishnaveni GV, Hill JC, Boucher BJ, Fisher DJ, Noonan K, et al. Vitamin D insufficiency is common in Indian mothers but is not associated with gestational diabetes or variation in newborn size. *Eur J Clin Nutr.* 2009;63(5):646-52.
148. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(5):342-57.
149. Fenton E, Britton HG. 25-hydroxycholecalciferol 1 alpha-hydroxylase activity in the kidney of the fetal, neonatal and adult guinea pig. *Biol Neonate.* 1980;37(5-6):254-6.
150. Fernandez-Alonso AM, Dionis-Sanchez EC, Chedraui P, Gonzalez-Salmeron MD, Perez-Lopez FR. First-trimester maternal serum 25-hydroxyvitamin D(3) status and pregnancy outcome. *Int J Gynaecol Obstet.* 2012;116(1):6-9.
151. Fibbi B, Benvenuti S, Giuliani C, Deledda C, Luciani P, Monici M, et al. Low extracellular sodium promotes adipogenic commitment of human mesenchymal stromal cells: a novel mechanism for chronic hyponatremia-induced bone loss. *Endocrine.* 2016; 52(1), 73-85.
152. Field S, Davies J, Bishop DT, Newton-Bishop JA. Vitamin D and melanoma. *Dermatoendocrinol.* 2013;5(1):121-9.
153. Firoozabadi RD, Ghasemi N, Firoozabadi MD. Sonographic fetal weight estimation using femoral length: Honarvar equation. *Ann Saudi Med.* 2007;27(3):179-82.
154. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol.* 1988;124(6):869-71.
155. Fleet JC. Rapid, membrane-initiated actions of 1,25 dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean? *J Nutr.* 2004;134(12):3215-8.
156. Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD, Bischoff-Ferrari HA, Tworoger SS, Willett WC, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension.* 2007;49(5):1063-9.

157. Frances J, Erol B, Dormans JP. The Growth Plate: Embryologic Origin, Structure, and Function. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH, editors. *Fetal and Neonatal Physiology*. (Second volume). Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2011: 1908-17.
158. Frost HM, Schonau E. The "muscle-bone unit" in children and adolescents: a 2000 overview. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2000;13(6):571-90.
159. Frost HM. Bone's mechanostat: a 2003 update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003;275(2): 1081–1101.
160. Frost HM. The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone Miner*. 1987;2(2):73-85.
161. Gallo S, Comeau K, Vanstone C, Agellon S, Sharma A, Jones G, et al. Effect of different dosages of oral vitamin D supplementation on vitamin D status in healthy, breastfed infants: a randomized trial. *JAMA*. 2013;309(17):1785-92.
162. Gallo S, Vanstone CA, Weiler HA. Normative data for bone mass in healthy term infants from birth to 1 year of age. *J Osteoporos*. 2012;2012:672403.
163. Galthen-Sorensen M, Andersen LB, Sperling L, Christesen HT. Maternal 25-hydroxyvitamin D level and fetal bone growth assessed by ultrasound: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014;44(6):633-40.
164. Ganpule A, Yajnik CS, Fall CH, Rao S, Fisher DJ, Kanade A, et al. Bone mass in Indian children-relationships to maternal nutritional status and diet during pregnancy: the Pune Maternal Nutrition Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):2994-3001.
165. García-García J, Pardo-Serrano C, Hernández-Martínez A, Lorenzo-Díaz M, Gil-González D. Diferencias obstétricas y neonatales entre mujeres autóctonas e inmigrantes. *Prog Obstet Ginecol*. 2008;51(2):53-62.
166. Gasser JA, Hulter HN, Imboden P, Krapf R. Effect of chronic metabolic acidosis on bone density and bone architecture in vivo in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306(5): 517-24.
167. Gattineni J, Bates C, Twombly K, Dwarakanath V, Robinson ML, Goetz R, et al. FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297(2):F282-91.
168. Gernand AD, Klebanoff MA, Simhan HN, Bodnar LM. Maternal vitamin D status, prolonged labor, cesarean delivery and instrumental delivery in an era with a low cesarean rate. *J Perinatol*. 2015;35(1):23-8.
169. Gernand AD, Simhan HN, Caritis S, Bodnar LM. Maternal vitamin D status and small-for-gestational-age offspring in women at high risk for preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2014;123(1):40-8.

170. Gertner JM, Coustan DR, Kliger AS, Mallette LE, Ravin N, Broadus AE. Pregnancy as state of physiologic absorptive hypercalciuria. *Am J Med.* 1986;81(3):451-6.
171. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Osteogenesis: The Development of Bones. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10056/>
172. Gilsanz V, Perez FJ, Campbell PP, Dorey FJ, Lee DC, Wren TA. Quantitative CT reference values for vertebral trabecular bone density in children and young adults. *Radiology.* 2009;250(1):222-7.
173. Gilsanz V, Roe TF, Mora S, Costin G, Goodman WG. Changes in vertebral bone density in black girls and white girls during childhood and puberty. *N Engl J Med.* 1991;325(23):1597-600.
174. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med.* 2008;168(11):1174-80.
175. Glade MJ. Vitamin D: health panacea or false prophet? *Nutrition.* 2013;29(1):37-41.
176. Glisson F. *De Rachitide sive morbo puerili, qui vulgo The Rickets diciteur*. London. 1650:1-416.
177. Glorieux FH, Pettifor JM. Vitamin D/dietary calcium deficiency rickets and pseudo-vitamin D deficiency rickets. *Bonekey Rep.* 2014;3:524.
178. Godang K, Qvigstad E, Voldner N, Isaksen GA, Frosli KF, Notthellen J, et al. Assessing body composition in healthy newborn infants: reliability of dual-energy x-ray absorptiometry. *J Clin Densitom.* 2010;13(2):151-60.
179. Godfrey K, Walker-Bone K, Robinson S, Taylor P, Shore S, Wheeler T, et al. Neonatal bone mass: influence of parental birthweight, maternal smoking, body composition, and activity during pregnancy. *J Bone Miner Res.* 2001;16(9):1694-703.
180. Goetzinger KR, Cahill AG, Macones GA, Odibo AO. Isolated short femur length on second-trimester sonography: a marker for fetal growth restriction and other adverse perinatal outcomes. *J Ultrasound Med.* 2012;31(12):1935-41.
181. Goode JL. Bone disease: a primer/Part I. Clinical differences among vitamin D hormone compounds. *Nephrol News Issues.* 2001;15(6):22-3.
182. Gordon CM, Baim S, Bianchi ML, Bishop NJ, Hans DB, Kalkwarf H, et al. Special report on the 2007 Pediatric Position Development Conference of the International Society for Clinical Densitometry. *South Med J.* 2008;101(7):740-3.
183. Gracia-Marco L, Rey-Lopez JP, Santaliestra-Pasias AM, Jimenez-Pavon D, Diaz LE, Moreno LA, et al. Sedentary behaviours and its association with bone mass in adolescents: the HELENA Cross-Sectional Study. *BMC Public Health.* 2012;12:971.

184. Greer FR. Defining vitamin D deficiency in children: beyond 25-OH vitamin D serum concentrations. *Pediatrics*. 2009;124(5):1471-3.
185. Grober U, Spitz J, Reichrath J, Kisters K, Holick MF. Vitamin D: Update 2013: From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. *Dermatoendocrinol*. 2013;5(3):331-47.
186. Guevara JM, Moncayo MA, Vaca-Gonzalez JJ, Gutierrez ML, Barrera LA, Garzon-Alvarado DA. Growth plate stress distribution implications during bone development: a simple framework computational approach. *Comput Methods Programs Biomed*. 2015;118(1):59-68.
187. Guillemant J, Guillemant S. Early rise in cyclic GMP after 1,25-dihydroxycholecalciferol administration in the chick intestinal mucosa. *Biochem Biophys Res Commun*. 1980;93(3):906-11.
188. Guzel R, Kozanoglu E, Guler-Uysal F, Soyupak S, Sarpel T. Vitamin D status and bone mineral density of veiled and unveiled Turkish women. *J Womens Health Gend Based Med*. 2001;10(8):765-70
189. Hacker-Thompson A, Schloetter M, Sellmeyer DE. Validation of a dietary vitamin D questionnaire using multiple diet records and the block 98 health habits and history questionnaire in healthy postmenopausal women in northern California. *J Acad Nutr Diet*. 112(3):419-23.
190. Hadlock FP, Deter RL, Roecker E, Harrist RB, Park SK. Relation of fetal femur length to neonatal crown-heel length. *J Ultrasound Med*. 1984a;3(1):1-3.
191. Hadlock FP, Harrist RB, Carpenter RJ, Deter RL, Park SK. Sonographic estimation of fetal weight. The value of femur length in addition to head and abdomen measurements. *Radiology*. 1984b;150(2):535-40.
192. Hall JE. Parathyroid Hormone, Calcitonin, Calcium and Phosphate Metabolism, Vitamin D, Bone, and Teeth. In: Hall JE, editor. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology Thirteenth Edition* ed. Philadelphia: Elsevier; 2016: 1001-19.
193. Halloran BP, De Luca HF. Effect of vitamin D deficiency on skeletal development during early growth in the rat. *Arch Biochem Biophys*. 1981;209(1):7-14.
194. Hammami M, Koo WW, Hockman EM. Body composition of neonates from fan beam dual energy X-ray absorptiometry measurement. *J Parenter Enteral Nutr*. 2003;27(6):423-6.
195. Hanieh S, Ha TT, Simpson JA, Thuy TT, Khuong NC, Thoang DD, et al. Maternal vitamin D status and infant outcomes in rural Vietnam: a prospective cohort study. *PLoS one*. 2014;9(6):e99005.

196. Harper ME, Dugaiczky A. Linkage of the evolutionarily-related serum albumin and alpha-fetoprotein genes within q11-22 of human chromosome 4. *Am J Hum Genet.* 1983;35(4):565-72.
197. Hart GR, Furniss JL, Laurie D, Durham SK. Measurement of vitamin D status: background, clinical use, and methodologies. *Clinical laboratory.* 2006;52(7-8):335-43.
198. Hart PH, Lucas RM, Walsh JP, Zosky GR, Whitehouse AJ, Zhu K, et al. Vitamin D in fetal development: findings from a birth cohort study. *Pediatrics.* 2015;135(1):e167-73.
199. Hashemipour S, Lalloo F, Zahir Mirdamadi S, Ziaee A, Dabaghi Ghaleh T. Effect of vitamin D administration in vitamin D-deficient pregnant women on maternal and neonatal serum calcium and vitamin D concentrations: a randomised clinical trial. *Br J Nutr.* 2013;110(9):1611-6.
200. Hashemipour S, Ziaee A, Javadi A, Movahed F, Elmizadeh K, Javadi EH, et al. Effect of treatment of vitamin D deficiency and insufficiency during pregnancy on fetal growth indices and maternal weight gain: a randomized clinical trial. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014; 172:15-9.
201. Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B, Looker A, Marcus R, Matkovic V, et al. Peak bone mass. *Osteoporos Int.* 2000;11(12):985-1009.
202. Heaney RP, Davies KM, Chen TC, Holick MF, Barger-Lux MJ. Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. *Am J Clin Nutr.* 2003a;77(1):204-10.
203. Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr.* 2003b;22(2):142-6.
204. Heaney RP. Serum 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone exhibit threshold behavior. *J Endocrinol Invest.* 2005;28(2):180-2.
205. Heine G, Niesner U, Chang HD, Steinmeyer A, Zugel U, Zuberbier T, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ promotes IL-10 production in human B cells. *Eur J Immunol.* 2008;38(8):2210-8.
206. Henderson RC. The correlation between dual-energy X-ray absorptiometry measures of bone density in the proximal femur and lumbar spine of children. *Skeletal Radiol.* 1997;26(9):544-7.
207. Hepple DH, Medina-Gomez C, Hofman A, Franco OH, Rivadeneira F, Jaddoe VW. Maternal first-trimester diet and childhood bone mass: the Generation R Study. *Am J Clin Nutr.* 2013;98(1):224-32.

208. Heppes DH, Medina-Gomez C, Hofman A, Rivadeneira F, Jaddoe VW. Does fetal smoke exposure affect childhood bone mass? The Generation R Study. *Osteoporos Int.* 2015;26(4):1319-29.
209. Hermann AP, Brot C, Gram J, Kolthoff N, Mosekilde L. Premenopausal smoking and bone density in 2015 perimenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2000;15(4):780-7.
210. Hewison M, Freeman L, Hughes SV, Evans KN, Bland R, Eliopoulos AG, et al. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2003;170(11):5382-90.
211. Hewison M. Antibacterial effects of vitamin D. *Nature reviews Endocrinology.* 2011;7(6):337-45.
212. Hillman LS, Rojanasathit S, Slatopolsky E, Haddad JG. Serial measurements of serum calcium, magnesium, parathyroid hormone, calcitonin, and 25-hydroxy-vitamin D in premature and term infants during the first week of life. *Pediatr Res.* 1977;11(6):739-44.
213. Hobbs RD, Habib Z, Alromaihi D, Idi L, Parikh N, Blocki F, et al. Severe vitamin D deficiency in Arab-American women living in Dearborn, Michigan. *Endocr Pract.* 2009;15(1):35-40.
214. Hochberg Z. Introduction. Rickets - Past and Present. In: Hochberg Z, editor. *Vitamin D and Rickets. Endocrine Development.* Switzerland: Karger; 2003. p. 1-13.
215. Högl W, Schmid A, Raber G, Solder E, Eibl G, Heinz-Erian P, et al. Perinatal bone turnover in term human neonates and the influence of maternal smoking. *Pediatr Res.* 2003;53(5):817-22.
216. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011d;96(7):1911-30.
217. Holick MF, Chen TC, Lu Z, Sauter E. Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. *J Bone Miner Res.* 2007b;22 Suppl 2:V28-33.
218. Holick MF, MacLaughlin J, Doppelt S. Regulation of cutaneous previtamin D₃ photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator. *Science (NY).* 1981;211(4482):590-3.
219. Holick MF, Tian XQ, Allen M. Evolutionary importance for the membrane enhancement of the production of vitamin D₃ in the skin of poikilothermic animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(8):3124-6.
220. Holick MF. Bioavailability of vitamin D and its metabolites in black and white adults. *The New England journal of medicine.* 2013;369(21):2047-8.
221. Holick MF. Evolution and function of vitamin D. *Recent Results Cancer Res.* 2003;164:3-28
222. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc.* 2006;81(3):353-73.

223. Holick MF. Photobiology of vitamin D. In: Feldman D, Pike JW, Adams JS, editors. Vitamin D. Third Edition ed. San Diego: Elsevier Inc; 2011:13-22.
224. Holick MF. Sunlight "D"ilemma: risk of skin cancer or bone disease and muscle weakness. *Lancet*. 2001;357(9249):4-6.
225. Holick MF. The D-batable Parathyroid Hormone Plateau. *Am J Med*. 2011b;124(12):1095-6.
226. Holick MF. The IOM D-lemma. *Public Health Nutr*. 2011c;14(5):939-41.
227. Holick MF. Vitamin D and bone health. *J Nutr*. 1996;126(4 Suppl):1159s-64s.
228. Holick MF. Vitamin D Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2007a;357(3):266-81.
229. Hollis BW, Johnson D, Hulsey TC, Ebeling M, Wagner CL. Vitamin D supplementation during pregnancy: double-blind, randomized clinical trial of safety and effectiveness. *J Bone Miner Res*. 2011;26(10):2341-57.
230. Hollis BW. Comparison of commercially available (125)I-based RIA methods for the determination of circulating 25-hydroxyvitamin D. *Clin Chem*. 2000;46(10):1657-61.
231. Hollis BW. Editorial: The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: no easy task. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(7):3149-51.
232. Hossain N, Khanani R, Hussain-Kanani F, Shah T, Arif S, Pal L. High prevalence of vitamin D deficiency in Pakistani mothers and their newborns. *Int J Gynaecol Obstet*. 2011;112(3):229-33.
233. Houghton LA, Vieth R. The case against ergocalciferol (vitamin D₂) as a vitamin supplement. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(4):694-7.
234. Howe TE, Shea B, Dawson LJ, Downie F, Murray A, Ross C, et al. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011(7):Cd000333.
235. Huffman DM, Landy NM, Potter E, Nagy TR, Gower BA. Comparison of the Lunar DPX-L and Prodigy dual-energy X-ray absorptiometers for assessing total and regional body composition. *Int J Body Compos Res*. 2005;3(1):25-30.
236. Huldshinsky K. Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 1919;45(26):712-3.
237. Husain SM, Mughal MZ, Tsang RC. Calcium, Phosphorus, and Magnesium Transport Across the Placenta. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH, editors. *Fetal and neonatal physiology 1*. Fourth Edition ed. Philadelphia: Elsevier; 2011:364-73.
238. Hussein I, Taha Z, Tewfik I, Badawi S, Siddieg H, Adegboye A, et al. Risk Factors for Maternal Vitamin D Deficiency within the United Arab Emirates. *J Pregnancy Child Health*. 2016;3(5):1000276.

239. Hypponen E, Power C. Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Clin Nutr.* 2007;85(3):860-8.
240. Hytinantti T, Rutanen EM, Turpeinen M, Sorva R, Andersson S. Markers of collagen metabolism and insulin-like growth factor binding protein-1 in term infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2000;83(1): F17-20.
241. Ilich JZ, Hangartner TN, Skugor M, Roche AF, Goel PK, Matkovic V. Skeletal age as a determinant of bone mass in preadolescent females. *Skeletal Radiol.* 1996;25(5):431-9.
242. Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium; Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, et al., editors. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D.* Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56070/> doi: 10.17226/13050
243. Ioannou C, Javaid MK, Mahon P, Yaqub MK, Harvey NC, Godfrey KM, et al. The effect of maternal vitamin D concentration on fetal bone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(11):E2070-7.
244. Jacobs ET, Alberts DS, Foote JA, Green SB, Hollis BW, Yu Z, et al. Vitamin D insufficiency in southern Arizona. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(3):608-13.
245. Jarjou LM, Prentice A, Sawo Y, Laskey MA, Bennett J, Goldberg GR, et al. Randomized, placebo-controlled, calcium supplementation study in pregnant Gambian women: effects on breast-milk calcium concentrations and infant birth weight, growth, and bone mineral accretion in the first year of life. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(3):657-66.
246. Javaid MK, Crozier SR, Harvey NC, Gale CR, Dennison EM, Boucher BJ, et al. Maternal vitamin D status during pregnancy and childhood bone mass at age 9 years: a longitudinal study. *Lancet.* 2006;367(9504):36-43.
247. Jeffery LE, Wood AM, Qureshi OS, Hou TZ, Gardner D, Briggs Z, et al. Availability of 25-hydroxyvitamin D₃ to APCs controls the balance between regulatory and inflammatory T cell responses. *J Immunol.* 2012;189(11):5155-64.
248. Jensen CB, Petersen SB, Granstrom C, Maslova E, Molgaard C, Olsen SF. Sources and determinants of vitamin D intake in Danish pregnant women. *Nutrients.* 2012;4(4):259-72.
249. Johnson DD, Wagner CL, Hulsey TC, McNeil RB, Ebeling M, Hollis BW. Vitamin D deficiency and insufficiency is common during pregnancy. *Am J Perinatol.* 2011;28(1):7-12.
250. Jones G, Riley M, Dwyer T. Maternal smoking during pregnancy, growth, and bone mass in prepubertal children. *J Bone Miner Res.* 1999;14(1):146-51.
251. Jones G, Riley MD, Dwyer T. Maternal diet during pregnancy is associated with bone mineral density in children: a longitudinal study. *Eur J Clin Nutr.* 2000;54(10):749-56.

252. Jorde R, Saleh F, Figenschau Y, Kamycheva E, Haug E, Sundsfjord J. Serum parathyroid hormone (PTH) levels in smokers and non-smokers. The fifth Tromso study. *Eur J Endocrinol* 2005;152(1):39-45.
253. Kalkwarf HJ, Abrams SA, DiMeglio LA, Koo WW, Specker BL, Weiler H. Bone densitometry in infants and young children: the 2013 ISCD Pediatric Official Positions. *J Clin Densitom*. 2014;17(2):243-57.
254. Kalkwarf HJ, Zemel BS, Yolton K, Heubi JE. Bone mineral content and density of the lumbar spine of infants and toddlers: influence of age, sex, race, growth, and human milk feeding. *J Bone Miner Res*. 2013;28(1):206-12.
255. Kalra P, Das V, Agarwal A, Kumar M, Ramesh V, Bhatia E, et al. Effect of vitamin D supplementation during pregnancy on neonatal mineral homeostasis and anthropometry of the newborn and infant. *Br J Nutr*. 2012;108(6):1052-8.
256. Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int*. 1994;4(6):368-81.
257. Katai K, Miyamoto K, Kishida S, Segawa H, Nii T, Tanaka H, et al. Regulation of intestinal Na⁺-dependent phosphate co-transporters by a low-phosphate diet and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem J*. 1999;343(3):705-12.
258. Katzman DK, Bachrach LK, Carter DR, Marcus R. Clinical and anthropometric correlates of bone mineral acquisition in healthy adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;73(6):1332-9.
259. Kawakami M, Blum CB, Ramakrishnan R, Dell RB, Goodman DS. Turnover of the plasma binding protein for vitamin D and its metabolites in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1981;53(6):1110-6.
260. Kestenbaum B, Drüeke TB. Disorders of Calcium, Phosphate, and Magnesium Metabolism. In: Johnson RJ, Feehally J, Floege J, editors. *Comprehensive Clinical Nephrology Fifth Edition* ed. Philadelphia: Elsevier; 2015:124-41
261. Kierszenbaum AL, Tres LL. Osteogenesis. In: Kierszenbaum AL, Tres LL, editors. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. Third Edition* ed. Philadelphia: Elsevier; 2012: 151-68.
262. Kilicaslan AO, Kutlu R, Kilinc I, Ozberk DI. The effects of vitamin D supplementation during pregnancy and maternal vitamin D levels on neonatal vitamin D levels and birth parameters. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2017:1-8.
263. Kimlin MG, Lucas RM, Harrison SL, van der Mei I, Armstrong BK, Whiteman DC, et al. The contributions of solar ultraviolet radiation exposure and other determinants to serum 25-

- hydroxyvitamin D concentrations in Australian adults: the AusD Study. *Am J Epidemiol.* 2014;179(7):864-74.
- 264.Kinsella S, Moran S, Sullivan MO, Molloy MG, Eustace JA. Hyponatremia independent of osteoporosis is associated with fracture occurrence. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(2):275-80.
- 265.Kirimoto A, Takagi Y, Ohya K, Shimokawa H. Effects of retinoic acid on the differentiation of chondrogenic progenitor cells, ATDC5. *J Med Dent Sci.* 2005;52(3):153-62.
- 266.Kizilgul M, Ozcelik O, Apaydin M, Ozbek M, Delibasi T. Letter to the Editor: Possible Mechanisms of Hyponatremia-Induced Osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(10): 89-90.
- 267.Klemm KM, Klein MJ. Biochemical Markers of Bone Metabolism. In: McPherson RA, Pincus MR, editors. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Twenty-Third Edition ed.* St. Louis, Missouri: Elsevier; 2017:188-204.
- 268.Knekt P, Kilkkinen A, Rissanen H, Marniemi J, Saaksjarvi K, Heliovaara M. Serum vitamin D and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2010;67(7):808-11.
- 269.Kolek OI, Hines ER, Jones MD, LeSueur LK, Lipko MA, Kiela PR, et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃ upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289(6):1036-42.
- 270.Kondo T, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S. 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D₃ rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways. *J Bone Miner Res.* 2004;19(9):1411-9.
- 271.Koo WW, Bush AJ, Walters J, Carlson SE. Postnatal development of bone mineral status during infancy. *J Am Coll Nutr.* 1998;17(1):65-70.
- 272.Koo WW, Hammami M, Margeson DP, Nwaesei C, Montalto MB, Lasekan JB. Reduced bone mineralization in infants fed palm olein-containing formula: a randomized, double-blinded, prospective trial. *Pediatrics.* 2003;111(5):1017-23.
- 273.Koo WW, Walters JC, Esterlitz J, Levine RJ, Bush AJ, Sibai B. Maternal calcium supplementation and fetal bone mineralization. *Obstet Gynecol.* 1999;94(4):577-82.
- 274.Korchia G, Amitai Y, Moshe G, Korchia L, Tenenbaum A, Rosenblum J, et al. Vitamin D deficiency in children in Jerusalem: the need for updating the recommendation for supplementation. *Isr Med Assoc J.* 2013;15(7):333-8.
- 275.Kovacs CS, Chafe LL, Fudge NJ, Friel JK, Manley NR. PTH regulates fetal blood calcium and skeletal mineralization independently of PTHrP. *Endocrinology.* 2001; 142:4983-93

276. Kovacs CS, Kronenberg HM. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocr Rev.* 1997;18(6):832-72.
277. Kovacs CS, Lanske B, Hunzelman JL, Guo J, Karaplis AC, Kronenberg HM. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(26):15233-8.
278. Kovacs CS. Bone development and mineral homeostasis in the fetus and neonate: roles of the calciotropic and phosphotropic hormones. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1143-218.
279. Kovacs CS. Fetal mineral homeostasis. In: H. GF, M. PJ, H. J, editors. *Pediatric bone: Biology and diseases.* San Diego: Elsevier/Academic Press; 2011a:247-75.
280. Kovacs CS. Fetus, Neonate and Infant. In: Feldman D, Pike JW, Adams JS, editors. *Vitamin D. Third Edition ed.* San Diego: Elsevier Inc; 2011b:625-46.
281. Kovacs CS. Maternal vitamin D deficiency: Fetal and neonatal implications. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2013.
282. Kovacs CS. Vitamin D in pregnancy and lactation: maternal, fetal, and neonatal outcomes from human and animal studies. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(2):520S-8S.
283. Krieger NS, Sessler NE, Bushinsky DA. Acidosis inhibits osteoblastic and stimulates osteoclastic activity in vitro. *Am J Physiol.* 1992; 262(3): 442-8.
284. Kronenberg HM. PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1068: 1-13
285. Kubota M, Ohno J, Shiina Y, Suda T. Vitamin D metabolism in pregnant rabbits: differences between the maternal and fetal response to administration of large amounts of vitamin D₃. *Endocrinology.* 1982;110(6):1950-6.
286. Kuroda E, Okano T, Mizuno N, Kobayashi T, Kodama S, Ninomiya M, et al. Plasma levels of 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ in maternal, cord and neonatal blood. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1981;27(1):55-65.
287. Lagiou P, Mucci L, Tamimi R, Kuper H, Lagiou A, Hsieh CC, et al. Micronutrient intake during pregnancy in relation to birth size. *Eur J Nutr.* 2005;44(1):52-9.
288. Land C, Schoenau E. Fetal and postnatal bone development: reviewing the role of mechanical stimuli and nutrition. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22(1):107-18.
289. Langsetmo L, Hitchcock CL, Kingwell EJ, Davison KS, Berger C, Forsmo S, et al. Physical activity, body mass index and bone mineral density-associations in a prospective population-based cohort of women and men: the Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos). *Bone.* 2012;50(1):401-8.

290. Lawson DE, Fraser DR, Kodicek E, Morris HR, Williams DH. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism. *Nature*. 1971;230(5291):228-30.
291. Leary S, Ness A, Emmett P, Davey S, Alspac S. Maternal diet in pregnancy and offspring height, sitting height, and leg length. *J Epidemiol Community Health*. 2005;59(6):467-72.
292. Lee CL, Ng BK, Wu LL, Cheah FC, Othman H, Ismail NAM. Vitamin D deficiency in pregnancy at term: risk factors and pregnancy outcomes. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2017 May 26;31(3)
293. Lee S, Clark SA, Gill RK, Christakos S. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and pancreatic beta-cell function: vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion. *Endocrinology*. 1994;134(4):1602-10.
294. Leffelaar ER, Vrijkotte TG, van Eijsden M. Maternal early pregnancy vitamin D status in relation to fetal and neonatal growth: results of the multi-ethnic Amsterdam Born Children and their Development cohort. *Br J Nutr*. 2010;104(1):108-17.
295. Lemann J, Jr., Gray RW, Maierhofer WJ, Cheung HS. The importance of renal net acid excretion as a determinant of fasting urinary calcium excretion. *Kidney Int*. 1986;29(3):743-6.
296. Leonard MB, Bachrach LK. Assessment of bone mineralization following renal transplantation in children: limitations of DXA and the confounding effects of delayed growth and development. *Am J Transplant*. 2001;1(3):193-6.
297. Leonard MB, Bachrach LK. Non-invasive Techniques for Bone Mass Measurement. In: Jüppner FH, Glorieux JM, Pettifor H, editors. *Pediatric Bone: Biology and diseases*. Second Edition ed. San Diego: Elsevier/Academic Press; 2011: 309-42.
298. Levine MA. Normal Mineral Homeostasis. Interplay of Parathyroid Hormone and Vitamin D. In: Hochberg Z, editor. *Vitamin D and Rickets*. Endocrine Development. Switzerland: Karger; 2003:14-33.
299. Li JY, Specker BL, Ho ML, Tsang RC. Bone mineral content in black and white children 1 to 6 years of age. Early appearance of race and sex differences. *Am J Dis Child*. 1989;143(11):1346-9.
300. Li W, Green TJ, Innis SM, Barr SI, Whiting SJ, Shand A, et al. Suboptimal vitamin D levels in pregnant women despite supplement use. *Can J Public Health*. 2011;102(4):308-12.
301. Lieberherr M, Grosse B, Duchambon P, Drueke T. A functional cell surface type receptor is required for the early action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the phosphoinositide metabolism in rat enterocytes. *J Biol Chem*. 1989;264(34):20403-6.

- 302.Lieberherr M. Effects of vitamin D3 metabolites on cytosolic free calcium in confluent mouse osteoblasts. *J Biol Chem.* 1987;262(27):13168-73.
- 303.Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92(1):4-8.
- 304.Liu S, Quarles LD. How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(6):1637-47.
- 305.Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD. Pathogenic role of FGF23 in Hyp mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(1):E38-49.
- 306.Long F. Prenatal Bone Development. In: Jüppner FH, Glorieux JM, Pettifor H, editors. *Pediatric Bone: Biology and diseases.* Second Edition ed. San Diego: Elsevier/Academic Press; 2011: 39-53.
- 307.Looker AC. Body fat and vitamin D status in black versus white women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(2):635-40.
- 308.Lorenz-Depiereux B, Bastepe M, Benet-Pages A, Amyere M, Wagenstaller J, Muller-Barth U, et al. DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis. *Nat Genet.* 2006;38(11):1248-50.
- 309.Lowe D, John S. Alkaline Phosphatase. [Updated 2017 Oct 22]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459201/>
- 310.Lu KC, Lin SH, Yu FC, Chyr SH, Shieh SD. Influence of metabolic acidosis on serum 1,25(OH)2D₃ levels in chronic renal failure. *Miner Electrolyte Metab.* 1995;21(6):398-402.
- 311.Lucas PA, Rouillet C, Duchambon P, Lacour B, Druke T. Rapid stimulation of calcium uptake by isolated rat enterocytes by 1,25(OH)2D₃. *Pflugers Arch.* 1989;413(4):407-13.
- 312.Ma Y, Zhang P, Wang F, Yang J, Liu Z, Qin H. Association between vitamin D and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *J Clin Oncol.* 2011;29(28):3775-82.
- 313.Maalmi H, Ordonez-Mena JM, Schottker B, Brenner H. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and survival in colorectal and breast cancer patients: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer.* 2014;50(8):1510-21.
- 314.Macdonald-Wallis C, Tobias JH, Davey Smith G, Lawlor DA. Parental smoking during pregnancy and offspring bone mass at age 10 years: findings from a prospective birth cohort. *Osteoporos Int.* 2011;22(6):1809-19.
- 315.Macdonald-Wallis C, Tobias JH, Smith GD, Lawlor DA. Relation of maternal prepregnancy body mass index with offspring bone mass in childhood: is there evidence for an intrauterine effect? *Am J Clin Nutr.* 2010;92(4):872-80.

316. Mahon P, Harvey N, Crozier S, Inskip H, Robinson S, Arden N, et al. Low maternal vitamin D status and fetal bone development: cohort study. *J Bone Miner Res.* 2010;25(1):14-9.
317. Mailath-Pokorny M, Polterauer S, Worda K, Springer S, Bettelheim D. Isolated Short Fetal Femur Length in the Second Trimester and the Association with Adverse Perinatal Outcome: Experiences from a Tertiary Referral Center. *PloS one.* 2015;10(6):e0128820.
318. Makgoba M, Nelson SM, Savvidou M, Messow CM, Nicolaides K, Sattar N. First-trimester circulating 25-hydroxyvitamin D levels and development of gestational diabetes mellitus. *Diabetes care.* 2011;34(5):1091-3.
319. Makiya R, Stigbrand T. Placental alkaline phosphatase as the placental IgG receptor. *Clin Chem.* 1992;38(12):2543-5.
320. Malich A, Freesmeyer MG, Mentzel HJ, Sauner D, Boettcher J, Petrovitch A, et al. Normative values of bone parameters of children and adolescents using digital computer-assisted radiogrammetry (DXR). *J Clin Densitom.* 2003;6(2):103-11.
321. Mandarinino NR, Junior F, Salgado JV, Lages JS, Filho NS. Is vitamin d deficiency a new risk factor for cardiovascular disease? *Open Cardiovasc Med J.* 2015; 9:40-9.
322. Mannion CA, Gray-Donald K, Koski KG. Association of low intake of milk and vitamin D during pregnancy with decreased birth weight. *CMAJ.* 2006;174(9):1273-7.
323. Mannstadt M, Juppner H, Gardella TJ. Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol.* 1999;277(5): 665-75.
324. Manousaki D, Rauch F, Chabot G, Dubois J, Fisaletti M, Alos N. Pediatric data for dual X-ray absorptiometric measures of normal lumbar bone mineral density in children under 5 years of age using the lunar prodigy densitometer. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2016;16(3):247-55.
325. Manzano C, García-Algar O, Mur A, Ferrer R, Carrascosa A, Yeste D, et al. Concentraciones plasmáticas de 25-OH-Vitamina D en sangre de cordón umbilical tras los meses de verano. *Rev Esp Salud Publica.* 2017;91.
326. Marshall WJ, Bangert SK, Lapsley M. Calcium, phosphate and magnesium. In: Marshall WJ, Bangert SK, Lapsley M, editors. *Clinical chemistry.* 7th Edition ed. Edinburgh: Elsevier; 2012: 207-22.
327. Martin A, David V, Li H, Dai B, Feng JQ, Quarles LD. Overexpression of the DMP1 C-terminal fragment stimulates FGF23 and exacerbates the hypophosphatemic rickets phenotype in Hyp mice. *Mol Endocrinol.* 2012;26(11):1883-95.
328. Martin A, Liu S, David V, Li H, Karydis A, Feng JQ, Quarles LD. Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor Fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling. *FASEB J.* 2011;25(8):2551-62.

329. Martin KJ, Gonzalez EA. Vitamin D analogs: actions and role in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Semin Nephrol.* 2004;24(5):456-9.
330. Martínez ME, Luque de Castro MD, Gámiz-García L. Determinaciones de la vitamina D en suero. Metodología e indicaciones. In: Rapado Erratzi A, Díaz Curiel M, editors. *Hipovitaminosis D en España.* Madrid: FHOEMO; 2000:55-63.
331. Martínez V, Moreno JM, Dalmau J. Recommended intake of calcium and vitamin D: positioning of the Nutrition Committee of the AEP. *An Pediatr (Barc)* 2012;77(1):57 e1-8.
332. Martinez-Mesa J, Menezes AM, Howe LD, Wehrmeister FC, Muniz LC, Gonzalez-Chica DA, et al. Lifecourse relationship between maternal smoking during pregnancy, birth weight, contemporaneous anthropometric measurements and bone mass at 18years old. The 1993 Pelotas Birth Cohort. *Early Hum Dev.* 2014;90(12):901-6.
333. Mata-Granados JM, Luque de Castro MD, Quesada Gomez JM. Inappropriate serum levels of retinol, alpha-tocopherol, 25 hydroxyvitamin D₃ and 24,25 dihydroxyvitamin D₃ levels in healthy Spanish adults: simultaneous assessment by HPLC. *Clin Biochem.* 2008;41(9):676-80.
334. Mataix JM, Barrionuevo M. Vitamina D₃, hormona D₃ y regulación homeostática de calcio. Mataix JM, editor. Madrid: Ergon; 2002.
335. Mataix JM. Tabla de composición de alimentos españoles. 5ª Ed ed. Granada; 2009.
336. Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D₃ synthesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(6):1165-8.
337. Matsuoka LY, Wortsman J, Haddad JG, Hollis BW. Skin types and epidermal photosynthesis of vitamin D₃. *J Am Acad Dermatol.* 1990;23(3):525-6.
338. Maxmen A. Nutrition advice: the vitamin D-lemma. *Nature.* 2011;475(7354):23-5.
339. Maxwell JP, Miles LM. Osteomalacia in China. *Proc R Soc Med.* 1925;18:48-66.
340. Mazhar S. Vitamin D supplementation for women during pregnancy: RHL commentary. Geneva: World Health Organization. 2012.
341. McCollum EV, Simmonds N, Becker JE, Shipley PG. Studies on experimental rickets XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J Biol Chem.* 1922;53(2):293-312.
342. McDevitt H, Tomlinson C, White MP, Ahmed SF. Quantitative ultrasound assessment of bone in preterm and term neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2005;90(4):F341-2.
343. McKee MD, Cole WG. Bone Matrix and Mineralization. In: Glorieux FH, Pettifor H, Jüppner FH, editors. *Pediatric Bone. Second Edition ed.* San Diego: Elsevier; 2012: 9-37.

344. Meisenberg G, Simmons WH. The Extracellular Matrix In: Meisenberg G, Simmons WH, editors. Principles of Medical Biochemistry. Third Edition ed. Philadelphia: Elsevier; 2012: 212-29.
345. Melamed N, Yogev Y, Linder N, Efrat Z, Bardin R, Wiznitzer A, et al. Role of fetal length in the prediction of fetal weight. *J Ultrasound Med.* 2012;31(5):687-94.
346. Mellanby E. An experimental investigation on rickets. *The Lancet.* 1919;193(4985):407-12.
347. Menea C, Vrtovnik F, Friedlander G, Corvol M, Garabedian M. Insulin-like growth factor I, a unique calcium-dependent stimulator of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ production. Studies in cultured mouse kidney cells. *J Biol Chem.* 1995;270(43):25461-7.
348. Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocrine reviews.* 1989;10(3):232-74
349. Merewood A, Mehta SD, Chen TC, Bauchner H, Holick MF. Association between vitamin D deficiency and primary cesarean section. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(3):940-5.
350. Meyer, R.A. jr.; Meyer, M.H.; Gray, R.W. Parabiosis suggests a humoral factor is involved in X-linked hypophosphatemia in mice. *J Bone Miner Res* 1989; 4:493-500
351. Michaylova V, Kouleva N. Arsenazo III as metallochromic indicator for complexometric determination of calcium in slightly alkaline medium. *Talanta.* 1973;20(5):453-8.
352. Miettola S, Hovi P, Andersson S, Strang-Karlsson S, Pouta A, Laivuori H, et al. Maternal preeclampsia and bone mineral density of the adult offspring. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;209(5):443.e1-.e10.
353. Mimouni F, Steichen JJ, Tsang RC, Hertzberg V, Miodovnik M. Decreased bone mineral content in infants of diabetic mothers. *Am J Perinatol.* 1988;5(4):339-43.
354. Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics.* 2008;122(2):398-417.
355. Moehrle M, Heinrich L, Schmid A, Garbe C. Extreme UV exposure of professional cyclists. *Dermatology.* 2000;201(1):44-5.
356. Moloney FJ, Collins S, Murphy GM. Sunscreens: safety, efficacy and appropriate use. *Am J Clin Dermatol.* 2002;3(3):185-91.
357. Moon RJ, Crozier SR, Dennison EM, Davies JH, Robinson SM, Inskip HM, et al. Tracking of 25-hydroxyvitamin D status during pregnancy: the importance of vitamin D supplementation. *Am J Clin Nutr.* 2015;102(5):1081-7.
358. Morales E, Rodríguez A, Valvi D, Iniguez C, Esplugues A, Vioque J, et al. Deficit of vitamin D in pregnancy and growth and overweight in the offspring. *Int J Obes (Lond).* 2015;39(1):61-8.

359. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadraro C. Tablas de composición de alimentos. 15ª Ed. Madrid; 2011.
360. Morelli S, de Boland AR, Boland RL. Generation of inositol phosphates, diacylglycerol and calcium fluxes in myoblasts treated with 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem J.* 1993;289 (Pt 3):675-9.
361. Morley R, Carlin JB, Pasco JA, Wark JD, Ponsonby AL. Maternal 25-hydroxyvitamin D concentration and offspring birth size: effect modification by infant VDR genotype. *Eur J Clin Nutr.* 2009;63(6):802-4.
362. Morley R, Carlin JB, Pasco JA, Wark JD. Maternal 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone concentrations and offspring birth size. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(3):906-12.
363. Moya M, Rapado A, Díaz M. Necesidades de vitamina D durante el crecimiento. In: Rapado Errazti A, Díaz Curiel M, editors. *Hipovitaminosis D en España* Madrid: FHOEMO; 2000:29-43.
364. Moyer-Mileur LJ, Brunstetter V, McNaught TP, Gill G, Chan GM. Daily physical activity program increases bone mineralization and growth in preterm very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2000;106(5):1088-92.
365. Mulligan ML, Felton SK, Riek AE, Bernal-Mizrachi C. Implications of vitamin D deficiency in pregnancy and lactation. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202(5): 429.e1-9.
366. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA.* 2006;296(23):2832-8.
367. Murali SK, Roschger P, Zeitz U, Klaushofer K, Andrukhova O, Erben RG. FGF23 Regulates Bone Mineralization in a 1,25(OH)₂D₃ and Klotho-Independent Manner. *J Bone Miner Res.* 2016;31(1):129-42.
368. Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, Kodera Y, Kawaguchi Y, Hosoya T, et al. Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D₃ 1α-hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1α,25(OH)₂D₃ in intact animals. *Endocrinology.* 1999;140(5):2224-31.
369. Nakano K, Iwamatsu T, Wang CM, Tarasima M, Nakayama T, Sasaki K, et al. High bone turnover of type I collagen depends on fetal growth. *Bone.* 2006;38(2):249-56.
370. Namgung R, Mimouni F, Campaigne BN, Ho ML, Tsang RC. Low bone mineral content in summer-born compared with winter-born infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1992;15(3):285-8.

371. Namgung R, Tsang RC, Lee C, Han DG, Ho ML, Sierra RI. Low total body bone mineral content and high bone resorption in Korean winter-born versus summer-born newborn infants. *J Pediatr*. 1998;132(3):421-5.
372. Namgung R, Tsang RC, Specker BL, Sierra RI, Ho ML. Low bone mineral content and high serum osteocalcin and 1,25-dihydroxyvitamin D in summer- versus winter-born newborn infants: an early fetal effect? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1994;19(2):220-7.
373. Namgung R, Tsang RC, Specker BL, Sierra RI, Ho ML. Reduced serum osteocalcin and 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations and low bone mineral content in small for gestational age infants: evidence of decreased bone formation rates. *J Pediatr*. 1993;122(2):269-75.
374. Namgung R, Tsang RC. Bone in the pregnant mother and newborn at birth. *Clin Chim Acta*. 2003;333(1):1-11.
375. Namgung R, Tsang RC. Factors affecting newborn bone mineral content: in utero effects on newborn bone mineralization. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2000;59(1):55-63.
376. Namgung R, Tsang RC. Neonatal Calcium, Phosphorous, and Magnesium Homeostasis. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH, editors. *Fetal and Neonatal Physiology*. 1. Fourth Edition ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2011:384-403.
377. Naylor KE, Eastell R. Biochemical markers in bone disease. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, editors. *Rheumatology*. 2. Sixth Edition ed. Philadelphia: Elsevier; 2015:1656-62.
378. Need AG, O'Loughlin PD, Horowitz M, Nordin BE. Relationship between fasting serum glucose, age, body mass index and serum 25 hydroxyvitamin D in postmenopausal women. *Clin Endocr*. 2005;62(6):738-41.
379. Negri, A. L. Regulación de la mineralización sea por factores inorgánicos y peptídicos. *Rev argent endocrinol metab*. 2011;48(4): 216-24.
380. Nemere I, Yoshimoto Y, Norman AW. Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology*. 1984;115(4):1476-83.
381. Nesbitt T, Coffman TM, Griffiths R. Cross-transplantation of kidneys in normal and hyp-mice: Evidence that the hyp-mouse phenotype is unrelated to an intrinsic renal defect. *J Clin Invest* 1992; 89:1453-1459
382. Nicolaidou P, Hatzistamatiou Z, Papadopoulou A, Kaleyias J, Floropoulou E, Lagona E, et al. Low vitamin D status in mother-newborn pairs in Greece. *Calcif Tissue Int*. 2006;78(6):337-42.
383. Nielsen HK, Thomsen K, Eriksen EF, Charles P, Storm T, Mosekilde L. The effects of high-dose glucocorticoid administration on serum bone gamma carboxyglutamic acid-containing

- protein, serum alkaline phosphatase and vitamin D metabolites in normal subjects. *Bone Miner.* 1988;4(1):105-13.
384. Nitta A, Suzumura H, Arisaka O, Miura T, Igarashi Y. Fetal Bone Formation Is Decreased from Middle Pregnancy to Birth. *Tohoku J Exp Med.* 2016;239(2):147-5
385. Njeh CF, Samat SB, Nightingale A, McNeil EA, Boivin CM. Radiation dose and in vitro precision in paediatric bone mineral density measurement using dual X-ray absorptiometry. *Br J Radiol.* 1997;70(835):719-27.
386. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(2):491S-9S.
387. Nouwen EJ, Pollet DE, Eerdeken MW, Hendrix PG, Briers TW, De Broe ME. Immunohistochemical localization of placental alkaline phosphatase, carcinoembryonic antigen, and cancer antigen 125 in normal and neoplastic human lung. *Cancer Res.* 1986;46(2):866-76.
388. O'Brien EC, Kilbane MT, McKenna MJ, Segurado R, Geraghty AA, McAuliffe FM. Calcium intake in winter pregnancy attenuates impact of vitamin D inadequacy on urine NTX, a marker of bone resorption. *Eur J Nutr.* 2018; 57(3), 1015-1023.
389. Ohata Y, Ozono K, Michigami T. Current concepts in perinatal mineral metabolism. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2016;25(1):9-17.
390. Okesina AB, Donaldson D, Lascelles PT, Morris P. Effect of gestational age on levels of serum alkaline phosphatase isoenzymes in healthy pregnant women. *Int J Gynaecol Obstet.* 1995;48(1):25-9.
391. Okonofua F, Menon RK, Houlder S, Thomas M, Robinson D, O'Brien S, et al. Parathyroid hormone and neonatal calcium homeostasis: evidence for secondary hyperparathyroidism in the Asian neonate. *Metabolism.* 1986;35(9):803-6.
392. Okpere E, Okorodudu A, Gbinigie O. Observations on the alkaline phosphatase isoenzyme distribution in maternal and amniotic fluid compartments in Nigerian parturients. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 1988;15(1-2):53-5.
393. Omdahl JL, Gray RW, Boyle IT, Knutson J, DeLuca HF. Regulation of metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by kidney tissue in vitro by dietary calcium. *Nat New Biol.* 1972;237(71):63-4.
394. Ontario Health Technology Advisory Committee. Clinical utility of vitamin d testing: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser.* 2010;10(2):1-93.
395. Onyesom I, Opajobi AO, Uzuegbu UE, Oriero D, Mordi J, Awhin PE, et al. Relationship between placental alkaline phosphatase activity and cord blood glucose, albumin and neonatal birth weight at term. *Invest Clin.* 2009;50(4):491-5.

- 396.Ortiz-Andrellucchi A, Sanchez-Villegas A, Ramirez-Garcia O, Serra-Majem L. Assessment of nutritional quality in healthy pregnant women of the Canary Islands, Spain. *Med Clin*. 2009;133(16):615-21.
- 397.Ott WJ. Fetal femur length, neonatal crown-heel length, and screening for intrauterine growth retardation. *Obstet Gynecol*. 1985;65(4):460-4.
- 398.Ovalle W, Nahirney P. Cartilage and bone. *Netter's Essential Histology*, 2nd ed Philadelphia: Saunders Elsevier Inc. 2013:131-56.
- 399.Ovesen L, Brot C, Jakobsen J. Food contents and biological activity of 25-hydroxyvitamin D: a vitamin D metabolite to be reckoned with? *Ann Nutr Metab*. 2003;47(3-4):107-13.
- 400.Ozlu T, Ozcan T. Fetal isolated short femur in the second trimester and adverse pregnancy outcomes. *Prenat Diagn*. 2013;33(11):1063-9.
- 401.Papageorghiou AT, Fratelli N, Leslie K, Bhide A, Thilaganathan B. Outcome of fetuses with antenatally diagnosed short femur. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008;31(5):507-11.
- 402.Papandreou L, Chasiotis G, Seferiadis K, Thanasoulas NC, Dousias V, Tsanadis G, et al. Calcium levels during the initiation of labor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;115(1):17-22.
- 403.Park SM, Jee J, Joung JY, Cho YY, Sohn SY, Jin SM, et al. High Dietary Sodium Intake Assessed by 24-hour Urine Specimen Increase Urinary Calcium Excretion and Bone Resorption Marker. *J Bone Metab*. 2014;21(3):189-94.
- 404.Pavlovic D, Katicic D, Gulin T, Josipovic J. Vitamin d in the patients with chronic kidney disease: when, to whom and in which form. *Mater Sociomed*. 2015;27(2):122-4.
- 405.Pena HR, de Lima MC, Brandt KG, de Antunes MM, da Silva GA. Influence of preeclampsia and gestational obesity in maternal and newborn levels of vitamin D. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2015;15:112.
- 406.Pereira-da-Silva L, Costa AB, Pereira L, Filipe AF, Virella D, Moreira AC, et al. Reference values for bone strength assessed by quantitative ultrasound early after birth in term and preterm neonates. *Acta Med Port*. 2011;24(4):561-4.
- 407.Perez-Ferre N, Torrejon MJ, Fuentes M, Fernandez MD, Ramos A, Bordiu E, et al. Association of low serum 25-hydroxyvitamin D levels in pregnancy with glucose homeostasis and obstetric and newborn outcomes. *Endocr Pract*. 2012;18(5):676-84.
- 408.Perez-Lopez FR, Fernandez-Alonso AM, Ferrando-Marco P, Gonzalez-Salmeron MD, Dionis-Sanchez EC, Fiol-Ruiz G, et al. First trimester serum 25-hydroxyvitamin D status and factors related to lower levels in gravids living in the Spanish Mediterranean coast. *Reprod Sci*. 2011;18(8):730-6.

409. Petersen SB, Strom M, Maslova E, Granstrom C, Vestergaard P, Molgaard C, et al. Predicted vitamin D status during pregnancy in relation to offspring forearm fractures in childhood: a study from the Danish National Birth Cohort. *Br J Nutr.* 2015;114(11):1900-8.
410. Pettifor JM. Vitamin D Deficiency and Nutritional Rickets in Children. In: Feldman D, Pike JW, Adams JS, editors. *Vitamin D. Third Edition ed.* San Diego: Elsevier Inc; 2011:1107-28.
411. Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, et al. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev.* 1996;76(1):127-73.
412. Pilz S, Dobnig H, Fischer JE, Wellnitz B, Seelhorst U, Boehm BO, et al. Low vitamin d levels predict stroke in patients referred to coronary angiography. *Stroke.* 2008;39(9):2611-3.
413. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(6):2017-29.
414. Potts JT. Enfermedades de las glándulas paratiroides y otros trastornos hipercalcémicos e hipocalcémicos. In: Longo DL, Kasper DE, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J, editors. *Harrison: Principios de Medicina Interna. 2.* Madrid: Madrid, McGraw-Hill – Interamericana de España; 2012: 2377-96.
415. Prada JA. Calcium-Regulating Hormones. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH, editors. *Fetal and Neonatal Physiology. 1. Fourth Edition ed.* Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2011: 352-63.
416. Prentice A, Jarjou LM, Goldberg GR, Bennett J, Cole TJ, Schoenmakers I. Maternal plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and birthweight, growth and bone mineral accretion of Gambian infants. *Acta Paediatr.* 2009;98(8):1360-2.
417. Prentice A, Parsons TJ, Cole TJ. Uncritical use of bone mineral density in absorptiometry may lead to size-related artifacts in the identification of bone mineral determinants. *Am J Clin Nutr.* 1994;60(6):837-42.
418. Prentice A. Micronutrients and the bone mineral content of the mother, fetus and newborn. *J Nutr.* 2003;133(5 Suppl 2):1693s-9s.
419. Price PA, Williamson MK, Haba T, Dell RB, Jee WS. Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(24):7734-8.
420. Priemel M, von Domarus C, Klatte TO, Kessler S, Schlie J, Meier S, et al. Bone mineralization defects and vitamin D deficiency: histomorphometric analysis of iliac crest bone biopsies and circulating 25-hydroxyvitamin D in 675 patients. *J Bone Miner Res.* 2010;25(2):305-12.

421. Pullig O, Weseloh G, Ronneberger D, Kakonen S, Swoboda B. Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone. *Calcif Tissue Int.* 2000;67(3):230-40.
422. Purdie DW, Aaron JE, Selby PL. Bone histology and mineral homeostasis in human pregnancy. *BJOG.* 1988;95(9):849-54.
423. Quarles LD. Skeletal secretion of FGF-23 regulates phosphate and vitamin D metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(5):276-86.
424. Quesada JM, Luque M. Funciones óseas y extraóseas del sistema endocrino de la vitamina D. In: Rapado Erratzi A, Díaz Curiel M, editors. *Hipovitaminosis D en España.* Madrid: FHOEMO; 2000:15-27.
425. Quesada JM. Vitamina D. In: Riancho Moral JA, González Macías J, editors. *Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral.* Madrid: Jarpyo editores; 2004:29-33.
426. Raman L, Rajalakshmi K, Krishnamachari KA, Sastry JG. Effect of calcium supplementation to undernourished mothers during pregnancy on the bone density of the neonates. *Am J Clin Nutr.* 1978;31(3):466-9.
427. Rapado A. Metabolismo de la vitamina D. In: Rapado Erratzi A, Díaz Curiel M, editors. *Hipovitaminosis D en España.* Madrid: FHOEMO; 2000: 1-13.
428. Rauch F, Plotkin H, DiMeglio L, Engelbert RH, Henderson RC, Munns C, et al. Fracture prediction and the definition of osteoporosis in children and adolescents: the ISCD 2007 Pediatric Official Positions. *J Clin Densitom.* 2008;11(1):22-8.
429. Rauch F, Schoenau E. Changes in bone density during childhood and adolescence: an approach based on bone's biological organization. *J Bone Miner Res.* 2001a;16(4):597-604.
430. Rauchenzauner M, Schmid A, Heinz-Erian P, Kapelari K, Falkensammer G, Griesmacher A, et al. Sex- and age-specific reference curves for serum markers of bone turnover in healthy children from 2 months to 18 years. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2007;92(2):443-9.
431. Reddy GS, Norman AW, Willis DM, Goltzman D, Guyda H, Solomon S, et al. Regulation of vitamin D metabolism in normal human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983;56(2):363-70.
432. Reitz RE, Daane TA, Woods JR, Weinstein RL. Calcium, magnesium, phosphorus, and parathyroid hormone interrelationships in pregnancy and newborn infants. *Obstet Gynecol.* 1977;50(6):701-5.
433. Reynolds WA, Williams GA, Pitkin RM. Calcitropic hormone responsiveness during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1981;139(7):855-62.

434. Richard A, Rohrmann S, Quack Lotscher KC. Prevalence of Vitamin D Deficiency and Its Associations with Skin Color in Pregnant Women in the First Trimester in a Sample from Switzerland. *Nutrients*. 2017;9(3).
435. Risteli J, Winter WE, Kleerekoper M, Risteli L. Bone and Mineral Metabolism. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Fifth Edition ed. St. Louis: Elsevier; 2012: 1733-801.
436. Rius JM, Ortuño J, Rivas C, Maravall M, Calzado MA, Lopez A, et al. Factors associated with early weaning in a Spanish region. *An Pediatr*. 2014;80(1):6-15.
437. Robinson CJ, Wagner CL, Hollis BW, Baatz JE, Johnson DD. Association of maternal vitamin D and placenta growth factor with the diagnosis of early onset severe preeclampsia. *Am J Perinatol*. 2013;30(3):167-72.
438. Rodriguez A, Santa Marina L, Jimenez AM, Esplugues A, Ballester F, Espada M, et al. Vitamin D Status in Pregnancy and Determinants in a Southern European Cohort Study. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2016;30(3):217-28.
439. Rodríguez M, Beltran B, Cuadrado C, Moreiras O. Influence of sun exposure and diet to the nutritional status of vitamin D in adolescent Spanish women: the five countries study (OPTIFORD Project). *Nutr Hosp*. 2010;25(5):755-62.
440. Rogers I, Emmett P. Diet during pregnancy in a population of pregnant women in South West England. ALSPAC Study Team. *Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood*. *Eur J Clin Nutr*. 1998;52(4):246-50.
441. Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(11):1357-66.
442. Romagnoli C, Zecca E, Tortorolo G, Diodato A, Fazzini G, Sorcini-Carta M. Plasma thyrocalcitonin and parathyroid hormone concentrations in early neonatal hypocalcaemia. *Arch Dis Child*. 1987;62(6):580-4.
443. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D: what dietetics practitioners need to know. *J Am Diet Assoc*. 2011;111(4):524-7.
444. Roth DE, Perumal N, Al Mahmud A, Baqui AH. Maternal vitamin D3 supplementation during the third trimester of pregnancy: effects on infant growth in a longitudinal follow-up study in Bangladesh. *J Pediatr*. 2013;163(6):1605-11.e3.
445. Rudang R, Mellstrom D, Clark E, Ohlsson C, Lorentzon M. Advancing maternal age is associated with lower bone mineral density in young adult male offspring. *Osteoporos Int*. 2012;23(2):475-82.
446. Rummens K, van Cromphaut SJ, Carmeliet G, van Herck E, van Bree R, Stockmans I, et al. Pregnancy in mice lacking the vitamin D receptor: normal maternal skeletal response, but

- fetal hypomineralization rescued by maternal calcium supplementation. *Pediatr Res.* 2003;54(4):466-73.
447. Rupich RC, Specker BL, Lieu AFM, Ho M. Gender and race differences in bone mass during infancy. *Calcif Tissue Int.* 1996;58(6):395-7.
448. Saarela T, Risteli J, Kauppila A, Koivisto M. Type I collagen markers in cord serum of appropriate vs. small for gestational age infants born during the second half of pregnancy. *Eur J Clin Invest.* 2001;31(5):438-43.
449. Saarem K, Pedersen JI. Sex differences in the hydroxylation of cholecalciferol and of 5 beta-cholestane-3 alpha, 7 alpha, 12 alpha-triol in rat liver. *Biochem J.* 1987;247(1):73-8.
450. Sabour H, Hossein-Nezhad A, Maghbooli Z, Madani F, Mir E, Larijani B. Relationship between pregnancy outcomes and maternal vitamin D and calcium intake: A cross-sectional study. *Gynecol Endocrinol.* 2006;22(10):585-9.
451. 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;81(5):1060-4.
452. Sadler TW. The Axial Skeleton. In: Sadler TW, editor. *Langman's medical embryology.* 12th Edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012: 133-44.
453. Saggese G, Baroncelli GI, Bertelloni S. Determination of intact parathyrin by immunoradiometric assay evaluated in normal children and in patients with various disorders of calcium metabolism. *Clin Chem.* 1991;37(11):1999-2001.
454. Saito H, Maeda A, Ohtomo S, Hirata M, Kusano K, Kato S, et al. Circulating FGF-23 is regulated by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ and phosphorus in vivo. *J Biol Chem.* 2005;280(4):2543-9.
455. Salameh W, Holmquist B, Lee G, Caston-Balderama A, Huang X, Clarke N, et al., editors. Quantification of Serum 25-Hydroxyvitamin D₂ and 25-Hydroxyvitamin D₃ Using High-Performance Liquid Chromatography, Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS): Correlation with PTH and Other Assay Methods. *Endocrine reviews*; 2010: ENDOCRINE SOC 8401 CONNECTICUT AVE, SUITE 900, CHEVY CHASE, MD 20815-5817 USA.
456. Salek M, Hashemipour M, Aminorroaya A, Gheiratmand A, Kelishadi R, Ardestani PM, et al. Vitamin D deficiency among pregnant women and their newborns in Isfahan, Iran. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2008;116(6):352-6.
457. Saliba W, Barnett O, Rennert HS, Lavi I, Rennert G. The Relationship Between Serum 25(OH)D and Parathyroid Hormone Levels. *Am J Med.* 2011;124(12):1165-70.
458. Sánchez A, Puché R, Zeni S, Oliveri B, Galich AM, Maffei L, et al. Papel del calcio y de la vitamina D en la salud ósea (Parte I). *REEMO.* 2002;11(06):201-17.

459. Sanchez-Gonzalez MC, Salanova L, Ruano P. FGF-23: just a phosphate metabolism regulator or something else?. *Reumatol Clin*. 2011;7 Suppl 2:S5-7.
460. Sann L, David L, Thomas A, Frederich A, Chapuy MC, Francois R. Congenital hyperparathyroidism and vitamin D deficiency secondary to maternal hypoparathyroidism. *Acta Paediatr*. 1976;65(3):381-5.
461. Sattar N, Welsh P, Panarelli M, Forouhi NG. Increasing requests for vitamin D measurement: costly, confusing, and without credibility. *Lancet*. 2012;379(9811):95-6.
462. Sawada N, Sakaki T, Ohta M, Inouye K. Metabolism of vitamin D₃ by human CYP27A1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273(3):977-84.
463. Schedewie HK, Odell WD, Fisher DA, Krutzik SR, Dodge M, Cousins L, et al. Parathormone and perinatal calcium homeostasis. *Pediatr Res*. 1979;13(1):1-6.
464. Scholl TO, Chen X. Vitamin D intake during pregnancy: association with maternal characteristics and infant birth weight. *Early Hum Dev*. 2009;85(4):231-4.
465. Schuit SC, van der Klift M, Weel AE, de Laet CE, Burger H, Seeman E, et al. Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. *Bone*. 2004;34(1):195-202.
466. Schushan-Eisen I, Cohen M, Leibovitch L, Maayan-Metzger A, Strauss T. Bone density among infants of gestational diabetic mothers and macrosomic neonates. *Matern Child Health J*. 2015;19(3):578-82.
467. Schwartz JB, Lai J, Lizaola B, Kane L, Weyland P, Terrault NA, et al. Variability in free 25(OH) vitamin D levels in clinical populations. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;144:156-8.
468. Schweer G, Pook WH. Studies on the usefulness of Biuret reaction according to Ditterbrandt-Weichselbaum for quantitative protein determination in vitreous body filtrates. *Albrecht Von Graefes Arch Ophthalmol*. 1957;158(4):387-92.
469. Sebastian A, Vijayaselvi R, Nandeibam Y, Natarajan M, Paul TV, Antonisamy B, et al. A Case Control Study to Evaluate the Association between Primary Cesarean Section for Dystocia and Vitamin D Deficiency. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(9):Qc05-8.
470. Seeman E, Kumar R, Hunder GG, Scott M, Heath H, 3rd, Riggs BL. Production, degradation, and circulating levels of 1,25-dihydroxyvitamin D in health and in chronic glucocorticoid excess. *J Clin Invest*. 1980;66(4):664-9.
471. Seeman E, Wahner HW, Offord KP, Kumar R, Johnson WJ, Riggs BL. Differential effects of endocrine dysfunction on the axial and the appendicular skeleton. *J Clin Invest*. 1982;69(6):1302-9.

- 472.Seki K, Furuya K, Makimura N, Mitsui C, Hirata J, Nagata I. Cord blood levels of calcium-regulating hormones and osteocalcin in premature infants. *J Perinat Med.* 1994;22(3):189-94.
- 473.Shahtaheri SM, Aaron JE, Johnson DR, Purdie DW. Changes in trabecular bone architecture in women during pregnancy. *BJOG.* 1999;106(5):432-8.
- 474.Shapiro C, Sutija VG, Bush J. Effect of maternal weight gain on infant birth weight. *J Perinat Med.* 2000;28(6):428-31.
- 475.Shapiro F, Forriol F. El cartílago de crecimiento: biología y biomecánica del desarrollo. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol.* 2005;49(1):55-67.
- 476.Shaw NJ, Högler W. Biochemical Markers of Bone Metabolism. In: Jüppner FH, Glorieux JM, Pettifor H, editors. *Pediatric Bone: Biology and diseases.* Second Edition ed. San Diego: Elsevier/Academic Press; 2011: 361-81.
- 477.Shaw NJ, Mughal MZ. Vitamin D and child health: part 2 (extraskelatal and other aspects). *Arch Dis Child.* 2013;98(5):368-72.
- 478.Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2004a;19(3):429-35.
- 479.Shore RM, Langman CB, Donovan JM, Conway JJ, Poznanski AK. Bone mineral disorders in children: evaluation with dual x-ray absorptiometry. *Radiology.* 1995;196(2):535-40.
- 480.Simmonds CS, Kovacs CS. Role of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) in regulating mineral homeostasis during fetal development. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20(3):235-73.
- 481.Sitara D, Razzaque MS, Hesse M, Yoganathan S, Taguchi T, Erben RG, et al. Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in *Phex*-deficient mice. *Matrix Biol.* 2004;23(7):421-32.
- 482.Smith-Bindman R, Hosmer W, Feldstein VA, Deeks JJ, Goldberg JD. Second-trimester ultrasound to detect fetuses with Down syndrome: a meta-analysis. *Jama.* 2001;285(8):1044-55.
- 483.Sniadecki J. Jerdrzej Sniadecki (1768–1838) on the cure of rickets (1840) Cited by W. Mozolowski. *Nature.* 1939;143:121–124
- 484.Somigliana E, Paffoni A, Lattuada D, Colciaghi B, Filippi F, La Vecchia I, et al. Serum Levels of 25-Hydroxyvitamin D and Time to Natural Pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 2016;81(5):468-71.

- 485.Somjen D, Katzburg S, Stern N, Kohen F, Sharon O, Limor R, et al. 25 hydroxy-vitamin D₃-1alpha hydroxylase expression and activity in cultured human osteoblasts and their modulation by parathyroid hormone, estrogenic compounds and dihydrotestosterone. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;107(3-5):238-44.
- 486.Song SJ, Zhou L, Si S, Liu J, Zhou J, Feng K, et al. The high prevalence of vitamin D deficiency and its related maternal factors in pregnant women in Beijing. *PloS one.* 2013;8(12):e85081.
- 487.Specker BL, Ho ML, Oestreich A, Yin TA, Shui QM, Chen XC, et al. Prospective study of vitamin D supplementation and rickets in China. *J Pediatr.* 1992;120(5):733-9.
- 488.Specker BL, Schoenau E. Quantitative bone analysis in children: current methods and recommendations. *J Pediatr.* 2005;146(6):726-31.
- 489.Spedding S. Vitamin D and depression: a systematic review and meta-analysis comparing studies with and without biological flaws. *Nutrients.* 2014;6(4):1501-18.
- 490.St-Arnaud R, Demay MB. Vitamin D Biology. In: Glorieux FH, Pettifor JM, Jüppner H, editors. *Pediatric Bone: Biology and Diseases.* Second Edition ed. San Diego: Elsevier/Academic Press; 2011: 163-87.
- 491.St-Arnaud R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):225-30.
- 492.Staines KA, MacRae VE, Farquharson C. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *J Endocrinol.* 2012;214(3):241-55.
- 493.Steichen JJ, Kaplan B, Edwards N, Tsang RC. Proceedings: Bone mineral content in full-term infants measured by direct photon absorptiometry. *AJR Am J Roentgenol.* 1976;126(6):124-5.
- 494.Stewart AF, Horst R, Deftos LJ, Cadman EC, Lang R, Broadus AE. Biochemical evaluation of patients with cancer-associated hypercalcemia: evidence for humoral and nonhumoral groups. *N Engl J Med.* 1980;303(24):1377-83.
- 495.Strewler GJ. The parathyroid hormone-related protein. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000;29(3):629-45.
- 496.Su MJ, Bikle DD, Mancianti ML, Pillai S. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ potentiates the keratinocyte response to calcium. *J Biol Chem.* 1994;269(20):14723-9.
- 497.Suda T, Ueno Y, Fujii K, Shinki T. Vitamin D and bone. *J Cell Biochem.* 2003;88(2):259-66.
- 498.Sulyok E, Varga F, Gyory E, Jobst K, Csaba IF. Postnatal development of renal sodium handling in premature infants. *J Pediatr.* 1979;95(5 Pt 1):787-92.
- 499.Sylvia VL, Schwartz Z, Ellis EB, Helm SH, Gomez R, Dean DD, et al. Nongenomic regulation of protein kinase C isoforms by the vitamin D metabolites 1 alpha,25-(OH)₂D₃ and 24R,25-(OH)₂D₃. *J Cell Physiol.* 1996;167(3):380-93.

- 500.Szulc P, Seeman E, Delmas PD. Biochemical measurements of bone turnover in children and adolescents. *Osteoporos Int.* 2000;11(4):281-94.
- 501.Taha SA, Dost SM, Sedrani SH. 25-Hydroxyvitamin D and total calcium: extraordinarily low plasma concentrations in Saudi mothers and their neonates. *Pediatr Res.* 1984;18(8):739-41.
- 502.Tamma R, Sun L, Cuscito C, Lu P, Corcelli M, Li J, et al. Regulation of bone remodeling by vasopressin explains the bone loss in hyponatremia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(46):18644-9.
- 503.Tan CM, Raman A, Sinnathayay TA. Serum ionic calcium levels during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 1972;79(8):694-7.
- 504.Tebben PJ, Kumar R. The Hormonal Regulation of Calcium Metabolism. In: Alpern RJ, Moe OW, Caplan M, editors. *Seldin and Giebisch's The Kidney Fifth Edition* ed. San Diego: Elsevier; 2013: 2249-72.
- 505.Thiede MA, Harm SC, McKee RL, Grasser WA, Duong LT, Leach RM. Expression of the parathyroid hormone-related protein gene in the avian oviduct: potential role as a local modulator of vascular smooth muscle tension and shell gland motility during the egg-laying cycle. *Endocrinology.* 1991;129(4):1958-66.
- 506.Thieden E, Philipsen PA, Wulf HC. Compliance and data reliability in sun exposure studies with diaries and personal, electronic UV dosimeters. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2006;22(2):93-9.
- 507.Tietz NW, Burtis CA, Duncan P, Ervin K, Petittclerc CJ, Rinker AD, et al. A reference method for measurement of alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem.* 1983;29(5):751-61.
- 508.Tobias JH, Steer CD, Emmett PM, Tonkin RJ, Cooper C, Ness AR. Bone mass in childhood is related to maternal diet in pregnancy. *Osteoporos Int.* 2005;16(12):1731-41.
- 509.Turan S, Topcu B, Gokce I, Guran T, Atay Z, Omar A, et al. Serum alkaline phosphatase levels in healthy children and evaluation of alkaline phosphatase z-scores in different types of rickets. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2011;3(1):7-11.
- 510.Uemura H, Yasui T, Kiyokawa M, Kuwahara A, Ikawa H, Matsuzaki T, 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(2):353-9.
- 511.Unal A, Gur E, Arvas A, Erginel A, Alikasifoglu M, Ilter O. Bone density values in healthy Turkish infants. *Indian Pediatr.* 2000;37(5):497-503.

512. Upala S, Sanguankeo A. Association Between Hyponatremia, Osteoporosis and Fracture: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016; 101(4):1880-6
513. Urashima M, Segawa T, Okazaki M, Kurihara M, Wada Y, Ida H. Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(5):1255-60.
514. Valcour A, Blocki F, Hawkins DM, Rao SD. Effects of age and serum 25-OH-vitamin D on serum parathyroid hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(11):3989-95.
515. Valverde M, Ortiz A, Martín A, Ruiz AM, Jerónimo I, Martínez de la Ossa R, et al. Atención en el parto en la mujer inmigrante; características sociodemográficas y de comportamiento en función de la procedencia de la paciente. *Clin Invest Ginecol Obstet.* 2015;42(2):50-5.
516. van Coeverden SC, Netelenbos JC, de Ridder CM, Roos JC, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA. Bone metabolism markers and bone mass in healthy pubertal boys and girls. *Clin Endocrinol.* 2002;57(1):107-16.
517. van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endoc Rev.* 2003;24(6):782-801.
518. van der Meer IM, Karamali NS, Boeke AJ, Lips P, Middelkoop BJ, Verhoeven I, et al. High prevalence of vitamin D deficiency in pregnant non-Western women in The Hague, Netherlands. *Am J Clin Nutr.* 2006;84(2):350-3; quiz 468-9.
519. van Rijn RR, Grootfaam DS, Lequin MH, Boot AM, van Beek RD, Hop WC, et al. Digital radiogrammetry of the hand in a pediatric and adolescent Dutch Caucasian population: normative data and measurements in children with inflammatory bowel disease and juvenile chronic arthritis. *Calcif Tissue Int.* 2004;74(4):342-50.
520. Varela G. Vitaminas liposolubles. In: García Arias MT, García Fernández MC, editors. *Nutrición y Dietética.* León: Universidad de León; 2003: 138-48.
521. Vasikaran S, Cooper C, Eastell R, Griesmacher A, Morris HA, Trenti T, et al. International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine position on bone marker standards in osteoporosis. *Clin Chem Lab Med.* 2011a;49(8):1271-4.
522. Vasikaran S, Eastell R, Bruyere O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int.* 2011b;22(2):391-420.
523. Venkataraman PS, Duke JC. Bone mineral content of healthy, full-term neonates. Effect of race, gender, and maternal cigarette smoking. *Am J Dis Child.* 1991;145(11):1310-2.
524. Verbalis JG, Barsony J, Sugimura Y, Tian Y, Adams DJ, Carter EA, et al. Hyponatremia-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2010;25(3):554-63.

525. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(10):3666-72.
526. Vervloet MG, Larsson TE. Fibroblast growth factor-23 and Klotho in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2011;1(4):130-5
527. Vesely DL, Juan D. Cation-dependent vitamin D activation of human renal cortical guanylate cyclase. *Am J Physiol.* 1984;246(1):E115-20.
528. Vierucci F, Del Pistoia M, Fanos M, Erba P, Saggese G. Prevalence of hypovitaminosis D and predictors of vitamin D status in Italian healthy adolescents. *Ital J Pediatr.* 2014;40:54.
529. Vieth R, Cole DE, Hawker GA, Trang HM, Rubin LA. Wintertime vitamin D insufficiency is common in young Canadian women, and their vitamin D intake does not prevent it. *Eur J Clin Nutr.* 2001;55(12):1091-7.
530. Vieth R, Ladak Y, Walfish PG. Age-related changes in the 25-hydroxyvitamin D versus parathyroid hormone relationship suggest a different reason why older adults require more vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(1):185-91.
531. Vieth R. What is the optimal vitamin D status for health? *Prog Biophys Biophys.* 2006;92(1):26-32.
532. Vieth Streym S, Kristine Moller U, Rejnmark L, Heickendorff L, Mosekilde L, Vestergaard P. Maternal and infant vitamin D status during the first 9 months of infant life-a cohort study. *Eur J Clin Nutr.* 2013;67(10):1022-8.
533. Viljakainen HT, Korhonen T, Hytinantti T, Laitinen EK, Andersson S, Makitie O, et al. Maternal vitamin D status affects bone growth in early childhood: a prospective cohort study. *Osteoporos Int.* 2011;22(3):883-91.
534. Viljakainen HT, Saarnio E, Hytinantti T, Miettinen M, Surcel H, Makitie O, et al. Maternal vitamin D status determines bone variables in the newborn. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(4):1749-57.
535. Vogeser M, Kyriatsoulis A, Huber E, Kobold U. Candidate reference method for the quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D₃ by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2004;50(8):1415-7.
536. Wagner CL, Greer FR. Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children, and adolescents. *Pediatrics.* 2008;122(5):1142-52.
537. Wainwright SA, Marshall LM, Ensrud KE, Cauley JA, Black DM, Hillier TA, et al. Hip fracture in women without osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5):2787-93.
538. Waiters B, Godel JC, Basu TK. Perinatal vitamin D and calcium status of northern Canadian mothers and their newborn infants. *J Am Coll Nutr.* 1999;18(2):122-6.

539. Walsh JM, Kilbane M, McGowan CA, McKenna MJ, McAuliffe FM. Pregnancy in dark winters: implications for fetal bone growth? *Fertil Steril*. 2013;99(1):206-11.
540. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol*. 2004;173(5):2909-12.
541. Wang Y, Sun Z. Current understanding of klotho. *Ageing Res Rev*. 2009;8(1):43-51.
542. Wasserman RH, Chandler JS, Meyer SA, Smith CA, Brindak ME, Fullmer CS, et al. Intestinal calcium transport and calcium extrusion processes at the basolateral membrane. *J Nutr*. 1992;122(3 Suppl):662-71.
543. Watson CG, Steed DL, Robinson AG, Deftos LJ. The role of calcitonin and parathyroid hormone in the pathogenesis of post-thyroidectomy hypocalcemia. *Metabolism*. 1981;30(6):588-9.
544. Weber HP, Gray RW, Dominguez JH, Lemann J, Jr. The lack of effect of chronic metabolic acidosis on 25-OH-vitamin D metabolism and serum parathyroid hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1976;43(5):1047-55.
545. Weiler H, Fitzpatrick-Wong S, Veitch R, Kovacs H, Schellenberg J, McCloy U, et al. Vitamin D deficiency and whole-body and femur bone mass relative to weight in healthy newborns. *Can Med Assoc J*. 2005;172(6):757-61.
546. Weiler HA, Fitzpatrick-Wong SC, Schellenberg JM. Bone mass in First Nations, Asian and white newborn infants. *Growth Dev Aging*. 2008;71(1):35-43.
547. Wetzsteon RJ, Hughes JM, Kaufman BC, Vazquez G, Stoffregen TA, Stovitz SD, et al. Ethnic differences in bone geometry and strength are apparent in childhood. *Bone*. 2009;44(5):970-5.
548. Whistler D. Morbo puerili Anglorum, quem patrio idiomate indigenae vocant The Rickets. *Lugduni Batavorum*. 1645:1-13.
549. Whiting SJ, Calvo MS. Nutrition and Lifestyle Effects on Vitamin D Status. In: Feldman D, Pike JW, Adams JS, editors. *Vitamin D*. Third edition ed. San Diego: Elsevier Inc; 2011:979-1007.
550. Whyte MP. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Ann N Y Acad Sc*. 2010;1192:190-200.
551. Windaus A, Lüttringhaus, WG. Über das krytallisierte vitamin D₂. *Justis Liebigs. Ann Chem*. 1932;492:226-41.
552. Windaus A. The Chemistry of Irradiated Ergosterol. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character*. 1931;108(759):568-75.
553. Windaus A. Über das antirachitisch wirksame bestrahlungsprodukt aus 7-dehydrocholesterin. *Z physiol Chem*. 1936;241:100-3.

554. Wongdee K, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Endochondral bone growth, bone calcium accretion, and bone mineral density: how are they related? *J Physiol Sci.* 2012;62(4):299-307.
555. Woolcott CG, Giguere Y, Weiler HA, Spencer A, Forest JC, Armson BA, et al. Determinants of vitamin D status in pregnant women and neonates. *Can J Public Health.* 2016;107(4-5):e410-e6.
556. Wootton AM. Improving the measurement of 25-hydroxyvitamin D. *Clin Biochem Rev.* 2005;26(1):33-6.
557. Wronski TJ, Halloran BP, Bikle DD, Globus RK, Morey-Holton ER. Chronic administration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: increased bone but impaired mineralization. *Endocrinology.* 1986;119(6):2580-5.
558. Wu H, Gozdzik A, Barta JL, Wagner D, Cole DE, Vieth R, et al. The development and evaluation of a food frequency questionnaire used in assessing vitamin D intake in a sample of healthy young Canadian adults of diverse ancestry. *Nutr Res.* 2009;29(4):255-61.
559. Wysolmerski JJ. Parathyroid Hormone-Related Protein. In: Jameson JL, De Groot LJ, de Kretser D, Giudice LC, Grossman A, Melmed S, et al., editors. *Endocrinology: Adult and Pediatric.* Philadelphia: Elsevier; 2016: 991-1003.
560. Xu H, Zhao Z, Wang H, Ding M, Zhou A, Wang X, et al. Bone mineral density of the spine in 11,898 Chinese infants and young children: a cross-sectional study. *PloS one.* 2013;8(12):e82098.
561. Yamada S, Shimizu M, Yamamoto K. Vitamin D Receptor. In: Hochberg Z, editor. *Vitamin D and Rickets.* Endocrine Development. Switzerland: Karger; 2003:50-68.
562. 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.
563. Yamazaki Y, Okazaki R, Shibata M, Hasegawa Y, Satoh K, Tajima T, et al. Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(11):4957-60
564. Yang Y. Skeletal Morphogenesis and Embryonic Development. In: Rosen CJ, Bouillon R, Compston JE, Rosen V, editors. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* Section I: Molecular, Cellular, and Genetic Determinants of Bone Structure and Formation. 8th Edition ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell; 2013: 3-14.
565. 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.

566. Yeste D, del Rio L, Gussinye M, Carrascosa A. Bone mineral density in nursing infants and young children (0-4 years old) at the level of the lumbar spine. The normal patterns. *An Esp Pediatr.* 1998;49(3):248-52.
567. Ylikomi T, Laaksi I, Lou YR, Martikainen P, Miettinen S, Pennanen P, et al. Antiproliferative action of vitamin D. *Vitam Horm.* 2002;64:357-406.
568. Yoshida T, Yoshida N, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T. Dietary phosphorus deprivation induces 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene expression. *Endocrinology.* 2001;142(5):1720-6.
569. Young BE, McNanley TJ, Cooper EM, McIntyre AW, Witter F, Harris ZL, et al. Maternal vitamin D status and calcium intake interact to affect fetal skeletal growth in utero in pregnant adolescents. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(5):1103-12.
570. Yu CL, Li Y, Freedman DM, Fears TR, Kwok R, Chodick G, et al. Assessment of lifetime cumulative sun exposure using a self-administered questionnaire: reliability of two approaches. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(2):464-71.
571. Yu X, Zhang J, Yan C, Shen X. Relationships between serum 25-hydroxyvitamin D and quantitative ultrasound bone mineral density in 0-6 years old children. *Bone.* 2013;53(1):306-10.
572. Zanello LP, Norman AW. 1 α ,25(OH)₂ vitamin D₃-mediated stimulation of outward anionic currents in osteoblast-like ROS 17/2.8 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;225(2):551-6.
573. Zsimevich A, Fijalkowska A, Chelchowska M, Maciejewski T. Maternal serum vitamin D and parathormone concentrations during gestation and in umbilical cord blood - pilot study. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017:1-9.
574. Zeghoud F, Vervel C, Guillozo H, Walrant-Debray O, Boutignon H, Garabedian M. Subclinical vitamin D deficiency in neonates: definition and response to vitamin D supplements. *Am J Clin Nutr.* 1997;65(3):771-8.
575. Zeitlin J, Mohangoo AD, Delnord M, Cuttini M. The second European Perinatal Health Report: documenting changes over 6 years in the health of mothers and babies in Europe. *J Epidemiol Community Health.* 2013;67(12):983-5.
576. Zerwekh JE. The measurement of vitamin D: analytical aspects. *Ann Clin Biochem.* 2004;41(4):272-81.
577. Zhang B, Hosaka M, Sawada Y, Torii S, Mizutani S, Ogata M, et al. Parathyroid hormone-related protein induces insulin expression through activation of MAP kinase-specific phosphatase-1 that dephosphorylates c-Jun NH₂-terminal kinase in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 2003;52(11):2720-30.

-
- 578.Zhang C, Qiu C, Hu FB, David RM, van Dam RM, Bralley A, et al. Maternal plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and the risk for gestational diabetes mellitus. *PloS one*. 2008;3(11):e3753.
- 579.Zhong Y, Armbrecht HJ, Christakos S. Calcitonin, a regulator of the 25-hydroxyvitamin D₃ 1alpha-hydroxylase gene. *J Biol Chem*. 2009;284(17):11059-69.
- 580.Zhou P, Cai J, Markowitz M. Absence of a relationship between thyroid hormones and vitamin D levels. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2016.
- 581.Zhu K, Whitehouse AJ, Hart PH, Kusel M, Mountain J, Lye S, et al. Maternal vitamin D status during pregnancy and bone mass in offspring at 20 years of age: a prospective cohort study. *J Bone Miner Res*. 2014;29(5):1088-95.
- 582.Zhu W, Robey PG, Boskey AL. The Regulatory Role of Matrix Proteins in Mineralization of Bone. In: Marcus R, editor. *Fundamentals of Osteoporosis* San Diego: Elsevier; 2010: 153-202.
- 583.Ziegler EE, O'Donnell AM, Nelson SE, Fomon SJ. Body composition of the reference fetus. *Growth*. 1976;40(4):329-41.
- 584.Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiol Rev*.2000;22(2):203-17

9 ANEXOS

ANEXO 1. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado “ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES MATERNO-FETALES DE VITAMINA D Y EL GRADO DE MINERALIZACIÓN ÓSEA EN LOS RECIÉN NACIDOS” que está siendo realizado por la Dra. Irene Ruiz del Servicio de Pediatría y que ha sido ya aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de La Ribera

ANTECEDENTES

La deficiencia de Vitamina D es un problema muy frecuente en nuestra zona, como ya hemos comprobado en un estudio previo. Hay trabajos recientes que muestran que puede existir una relación entre los niveles bajos de vitamina D de las embarazadas y alteraciones óseas en el recién nacido.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

Estudiar las consecuencias que tiene el déficit de Vitamina D en la salud de las mujeres embarazadas y sus recién nacidos

¿Por qué existe interés en este tema?

La deficiencia de vitamina D constituye un importante problema de salud. Hay estudios recientes que muestran que puede existir una relación entre los niveles bajos de vitamina D de las embarazadas y el desarrollo adecuado de los huesos en el recién nacido. Por ello, los profesionales del Servicio de Pediatría del Hospital de la Ribera estamos interesados en conocer la consecuencia del déficit de esta vitamina sobre la salud de las madres y de los recién nacidos.

¿Por qué se le ha pedido que participe?

Se le pide su participación en este estudio por encontrarse en el primer trimestre de su embarazo y no padecer ninguna enfermedad relacionada con la mineralización de los huesos

¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?

La participación en el presente trabajo no supone ninguna alteración en el seguimiento habitual de su embarazo ni de su recién nacido y todo el tratamiento que se le pueda poner a partir de los estudios clínico-bioquímicos que se le realicen será siempre bajo criterio médico.

Su participación en el estudio incluye:

a) Una entrevista personal en el momento de aceptar la inclusión en el estudio. La entrevista durará aproximadamente 30 minutos y será realizada por uno de los miembros del equipo investigador; la información suministrada en la entrevista será confidencial.

b) Dos encuestas a rellenar por usted en su domicilio con el fin de conocer el consumo de ciertos alimentos, así como la realización de diversas actividades de la vida cotidiana.

c) Dos determinaciones analíticas aprovechando las extracciones habituales del embarazo, por lo que NO implicarán ninguna punción adicional y únicamente supondrán un pequeño aumento de la cantidad de la sangre extraída (que pasará de 8 a 10ml). Esta sangre se usará para determinar diferentes parámetros relacionados con la Vitamina D.

d) En el recién nacido se realizará una primera analítica con la sangre del cordón umbilical que habitualmente se deshecha (SIN extracción directa al niño). La segunda muestra (2ml) se obtendrá entre el 5º-7º día de vida, aprovechando la extracción de sangre que se realiza a todos los recién nacidos para la detección de enfermedades metabólicas.

e) La realización de una densitometría durante las dos primeras semanas de vida al recién nacido con el fin de conocer los depósitos de calcio en el hueso. La densitometría es un procedimiento NO doloroso, que emplea una dosis muy baja de radiación (<3mrem, que es una medida diez veces inferior a la de una radiografía de tórax).

¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?

Una vez analizados los datos, si usted o su hijo padecen un déficit de Vitamina D, se contactará con ustedes para ofrecerles el tratamiento más adecuado.

Asimismo, los resultados que se obtengan en el estudio podrán servir para avanzar en el conocimiento científico sobre diferentes enfermedades y la manera de prevenirlas.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?

No se prevé ningún riesgo adicional para usted o su hijo.

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en el estudio, esto no modificará el seguimiento que se realice de su embarazo o de su recién nacido. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para su participación.

Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, la Dra. Irene Ruiz en el teléfono 96-245-8626 o mediante correo electrónico (iruib@Hospital-Ribera.com)

CONFIDENCIALIDAD

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su embarazo y parto serán tratados con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Así mismo, si los resultados fueran susceptibles de publicación en revistas

científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los participantes que han colaborado en esta investigación.

Tal y como contempla la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio

ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto: VALORACIÓN DE LOS NIVELES MATERNO-FETALES DE VITAMINA D Y GRADO DE MINERALIZACIÓN ÓSEA DEL RECIÉN NACIDO

Investigador principal: IRENE RUIZ ALCÁNTARA

Servicio: PEDIATRÍA

Yo, _____, con DNI _____ he sido informado por el Dr. _____, colaborador del proyecto de investigación arriba mencionado y declaro que:

- He leído la hoja de información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
- He recibido suficiente información sobre el estudio

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente

Comprendo que puedo retirarme del estudio

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Con esto doy mi conformidad para mi participación y la de mi hijo en este estudio

Firma del paciente

Firma del investigador

FechaFecha

Los investigadores del Hospital Universitario La Ribera le agradecemos su decisión de participar en este estudio

ANEXO 3. REGISTRO DE 3 DÍAS DE CONSUMO DE ALIMENTOS

Anotar cantidad de sal (pizcas) añadidas (al cocinar o en las comidas ya elaboradas)

NOMBRE
NHC

DIA SEMANA

MENÚ	INGREDIENTES	TIPO Y MARCA	FORMA DE PREPARACIÓN	CANTIDAD	HORA Y LUGAR
<u>Desayuno</u>					
	LÁCTEOS				
	GALLETAS				
	CEREALES				
	PAN				
	BOLLERÍA				
	COLACAO				
	AZÚCAR				
	MIEL				
	FRUTA				
	OTROS				
<u>Almuerzo</u>					
	PAN				
	FIAMBRE				
	LÁCTEOS				
	FRUTA				
	ACEITE				
	BOLLERÍA				

MENÚ	INGREDIENTES	TIPO Y MARCA	FORMA DE PREPARACIÓN	CANTIDAD	HORA Y LUGAR
<u>Comida</u>					
PASTA/ARROZ					
LEGUMBRES					
CARNE					
PESCADO					
HUEVO					
VERDURAS					
PAN					
OTROS					
<u>Postres</u>					
LÁCTEOS					
FRUTA					
DULCES					
OTROS					
<u>Bebidas</u>					
AGUA					
REFRESCOS					
ZUMOS INDUSTRIALES					
OTROS					
<u>Merienda</u>					
LÁCTEOS					
PAN					
FIAMBRE					
FRUTA					
ACEITE					
BOLLERÍA					
OTROS					

MENÚ	INGREDIENTES	TIPO Y MARCA	FORMA DE PREPARACIÓN	CANTIDAD	HORA Y LUGAR
<u>Comidas y bebidas entre horas</u>					
<u>Cena</u>					
PASTA/ARROZ					
LEGUMBRES					
CARNE					
PESCADO					
HUEVO					
VERDURAS					
PAN					
OTROS					
<u>Postres</u>					
LÁCTEOS					
FRUTA					
DULCES					
OTROS					
<u>Bebidas</u>					
AGUA					
REFRESCOS					
ZUMOS INDUSTRIALES					
OTROS					
<u>Resopón</u>					

Observaciones

ANEXO 4. CUESTIONARIO FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

NOMBRE
NHC

ENCUESTA NUTRICIONAL DE FRECUENCIA DE CONSUMO

Anote el consumo medio de los siguientes productos en los últimos 3 meses. Si tiene dudas sobre alguno de los alimentos, anote el nombre comercial

TAMAÑO RACIÓN	ALIMENTOS	Consumo a la semana	ó	Consumo al mes
	LACTEOS			
1 vaso (200 cc)	Leche entera o semi o desnatada			
1 vaso (200 cc)	Leche entera o semi o desnatada (enriquecida con vit D y Calcio)			
1 envase (125cc)	Yogur (normal, bio, futas, desnatado), cuajada			
1 envase (125cc)	Yogur o cuajada con calcio			
2 lonchas (50 g)	Queso manchego, bola			
1 trozo (100 g)	Queso Burgos			
1 trozo (100 g)	Requesón, mató			
2 lonchas (50 g)	Queso cremoso (Brie, Camembert)			
2 lonchas (50g)	Queso emmental, edam, parmesano, gruyere			
2 lonchas	Queso para sandwich			
1 porción (20 g)	Quesito tamaño tipo El Caserío			
1 tarrito	Petit Suisse			
1 envase	Flan, natillas, arroz con leche, Petit suisse líquido, helado cremoso, otros postres lácteos			
1 tarrito	Helado			
	CEREALES			
100 g	Pan blanco, integral			
1 ración	Bollería (2 magdalenas medianas, 1 cruasán, 1 ensaimada, 4 galletas María, etc)			
1 taza	Cereales de desayuno			
	HORTALIZAS Y FRUTAS			
200 g	1 naranja mediana o 2 mandarinas medianas			
1 vaso (200 cc)	Zumo de naranja enriquecido Vitamina D			
1 plato	Garbanzos, alubias (potaje, cocido, fabada, etc)			
1 plato	Lentejas (potaje)			
1 plato	Acelgas, cardo (aprox 200-250 g)			
1 plato	Espinacas, grelos, navizas			
1 plato	Lechuga, escarola, endivias			
1 plato	Judía verde			
1 plato	Brocoli			
1 plato	Col, repollo			
	PESCADOS			
1 plato	Sardina fresca, boquerones, arenques (200 g)			
1 lata	Sardinias en conserva			
1 lata o 100 gr	Atún enlatado o plancha			
1 plato	Pescadito (se come con espina, 100 g)			
1 ración	Salmón (150gr)			
1 ración	Caballa (100gr)			
1 plato	Calamares, gambas, langostinos (150 g)			
1 plato	Pulpo (150 g)			
1 plato	Otros pescados (200 g merluza, rape, etc)			
1 plato	Almejas, mejillones, caracoles, percebes			
1 plato	Ostras (100 gr)			
	CARNES			
1 plato	Carne (1 bistec, 1/4 pollo/pavo/pato, 100 g otras carnes)			
1 ración	Higado, también de pollo (100gr)			
	OTROS			
1 ración	5 higos secos, 1 puñado de almendras o avellanas			
1 platillo	Olivas			
1 unidad	Huevo			
1 plato	Espagueti, lasagna o otra pasta con salsa de tomate			
1 ración	Platos combinados con queso (pe pizza)			

ANEXO 5. CUESTIONARIO SOBRE ESTILO DE VIDA

EXPOSICION SOLAR

Anote los siguientes datos

- ¿Cuánto tiempo (minutos) al día está expuesta al sol?

- ¿Qué zonas de su cuerpo quedan expuestas directamente al sol?
 - Cara
 - Manos / antebrazos
 - Piernas

- ¿Utiliza cremas protectoras solares para la exposición diaria (habitual) al sol?

ACTIVIDAD FÍSICA

- ¿Realiza de forma habitual algún tipo de actividad física? Indique cuál

- Durante cuantos minutos realiza dicha actividad
 - 30 minutos o menos
 - 30 – 60 minutos
 - Más de 60 minutos

- ¿Con qué frecuencia realiza dicha actividad?
 - 1 vez/semana
 - 2 veces/semana
 - 3 o más veces a la semana

- ¿Realiza dicha actividad al aire libre?

SUPLEMENTOS VITAMINICOS

¿TOMA ALGUN TIPO DE SUPLEMENTO VITAMÍNICO DE FORMA HABITUAL?

Indique cuál y con qué periodicidad

N.º comprimidos al día

- Natalben
- Natalben supra
- Gestagyn embarazo
- Femibion
- Ginecomplex
- Maleavit
- Otros (indique nombre comercial)