DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

TITULO

OSTEOCALCINA COMO "MARCADOR BIOQUIMICO SERICO" DEL CRECIMIENTO OSEO PERINATAL Y RELACIONES CON OTROS MARCADORES BIOQUIMICOS SERICOS DEL METABOLISMO FOSFOCALCICO

AUTOR

Ldo. Manuel Martín González

Granada, septiembre 1988

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

Curso de 19 88 a 19 89 Folio 33 Número 66

Reunido en el dia de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. MANUEL MARTIN GONZALEZ, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente habia elegido: "Osteocalcina como "marcador bioquímico renal" del crecimiento óseo prenatal y relaciones con dos marcadores bioquímicos renales del metabolismo fosfocálcico"

Terminada la lectura y contestadas la objecciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este le calificó de Apto "Cum laude"

Granada 19 de Octubre de 1988

EL PRESIDENTE,

Fdo.: Juan A Molina Font

El Secretario del Tribunal,

Fdo.: A. Valenzuela Ruiz

EL VOCAL,

Fdo.: J.A. Gomez Capilla

EL VOCAL,

Fdo.: J. GUERO JIMENEZ

EL VOCAL,

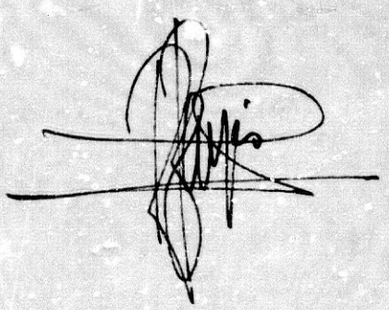
Fdo.:

FIRMA DEL GRADUANDO.

CERTIFICACIONES

DON ROGELIO BAYES GARCIA, PROFESOR TITULAR DE PEDIATRIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y JEFE DE SERVICIO DE NEONATOLOGIA DEL HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE GRANADA,

CERTIFICA: Que D. Manuel Martín González, Licenciado en Medicina y Cirugía y Especialista en Pediatría y Areas Específicas, ha realizado su trabajo de investigación prospectiva para la confección de la Memoria de Tesis Doctoral bajo mi dirección, sobre: " OSTEOCALCINA COMO MARCADOR SERICO BIOQUIMICO DEL CRECIMIENTO OSEO PERINATAL Y SUS RELACIONES CON OTROS MARCADORES DEL METABOLISMO FOSFOCALCICO", la cual ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido leida y revisada la presente y estando conforme con su presentación para que sea juzgada.



Granada, septiembre 1988.

DON EDUARDO NARBONA LOPEZ, PROFESOR TITULAR DE PEDIATRIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y JEFE DE LA SECCION DE NEONATOLOGIA DEL HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE GRANADA,

CERTIFICA: Que D. Manuel Martín González, Licenciado en Medicina y Cirugía y Especialista en Pediatría y Areas Específicas, ha realizado su trabajo de investigación prospectiva para la confección de la Memoria de Tesis Doctoral bajo mi dirección, sobre: " OSTEOCALCINA COMO MARCADOR SERICO BIOQUIMICO DEL CRECIMIENTO OSEO PERINATAL Y SUS RELACIONES CON OTROS MARCADORES DEL METABOLISMO FOSFOCALCICO", la cual ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido leida y revisada la presente y estando conforme con su presentación para que sea juzgada.

Granada, septiembre 1988.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Granada,

D. Eduardo Rodriguez Sanchez, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Universidad de Granada.

CERTIFICA: Que las determinaciones séricas de osteocalcina, hormona paratiroidea, fosfatasas alcalinas, calcio y fósforo, analizado en recién nacidos y base bioquímica para la confección de la Memoria de la Tesis Doctoral, titulada: "Osteocalcina como marcador bioquímico sérico del crecimiento osea perinatal y relaciones con otros marcadores bioquímicos séricos del metabolismo fosfocálcico", del Licenciado Manuel Martín González, ha sido realizada bajo mi dirección y supervisión.

Hago constar asimismo, que su constancia y perseverancia han hecho obtener un aprovechamiento notable del valor técnico de los procedimientos de análisis de laboratorio.

Y para que conste a instancia del interesado, se expide el presente certificado en Granada a diecinueve de Septiembre de mil novecientos ochenta y ocho.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

RESUMEN

TITULO.- OSTEOCALCINA COMO "MARCADOR BIOQUIMICO SERICO" DEL CRECIMIENTO OSEO PERINATAL Y RELACIONES CON OTROS MARCADORES BIOQUIMICOS SERICOS DEL METABOLISMO FOSFOCALCICO.

AUTOR: Manuel MARTIN GONZALEZ
DIRECTORES: Prof.Rogelio BAYES GARCIA y Prof. Eduardo NARBONA LOPEZ

DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA (Dir. Prof. Juan Antonio MOLINA FONT)
FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE GRANADA.

La osteocalcina (BGP) está siendo intensamente investigada en enfermedades óseas (HAUSCHKA, 1975; PRICE, 1975, 1976). Diversos autores le han atribuido un papel funcional en la regulación del "remodelamiento óseo" y se esta investigando su utilidad como marcador sérico del complejo fenómeno del crecimiento del esqueleto (GUNDBERG, 1983; COUCH 1984; SHIMA, 1985; COLE, 1985, SAGESSE, 1986; RICO, 1987; CATALA, 1987; AVRAMIDES, 1988; MIMOUNI, 1988; BAYES, 1988); pero las interrelaciones de este polipéptido gammacarboxilado con otros factores que regulan e intervienen en la osteofomación, mineralización y resorción ósea en la infancia están aún por clarificar (MARTIN, 1987; MIMOUNI, 1988; BAYES, 1988), y practicamente su investigación en el periodo perinatal ha dado sólo comienzo. Por ello los Departamentos de Pediatría y Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, y formando parte de un "Proyecto de Investigación" becado por "*La Junta de Andalucía*" (Ref. 07/CLM/MDM, 1986), planearon un modelo experimental cuyos objetivos se relacionan seguidamente:

OBJETIVO.- Estudiar los marcadores séricos de osteoformación (osteocalcina: BGP, hormona paratiroidea: PTH, fosfatasas alcalinas: FA) y de estado metabólico calciofósforo (Ca y P), analizando las interrelaciones de la BGP con la madurez fetal (edad gestacional: EG) y el crecimiento longitudinal en el periodo neonatal (PN).

MATERIAL y METODOS.- a) Casuística y metodología clínica: Comprende el estudio de 176 recién nacidos (RN): en 120 RN (con 1116 determinaciones analíticas) subdivididos en dos grupos, según hubieran nacido pretérmino (n: 25, EG<37 semanas) ó a término (n: 95, EG≥37 semanas) en los que se analizan los marcadores séricos, antes mencionados en objetivos, en arteria y vena umbilical AU y VU, respectivamente), base de referencia para el cotejo de los grupos que a continuación se detallan. En otros 56 RN (con 528 determinaciones analíticas) estudiados a lo largo del periodo neonatal, subdivididos a su vez , en función de la EG, en dos grupos: EG<37 semanas (n: 31) y ≥37 semanas (n: 25), en los que se determinan los niveles séricos de estos marcadores objeto de estudio, en el PN inmediato-precoz y PN tardío, comparando estos parámetros en sentido longitudinal (muestras apareadas) y con los valores medios de referencia de cordón umbilical (ANOVA, test de Bonferroni / Welch), para cada

grupo de edad gestacional. Se analizan asimismo, los incrementos de estos marcadores de remodelamiento óseo con los incrementos de longitud en el periodo perinatal, estableciendo las correlaciones existentes. b) Método de laboratorio o bioquímico: Las determinaciones séricas de BGP y PTH-MM se realizaron por radioinmunoanálisis, segun los principios de BERSON y YALOW de 1968, con las observaciones hechas por FELBER en 1978, y las técnicas de GUNDBERG de 1985 para la BGP y AARON, descrita en 1981, para la PTH-MM; el análisis de BGP y de PTH-MM se realizaron con "Kits" suministrados por "INCSTAR Corporation (Cat. 15065 y 51065-51130, respectivamente), Stillwater, Minnesota 55082, USA" y cuantificado en un contador "Multigamma LKP-1260"; las FA fueron determinadas según la técnica espectrofotométrica que BOWER Y McCOMB describieran en 1966 en un "Enzyme Activity Analizer"; el Ca total se determinó por fluorimetría. según la técnica desarrollada en 1956 por DIEHL y BILINGBOL, y cuantificado en un "Calcium Analizer 1940, Corning"; y, el P inorgánico se determinó mediante la técnica colorimétrica descrita por ZILVERMIT en 1950, y cuantificado en un " SPECTRONIC 70, Zauch-Long" con lector automático "KLB Ultralasystem. c) Método bioestadístico: Para la tabulación de los resultados se han utilizado un programa estadístico "Abstat", un ordenador "AMSTRAD PC1512DD" y una calculadora programada "Hewlett-Packar" para los cálculos numéricos y ajuste de funciones curvilíneas. Los test aplicados han sido: test de rechazo de muestras extremas, análisis de la varianza (ANOVA), tests "t" de STUDENT", BONFERRONI y WELCH; test "t" de STUDENT para muestras apareadas; análisis de correlación "r" de PEARSON y de regresión; test de transformación "z" de "r" de FISHER para la comparación de índices de correlación; y, correlación lineal múltiple (SOKAL, 1979; CARRASCO, 1983; MARTIN, 1986). Todos los valores se expresan como media ± SEM. Unidades: BGP en ng/ml; PTH en pmol/L; FA en UI/L; Ca y P en mg/dl. Aceptación del grado de significación estadística * $p<0.05$.

RESULTADOS.- a) En cordón umbilical (CU) (arteria y vena: AU y VU, respectivamente): En VU la BGP estuvo más elevada que en AU (3.08 ± 0,23 versus 2.46 ± 0.18, *), aunque todos los valores bioquímicos analizados en AU y VU se correlacionaron, el índice de correlación de la BGP resultó el más significativo (n: 120, r: 0.80, t: 14,31, *). La BGP sigue una correlación negativa con la EG (n: 120, r: -0.23, *), el Ca sigue una correlación positiva con EG (n: 120, r: 0.46, t: 5.65, *), en tanto que el P lo hace negativamente (n: 120, r: -0.35, *). La BGP sigue una tendencia negativa con la PTH (n: 102, r: -0.20, t: 2.05, *). Las variaciones del índice Ca/P se correlacionaron más significativamente con las del P que con las del Ca (n: 120, r: -0.90, *; r: 0.47, *: respectiva-

mente). Los RN <37 semanas de EG tienen concentraciones de BGP, PTH y P más elevadas que los RN≥37 semanas (3.21 ± 0.56 vs 2.26 ± 0.18, p:NS; 77.92 ± 10.0 vs 64.12 ± 4.35, *; 8.06 ± 0.34 vs 6.73 ± 0.16, *: respectivamente) y muestran un Ca y un índice Ca/P significativamente más bajos (9.12 ± 0.20 vs 10.06 ± 0.08, *; 1.18 ± 0.06 vs 1.57 ± 0.03, *; respectivamente). b) Periodo neonatal (PN): Los RN≥37 semanas la BGP aumenta el PN precoz (PNP) vs AU y en PN tardía (PNT) vs AU y PNP (AU: 2.26 ± 0.18, PNP: 3.69 ± 0.93, PNT: 8.91 ± 1.14, *); la PTH no muestra diferencias en los las determinaciones de AU, PNP y PNT; las FA descienden en el PNP y aumentan posteriormente en el PNT; la calcemia desciende a lo largo del PN y la fosforemia aumenta, con lo que el índice Ca/P de 1.57 ± 0.03 de AU desciende a 1.27 ± 0.05 en el PNP (*) y desciende aún más en el PNT (*). En los RN<37 semanas, la BGP también aumenta de forma parecida a los RN≥37 semanas; asimismo, lo hace la PTH y sobre todo las FA. Mientras el Ca tiende a incrementarse los niveles de P desciende progresivamente durante el PN, con lo que índice Ca/P de AU, 1.18 ± 0.06, pasa a 1.26 ± 0.03 en el PNP, y de 1.37 ± 0.07 en el PNT. Los RN<37 semanas a los 21.38 ± 1.94 dias de vida extrauterina, y a una edad postconcepcional homogénea con los RN≥37 semanas, y tomados los patrones somatométricos y valores bioquímicos séricos de AU como referencias de crecimiento y equilibrio idóneo bajo las influencias materno-placentarias, los primeros muestran vs los segundos, las siguientes características diferenciales: menor talla, perímetro cefálico y peso; un aumento significativo de BGP y FA, y un índice Ca/P menor a expensas de una hipocalcemia (*) y de una hiperfosforemia (no estadisticamente significativa). Para una edad postnatal homogénea de 15.85 ± 1.20 dias, los RN<37 semanas muestran mayor incremento de longitud (1.40 ± 0.23 cm vs 0.48 ± 0.07, *), un mayor incremento de actividad de FA (60.82 ± 14.18 vs 21.26 ± 9.94, *) y menores incrementos de P (0.04 ± 0.3 vs 0.93 ± 0.29, *). El incremento de talla en el PN es predecible, según la ley establecida por la correlación lineal múltiple de los incrementos de talla (W) con los incrementos de BGP (X), FA (Y), Ca (Z) (r: 0.63, $F_{exp.\ 3,18}$: 4.03, *; regresión: W= 0.02·X + 0.003·Y + 0.09·Z + 0.26).

DISCUSION Y CONCLUSIONES.- La BGP de VU esta más elevada que la de AU. La cuestión es ¿existe un transporte transplacentario o síntesis placentaria de BGP, o ambas?. Con el modelo experimental planeado para el presente estudio, no ha podido ser dilucidado. Hay desacuerdo sobre estas cuestiones (COLE 1985; SHIMA 1985; CATALA, 1987; RICO, 1987; NARBONA, 1988). Pero al nacer tiene plena capacidad para mantener y aún aumentar en las horas siguientes al parto, las concentraciones séricas de BGP cuya vida media es muy corta (PRICE, 1985). La tendencia negativa entre la BGP y PTH

(MIMOUNI, 1988) y de la primera conforme avanza la gestación asi como la correlación positiva entre el Ca la madurez fetal, caracterizan una situación serobiológica en la que predomina la mineralización sobre la formación y resorción al irse completando la gestación. Al nacer los importantes cambios en las concentraciones de Ca y P, debidos a la supresión brusca de los aportes maternos, y de los marcadores serobiológicos de osteoformación (BGP y FA), apenas influyen en los niveles séricos de PTH como si el RN en el PN no respondiera a los sistemas de regulación habituales fuera del periodo neonatal (PITKIN, 1980; WHISE, 1980; ROYER, 1981; COOPER, 1985; SENTERRE, 1987; KRUSE, 1987; VILLANUEVA, 1987; BECEIRO, 1987; MARTINEZ, 1988; JANA, 1988; MIMOUNI, 1988). En los RN pretérmino, la situación serobiológica del CU refleja remodelamiento óseo en la que predomina la resorcion sobre la mineralización (RASMUSEN-BORDIER, 1973). Los prematuros para una edad postnatal homogénea con los maduros, muestran una elevación de los niveles séricos de los marcadores de osteoformación y un mayor ritmo de crecimiento, pero el incremento de fosforemia es insuficiente para subvenir el elevado ritmo de mineralización que se requiere (DELMAS, 1986; MOYA, 1987; KRUSE, 1987; CAMPOY, 1988; QUERO, 1988). El riesgo potencial de que un prematuro sufra un "*raquitismo hipofosforémico*" es directamente proporcional a su inmadurez y una estimación de dicho riesgo se puede hacer analizando los niveles séricos de BGP y FA, que se hallarian elevados, si el índice Ca/P tiende a incrementarse en el PN (OLANTUMBOSUM, 1975; GRAY 1976; SCHEDEWIE, 1980; ROYER, 1981; DAVID, 1987; ROWE, 1987; BAYES, 1988; PELEGANO, 1988; ZECCA, 1988).

INDICE GENERAL

CAPITULO I

pag.

INTRODUCCION

1.-HUESO: RECUERDO ANATOMOFISIOLOGICO.....1

1.1. Introducción.....1

1.2. Células óseas.....1

1.2.1. Origen.....1

1.2.2. Osteoblastos.....3

1.2.3. Osteocitos.....4

1.2.4. Osteoclastos.....5

1.3. Matriz ósea.....6

1.4. Mineralización ósea.....7

1.5. Sistema esquelético en el periodo perinatal...9.

2. METABOLISMO FOSFOCALCICO.....10

2.1. Fisiología del calcio.....10

2.1.1. Generalidades.....10

2.1.2. Actividad metabólica.....13

2.1.3. Vias metabólicas.....14

2.2. Factores que influyen en la regulación del calcio.....17

2.2.1. Fósforo.....17

2.2.2. Hormona paratiroidea.....19

2.2.3. Equilibrio ácido-base.....19

2.2.4. Otros: Magnesio, Calcitonina, Vitamina D..20

2.3. Características del metabolismo fosfocálcico en el periodo perinatal.....23

3. PARATHORMONA.....31

3.1. Estructura química y biosíntesis.....31

3.2. Secreción y regulación.....33

3.3. Metabolismo.....34

3.3.1. PTH circulante.....35
3.3.2. Degradación.....36
3.3.3. Eliminación.....37
3.4. Efectos fisiológicos de la PTH.....37
3.4.1. Hueso.....38
3.4.2. Riñón.....39
3.4.3. Tracto gastrointestinal.....40
3.5. Mecanismo de acción.....40
3.6. Características de la parathormona en el periodo perinatal.....43

4. OSTEOCALCINA 46
4.1. Estructura.....46
4.2. Síntesis.....47
4.3. Metabolismo.....48
4.4. Función biológica.....50
4.4.1. Osteocalcina sérica como marcador del metabolismo óseo.....55
4.5. Niveles normales y en diferentes patologías...57
4.5.1. Tecnicas de cuantificación.....58
4.5.2. Niveles normales.....58
4.5.3. Niveles en diferentes patologías.....62
4.6. Osteocalcina en el periodo perinatal.....75
6. Fosfatasas alcalinas en el periodo perinatal.....77

CAPITULO II

Objetivo.....79

CAPITULO III

Material y métodos.....82
a) Casuística y metodología clínica.....82
b) Métodos bioquímicos.....83

1. Principio de la técnica.....83

2. Recogida de muestras.....87

3. Material de laboratorio para las determinaciones bioquímicas.....88

4. Método de laboratorio (procedimientos).....90

5. Valoración de la técnica.....92

c) Método bioestadistico.....94

CAPITULO IV.

RESULTADOS.....97

A) Resultado del análisis en muestras de cordón umbilical.....97

1) Valores bioquímicos séricos globales de los marcadores del estado del "turnover" óseo (osteocalcina, parathormona y fosfatasa alcalinas) y metabólico fosfocálcico (calcio y fósforo).....97

2) Comparación de los valores bioquímicos séricos, marcadores del estado del "turnover" óseo (osteocalcina, parathormona y fosfatasas alcalinas) y metabólico fosfocalcálcico (calcio y fósforo) de arteria y vena umbilical, respectivamente). (Tabla IX), (Figuras 12 y 13).....97

3) Análisis de correlación y regresión de los valores bioquímicos séricos, marcadores del estado del "turnover" óseo (osteocalcina, parathormona y fosfatasas alcalinas) y del estado metabólico fosfocálcico (calcio y fósforo), entre arteria y vena umbilical. (Tablas X y XI). (Figuras 14-20).....98

4) Análisis de intercorrelación y regresión entre parámetros de madurez fetal (edad gestacional), el grado de acidosis intraparto (pH de arteria umbilical), marcadores séricos de arteria umbilical (AU), del estado del "turnover" óseo (osteocalcina, parathormona y fosfatasas alcalinas) y del estado metabólico fosfocálcico (Calcio y fósforo). (Tablas XII y XIII). (Figuras 21-31).....98

5) Comparación de los valores séricos de los marcadores del estado del "turnover" óseo (osteocalcina, parathormona y fosfatasas alcalinas) y del estado metabólico fosfocálcico (Calcio y fósforo), entre

recién nacidos pretérminos (EG<37 semanas) y a término (EG≥37 semana. (Base de referencia del estudio y análisis en el periodo neonatal). (Tabla XIV) (Figuras 32 y 33).....99

B) Resultados del análisis en el periodo neonatal. 100

1) Análisis comparativo entre los valores bioquímicos séricos del estado del "turnover" óseo (osteocalcina, parathormona y fosfatasas alcalinas) y del estado metabólico fosfocálcico (Calcio y Fósforo) entre lo periodos neonatal precoz (I) y tardio (II), frente a la arteria umbilical (AU) e interperiodos neonatales en recién nacidos pretérminos (edad gestacional <37 semanas). (Tabla XV) (Figuras 34-40).....100

2) Análisis comparativo entre los valores bioquímicos del "turnover" óseo (osteocalcina, parathormona y fosfatasas alcalinas) y metabólico fosfocálcico (Calcio y Fósforo), en los periodos neonatal precoz (I) y tardio (II), frente a la arteria umbilical (AU) e interperiodos neonatales en recién nacidos a término (edad gestacional ≥ 37 meses). (Tabla XVI). (Figuras 41-47).....101

3) Análisis comparativo entre los valores bioquímicos del estado del "turnover" óseo (osteocalcina, parathormona y fosfatasa alcalinas) y metabólico (Calcio y Fósforo) en el periodo neonatal precoz (I) y tardío (II), entre recién nacidos pretérmino (edad gestacional <37 semanas) y a término (edad gestacional ≥37 semanas). a) periodo neonatal precoz (Tabla XVII). b) periodo neonatal tardío (tabla XVIII).....103

4) Estudio comparativo (Tablas XXV-XXIX) (Figuras 48-53) de las correlaciones de los marcadores séricos del "turnover" óseo (osteocalcina, parathormona y fosfatasa alcalinas) y metabólico fosfocálcico (Calcio y Fósforo) con la madurez fetal e intercorrelacione entre si, en arteria umbilical (AU) y los periodos neonatal precoz (I) y tardío (II), de recién nacidos pretérmino (edad gestacional (37 semanas) (Tablas XIX-XXI) y a término (edad gestacional ≥37 semanas) (Tablas XXII-XIV)...104

5) Valoración somatométrica y comparación de los marcadores serobiológicos del estado del "turnover" óseo (osteocalcina, parathormona y fosfatasa alcalinas) y metabólico fosfocálcico (Calcio y Fósforo), en neonatos pretérmino en el periodo neonatal tardío (grupo de estudio) versus los determinados en arteria umbilical (grupo control) para una

edad postconcepcional homogénea para ambos grupos (Tabla XXX) (Figuras 54-57).....106

6) Estudio comparativo de las correlaciones de los marcadores serobiológicos del estado del "turnover" óseo (osteocalcina y parathormona) y del estado metabólico fosfocálcico (Calcio y Fósforo) en arteria umbilical de recién nacidos a término (grupo control) y neonatos pretérmino en el periodo neonatal tardío (grupo de estudio) a una edad postconcepcional homogénea con el grupo control (Tablas XXXI-XXXIII). (Figuras 58-60).....107

7) Comparación de los incrementos de longitud y de los incrementos de los niveles séricos de los marcadores del "turnover" óseo (osteocalcina, parathormona y fosfatasa alcalinas) y del estado metabólico fosfocálcico (Calcio y Fósforo) entre recién nacidos a término (edad gestacional ≥37 semanas) y nacidos pretérmino (edad gestacional <37 semanas), para una edad postnatal homogénea (Tabla XXXIV).....108

8) Estudio comparativo (Tablas XXXIX) de las correlaciones de los incrementos de longitud con los marcadores serobiológicos del estado del "turnover" óseo y del metabolismo fosfocálcico (Calcio y Fósforo), en el periodo neonatal de recién nacidos pretérmino (Tablas XXXV y XXXVI) y término (Tablas XXXVII y XXXVIII). (Figuras 61-63).....109

CAPITULO V

DISCUSION.....111

A) CORDON UMBILICAL.....112

1) Osteocalcina.....112
2) Parathormona.....124
3) Fosfatasas alcalinas.....127
4) Calcio y Fósforo.....129

B) PERIODO NEONATAL.....138

1) Osteocalcina.....138
2) Parathormona.....140
3) Fosfatasas alcalinas.....147
4) Calcio y Fósforo.....148

C) RELACIONES ENTRE EL INCREMENTO DE LONGITUD DE LOS RECIEN NACIDOS EN EL PERIODO NEONATAL CON LOS INCREMENTOS SERICOS DEL "TURNOVER" OSEO Y METABOLICO FOSFOCALCICO.....153

CAPITULO VI

CONCLUSIONES.....161

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA.....163

LINEA DE INVESTIGACION

LINEA DE INVESTIGACION

PROYECTO DE INVESTIGACION

"ESTUDIO DEL METABOLISMO FOSFOCALCICO EN EL PERIODO PERINATAL".

Proyecto de investigación y desarrollo tecnológico en la Comunidad Autónoma Andaluza (orden del 15 de octubre de 1984, BOJA nº 95, 19 de octubre 1984, pag. 1993). Periodo de realización 3 años, 1985-87. Aprobado por la Conse jeria de Educación y Ciencia de la Dirección General de Universidades e Investigación de la Junta de Andalucia, con fecha 16 de enero de 1986, referencia 07/CLM/MDM.

TESINAS DE LICENCIATURA

Estudio del metabolismo fosfocálcico en recién nacidos normales y afectos de sufrimiento fetal agudo.

Lda. R. Moliz.

Calificación: sobresaliente.

Facultad de Medicina. Universidad de Granada. 1984

Actualización de los conocimientos sobre vitamina D y sus formas activas en la infancia.

Lda. A. Ortega.

Calificación: sobresaliente.

Facultad de Medicina. Universidad de Granada. 1985.

Metabolismo fosfocálcico en recién nacidos normales, de bajo peso y macrosomas.

Ldo. J. Velasco.

Calificación: sobresaliente.

Facultad de Medicina. Universidad de Granada. 1986.

PUBLICACIONES EN MONOGRAFIAS INTERNACIONALES

Growth catch-up and osteocalcin blood levels in preterm infants. In: Cosuni EV and Di Renzo GC (eds): XI Congress of Perinatal Medicine (Comunication and Poster). Roma. Ed C/C. CIC. Edizione Internationali. 1988 (vol. 53). pp 67-71.

Osteocalcin blood levels as indicator of bone turnover in perinatal growth. In: Cosuni EV and Di Renzo GC (eds): XI Congress of Perinatal Medicine (Comunication and Poster). Roma. Ed. C/C. CIC. Edizione Internationali. 1988 (en prensa).

COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES (PUBLICADAS)

Hipocalcitonemia en recien nacidos macrosomas (no hijos de madre diabéticas). En: Molina Font JA; Galdó Muñoz G; Bayés Garcia R. y Narbona Lopez E. (Eds).: II Jornadas de neonatologia. Granada. Ed. Centro de Documentación Uriach, 1986: 248-251.

Contribución al estudio del metabolismo fosfocálcico en el periodo perinatal. An. Esp. Pediatr. 1983; sup.nov:6.

Metabolismo fosfocálcico y sus sistemas de regulación en recién nacidos pretérmino, a término y postérmino. XVIII Reunión Anual de la Asociación Española de Pediatria. Puerto de la Cruz (Tenerife). Octubre. 1984.

Elevación de los niveles plasmáticos de PTH en el periodo neonatal en relación al momento del parto y el periodo

nenatal tardío. Resumen de Comunicaciones. VII Reunión Nacional de Medicina Perinatal. Badajoz. Ed. Asociación Española de Pediatria. 1985: 105.

Hipercalcitonemia en la hipoxia intraparto. Resumen de Comunicaciones. XVI Congreso Español de Pediatria. Madrid. Ed. Asociación Española de Pediatria. 1985: 127.

Alteraciones de los niveles de calcitonina en relación con el "stres" del parto. Resumen de comunicaciones. VII Reunión Conjunta de las Sociedades de Pediatria de Andalucia y Extremadura. Granada. Ed. Sociedad de Pediatria de Andalucia Oriental. 1985: 9.

Hipercalcitonemia en recién nacidos con hipoxia intraparto. VIII Reunión Anual de la Sección de Endocrinologia de la Asociación Española de Pediatria. Murcia. (17-18 de Octubre de 1986). Ed. AEP. 1986: 17.

Diferencias en los factores reguladores del metabolismo fosfocálcico entre recién nacidos de bajo peso y macrosomas. An. Esp. Pediatr. 1986; 24 (sup-26): 34.

Osteocalcina: Marcador de la actividad osteoblática en el periodo neonatal. (Estudio preliminar). Libro de ponencias, simposium y comunicaciones. IX Reunión Nacional de Medicina Perinatal. Alicante, 5-7 de noviembre de 1987). Ed. Asociaciones Españolas de Pediatria y Ginecologia 1987: 197.

¿Regula el fósforo la actividad de la osteocalcina en el recién nacido pretérmino?. Libro de Ponencias, Simposium y Comunicaciones. IX Reunión Nacional de Medicina

Perinatal. (Alicante, 5-7 de noviembre de 1987). Ed. Asociaciones Española de Pediatria y Ginecologia.1987: 196.

Osteocalcina y marcadores séricos del metabolismo fosfocálcico en el crecimiento neonatal. XVII Congreso Español de Pediatria. Zaragoza. Septiembre, 1988. (Comunicación aceptada).

¿Atraviesa o no la osteocalcina la placenta?. XVII Congreso Español de Pediatria. Zaragoza. Septiembre, 1988. (Comunicación aceptada).

COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALS (PUBLICADAS).

Calcium metabolism in perinatal asphyxia. IX European Congress of Perinatal Medicine. Abstracts. Ed. Royal Dublin Society. Dublin. Ireland, 1984: 125.

Hypercalcitonemia in infants with birth asphyxia. Abstracts.10th European Congress of Perinatal Medicine. Leipzig (GDR), August 1986: 277.

Osteocalcin blood levels as indicator of bone turnover in perinatal growth. Abstract Book. XI European Congress of Perinatal Medicine. Roma. Ed. CIC Edizioni Internationali, 1988: 112.

Growth catch-up and osteocalcin blood levels in preterm infants. Abstract Book. XI European Congress of Perinatal Medicine. Roma. Ed. CIC Edizioni Internationali, 1988: 61.

Growth and osteocalcin blood levels in preterm infants. Abstract Book. European Society for Pediatric Research,

LINEA DE INVESTIGACION

1988: 67.

TESIS DOCTORAL

AGRADECIMIENTOS

A MARIA DEL MAR,

A MARTIRIO,

A MIS PADRES.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo que a continuación se presenta y que tengo el honor de someter al autorizado y elevado criterio del TRIBUNAL DESIGNADO para su valoración, es el resultado de tres años de trabajo, constituyendo una enorme satisfacción personal, por cuanto supone la coronación de una serie de esfuerzos iniciados al ingreso en la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Es justo reconocer que este trabajo no es en absoluto una labor individual, ni en su realización ni en su motivación que en sus inicios la cimentó. Esta última es el resultado de la identificación con todos mis maestros y aquella, del todo un extraordinario equipo multidisciplinario, cuyo eje común es la UNIVERSIDAD de GRANADA. A las instituciones científicas, a sus maestros, a sus profesores y a sus enseñanzas, los recordaré con respeto, admiración y cariño y quiero expresar mi más sincero agradecimiento por su desprendida labor.

Para la realización de una serie de trabajos de investigación que han dado lugar a la presentación de esta TESIS DOCTORAL han sido fundamentales las facilidades que el Departamento de Pediatria de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada puso a mi disposición. Desde el comienzo de mi periodo de formación de médico interno residente, fuí acogido con verdadera confianza y atención por parte de mis tutores y directores, que mejores conocedores que uno mismo de los problemas que la Pediatria tiene planteados y como continuidad de una linea de investigación iniciada hace varios años en dicho

Departamento, me dispensaron toda clase de facilidades para formar parte de un equipo de tabajo dedicado al " Estudio del metabolismo fosfocálcico en el periodo perinatal". Por ello quiero expresar mi más sincera gratitud al Profesor D. Juan Antonio Molina Font, catedrático de Pediatria del Hospital Universitario de Granada, sus enseñanzas de la pediatria y la gran preocupación y entusiasmo por el "niño", el alto nivel de su capacidad docente que junto a su gran dimensión humana, hacen que me sienta satisfecho de haberme formado bajo su dirección.

Al Profesor D. Rogelio Bayés Garcia, Profesor Titular de Pediatria de la Universidad de Granada y Jefe de Servicio de Pediatria del Hospital Universitario de Granada, mi más sincero agradecimiento. Su paciencia y dedicación, que unido a una alta preparación científica e investigadora y su dimensión humana, han hecho posible la culminación de este trabajo.

Al Profesor D. Eduardo Narbona Lopez, Profesor Titular de Pediatria de la Universidad de Granada y Jefe de Sección de Pediatria del Hospital Universitario de Granada, mi más sincero y profundo agradecimiento. Desde el primer momento me ofreció su amistad y depositó en mí su confianza. Supo estar en los momentos difíciles y de desánimo, contribuyendo con sus consejos a impregnarme su afan de superación y de trabajc

Al Profesor D. Eduardo Rodriguez Sanchez, Profesor Titular de la Universidad de Granada y Jefe de Servicio del Departamento de Bioquímica y Biologia Molecular del Hospital Universitario de Granada, mi agradecimiento. Desde

el primer momento se interesó por el tema, contribuyendo con su dirección y supervisión a minimizar los problemas técnicos.

A María José Ayala, auxiliar de laboratorio, gracias por su colaboración, su esmero en la determinación de las muestras y su paciencia con nosotros. Asimismo, no puedo dejar de olvidar al personal de enfermería y auxiliar de clínica del Servicio de Recién nacidos, por su profesionalidad, sin cuya colaboración no hubiera podido realizarse este trabajo.

Al resto de los médicos de plantilla del Departamento de Pediatría del Hospital Universitario de Granada, residentes y compañeros del programa de doctorado, por su amistad y porque de todos he aprendido.

A todos los "niños" que constituyen el bien más apreciado de la humanidad, fuente y guía de nuestros conocimientos y motivo de nuestra inquietud por la consecución del mejor estado de salud posible, quiero expresarles mi gratitud, y aunque aquí quede en algo tan frío como parámetros numéricos, no es así en nuestro espíritu en el que perduraran de manera muy especial al haber sido los protagonistas de este trabajo.

A todos muchas gracias.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

aa: aminoácido.

A: amstrongs.

Ac: anticuerpo.

Ag: antígeno.

Ag^*: antígeno radiomarcado.

AMPc: adenosín monofosfato cíclico.

ANOVA: análisis de la varianza.

ATP: adenosin trifosfato.

Arg: arginina.

AU: arteria umbilical.

Ba: bario.

BGP: osteocalcina ("Bone Gla Protein").

BGPs: osteocalcina sérica.

ºC: grados centígrados.

Ca: calcio.

Ca^{2+}: calcio iónico.

$Ca_{10}(PO_4)_6$: fosfato cálcico.

cpm: cuentas por minuto.

CU: cordón umbilical.

cv(cv%): coeficiente de variación.

D_2, D_3: metabolitos de la vitamina D.

dl: decilitro.

DMID: diabetes insulino dependiente.

Do: densidad óptica.

DS: desviación estandar.

EG: edad gestacional.

et al.: colaboradores.

FA: fosfatasas alcalinas.

Fig.: figura.

$F_{2\alpha}$: tipo de prostaglandina.

g: gramos.

GFR: filtrado glomerular renal.

GH: hormona de crecimiento.

Gla: ácido gammacarboxiglutámico.

Glu: ácido glutámico.

h: hora.

HPP: hiperparatiroidismo primario.

H^+: hidrógeno.

HPO_4^-, $HPO_4^=$: iones fosfato.

HT: hipercalcemia tumoral.

I^{125}: yodo radioactivo.

I-BGP: osteocalcina marcada con yodo radioactivo.

K: kilogramos.

KOH: hidróxido de potasio.

L: litro.

La: lantano.

Ly: lisina.

m^2: metro cuadrado.

Mg: magnesio.

mg: miligramos.

min: minuto.

mq: miliequivalente.

µeq: microequivalente.

mM: milimoles.

mol: moles.

N: normal.

n: tamaño de la muestra.

ng: nanogramos.

NH_2: grupo amino.

nm: nanometros.

OH_2 : grupo dihidroxi.

P: fósforo.

p(:)(><); nivel de significancia.

p: peso.

Pc: perímetro cefálico.

p ej.: por ejemplo.

pH_{AU} : pH de arteria umbilical.

pmol: pico moles.

Pro: prolina.

PSP: proteina secretortia acídica.

PTH: hormona paratiroidea.

PTH-MM: parathormona media molécula.

%: porcentaje.

r: coeficiente de correlación de Pearson.

RIA: radioinmunoanálisis.

RN: recién nacido.

rpm: revoluciones por minuto.

T: talla.

t: "t" de Student.

$t_{1/2}$: vida media.

tb: terbio.

u: unidades.

UI: unidades internacionales.

Sr: estroncio.

SEM: error estandar de la media.

vs: versus.

Vs: volumen de la muestra.

Vt: volumen total.

VU: vena umbilical.

$\bar{x}$: media.

CAPITULO I

INTRODUCCION I

1.HUESO: RECUERDO ANATOMOFISIOLOGICO

1.1.-Introducción

El hueso desempeña un doble papel en fisiologia humana. En primer lugar, constituye la base física para la locomoción y proporciona protección a los órganos internos. En segundo lugar, la fase mineral del hueso, actua como reservorio de minerales esenciales y tampón . En el proceso continuo de catabolismo y remodelación, habitualmente el hueso es capaz de realizar ambas funciones; sin embargo, el papel esencial de mantener entre niveles normales las concentraciones de iones en el espacio extracelular, tiene preferencia sobre el papel mecánico de sostén, muchas veces con detrimento de éste último (HAHN,1987).

Los mecanismos de formación del hueso, es un tema ampliamente investigado (BOSKEY,1981; RAISZ, 1983). En estos últimos años distintas aportaciones han permitido, si no comprenderlo totalmente, al menos ayudarnos a entenderlo. La formación ósea conlleva, en primer lugar, la génesis de una matriz ósea, que posteriormente al mineralizarse dara lugar al hueso. En ambas hay una perfecta regulación entre las células formadoras de la matriz ósea y facilitadoras de la mineralización y factores humorales o de modulación, así como influencias hormonales. Todo ello en una secuencia perfectamente escalonada, que, hoy sino perfectamente conocida, es al menos lógica y comprensible.

EL hueso está formado por tres elementos: 1-CELULAS OSEAS; 2-MATRIZ PROTEICA;3-FASE MINERAL.

1.2.-.CELULAS OSEAS.

1.2.1.-.Origen de las células óseas.

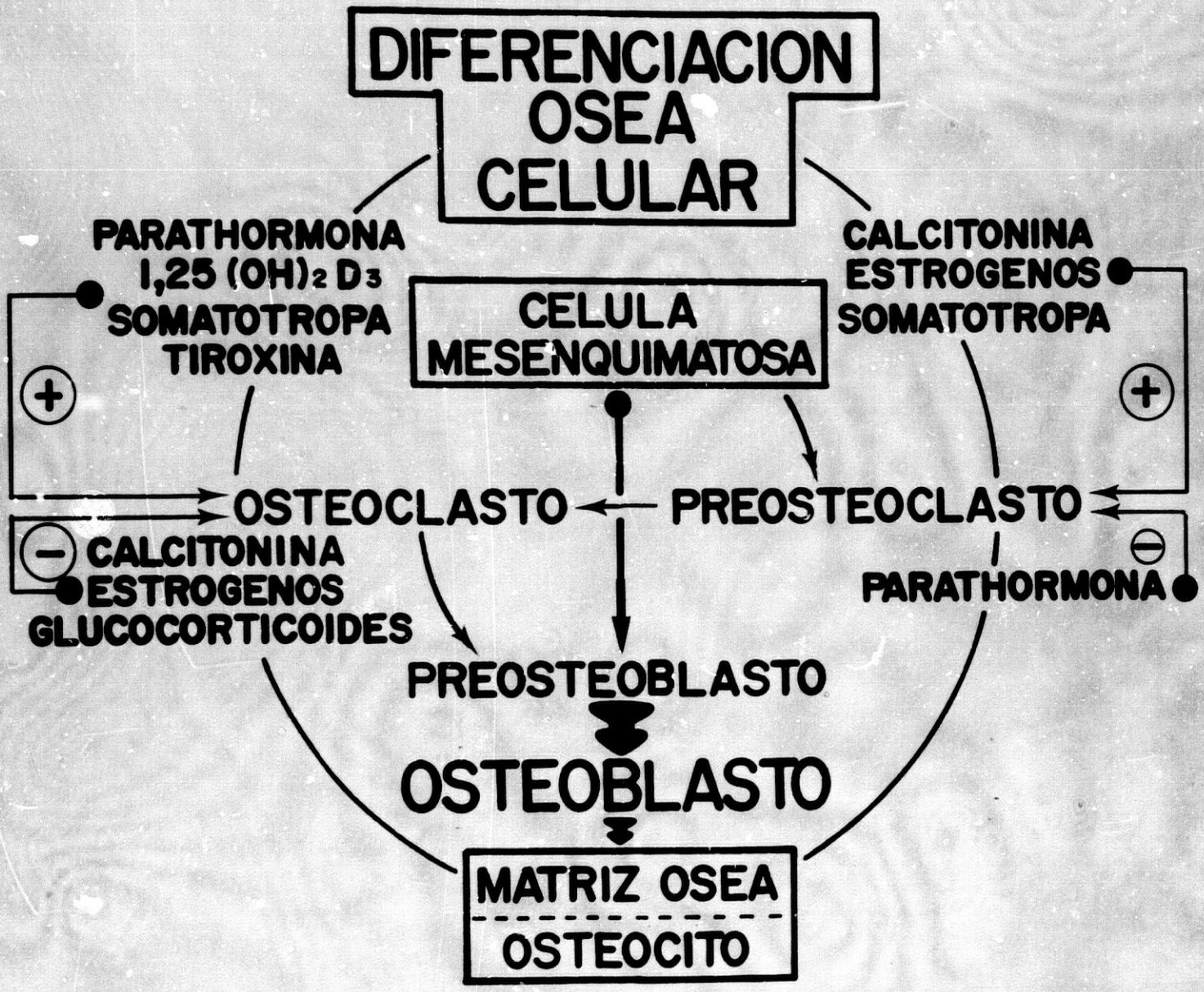
RASMUSEN y

BORDIER 1973), consideraban que las células óseas derivaban de una célula ósea, denominada por ellos progenitora. De ella se generaría el preosteoblasto, osteoblasto y osteccito (Fig.1). Ya, BORDIER y cols. (1973), en ese mismo año ponen en duda tal planteamiento. Estudios más recientes (GOTHLIN y ERICSON, 1976; OWEN, 1978; 1980), indican un origen distinto para las células óseas. En el hueso hay un tejido hematopoyético, del que a través de los monocitos, derivan los osteoclastos. Estudios de marcadores de superficie aplicados al monocito (STUART, 1972), han podido demostrar que esta célula sanguinea y el macrófago tisular son la misma célula, tienen su origen en la médula ósea y eligen sus tejidos de destino a través de la sangre. Ambas células monocito y osteoclasto, tienen la capacidad de moverse, fagocitar y fundirse en una sola célula multinucleada (HANKOX,1979; CHAMBERS,1979; TEITELBAUM y KAHN, 1980), ambas tienen enzimas comunes (CABRINI, 1962) y son sensibles a la parathormona y calcitonina (MINKIN, 1977). Por otro lado, los monocitos son capaces de absorber hueso muerto "in vitro" (KANH,1978) y de responder quimiotácticamente a los productos de la resorción ósea (MUNDY, 1983). Asimismo existe un tejido estromal fibroblástico con osteoblastos, células endoteliales y reticulares (WEISS,1976).

El estroma actua como soporte al tejido hematopoyético y ejerce influencias en su diferenciación y proliferación, pudiendo ocasionar los cambios óseos y casi obligatoriamente, alteración en la médula ósea (VAUGHAN, 1981).

Aunque en íntima conexión, los tejidos estromal y hematopoyético, se ha visto que poseen distinta histoge-

FIGURA 1



VIAS DE LA DIFERENCIACION OSEA CELULAR
(Rasmusen y Bordier, 1973)

nidad (FRIEDENSTEIN, 1970). Al cultivar células de la médula ósea y fibroblastos o al ser implantados en cámaras de difusión intraperitonealmente a animales, lo primero que aparecen son fibroblastos y posteriormente tejido hematopoyético. La aparición de fibroblastos se acompaña de la formación de un tejido fibroso y óseo, mostrandose la actividad osteoformadora por la presencia de fosfatasa alcalina (ASTHON, 1980). Esta capacidad del hueso de generar hueso "in vitro", fué lo que hizo que se propusiera el nombre de CFU-O (Colony Forming Units Osteogenic) para estas células (FRIEDENSTEIN, 1973), ello hace pensar que los osteoblastos derivan de los fibroblastos.

La importancia del conocimiento de esta doble linea celular, cada una con un origen independiente, aparte de planteamientos patogénicos, permitiria actuar terapeuticamente, sobre la que deseemos y de esta forma influir en los desequilibrios del remodelamiento, ya sea frenando o estimulando, tanto la formación ósea como la resorción (RICO, 1986d).

1.2.2.- Ostecblastos.

Son células uninucleadas, responsables de la formación de las matrices óseas, encontrandose en la superficie de avance del hueso en crecimiento, pudiendo ser observados en las superficies de las trabéculas óseas recientemente formadas.

Producen la matriz colágena. El colágeno óseo es de tipo I, con dos bandas, alfa 1 y alfa 2 respectivamente (EPSTEIN,1975).Los osteoblastos sintetizan colágeno tipo I, glicosaminoglicanos, glicoproteinas, proteoglicanos y pro-

teinas óseas no colágenas, como la osteonectina (TERMINE,1981) y la BGP u osteocalcina (PRICE,1981), asi como las vesiculas extracélulares de la matriz, productoras de fosfatasa alcalina (ANDERSON, 1978). Todo ello pone en marcha la génesis de la formación ósea y el inicio de la mineralización. Cada osteoblasto completa un ciclo de síntesis de la matriz y posteriormente, o bien queda incluido en las lagunas del hueso recien formado en forma de osteocito o bien permanece sobre la superficie de la trabécula en forma quiescente de osteoblasto inactivo (RAISZ,1983).

Los osteoblastos estan sujetos a múltiples influencias, ya sean humorales y/o hormonales (DIETRICH, 1976; PARFIT, 1976). Así, productos propios de la desintegración ósea, tienen un potente efecto quimiotáctico sobre los osteoblastos,lo que hace que,posterior a una destrucción ósea, estos mismos productos desencadenen o inicien la formación del hueso. WONG y cols (1977) indican que la 1,25 $(OH)_2$ D_3, metabolito renal de la vitamina D, que estimula la producción de la BGP por los osteoblastos (PRICE y BAUKOL, 1981a), inhibe la actividad de la fosfatasa alcalina de los mismos, que a su vez disminuye la concentración de pirofosfato inorgánico, que es un potente inhibidor de la mineralización. Ello demuestra la importancia de los osteoblastos en la mineralización y formación del hueso (RICO,1986d). La síntesis de BGP esta influenciada por otras hormonas. como los esteroides y parathormona (GALLAGHER,1983), como se verá posteriormente.

1.2.3.-<u>Osteocito</u>

Los osteocitos, se consideran osteoblastos, que han

quedado enterrados en la propia matriz, por ellos formada y cuya misión, es bombear el calcio desde el interior del hueso a los líquidos interticiales (RICO, 1986d). Los osteocitos se comunican entre sí y con los osteoblastos, mediante prolongaciones célulares "en brecha", logrando de esta forma: 1) crear un espacio óseo extracelular, que puede controlar la velocidad de mineralización de la matriz recientemente formada (el osteoide), al regular los niveles de calcio, fosfato, citrato y ph, en la superficie de la trabécula ósea (HAHN,1987); 2) las células situadas profundamente dentro de la matriz del hueso, pueden responder a estímulos hormonales que solo parecen tener acceso directo a las células situadas en la vecindad inmediata de los vasos sanguineos (SPECKER y TSANG, 1987).

Por tanto, los osteocitos tienen una notable influencia sobre la matriz ósea, al ser responsables de la osteolisis, un proceso fisiológico activo, por el cual la matriz ósea que rodea inmediatamente al osteocito, se modifica y la sal se reabsorbe (BLOOM y FAWCET, 1975). Así podria intervenir de forma activa en la liberación de calcio, desde el hueso a la sangre y de la misma forma desempeñaria un papel importante en la regulación homeostática del calcio en el organismo.

1.2.4.-Osteoclastos

Son células multinucleadas de gran tamaño, cuya principal función es la reabsorción ósea. Su origen es controvertido, pero los estudios actuales sugieren que proceden de células mononucleadas situadas en la médula ósea, como ya hemos visto. La producción y activación de los osteo-

clastos, parece depender de señales emitidas por los osteoblastos (HANH, 1987). Son los encargados de la destrucción ósea, que conlleva una primera fase de desmineralización, con una posterior degradación de la matriz ósea. La primera favorecida por la producción de proteinasas (colagenasas, proteogliconasas y catepsina), asi como hidrolasas ácidas, facilita la degradación del colágeno óseo y completa la destrucción del hueso (SPECKER y TSANG, 1987).

1.3.-MATRIZ OSEA.

Antes de la mineralización es preciso que se forme una cantidad adecuada de matriz ósea. Aproximadamente, un 90% de esta matriz se compone de fibras cólagenas, las cuales estan altamente ordenadas en su disposición, mientras que el 5-10% restante, esta constituido principalmente por proteinas orgánicas no colágenas (SPECKER,1987).

La OSTEOCALCINA, es la proteina no colágena de la matriz ósea mas abundante, producida por los osteoblastos, liberada durante la reabsorción, parece ser un indicador del recambio metabólico óseo (PRICE, 1980a). Su participación en el "turnover" óseo queda esquematizada en la Fig. 2. La OSTEONECTINA, es la segunda proteina no colágena más común encontrada en el hueso y representa aproximadamente un 25% de las proteinas no colágenas de la matriz ósea. Tiene una gran afinidad para el calcio y para el colágeno (TERMINE, 1981). No está determinado el papel específico de la ostenectina en la mineralización ósea normal, pero parece estar involucrada en la orientación y crecimiento de los cristales minerales.

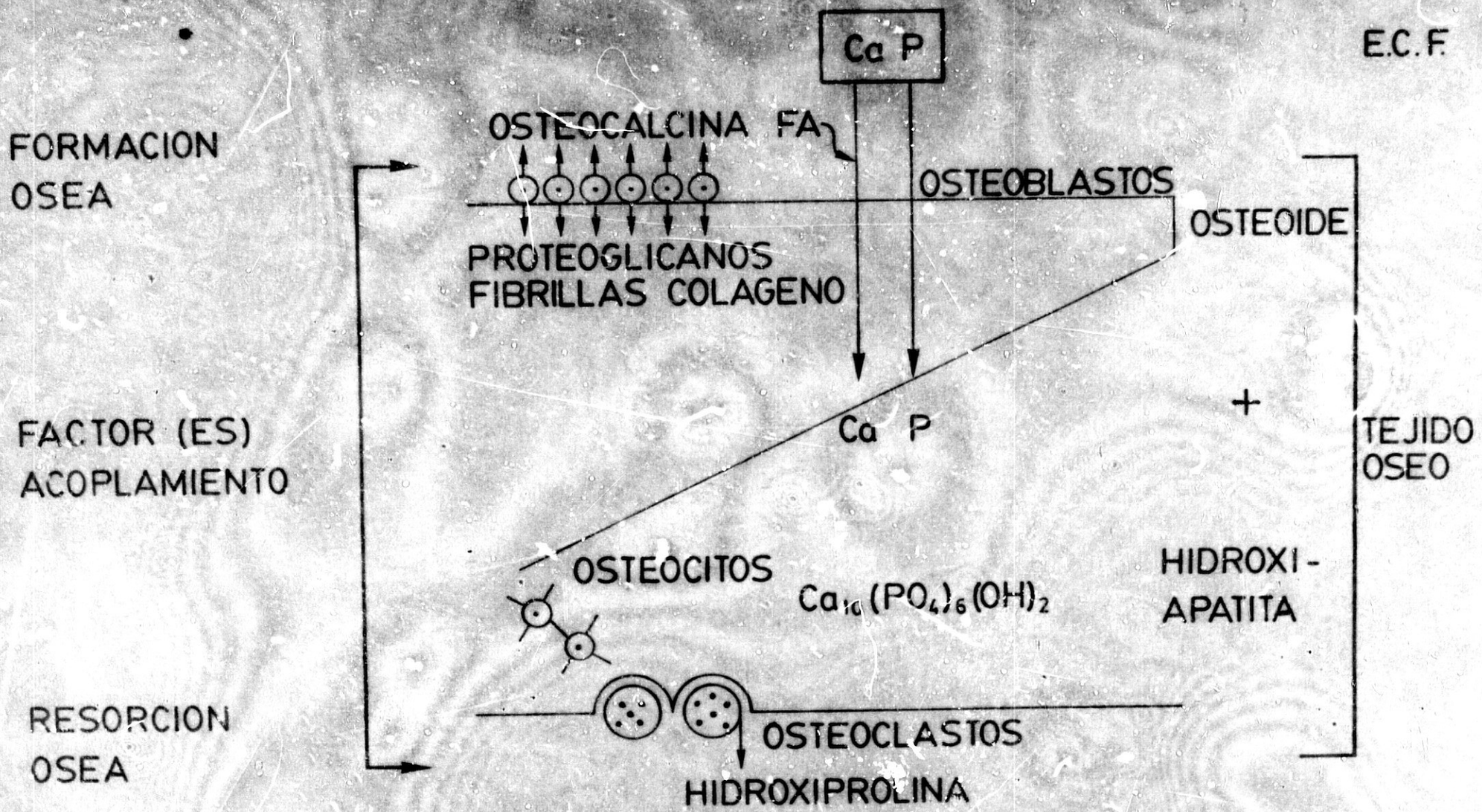


Figura 2.- Formación y resorción de hueso trabecular (Ca: Calcio; P: Fósforo; FA: Fosfatasa alcalina; ECF: Fluido extracelular.). (Tomado de Krause, 1987).

También se encuentran sialoproteinas, fosfoproteina proteoglicanos y alfa 2HS glicoproteinas, en la matriz ós y todas presentan altas afinidades de ligazón para calcio. No quedan claras los papeles que desempeñan est proteinas en el hueso. Se ha observado que las concentr ciones séricas de alfa 2HS glicoproteinas y sialoprotein estan elevadas durante la lactancia y la niñez (QUELC 1984; DICKSON, 1985) y recientemente se ha sugerido que función podria estar relacionada con la formación y recambio metabolico óseo, más que con la estabilización la matriz (DICKSON, 1985).

1.4.-MINERALIZACION OSEA.

Aunque la elasticidad y resistencia del hueso radic en en su matriz orgánica, en particular en el colágeno, dureza depende de sus constituyentes inorgánicos. La mat ria inorgánica, contiene depósitos submicroscópicos fosfato cálcico (TERMINE, 1966). Una vez que los osteobla tos han depositado el colágeno y la matriz ósea es madura, la mineralización empieza rapidamente,si est presentes las concentraciones adecuadas de calcio y fósf ro. La mineralización se produce en las laminillas de matriz, en capas perpendiculares al eje del hueso, co duciendo a la aparición de un frente de mineralizació donde se deposita inicialmente un 80% del mineral, estan bajo la influencia de los osteoblastos y de los osteocito Después de esta aposición inicial rápida, el mineral acumula más despacio hacia los extremos del hueso a dista cia de los osteoblastos y del frente de mineralizació hasta alcanzar un nivel máximo. Durante esta fase de min

ralización secundaria, el crecimiento de los cristales óseos parece independiente de cualquier influencia significativa de los osteoblastos.

Es dificil definir la estructura del mineral óseo. Se cree que está constituido principalmente por hidroxiapatita (Ca_{10} $(PO_4)_6$ $OH)_2$. Se ha encontrado que la relación calcio/fósforo en el hueso varia entre 1.33 y 1.66. En la hidroxiapatita, la relación calcio/fosforo es de 1.66 (RASMUSEN-BORDIER, 1974). Se cree que un complejo cálcico amorfo, con una relación calcio/fósforo de 1.5, se transforma lentamente en hidroxiapatita cálcica cristalizada en el frente de mineralización. Para esta aposición de mineral, es necesario que las concentraciones locales sean las adecuadas.

Durante la formación de hidroxiapatita cálcica, los hidrogeniones son generados y eliminados normalmente. Si esto no ocurre, aparecen alteraciones en la mineralización. Una acumulación aumentada de hidrogeniones, puede interferir también los fenómenos célulares mediados por enzimas pH-dependientes, que son necesarios para la mineralización. Los intercambios iónicos ocurren en los cristales, siendo rápidos a nivel de los iones superficiales y mucho más lentos a nivel de las capas más profundas. La parte externa de los cristales o capa de hidratación, permite una rápida difusión de los iones y desempeña un papel importante en la homeostasis del calcio en el organismo.

El papel de distintos factores hormonales y nutricionales en la formación de la matriz ósea (CANALIS, 1983; RAISZ, 1983), quedan reflejados en la TABLA I, que seran

TABLA I.

FACTORES QUE INFLUYEN
SOBRE
LA MINERALIZACION OSEA.

A NIVEL DEL HUESO

- Matriz apropiada.
- Adecuada concentración de calcio y fosfato.
- Concentración normal de iones H^+.

FACTORES ENDOCRINOS

- Aumento de la reabsorción ósea.
  * aumento de la formación de osteoclastos:
    HORMONA PARATIROIDEA.
    1,25,DIHIDROXIVITAMINA D.
    TIROXINA.
    HORMONA DE CRECIMIENTO.
  * disminución de la formación de osteoblastos.
    HORMONA PARATIROIDEA.
- Disminución de la reabsorción ósea.
  * disminución de la formación de osteoclastos.
    CALCITONINA.
    GLUCOCORTICOIDES.
    ESTROGENOS.
  * aumento de la formación de osteoblastos.
    CALCITONINA.
    ESTROGENOS.
    HORMONA DEL CRECIMIENTO.

FACTORES NUTRICIONALES

- Necesarios para una adecuada mineralización.
  VITAMINA D.
  CALCIO Y FOSFORO.
  MAGNESIO Y ZINC.
- Inhibidores de la mineralización.
  MAGNESIO.
  ALUMINIO.

(Tomado de SPECKER Y TSANG, 1987).

comentados a lo largo de esta introducción.

Por último y a modo de resumen, son clásicos los trabajos de BOSKEY (1981), describiendo de modo experimental la secuencia de formación de hueso nuevo: DIA 1: en la zona donde se formará hueso nuevo, hay una proliferación quimiotáctica de polimorfonucleares; DIA 3: se inicia una proliferación de fibroblastos (RATI, 1979); DIA 7: se detecta la presencia de cartílago hialino; DIA 9: el cartílago se hipertrofia y hay complejos de $Ca_{10}(PO_4)_6OH$; DIA 10: los complejos de $Ca_{10}(PO_4)_6OH$, aumentan los signos evidentes de mineralización y puede "ya" verse hueso (REDDI, 1975; BOSKEY,1976;); DIAS 11 y 13: hay hueso en un sentido estricto y pueden observarse los osteoblastos como tales células sobre el hueso, se inicia una invasión vascular; DIA 21. el tamaño de los cristales minerales aumenta ,hay signos de remodelamiento óseo y aparece la cavidad medular ósea; DIA 28: el hueso detectado el dia 10, esta completamente maduro.

1.5.- Sistema esquelético en el periodo perinatal.

La evolución de la talla del feto está fuertemente ligada al desarrollo de su esqueleto. Los principales acontecimientos que corresponden a la formación de este ultimo han sido analizados (DAVID, 1987): así, a nivel de los huesos largos, una primera osificación empieza a mitad de la diáfisis hacia la semana 9 de vida embrionaria, pero enseguida se produce su resorción. Seguidamente aparece en las extremidades distales y proximales el hueso primario encondral, que a la semana mide 37 mm y más adelante se forma hueso periostio. Este hueso fetal se caracteriza por

un alto grado de mineralización , la persistencia de un tejido conjuntival muy vascularizado y la formación de cortezas óseas gruesas y densas. Hay que hacer notar que la remodelación ósea, a diferencia de lo que se observa después del nacimiento, es muy reducida hasta que se acerca el término.

Todos los centros de osificación primarios de los huesos largos son ya visibles en la semana 13. Al término, cierto número de puntos osificados, pueden ser utilizados como índices de maduración, teniendo en cuenta el peso y el sexo del feto. Así la epífisis femoral distal está presente en el 100% de los casos cuando el peso al nacer supera los 3.000 gramos, mientras que la epífisis tibial superior solo se observa en un 7% de los casos (DAVID,1987). Las niñas presentan un avance de su maduración ósea de alrededor de 2 semanas al nacer y de 8 semanas al año. Esta diferencia entre los sexos se hace perceptible a partir de la semana de vida fetal.

2.-METABOLISMO FOSFOCALCICO

2.1.-Fisiologia del calcio

2.1.1.-Generalidades.

El calcio (Ca) es un mineral bivalente, cuyo peso atómico es 40. Su concentración, se expresa habitualmente en miligramos (mgr): 20 mgr de calcio corresponde a un miliequivalente (meq).

Es el elemento inorgánico más abundante en el adulto, variando su contenido en el organismo con la edad. El esqueleto contiene el 99% del Ca total del cuerpo y 1% en

los vasos del intersticio y líquidos intracelulares. En el RN y en el niño, estas proporciones se mantienen, pero varian las cantidades absolutas. WIDDOWSON (1965), ha calculado que la cantidad de Ca presente en el organismo, es por término medio 5.7 g en el feto de 1 kg; de 28.8 g en el recién nacido a término de 3.5 kg. Después del nacimiento la mineralización ósea no evoluciona pararelamente al crecimiento del esqueleto. Así, KHAN (1969), indican que por kilo de peso corporal los valores de Ca del organismo descienden del 0.8% en el nacimiento al 0.65% a los cuatro meses y luego aumentan lentamente para alcanzar de nuevo el 0.8% al final del primer año. Según ROYER (1981), posterior a la época neonatal se produciria una importante aceleración de los procesos de reabsorción, que acompaña al remodelado de los huesos. Es evidente pués, que a lo largo de la infancia, niñez y adolescencia, deben existir unos mecanismos importantes, que garanticen el incremento diario, que supone la consecución de 1.2 gr de Ca total al final del crecimiento (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1985). Ello ha hecho que hayan quedado bien establecidos sus requirimientos (ROOT,1976; TANTTIBNEDYAGKUL ,1978),para el primer año de vida (300-600 mgr/dia), para la infancia y niñez (1.000 mgr/dia) y para la pre y adolescencia (1.200-1.400 mgr/dia). Con las dietas habituales de los paises occidentales, estos requirimientos se alcanzan facilmente y consiguen el equilibrio del organismo siempre que esté sano y normoreplecionado de vitamina D.

El Ca del esqueleto es el "pool" no cambiable y no es posible usarlo por el neonato para la regulación de la homeostasis cálcica, aunque los huesos estén bajo constante

remodelación. El Ca del "pool" de rápido intercambio es utilizado para actividades del metabolismo; junto con ésto, el líquido intestinal ayuda al mantenimiento del calcio sérico en un margen determinado. Anatomicamente el "pool" de rápido intercambio, está localizado en el suero, líquido intersticial, citosol celular y recientes depósitos en la superficie del hueso. El Ca iónico presente en organelas celulares (mitocondria) y en áreas de distrofia cálcica, como el cartílago y ateroma, está considerado como el "pool" de intercambio lento.

El Ca sérico total, como lo informan de rutina los laboratorios clinicos, representan la suma del Ca unido a las proteínas, los complejos de Ca no difusible (p. ej. unido a citrato) y el Ca libre no ionizado. Solo la fracción de Ca ionizado, de 4 a 4.5 mg/dl, es fisiologicamente activa, atraviesa las membranas y está regulada homeostaticamente. Actualmente es posible determinar de forma directa el Ca ionizado, pero cuando esta medición no es factible, éste es habitualmente paralelo a los valores de Ca total (KLIEGMAN,1987).

El Ca ionizado y el que está unido a proteínas, están en equilibrio y la distribución del Ca entre estas fracciones está controlada en parte por el estado de acidez. La porción de Ca unido a proteínas aumenta conforme disminuye la concentración de hidrogeniones (alcalosis) y disminuye conforme aumenta (acidosis) (ROOT ,1976).

Las concentraciones séricas de Ca total e ionizado son mayores en la sangre de cordón y después de un declive transitorio, se mantienen a niveles más altos durante la

niñez y adolescencia, que en la edad adulta. Puede haber una pequeña correlación entre el Ca total y el ionizado en el suero de los sujetos normales o anormales y el nomograma de McLEAN-HASTING empleado para calcular el Ca libre del total en suero y valores de albúmina, no correlaciona bien con las medidas actuales de este ión en todas las circunstancias (KLIEGMAN, 1987)

2.1.2.-Actividad metabólica.

El Ca posee una intensa actividad metabólica a nivel celular: 1) estabilizador de membranas (función de transporte a través de membranas).2) Transmisión de iones a través de las membranas de las organelas intracelulares. 3) Liberación de neurotransmisores en la unión sináptica. 4) Síntesis, secreción y efectos metabólicos de hormonas proteicas. 5) Liberación y activación de enzimas intra y extracelulares. 6) Coagulación sanguinea. 7) Otras funciones celulares.

En las células, solo una mínima cantidad de Ca está presente en el citosol de forma ionizada, también se encuentra en la mitocondria como sales de fosfato y en el retículo endoplásmico. La interacción de múltiples hormonas y proteínas especializadas, en regular los efectos intracelulares del Ca, traducen la complejidad de una "perfecta maquinaria", cuya importancia queda establecida por la amplia representación fisiológica, anteriormente enumerada.

Después de la unión con la hormona protopeptídica a los receptores de la membrana plasmática de una especie de

célula blanco, una serie de hechos se inician, las cuales resultan de una apropiada acción metabólica para aquel complejo celular-hormonal. En concordancia a la hipótesis de BORLE (1973), RASMUSSEN y BORDIER (1973), ROOP (1975), después de la recepción del primer mensaje hormonal, la adenilciclasa de la membrana celular es activada lo que cataliza la transformación de ATP en AMPc. Simultaneamente hay un cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática para el ión cálcico y éste entra y sale del citoplasma celular. En el citosol, el AMPc, el Ca y el fosfato de monohidrógeno, actuan como segundo mensajero intracelular (ROYER,1985).

El AMPc activa a la proteinquinasa, la cual cataliza la fosforilación de las proteínas citoplasmáticas. Estas proteínas dan orden a las células de transformar sus características funcionales a través de un efecto sobre la función nuclear y formación proteíca, que puede ser modificado directa o indirectamente por la concentración de Ca intracelular. El AMPc también puede aumentar la cantidad de Ca transferido desde la mitocondria al citosol. En la medida que la actividad de la adenilciclasa está reciprocamente relacionada a un nivel citoplasmático de Ca iónico, elevada concentración de Ca puede inhibir la actividad de la enzima y las tasas de producción de AMPc y por lo tanto predecir un mecanismo autoregulativo efectivo (Fig.3).

2.1.3.-Vias metabólicas del Ca.

La forma más importante de Ca en la alimentación es, con mucho, la leche y sus derivados. También contiene

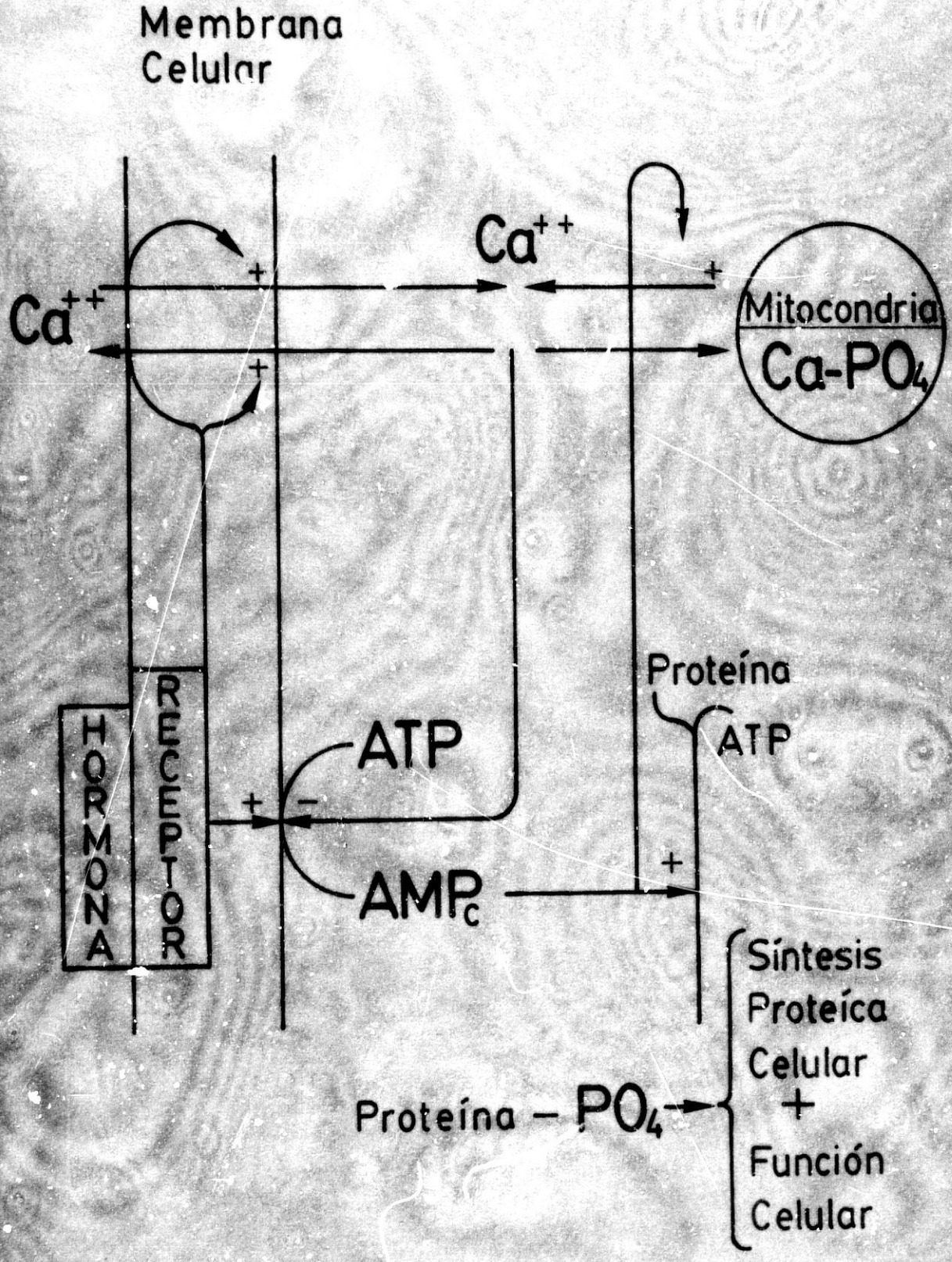


Figura 3.- Actividad metabólica del Calcio

grandes cantidades de fosfato, pero éste se encuentra además en otros alimentos, sobre todo en la carne.

El primer paso para que el Ca pueda absorberse, es que se libere de los complejos alimentarios (caseinato y otras sales), hasta formas solubles y quizás ionizadas. Para que este proceso pudiera tener lugar, siempre se le habia dado gran importancia a la acidez gástrica, pero hoy, ésto se duda, dada la buena absorción en pretérminos y adultos con aclorhidria y se valora más la existencia de microclimas duodenales (BO LINN ,1984).

Existen dos mecanismos de transporte de Ca. Uno activo que ocurre en tramos altos (duodeno), cuando la luz intestinal es inferior a 5 nM y otro por difusión, propio de tramos distales (ciego) y con concentraciones superiores a las expresadas.

El mecanismo activo descansa en tres pasos: 1) transporte a través del borde de cepillo (KOWARSKI ,1980); 2) paso intracelular, que depende de 1,25 $(OH)_2D_3$ (MOYA, 1987); 3) transporte a través de la membrana basolateral (MURER , 1981).

En el ciego, el mecanismo es pasivo, dependiente de las altas concentraciones (hasta 8 mM) en la luz intestinal y en principio no saturables. Este mecanismo comienza a funcionar cuando las concentraciones de Ca iónico son superiores a 2 mM y las de Ca iónico sanguineo de 1.27 mM (FAVUS, 1985).

Diversos factores inhiben o favorecen la absorción intestinal de Ca . La vitamina D tiene una función bien

comprobada y es, su capacidad de aumentar la absorción digestiva de Ca . Este efecto se debe a una acción directa sobre las células epiteliales de la mucosa del duodeno y del yeyuno, aumentando el transporte activo del Ca por la membrana intestinal, como hemos visto. Otros factores que influyen, incluso en mayor medida, es la concentración de ion cálcico en el líquido extracelular de forma directa y la hormona PTH estimulando el efecto de la vitamina D. En cuanto a la calcitonina, su acción sobre el intestino es mal conocido.

Existe una eliminación intestinal de Ca por las heces, el llamado Ca endógeno (SUTTON,1977), que procede de la secreción intestinal, es decir, del yeyuno e ileón, que son zonas donde el flujo de secreción es mayor, que el de absorción. El Ca endógeno, puede colocar a cualquier ser vivo en balance negativo de Ca, si la ingesta o absorción está anormalmente reducida. El mecanismo de secreción es poco conocido,aunque parece guardar cierta relación con el nivel de somatoestatina (FAVUS ,1981; MOYA ,1987).

La eliminación urinaria se produce principalmente por filtración glomerular, sin secreción activa, dependiendo de un mecanismo similar a la eliminación de sodio. La cantidad final de Ca en la orina es el resultado, fundamentalmente, de la reabsorción tubular (ROOT ,1976), con la participación de la PTH; mientras que la calcitonina actua en sentido inverso, aumentando las pérdidas urinarias. La calciuria fisiológica en el niño debe ser expresada en mg/kg/24 h.. Su valor es en general inferior a 3 mgr/kg/24 h.; una calciuria superior a 6 mgr/kg/24 h., debe ser considerada una hipercalciuria eventualmente patológica.

Las pérdidas de Ca por el sudor, son en condiciones climáticas habituales, despreciables.

2.2.-Factores que influyen en la regulación del Ca.

2.2.1.-FOSFORO

Puede ser encontrado en todo el organismo humano. Es un ión esencial para los seres vivos, ya que participa principalmente en: 1) procesos de almacenaje de energia; 2) metabolismo óseo y cálcico; 3) mantenimiento del equilibrio ácido-base.

En el plasma, el fostato inorgánico se encuentra sobre todo en dos formas: HPO_4 y $H_2PO_4^-$. Pero como es muy dificil analizar la concentración exacta de uno y otro, en el plasma se habla de P en mg/100 ml o dl. En el hueso la relación calcio/fósforo permanece constante (2.2/1) desde la vida fetal a la adulta, siendo la acumulación de fósforo en el curso del crecimiento, función directa de la importancia de la retención cálcica y nitrogenada, según la fórmula: P retenido= Ca retenido/2.2 + N retenido/17 (SENTERRE,1987).

La concentración extracelular de P, está determinada por la interacción sobre:1) absorción gastrointestinal; 2) metabolismo óseo; 3) excreción urinaria.

La absorción de P por el intestino, se realiza en el yeyuno y zona proximal del ileon, por dos mecanismos: una difusión pasiva y un transporte activo acoplado a la entrada de sodio (TSANG,1976). La absorción de P es siempre muy elevada en el prematuro y en el recién nacido a término

alimentado con leche materna o con preparados a base de leche de vaca. No está claro el papel de la vitamina D (DE LUCA,1973;SENTERRE,1987) y no se correlaciona con el Ca (SENTERRE,1982). La PTH no tiene efecto directo sobre la absorción gastrointestinal de P, pero de forma indirecta la podria aumentar por estimulación de la 1,25 $(OH)_2D_3$ (LUND ,1980), aunque no parece dependiente de ello.

El P tiene un importante papel en la <u>regulación del metabolismo óseo</u>. "In vitro", estimula la mineralización ósea y formación de la matriz (BINGHAN ,1974) e inhibe la resorción ósea (BRAND ,1972; ROWE ,1987). "In vivo" cambios en la concentración sérica de P, habia sugerido un mecanismo para la regulación del crecimiento esquelético. Así, altas concentraciones de suero observadas en animales en crecimiento han sido responsables del crecimiento óseo, por favorecer la formación ósea sobre la resorción (BROOKE, 1980). De esta forma el esqueleto actua como reserva de P.

Está regulado por el 1,25 $(OH)_2D_3$, que estimula la resorción ósea, con aumento de P en el espacio extracelular (RAISZ ,1972), que actua a su vez sobre la producción del metabolito de la vitamina D elevandose en la hipofosfatemia, por aumento de la hidroxilación del 25 $(OH)_2D$ en el riñón (HUGUES,1975; GRAY ,1981), decreciendo por la carga de P (PORTALE ,1986). Igualmente la PTH estimula la resorción, guiada por el descenso de P (RAISZ,1983). A través de todos estos mecanismos, el P sérico es un regulador de la calcemia (FIG.4).

El riñón es el principal órgano de eliminación de P, siendo filtrado a nivel glomerular reabsorbiendose casi

totalmente en el túbulo proximal. A nivel del túbulo distal es el tampón que permite la excreción de grandes cantidades de H^+, sin disminuir el pH urinario (MASSRY ,1973; SANCHEZ,1982).

La excreción diaria de P está fuertemente correlacionada con la dieta (ROWE ,1987), con la edad hasta la segunda o tercera década de la vida, para posteriormente descender. Otros factores que influyen sobre la excreción de P, pueden ser clasificados en hormonales: PTH, vitamina D, calcitonina, hormona del crecimiento, glucocorticoides; y no hormonales: evidencia de calciuria, administración de bicarbonato, filtación glomerular renal. La PTH aumenta la excreción de P por un efecto directo sobre los túbulos renales (AGUS ,1971). También se ha identificado un mecanismo de P insensible a la PTH y modulado por el Ca. La acidosis provoca un aumento de P sérico y como consecuencia aumenta su eliminación renal por una activación de la PTH (BARZEL ,1971).

2.2.2.-HORMONA PARATIROIDEA

Se estudia ampliamente en el capitulo 4.

2.2.3.-EQUILIBRIO ACIDO-BASE

La acidosis incrementa el paso de Ca desde el hueso al espacio extracelular, en tanto que la alcalosis lo disminuye o lo invierte (RAISZ ,1983). Por el contrario, el depósito de Ca en el hueso desplaza al ión hidrógeno y lo hace pasar al espacio extracelular, lo cual origina acidosis metabólica.

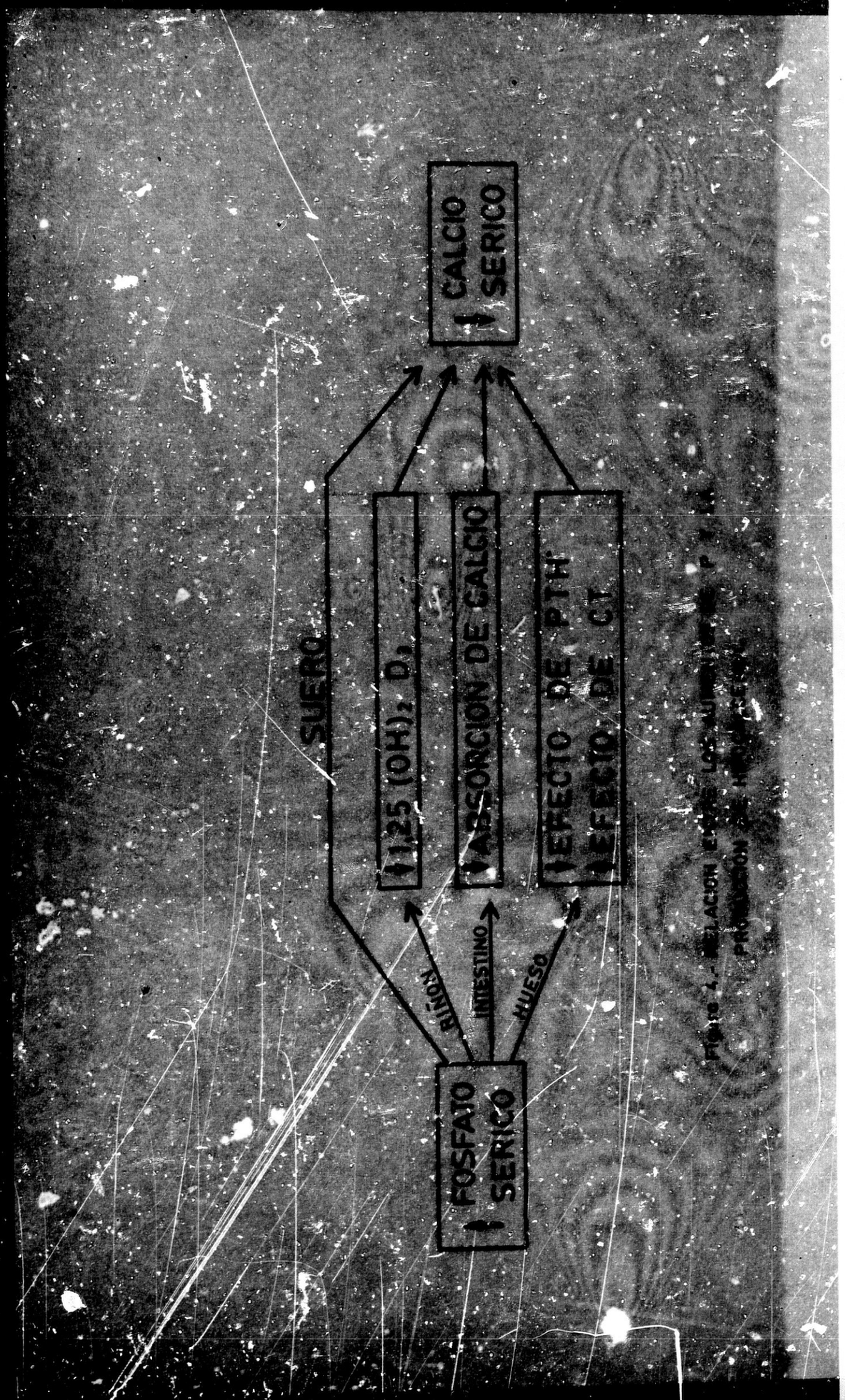


Figura 4.- RELACION ENTRE LOS [illegible] PARATIROIDEA

La alcalosis aguda por disminución de las concentraciones de Ca ionizado circulante, origina mayor producción de PTH. Por otra parte, esta hormona al incrementar la pérdida de bicarbonato por el riñón y disminuir la excreción de hidrogeniones, puede producir acidosis metabólica, que según algunos autores, es un factor adicional que intensifica la reabsorción ósea inducida por la PTH (SANCHEZ ,1982). La 25 $(OH)_2$ vitamina D, incrementa la reabsorción de bicarbonato por el túbulo renal, posiblemente por inhibición de la PTH. La vida media de éste metabolito de la vitamina D se acorta con la acidosis metabólica (BUSHINSKY ,1982). Con base a la relación del equilibrio ácido-base con la homeostasis del Ca, cabe esperar que la corrección de la acidosis con alcalinos, origine una disminución de la calcemia.

2.2.4.-Otros factores que intervienen en la regulación del Ca, son los siguientes: 1)Magnesio; 2)Calcitonina; 3)Vitamina D.

2.2.4.1.-MAGNESIO.

Comparte muchas características fisiológicas con el Ca, de forma que cualquier trastorno de la homeostasis en uno de ellos suele acompañarse de alteración en el otro.

La hipomagnesemia origina hipocalcemia por diversos mecanismos: 1)menor producción de PTH (ANAST ,1976); 2) resistencia de los órganos "diana" a la acción de la PTH; 3) disminución de la absorción intestinal de Ca con/sin alteración del metabolismo de la vitamina D o menor intercambio heteroiónico entre Ca y Mg, en la superficie

ósea, con disminución de la liberación de Ca desde el hueso (TSANG ,1976).

2.2.4.2.-CALCITONINA

Se piensa que su principal acción o función seria la disminución de la reabsorción ósea en situaciones de necesidad fisiológica de Ca, tales como crecimiento, embarazo y lactancia y a largo plazo la conservación del esqueleto, aumentando las trabéculas óseas en las metáfisis y disminuyendo el número de osteoclastos.

A nivel intestinal, SWAMINATBAN (1974), demostró que la calcitonina posee un efecto inhibidor en la absorción de Ca.

En el riñón, favorece la eliminación de Ca y P. A su vez disminuye la actividad de la 1,α,hidroxilasa renal, disminuyendo la formación de 1,25,$(OH)_2D_3$ (TALMAGE,1981).

2.2.4.3.VITAMINA D

La vitamina D, producida en la piel o ingerida, sufre una hidroxilación en el hígado, transformandose en 25-dihidroxivitamina D, siendo transportada por una alfa-globulina al riñón, sufriendo una nueva hidroxilación, convirtiéndose en 1,25, dihidroxivitamina D. Ésta útima etapa esta regulada por la necesidad de Ca, actuando como intermediario, probablemente la PTH.

El metabólito activo, la 1,25 $(OH)_2D_3$: 1) incrementa la absorción de Ca y P por el intestino; 2) en el hueso, moviliza el Ca y posiblemerte el P, quizás activando los osteocitos; 3) a nivel renal, probablemente aumenta la

reabsorción de P y Ca a nivel del túbulo proximal, disminuyendo la excreción de estos iones en la orina.

2.2.4.4.-OTRAS HORMONAS

-Hormona del crecimiento: cuya acción principal sobre el hueso, parece ejercer sobre la osificación encondral, afectando al crecimiento en longitud de los huesos largos en el organismo que se está desarrollando (JOB ,1981).

-Estrógenos: inhibe la reabsorción osea provocada por la PTH (RAISZ ,1983).

-Hormona tiroidea: aumenta la reabsorción y la formación de los huesos. El RN, biologicamente hipertiroideo (ERENBERG ,1974), pero los efectos sobre el metabolismo óseo no están muy claros. Teoricamente, el papel en la reabsorción ósea de la hormona tiroidea, pudiera ser protectora contra la hipocalcemia neonatal.

-Hormonas pancreaticas. El glucagón ejerce un efecto hipocalcémico directamente y también aumentando la secreción de calcitonina. Este efecto es contrarestado por la insulina (ELRAD ,1980). El alza postnatal de glucagón, especialmente en RN asfixiados, podria tener un rol secundario en la génesis de la hipocalcemia neonatal (VENKATARAMAN ,1982).

-Corticoesteroides. Disminuyen la absorción intestinal en forma directa y antagonizando la acción de la vitamina D (ROOT ,1976). La hipersecreción de cortisol observada en presencia de asfixia, puede contribuir a la presencia de hipocalcemia neonatal (SCHEDEWIE ,1979).

2.3. Características del metabolismo fosfocalcico en el periodo perinatal

A lo largo del embarazo, el organismo materno sufre una serie marcada de ajustes fisiológicos que ayudan a conservar la homeostasis materna, así como a la vez ayuda al óptimo desarrollo del feto y de la placenta (REITZ, 1977).

Los cambios en el metabolismo materno del Ca empiezan después de la concepción, aparentemente como respuesta a las hormonas gestacionales. El aporte de Ca proviene en gran parte del esqueleto materno, en relación a la acción biológica del lactógeno placentario, estrógenos (PITKIN , 1978) y PTH (HEANEY ,1971) , probablemente la prolactina (HILLMAN ,1976) y la activación del metabolito activo de la vitamina D (FENTON ,1980) de forma que al término de la gestación, las tasas de reconstrucción y recambio óseo, ya se han doblado (HEANEY , 1971). sin embargo, parece que el esqueleto de la mujer embarazada, se mantiene bastante bién (GOLDSMITH ,1975; CRISTIANSON ,1976; GRAY ,1979).

La concentración de Ca total en el suero materno disminuye de forma característica durante el embarazo (PITKIN ,1980; MARTINEZ ,1985). La caida es más o menos progresiva, hasta la mitad del tercer trimestre, después del cual, hay un ligero aumento hasta el término. El nivel del Ca sérico, está en unos 0.25 meq/l por debajo, en relación a la mujer no embarazada, representando un descenso del 5-6%. Este patrón paralelo al de la concentración sérica de albúmina, parece indicar que el descenso está en relación con la fracción unida a las

proteinas (PITKIN ,1979).

El efecto de la gestación sobre las concentraciones séricas maternas de Ca iónico, es un punto de gran importancia, con respecto a la discusión, de si el hiperparatiroidismo fisiológico del embarazo es primario o secundario. Estudios realizados midiendo directamente el Ca iónico, han llegado a resultados contradictorios, pues en algunos trabajos se ha visto una tendencia a disminuir (PITKIN ,1975; DRAKE ,1979), en otros a aumentar (REITZ, 1977; FOGH-ANDERSEN ,1981) y aun en otros, se mantiene constante (PITKIN ,1979).

A pesar de estas aparentes contradicciones, todos los cambios han sido bastante pequeños, por lo que parece que son mínimos los efectos de la gestación sobre los niveles séricos de Ca iónico (PITKIN ,1979).

En cuanto al contenido total de Ca del feto, en el 5º mes contiene 3 gr, en el 6º 6 gr, 9 en el 7º, 15 en el 8º y 30 gr en el momento del nacimiento (ROYER, 1981). Por tanto, el Ca se acumula en el feto en los últimos meses del embarazo, guardando una relación lineal con el peso del feto (PITKIN,1975). Así la existencia de hipercalcemia (100-110 mg/L) en la sangre de cordón en el momento del parto, es un fenómeno bien establecido. Por el contrario hay poca información sobre la evolución de la calcemia en el curso de la vida fetal, refiriendose valores de 55-60 mg/L al final del 4º mes de gestación (TALME,1971), ascendiendo a valores de 80-90 mg/L en la sangre de cordón de pretérminos (DAVID,1987). Tales datos sugieren la instauración tardia al final de la gestación de la

hipercalcemia fetal.

Durante la vida intrauterina se ha comprobado, en experimentación animal, que se produce una transferencia continua de Ca de la madre al feto, a través de la placenta (TWARDOCK ,1970), proporcionando el Ca suficiente para cubrir las demandas de mineralización ósea. Así, se ha podido ver, que existen flujos de Ca en las dos direcciones de la placenta, por dos mecanismos distintos y que la calcemia fetal, está más elevada que la calcemia materna. Ello es debido, a que se realiza un transporte maternofetal de Ca contra un gradiente creciente , a ritmo de 150 mgr/kg/dia, en el último trimestre, originando valores de Ca fetal ultrafiltrable e ionizado, mucho mayores que los valores maternos (10-20 mg/l) (HEANEY, 1971;TSANG, 1977; SENTERRE,1987). Lo esencial de la aportación cálcica transplacentaria va destinada al esqueleto del feto, cuya osificación empieza hacia el final del segundo mes. La naturaleza exacta del transporte activo de Ca no se conoce, si bien, se supone relacionado con la identificación a nivel de la placenta, de una proteina migradora de Ca y otra de 25,$(OH)_2D_3$ (RAWLER, 1978), por tanto la placenta tiene un papel muy importante en la regulación de la homeostasis fosfocálcica fetal.

Durante la gestación se transfiere activamente unos 30 gr de Ca (HEANEY ,1971). El flujo de Ca transplacentario, es notablemente superior a las necesidades fetales, lo que se interpreta como un "margen de seguridad", que protegeria al feto, frente a las oscilaciones de la calcemia materna. Considerando que las demandas fetales suponen el 2.5% del

contenido de Ca corporal materno (VENTO ,1988) y que en el último mes de gestación, a pesar del reajuste paratiroideo y de la posible acción facilitadora de la progesterona sobre la proteina ligadora de Ca, no se consiguen retenciones netas maternas, que lleguen a igualar el "transfer" feto-materno (PITKIN ,1979), es evidente que se tienen que utilizar los propios depósitos maternos para cubrir las demandas. En condiciones adversas, tales como: embarazos repetidos con escaso intervalo, carencias nutricionales etc., se podria producir una deplección que afectase secundariamente al feto (FETTER ,1985).

En las horas que siguen al nacimiento, se asiste a una caida progresiva de la calcemia (85-90 mg/l), que remontará hasta 100 mg/l, al final de la primera semana de vida, su fracción ionizada sigue una evolución paralela (DAVID,1974). En el periodo neonatal esta hipocalcemia, está relacionada con varios factores (LEGIDO,1984; KLIEGMAN,1987): cese brusco del flujo materno-fetal de Ca; importante aposición de minerales en el esqueleto del RN, secundaria a un aumento de la velocidad de remodelamiento óseo; situación transitoria de hipoparatiroidismo fetal; inmadurez transitoria de las enzimas hidroxilantes de la vitamina D_3; hiperactividad secretoria de la calcitonina; situación de hipomagnesemia. En situaciones patológicas, la dificultad en el aporte de Ca (recordemos que en el feto el 80% de la mineralización ósea se produce en el tercer trimestre de la gestación (TSANG,1979; ROYER,1981; LINDROTH,1986), lo cual influiria de forma decisiva en el parto pretérmino en un momento donde los requirimientos son mayores y la intervención de otros mecanismos: inmadurez

paratiroidea acentuada o resistencia periférica a la PTH en niños prematuros (KRUSE, 1987a). hiperfosforemia e hipercalcitonemia secundaria a la asfixia perinatal, disminución de HG en hijos de madre diabética (KLIEGMAN, 1987) , que pueden contribuir a agravar dicha hipocalcemia.

Una situación especial, es la que se da en los RN alimentados con leche humana, ya que ésta solo contiene 35 mg de Ca y 15 mg de P por dl. Un ingesta de 80 ml por kg es insuficiente para una mineralización ósea mantenida al ritmo de la existente en la vida intrauterina (LINDROTH, 1986). Aun más, la absorción de Ca y P, cuando hay un aporte óptimo de vitamina D, es solo del 60-90% , respectivamente (SENTERRE ,1982,1985).

La mayoria de las fórmulas de iniciación para los RN a término, contienen una cantidad de Ca, alrededor de 60 mg/dl, una vez que han sido reconstituidas. Con estas cantidades, dificilmente se hace frente a las necesidades reales del pretérmino. Pero al analizar las existentes en fórmulas especiales para pretérminos, las cifras , aunque son más altas, 80 mg/dl,siguen siendo insuficientes (MOYA, 1987). Es por ello, que la idea de los suplementos se ha generalizado recientemente, en razon de que la retención cálcica del pretérmino está en relación con la ingesta de de Ca, preconizando que estos RN retendrian linealmente el Ca segun los incrementos orales. con la corrección del Ca endógeno (DAY ,1975; BARLTROP ,1975 ;EHRENKRANZ,1985) y con el estado de replección de vitamina D (DELVIN,1986). En ausencia de esta vitamina la absorción de Ca por el prematuro es débil, produciendose un aumento neto con su

administración (SENTERRE,1985,1987). Otros factores que influyen en su absorción en el recién nacido son: calidad de las grasas, presencia de lactosa, aporte de P y edad gestacional y postnatal.

El COMITE DE NUTRICION DE LA ACADEMIA AMERICANA DE PEDIATRIA (1985), ha preconizado recientemente para el Ca cifras de 200-250 mg/kg/d y para el P de 110-125 mg/kg/d, para conseguir un óptimo crecimiento y evitar la osteopenia.

La realidad es que, desde los comienzos de esta década, se conocia que el pretérmino recibia postnatalmente menos Ca y seguramente menos P, del que requiere para su óptimo crecimiento. Como hemos visto, no existen fórmulas que aporten estas cantidades y ello ha hecho que el contenido mineral del hueso en esto niños sea anormalmente bajo, com han demostrado técnicas de muy reciente incorporación, como la absorciometria fotónica (MIMOUNI, 1987), que ha definido perfectamente el llamado raquitismo u osteopenia del prematuro (BOSLEY ,1980; KOO, 1982; LINDROTH ,1986; TSANG ,1987), con evidencia radiológica de huesos deslustrados en pretérminos. Los cambios óseos son más evidentes en los pretérminos muy pequeños, que en la actualidad se mantienen vivos en las unidades de vigilancia intensiva neonatal. Algunos prematuros con osteopenia, pueden llegar a presentar fracturas y otros signos clínicos y radiológicos de raquitismo flórido.

Por tanto, el objetivo primordial de la nutrición en esta población de pretérminos, será conseguir un crecimiento cuali y cuantitativo, análogo al intrauterino

en esa edad gestacional, lo cual no ocurre, ya que la ganancia de peso en las dos primeras semanas postnatales. es mínimo.

En el caso concreto del Ca y P, no se conoce además, la cantidad que a diario incorpora el feto durante la vida intrauterina. En el momento actual, las recomendaciones sobre la ingesta diaria de Ca y P, se basan en el creciente contenido mineral total medido en diversos fetos segun la edad gestacional. El trabajo pionero y más difundido en este sentido, fue el de SHAW (1973;1976), al que han seguido los de FORBES (1976), ZIEGLER (1981), GREER y TSANG (1985).

En cuanto al P, los niveles séricos tienden generalmente a disminuir durante el embarazo, sobre todo en la primera mitad (OLANTUMBOSUM ,1975), volviendo a niveles normales durante la segunda mitad de gestación, no encontrándose diferencias en las concentraciones plasmáticas de P de la gestante y adulto normal (GRAY, 1977).

En el feto, el P se va acumulando desde los 2 gr a los 5 meses, a los 18 gr en el momento del nacimiento, depositándose alrededor de los 2/3 en el tercer trimestre (SCHEDEWIE ,1980), encontrándose el feto con respecto a la madre en situación de hiperfosfatemia.

El P fetal depende, sobre todo, del transporte activo via placentaria (ROYER ,1981) (80 mg/kg/día, al final del embarazo, DAVID,1987), demostrándose en la sangre de cordón en el momento del nacimiento una elevación del mismo (55-60

mg/l) en el recién nacido a término.

En las horas siguientes al nacimiento, se asiste a un aumento progresivo de la fosfatemia (70-80 mg/l), siendo en el tercer día de vida, más elevados que en la gestante y que en el adulto normal. El riñón fetal, puede tratar las cargas de P "eficazmente", desencadenando respuestas fosfatúricas compensadoras (ROYER ,1981). En general, su metabolismo muestra una evolución similar a la descrita en el metabolismo perinatal del Ca.

Es preciso comentar una serie de situaciones con relación al metabolismo del P en la época neonatal:

-El sindrome de deficiencia de P encontrado en prematuros alimentados con leche humana, ha sido referido como paradigma del papel del P en el metabolismo óseo de esta población. En este sentido, son clásicos los estudios de BROOKE y LUCAS (1985), GREER y TSANG (1985) y recientemente ROWE y HAREY (1987) (FIG.5).

-La ingestión de biberones con leche de vaca, fórmulas a base de soja y cereales ricos en P, representan cargas extraordinariamente elevadas en P, que pueden ser causa de hipofosfatemia. Ésta es tambien causa bien conocida de hipocalcemia, probablemente por aumentos del depósito de Ca en el hueso, disminuir la acción de la PTH e incrementar la de Calcitonina. También se ha comprobado que la hipocalcemia en lactantes pequeños "enfermos", como los que sufren asfixia perinatal, prematuros e hijos de madre diabética, guardan en parte relación con las cargas endógenas de P, resultantes de la desintegración del glucógeno y proteínas (HEANEY ,1971; ROOT,1976).

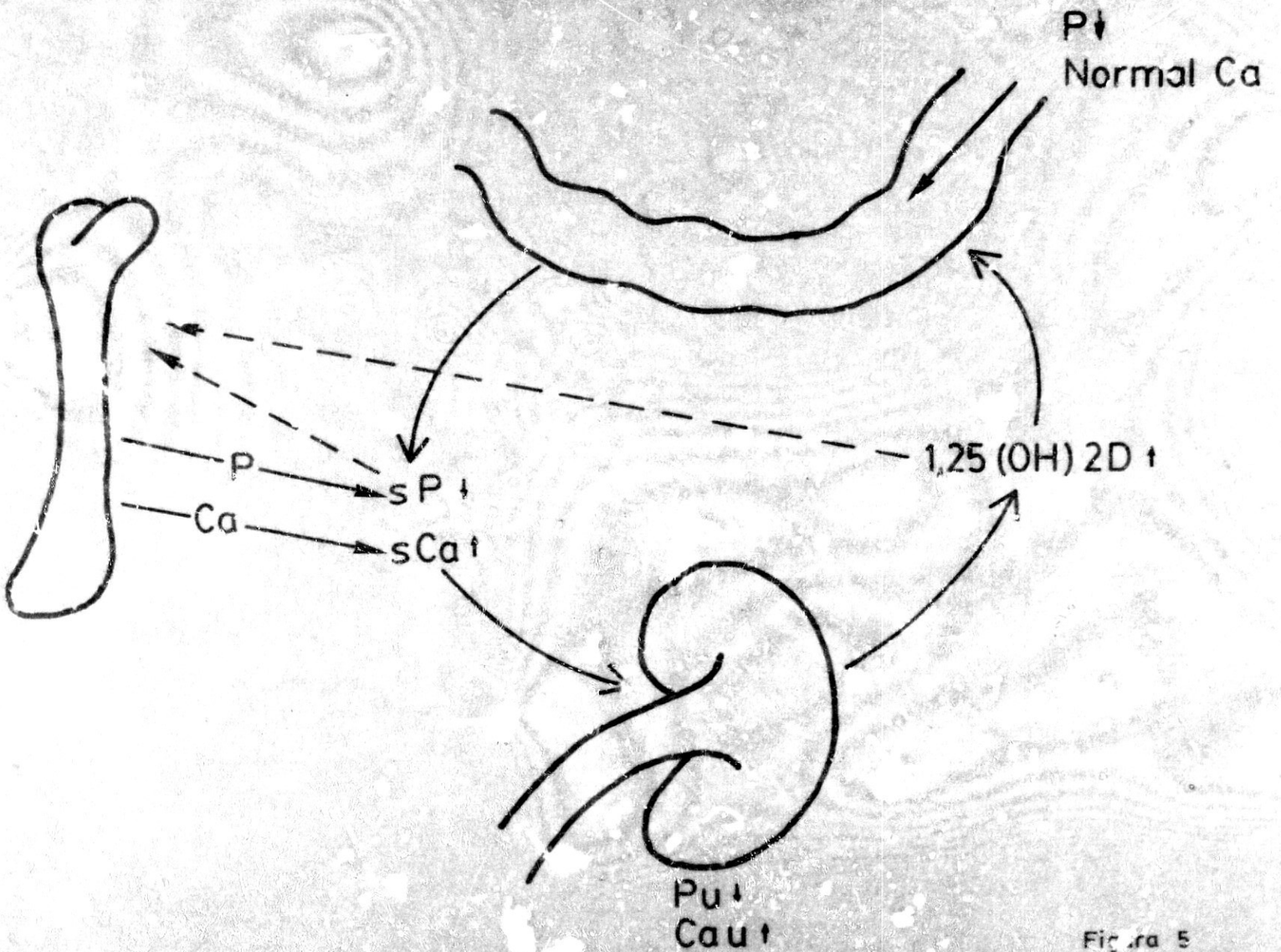


Figure 5

En resumen, en el metabolismo fosfocálcico en el periodo perinatal, intervienen principalmente 4 factores:

1).-Metabolismo mineral de la madre, con sus componentes nutricionales y su regulación endocrina propia.

2).-La placenta, que permite: paso de metabolitos de la vitamina D; transporte bidireccional de Ca y P, con un mecanismo activo, que mantiene la calcemia fetal (10-20 mg/L) por encima de la calcemia materna, estableciendose así las condiciones óptimas para la mineralización ósea.

3).-Regulación endocrina propia del feto, que por lo que respecta a la PTH y a la calcitonina, parece disponer pronto de la posibilidad de elaborar estas hormonas y de regular su secreción, de manera que responda a la hipercalcemia mantenida con disminución de la actividad de la PTH y aumento de la de calcitonina, todo lo cual favorece la mineralización ósea.

4).-El RN a término, posee una maduración enzimática y funcional suficientes para equilibrar por si solo y desde el momento del nacimiento el metabolismo fosfocálcico. Las desviaciones de la normalidad que manifiestan son transitorias y en general limitadas al periodo neonatal precoz. No ocurre así en el preterminal, donde se han descrito cuadros de déficit, muy en relación con los aportes que se le proporciona en la dieta.

3.-PARATHORMONA

3.1.- ESTRUCTURA QUIMICA Y BIOSINTESIS.

La estructura molecular de la PTH humana, es la de una cadena única polipeptídica, de 9.500 daltons de peso molecular (pm), que contiene 84 aminoácidos, con la

característica que posee a la serina, formando el grupo NH_2 terminal y a la glicina, el grupo carboxiterminal (KEUTMAN, 1981). La parte media de la cadena es rica en prolina, siendo en esta zona donde existen las mayores diferencias en la composición de los diferentes PTH animales. La parte crítica, para la actividad mínima biológica, está en la secuencia 1-27, de la porción NH_2 terminal, mientras que la cadena 1-34, posee una actividad biológica tan importante, como la secuencia completa 1-84 (BROADUS , 1981).

La hormona se biosintetiza en los ribosomas de las células principales de las glándulas paratiroides, primero como un polipéptido de 115 aminoácidos, llamado PRE-PRO-PTH (KEMPER 1976; HABENER ,1976). En el retículo endoplásmico rugoso, una cadena polipéptidica de 25 aminoácidos, se extrae del terminal NH_2, convirtiendose en PRO-PTH, que tiene además , una cadena de 6 aminoacidos, unido a la terminal PTH-NH_2 (HAMILTON,1974; HABENER ,1981). La actividad biológica de la PRO-PTH es marcadamente reducida en relación a la PTH, a causa del bloqueo del NH_2 por una hexapeptidasa (HABENER ,1978). Asimismo, no es secretada por la glándula paratiroides, funcionando al parecer, como un intermediario en la biosíntesis de la PTH (COHN y McGREGOR,1981).

En el paso siguiente, la PRO-PTH, es degradada a PTH, en el aparato de Golgi, por medio de la actividad proteolítica. La mayor parte de la PTH, se almacena en los gránulos secretores, pero alguna de la PTH recién producida, es inmediatamente secretada hacia la circulación (McGREGOR,1975). En algunas circunstancias, especialmente

en la hipercalcemia, la PTH puede degradarse intracelularmente (HANLEY, 1978), creyendose que esta acción regularia la cantidad de hormona almacenada.

El mayor regulador celular de la secreción de PTH, es el adenosín monofosfato cíclico (AMPc); su elevación o disminución lleva consigo un aumento o disminución, respectivamente, de la hormona. Agentes que activan la adenilciclasa como, catecolaminas, B-adrenérgicos, secretina y prostaglandina E y otros que inhiben las fosfodiesterasas nucleótido cíclicas, estimulan la liberación de PTH (AUERBACH,1981; BROWN,1977). La inhibición de la acumulación de AMPc intracelular, por agentes como el calcio y la prostaglandina F_{2a} traen consigo una secreción disminuida de la PTH (CARO ,1978). No se conoce donde el AMPc, ejerce su influencia sobre la cadena metabólica de la PTH, ni que otros factores, podrian estar envueltos en su secreción. Sin embargo, está claro que los efectos del Ca están mediatizados también, por otros mecanismos (ALON ,1985).

3.2. SECRECION Y REGULACION DE LA PARATHORMONA.

La secreción de PTH, presenta un ritmo nictameral, con un máximo de concentración plasmática, que se produce entre las dos y las cuatro de la madrugada (HABENER, 1981).

Entre las sustancias que intervienen en la secreción y regulación de la PTH, destacan:

1.-CALCIO: es el principal regulador de la secreción de PTH, fundamentalmente la concentración de calcio iónico y su normal rango sérico (BLUM,1974; BROWN ,1982) actuando

a través de un mecanismo de retroalimentación negativo o "feed-back" negativo (FISHER , 1974). El sitio exacto de la acción del calcio se desconoce, pero parece ser que se produce en el estado de fusión de los gránulos de almacenaje con la membrana celular principal (ALON, 1985).

2.-FOSFORO: No tiene un efecto directo sobre la secreción de PTH, parece ejercer su influencia por medio de las alteraciones recíprocas en las concentraciones de calcio ionizado en el suero (FISHER ,1974).

3.-MAGNESIO: Siempre que las concentraciones de Ca permanezcan constantes, las alteraciones de este ión afectan a la secreción de PTH (TARGOGOVNICK , 1971; ANAST,1976).

4.-METABOLITOS DE LA VITAMINA D: MAYER (1981) sugiere que una baja concentración de 24,25 dehidroxicolecalciferol, puede originar una hipersecreción de PTH. Sin embargo, esta hipótesis necesita ser confirmada.

Además de la PTH, las células principales, también sintetizan una glicoproteína acídica, llamada proteína secretoria paratiroidea (PSP) (KEMPER ,1974; MAJZOUB, 1979). Se almacena junto a la PTH, en los gránulos secretores y se segrega con ella en una proporción 6:1. Su secreción está influida asismismo, por las concentraciones de calcio y magnesio en el suero. Su función biológica se desconoce; aunque se piensa que es un portador de proteínas, análogo en función a la neurofisina , que está involucrada en la secreción de vasopresina y oxitocina.

3.3.METABOLISMO DE LA HORMONA PARATIROIDEA.

3.3.1. PARATHORMONA CIRCULANTE.

En 1968, BERSON y YALOW, comunicaron que la hormona paratiroidea en el plasma humano era heterogenea y diferia inmunoquimicamente del material extraido de las glándulas paratiroideas humanas. Posteriores investigaciones han evidenciado la presencia de varias secuencias de la molécula de PTH circulante (DRAPER ,1982), que cumplen estas características:

-PTH intacta o nativa: sometida a una rápida degradación periférica, vida media de minutos y que representa solo un 10% de la inmunoreactividad circulante.

-Fragmentos aminoterminales, constituyen otro 10%, son biologicamente activos y desaparecen de la circulación en minutos (t1/2=5 minutos) (BROADUS ,1981).

-Fragmentos carboxiterminales, inactivos, pero de larga vida media (t1/2:60 minutos), constituyen el principal fragmento presente en la circulación periférica, 80% restánte (MARTIN ,1979 ;BROADUS ,1981).

El producto mayor secretado por la glándula paratiroides, es la PTH, 1-84 moleculas. Dado los datos contrapuestos, no está claro que estas glándulas segreguen fragmentos polipeptídicos y si lo hacen, bajo que circunstancias. Sin embargo, parece que en estados de hipercalcemia, las glándulas también segregan fragmentos carboxiterminales, biologicamente inactivos (HANLEY,1978; MAYER ,1979). La mayoria de los pequeños péptidos en la circulación periférica son, sin embargo, productos de degradación periférica de la PTH, especialmente en hígado y

riñones (MARTIN ,1979).

Desde la introducción del radioinmunoanálisis (RIA) de PTH, han sido múltiples los ensayos realizados y dispares sus correlaciones con los parámetros clínico-biológicos (BERSON , 1966; EUROPEAN PTH STUDY GROUP, 1978).

La incorporación de un RIA frente la región media de la molécula de PTH (PTH-MM) (PTH 44-68), ha sido considerado por algunos autores como un avance, refiriendo que dicho método, es rápido, sensible y específico para el estudio de las alteraciones funcionales de la glándula paratiroides (ROOS ,1981; MALLETTE ,1982;JUPPNER, 1983; AGUILAR,1987).

El elemento clave de los RIAs para PTH-MM, parece ser el antisuero usado. Éste no solo debe poseer una alta afinidad, sino que también ha de ser específico para la región M de la mólecula PTH nativa (PTH 1-84) (ROOS,1981; MALLETTE ,1981). La explicación de estos requisitos, aún no están aclarados. De hecho el fenómeno , es en cierto modo, paradójico, puesto que la actividad biológica de la molécula de PTH, reside en los 34 primeros aminoácidos y no se conoce actividad biológica alguna de los fragmentos M. No obstante, los niveles séricos de estos fragmentos, reflejan generalmente, la tasa de secreción de PTH (ROOS,1981; MALLETTE ,1982; AGUILAR ,1987).

3.3.2.DEGRADACION DE LA PARATHORMONA.

Estudios realizados en experimentación animal, demuestran la existencia de una fragmentación de la molécula de PTH en sus porciones carboxi y aminoterminal,

creyéndose, que es éste realmente el proceso durante el cual la PTH ejerce su efecto sobre las células tubulares renales, siendo diferente el índice de filtración glomerular (MARTIN 1979). En el hígado, considerado como factor menos importante en el metabolismo periférico de la PTH, se produce un proceso de degradación similar en las células de Kupffer (BROADUS ,1981; SLATOPOLSKY, 1982). El lugar inicial de partida ha sido localizado en la unión de los aminoácidos 33-37. En estas dos localizaciones, el índice de producción de fragmentos, depende de la concentración de calcio; cuanto más alto es la concentración del ión, más bajo es el índice de fragmentación. Se desconoce la participación del tejido oseo en este mecanismo.

Los fragmentos aminoterminales, se absorben por el hueso y riñón. Algunos investigadores han encontrado que en el hueso, los fragmentos aminoterminales, ejercen efectos biológicos más potentes que la mólecula intacta 1-84 (MARTIN , 1979).

3.3.3.ELIMINACION DE LA PARATHORMONA.

Es el riñon el órgano más importante en el escalón final del metabolismo periférico de la hormona. Los fragmentos carboxiterminales, se eliminan por filtración glomerular, al igual que cantidades muy pequeñas y poco importantes de moléculas intactas PTH 1-84 y de fragmentos aminoterminales (HABENER ,1976; BROADUS ,1981).

3.4.-EFECTOS FISIOLOGICOS DE LA PARATHORMONA.

La PTH es el factor más importante en la concentración

de calcio extracelular (RAISZ ,1983), debido al efecto directo de la hormona sobre el hueso y riñón e indirecto sobre el conducto gastrointestinal. Así, actua sobre la resorción cálcica de hueso y la absorción de calcio a nivel de los túbulos renales y por medio de 1,25 $(OH)_2D_3$, a través del intestino delgado, reflejandose su efecto total, en un aumento de la concentración de calcio sérico.

3.4.1.-HUESO: La PTH es un factor importante en la regulación, tanto de la matriz orgánica, como del crecimiento mineral, "turnover" y metabolismo óseo.

La acción de la PTH, sobre el hueso es bifásico (BROADUS ,1981): a) En una primera fase, la hormona estimula los osteocitos y los osteoclastos, aumentando la osteolisis y reabsorción ósea. Realiza el proceso de conversión de los fagocitos en osteoclastos y posiblemente prolonga la vida media de los ya existentes. Inhibe la función osteoblástica, bloqueando la formación de colágeno por el hueso. b) En una segunda fase, hay una estimulación osteoblástica con nueva síntesis de colágeno y mineralización (RASMUSEN ,1974). Todos estos efectos combinados, tienen como resultado un proceso de remodelación.

Con el efecto primero de la PTH sobre el hueso, hay un aumento de la concentración de calcio en el suero, sín que haya elevación de hidroxiprolina en orina. Tras 12 horas de exposición a la PTH, la movilización de calcio del hueso, va acompañada de un aumento de la hidroxiprolinuria urinaria, lo que refleja la formación de nuevos osteoclastos y el aumento de la resorción ósea

(BROADUS,1981).

Asimismo, la acción de la PTH sobre el hueso, va acompañada de una liberación de fosfatos y de otros constituyentes minerales del hueso.

3.4.2.-RIÑON: La PTH tiene efectos múltiples sobre los riñones.

Aunque la administración de PTH bovino purificado, no causa cambios en el flujo renal plasmático y en el filtrado glomerular renal (GFR) (AGUS ,1973), se han encontrado receptores de la hormona en los glomérulos (SRAER ,1978) y se ha demostrado que la hormona afecta al coeficiente de ultrafiltración en cierta medida (ICHIKAWA, 1978).

El efecto último de la PTH sobre el calcio renal es la hipocalciuria. En el túbulo contorneado proximal inhibe la reabsorción de sodio, produciendo una reducción isotónica de la reabsorción de calcio y fosfato monohidrato (WEN ,1974). En el túbulo contorneado distal, la PTH aumenta la reabsorción de calcio, magnesio, sodio e hidrogeniones y disminuye la de potasio y fosfato monohidrato (SUTTON ,1976; ALON ,1985).

Asimismo es un agente bicarbonatúrico. El efecto sobre el bicarbonato se ejerce en los túbulos proximales y probablemente no se mediatiza a través de la inhibición de la anhidrasa carbónica (GARG ,1975). La bicarbonaturia, en si misma, aumenta la excreción de fosfato, cambiando la acidez intratubular. Es posible que parte de la fosfaturia inducida por la PTH, este causada por su efecto sobre la

secreción de ión hidrógeno (DENIS , 1981). Aunque estos últimos mecanismos no están del todo aclarados.

Se considera que la PTH, es un regulador importante del paso final en la activación de la vitamina D. La hormona estimula la conversión de 25, hidroxivitamina D_3, en 1,25, dihidroxivitamina D_3, en la mitocondria tubular (HAUSSLER ,1975).

3.4.3-TRACTO GASTROINTESTINAL.:Sobre esta zona la PTH actua de dos maneras diferentes, de manera directa a nivel de la propia célula intestinal, aumentando el transporte activo de calcio o bién, de manera indirecta, aumentando la síntesis de 1,25 dihidroxivitamina D_3 (ALON , 1985).

3.5..MECANISMO DE ACCION DE LA PTH.

Del mismo modo que otras hormonas péptidicas, la acción de la PTH, se considera iniciada por la unión de la misma a receptores específicos en la superficie de la membrana celular de los tejidos efectores. La caracterización de los receptores de la PTH ha presentado dificultades (BREWER ,1970: GOLTZMAN,1981). Muchas pruebas sugieren que casi todos los efectos de la PTH, están mediados por el 3,5 monofosfato cíclico de adenosina (3,5 AMPc) (RASMUSEN ,1974). La estimulación directa de la adenil ciclasa en respuesta a la PTH, ha sido demostrada en membranas celulares preparadas con los principales tejidos efectores (MAJESKA ,1980).

La adenilciclasa, sensible a la PTH, se ha localizado "in vitro" en la corteza renal (GOLTZMAN ,1981) y dentro del nefrón en el túbulo contorneado proximal, en la porción

cortical del asa de Henle, en el túbulo contorneado distal y en la primera porción ramificada del túbulo colector.

La multiplicidad de sitios de generación del AMPc por la PTH, es compatible con la aparente modificación del transporte de soluto en las porciones proximales (inhibición de la reabsorción de fosfatos) y distales (aumento de la reabsorción de calcio) del nefrón.

La secuencia de hechos que se producen posteriormente a la generación del AMPc, mediado por la PTH en el riñón y que culmina eventualmente en el transporte de iones, es desconocida. Se ha sugerido (GOLTZMAN ,1981), en analogia con la acción del AMPc en otros tejidos, que una proteinquinasa se activaria por la combinación del nucleótido con una subunidad reguladora del enzima que libere el componente catalítico. Este resto catalítico que ya no esta inhibido, es capaz entonces de fosforilar a una o más proteínas celulares específicas, necesarias para las acciones intracelulares mediadas por la PTH.

Las acciones secuenciales mediadas por la PTH que se producen en el hueso, son las siguientes: un primer efecto (CHASE ,1967), ejercido principalmente sobre la reabsorción del mineral óseo, está probablemente mediada por la via de la osteolisis osteoclástica. Un efecto posterior, seria el de la remodelación ósea, involucrando en su desarrollo a osteoclastos y también a osteoblastos, pues hay nueva síntesis de hueso. Por consiguiente, si el AMPc es el único mediador de los efectos de la PTH debe bien directa o indirectamente:

-Estimular la actividad de los osteocitos existentes o recién formados en las fases tempranas o tardias de la acción de la PTH.

-Estimular la diferenciación y proliferación celular para explicar el aumento de los "pool" de los osteoclastos y osteoblastos que se producen en la segunda fase.

-Mediar, quizas indirectamente, en la destrucción de la matriz y del mineral óseo (GOLTZMAN ,1981).

Se ha propuesto al calcio, como un "segundo mensajero adicional", para la acción de la hormona peptídica (HILLMAN,1977; POSILLICO ,1987). Hay algunas pruebas de que el calcio, pueda ser mediador de la acción de la PTH en el hueso, asi, se ha demostrado que:

-La PTH "in vitro" aumenta la acumulación del AMPc en las células óseas y el transporte de calcio a éstas (RASMUSEN ,1974).

-Una rápida hipocalcemia precede a la hipercalcemia consecutiva a la infusión "in vitro" de PTH a animales (GOLTZMAN ,1981).

Por su parte, el calcio, puede también influir en los niveles netos de AMPc, alterando la fosfodiesterasa.

Respecto al riñón, la infusión de calcio afecta a la depuración de fosfato (CHASE ,1967; BIKLE ,1983), imitando asi el efecto de la PTH sobre el riñón.

Varios estudios en animales han demostrado que los efectos generales de la PTH en el hueso y en cierto modo, en el riñón, se determina por la deficiencia de vitamina D.

La movilización del calcio inducida por la PTH, desde el hueso, puede estar muy disminuida o ausente y la fosfaturia renal deprimida (GOLTZMAN ,1981), si hay una deficiencia de vitamina D. La base molecular de la interacción de la vitamina D, con la PTH , es desconocida (SHILS ,1980; SILVER ,1986).

3.6.-Caracteristicas de la PTH en el periodo perinatal

En la gestación normal , esta descrito con pocas excepciones (DENT ,1975; WHITEHEAD ,1981), una secreción aumentada de PTH, "hiperparatiroidismo fisiológico", sobre todo en el tercer trimestre, llegando a niveles de hasta el 50% de los previos al embarazo, (PITKIN, 1979), que seria un ajuste lógico en la homeostasis materna, para contrarrestar los factores que tienden a disminuir el Ca sérico, en una situación de expansión del espacio extracelular, aumento de la excreción y transferencia de Ca al feto (PITKIN ,1983). A su vez el aumento de la PTH, favoreceria la síntesis de 1,25, dihidroxicolecalciferol (MARTINEZ ,1988), actuando las dos sinergicamente para satisfacer las demandas cálcicas en la gestación (KUMAR,1979; GRAY,1.981). Los fetos actuarian de parásitos y se beneficiarian de los cambios histológicos que se traducen en una desmineralización del hueso materno por medio de una disminución de la formación de matriz ósea y un incremento en la resorción de la ya formada. El mineral así liberado, permitiria mantener un flujo adecuado de Ca al feto, evitando las graves repercusiones que sobre el mismo pudiese ocasionar un periodo prolongado de hipocalcemia.

Sin embargo, está en discusión el tipo y extensión de este aumento, existiendo discrepancias sobre la función paratiroidea de la gestante. Así, no todos los autores refieren esta elevación de la PTH durante la gestación, describiendo unos valores normales (CRUISKSHAND ,1979; MARTINEZ ,1988) o en algunos casos tan solo ligeramente superiores (MARTINEZ ,1985).

En los embriones humanos se puede detectar respuesta a las paratiroides desde la 12-13 semana de gestación. Existe evidencia histológica, que en la mitad del embarazo, las paratiroides fetales, ya tienen las características de glándulas adultas activas (TSANG,1983).

"In útero", la elevada concentración de Ca en la sangre fetal, probablemente sirva para amortiguar la actividad paratiroidea fetal, impidiendo así la resorción ósea (TSANG ,1977; DURAN ,1982). Estudios realizados en nuestro pais por VILLANUEVA et al. (1987), observan niveles equivalentes de PTH tanto en la madre como en el feto a término, que puede indicar a diferencia de lo descrito por los autores anteriores, que la síntesis por parte del feto no está suprimida a pesar de los elevados niveles de Ca circulante. Ésto puede sugerir que la sensibilidad de las paratiroides fetales a la variación de la calcemia aparece en la época postnatal(KEATON, 1978;WHISETT,1980; COOPER, 1985).

En teoria, segun los datos aportados por diversas fuentes (GAREL ,1972; NORTHROP ,1979; ROYER ,1981), la PTH no cruza la placenta. Pero si se admite que los niveles de PTH maternos y cordón umbilical no son significamente

diferentes (TSANG ,1973; PITKIN , 1980), resulta paradójico la aparente incapacidad fetal para frener la liberación de PTH en respuesta a la hipercalcemia, que preside las últimás fases de la vida intrauterina. Otra posible explicación sugerida por SCHEDEWIE (1979), es que el feto posee un mecanismo de secreción de PTH "no supresible", en el que otros factores , además del Ca, afectarian la liberación de la hormona. Por último, es posible que el sistema de retroalimentación negativo, que regula la secreción de PTH en función del nivel de Ca, opera con distinto umbral en el feto expuesto a una prolongada hipercalcemia, de forma que la supresión de la secreción de la PTH durante la vida intrauterina, requiere niveles de Ca mayores que tras el nacimiento (PITKIN,1980).

En el periodo neonatal los valores de PTH son bajos o normales con relación a los niveles del adulto (ROOT,1974). Al disminuir espontaneamente la calcemia tras el nacimiento, los lactante a término son capaces de aumentar los valores séricos de PTH, a partir de las 48-72 horas de vidas (TSANG,1977). Concordando con otras descripciones (TSANG, 1973; HILMAN ,1977; RUBINAL ,1984), dicho incremento coincide con el descenso, tanto del calcio total como del calcio iónico, que se produce en el neonato en este momento y en relación directa con el aumento de los niveles de 1,25 $(OH)_2D_3$ (VILLANUEVA,1987).

En los pretérminos, se ha descrito una menor y más tardia respuesta de la PTH a la hipocalcemia neonatal (TSANG ,1977; NOGUCHI ,1980) o un retraso en el desarrollo del receptor renal a la respuesta a la PTH (MALLET ,1978; KRUSE, 1987a).

No obstante, independiente de la edad gestacional y la calcemia, las glándulas paratiroides del RN pueden responder con niveles altos de PTH, en respuesta a la asfixia, aun durante los primeros dias de vida (SCHEDEWIE, 1980) aunque no todos los trabajos están de acuerdo en este punto (MOLIZ ,1984).

Es probable que otros factores, tales como la estimulación B-adrenérgica y la tensión, puedan incrementar la liberación de PTH, por un mecanismo presente incluso en el prematuro. El hallazgo anatómico de una densa red de terminaciones simpáticas rodeando las paratiroides, está a favor de esta hipótesis (SCHEDEWIE ,1980).

4.OSTEOCALCINA (BGP).

La osteocalcina, conocida desde hace algo más de una década (HAUSCHKA ,1975; PRICE ,1976a), constituye el principal componente de las proteínas óseas no colágenas (HAUSCHKA ,1978). Es sintetizada por los osteoblastos, en los huesos y en la dentina, fundamentalmente (DIMUZIO,,1983; BERESFORD, 1984), parte se incorpora a la matriz ósea extracelular y parte pasa directamente al plasma.

4.1.Estructura

Es una proteína de pequeño tamaño, con un peso molecular de 6.000 daltons, compuesta por 49 aminaoácidos (Fig.6), muy acídica, con un punto isoelectrico de 4.0 y una carga negativa neta en un pH de 8 a 9 (POSER ,1979).

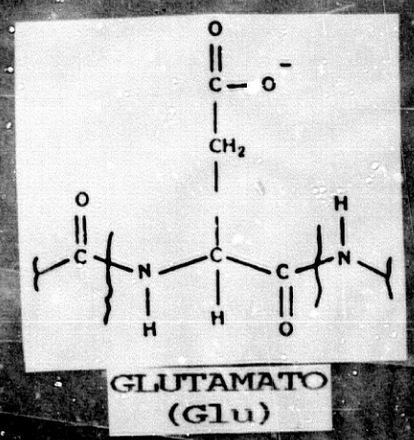
Su principal característica estructural se la confiere

la presencia de tres ligandos bidentados de ácido g-carboxiglutámico (Gla), por lo que también se le denomina BGP (bone gla protein), que le proporciona la más importante de sus propiedades: la capacidad de unirse intensamente a la hidroxiapatita (PRICE ,1983) y al calcio del hueso, siendo ésta última asociación más debil. El Gla procede de la g-carboxilación postraduccional vitamino K-dependiente, de los residuos de ácido glútamico (glu) de la BGP (FIG 7)(PRICE ,1983). La distancia entre los restos de gla, en las posiciones 17, 21 y 24, cuando la osteocalcina adopta su estructura secundaria alfa helicoidal, es de 5.4 Amstrongs (A) entre sí, semejante a la distancia interatómica entre los calcios de la hidroxapatita, 5.45 A (HAUSCHKA ,1985).

4.2.-Síntesis

La BGP se sintetiza en el hueso (NISHIMOTO ,1979), fundamentalmente en los osteoblastos (POSER ,1980; MAJESKA, 1980) y en los odontoblastos de los dientes (DIMUZIO, 1983), como un precursor, al que podriamos denominar pro-osteocalcina de mayor peso molecular que ésta. Este precursor necesita una señal o secuencia guia para liberar la BGP. Algunos autores señalan que el metabolito activo de la vitamina D, la 1,25, dihidroxivitamina D_3, podria estar implicado en la liberación de BGP, a partir de su precursor (LIAN 1982), aunque no está claro en que punto de la ruta biosintética (FIG 8)(LIAN ,1985).

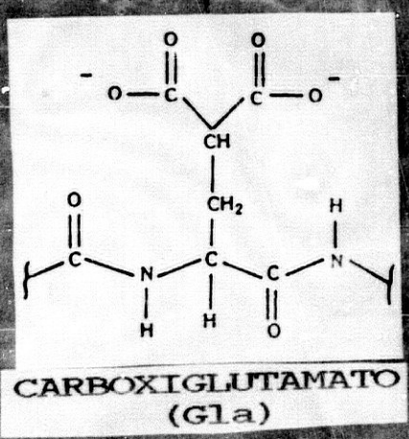
Este hecho ha sido demostrado , "in vitro" en cultivo de células de osteosarcoma de rata (PRICE, 1980a; PAN, 1984) y de células óseas humanas con fenotipo



GLUTAMATO
(Glu)

CO_2

Vitamina K



CARBOXIGLUTAMATO
(Gla)

Figura 7.- Gamma-carboxilación, vitamino K dependiente, de los residuos de Glu de la osteocalcina. La estructura del Gla es la de un ligando bidentado, con una gran capacidad de unión al calcio.

osteoblástico (BERESFORD ,1984) y en experimentación animal (PRICE ,1981a), existiendo un gran paralelismo entre la respuesta a la 1,25 $(OH)_2$ D_3 de la proteína intestinal ligadora de calcio y la BGP, en cuanto a la amplitud y duración, lo que parece indicar que la elevación de los niveles de BGP es, como la elevación de la proteína ligadora de calcio, parte de la respuesta fisiológica a la vitamina D. "In vivo" (GUNDBERG, 1983a; ZERWEKN ,1985), se han comprobado importantes subidas de los niveles séricos de BGP en pacientes con raquitismo y osteoporosis, trás tratamiento con 1,25 $(OH)_2D_3$, siendo su efecto dosis-dependiente. Se ha observado que la 24,25 $(OH)_2D_3$ no afecta a la síntesis de BGP e igualmente que los corticoides y la parathormona, no tienen "in vitro" efecto sobre la producción basal de BGP, pero ambos antagonizan el efecto estimulador de la 1,25 $(OH)_2$ D_3 (BERESFORD ,1984).

Sin embargo, la síntesis de BGP, es posible en ausencia de esta hormona (LIAN ,1982), ya que se ha demostrado en experimentación animal, niveles apreciables de BGP en ausencia de dicha vitamina, por lo que parece probable que la osteocalcina desempeñe una función en el metabolismo del hueso, (independiente de la vitamina D en relación a la síntesis de BGP), que seria acelerar la acción BGP normal en el hueso para ajustar el metabolismo óseo a situaciones tales como, aportes deficitarios de calcio (PRICE ,1985).

4.3.Metabolismo.

La BGP se encuentra mayoritariamente en el hueso, concretamente en la matriz ósea extracelular (HAUSCHKA,

1975; PRICE ,1976a), pero también aparece, aunque en muy pequeñas concentraciones en el plasma sanguineo (PRICE, 1980b).

La BGP presente en el suero es idéntica a la del hueso. En principio se pensó que esta BGP sérica (BGPs), podria proceder de la resorción ósea. Sin embargo, experiencias llevadas a cabo en ratas tratadas con warfarina, parecen demostrar que la BGPs procede de la proteína recién sintetizada y que es vertida directamente a la circulación (PRICE ,1981b; PRICE ,1985).

El "turnover" de la BGP en el plasma es muy rápido, como lo indica el hecho de que tres horas después de administrar warfarina a ratas, la BGPs de éstas pierde totalmente la capacidad de unión a la hidroxiapatita. La warfarina antagonista de la vitamina K, inhibe la gamma carboxilación postraduccional de la BGP. El intervalo entre la nueva síntesis de BGP dentro de la célula y su "turnover" completo es solo de tres horas (PRICE ,1983).

Experiencias llevadas a cabo en animales, a los que se administró I -BGP, mostraron que la BGP inyectada desaparece rapidamente del suero con una vida media de 4-5 minutos (PRICE ,1981b) y que la filtración renal es la forma más importante de aclaramiento de esta proteína, lo que se deduce por el acumulo de I -BGP en el riñón. Tambien se comprueba que trás una nefrectomia, los niveles de BGP en suero aumentan 8 veces en 4 horas. El aclaramiento de I -BGP por el hueso es cuantitativamente menos importante que el aclaramiento renal (PRICE ,1981b). A causa de este rápido movimiento de BGP en el suero, un cambio en su

índice de secreción en las células del hueso, deberia reflejarse en niveles alterados de su concentración sérica, en un periodo de pocos minutos (DELMAS, 1982).

El catabolismo de la BGP a oligopéptidos y aminoácidos libres, ocurre probablemente en el riñón y otros tejidos blandos (DE LA PIEDRA ,1987). Puesto que el aminoácido Gla no se metaboliza, su presencia en orina indica el metabolismo de la BGP, asi como de otras proteínas que contienen este aminoácido (SHIMA ,1985). Menos de 0.1% del Gla en orina aparece como BGP intacta (GUNDBERG, 1983a).

4.4.- Función biológica de la BGP.

La localización , abundancia, estructura y alto grado de conservación de la secuencia de BGP en la escala filogenética, hicieron pensar desde su descubrimiento, en la posible importancia de la misma en la fisiologia del hueso. Sin embargo, y debido posiblemente a la complejidad de este tejido y que quedan muchos puntos por esclarecer de su metabolismo, no se ha llegado a conclusiones definitivas sobre el papel fisiológico de la BGP en el metabolismo mineral y en su comportamiento en distintas situaciones.

Se sabe con seguridad que la BGP se sintetiza en los osteoblastos, como ya hemos visto. Un hecho importante es que la BGP aparece en los tejidos calcificados una vez que la fase mineral inicial se ha transformado en hidroxiapatita, ya que no es capaz de unirse al fosfato cálcico amorfo (PRICE ,1983). Una posible función de la BGP, podria ser la de regular la mineralización de los

tejidos calcificados. Se ha demostrado que a través de las moleculas de Gla, se une a la hidroxiapatita inhibiendo su mineralización y cristalización ósea (PRICE ,1976b); PRICE ,1983), a pH y fuerzas iónicas fisiológicas. La cristalización se retrasa más de un dia a una concentración de BGP igual al 2% de la presente en el hueso y con una concentración de fosfato cálcico diez veces superior de la existente en el suero. En las condiciones "in vivo" con una concentración elevada de BGP y unas concentraciones de fosfato y calcio fisiológicas, la cristalización se retrasará durante un tiempo aun mayor.

Otra posible función de la BGP, podria ser la de señal de pérdida de mineral para los tejidos circundantes. La BGP se encuentra unida exclusivamente a la fase mineral, de tal modo que la desmineralización de una región produciria una alta concentración local de BGP. En este sentido, la BGP podria tener un efecto directo como "señal" sobre determinados sistemas celulares (PRICE ,1976a).

La BGP podria constituir la clave del conocimiento de las calcificaciones patológicas de los tejidos blandos. La calcificación de las arterias con la edad o el endurecimiento de las mismas, es consecuencia del depósito de cristales de hidroxiapatita . PRICE (1983), han encontrado Gla en las partes duras de dichas arterias, en concentraciones similares al 60% de las del hueso humano. Asimismo se ha encontrado en calcificaciones renales (LIAN, 1977).

En un interesante trabajo de BERESFORD y cols. (1984), ya mencionado, se demuestra que la producción de BGP en

células humanas óseas con fenotipo osteoblástico es dependiente de la 1,25 $(OH)_2$ D_3. Las curvas dosis-respuesta a este metabolito cubren su rango normal de concentración e indican que la regulación de la síntesis de BGP podría ser una de las funciones fisiológicas de la 1,25 $(OH)_2$ D_3. PRICE (1980b), ya habian propuesto que la BGP podia tener una función de proteína "mensajera" y es posible que todos y/o varios efectos del metabolito activo de la vitamina D sobre el hueso podría estar mediado por esta proteína. Así, el mantenimiento del calcio plasmástico, como se sabe es una de sus principales funciones, y la estimulación de la síntesis de BGP podría ser el mecanismo mediante el cual se regulara la aposición del mineral en el hueso (DE LA PIEDRA ,1987)

Un hecho interesante es que los fibroblastos de la piel humana contienen receptores para la 1,25 $(OH)_2$ D_3. Sin embargo este metabolito de la vitamina D, no es capaz de inducir la síntesis de BGP en cultivo de fibroblastos, lo cual apoya la hipótesis de que la osteocalcina es específica del hueso (BERESFORD ,1984). Otro hecho experimental observado por este autor y que avala el papel mediador de la BGP sobre el metabolismo óseo, es el que, de todos los efectos complejos producidos por los glucocorticoides sobre la síntesis de la matriz ósea y proliferación celular, el más acusado es el de la inhibición de la síntesis de BGP.

Se han observado anomalias óseas en el hueso de ratas tratadas con warfarina durante 8 meses desde el nacimiento (PRICE ,1982).En estos animales se ha observado la completa fusión de la placa de crecimiento óseo con el cese asociado

de todo crecimiento longitudinal. Dado que en las ratas tratadas con warfarina se produce una deficiencia casi total de la BGP ósea, se puede asociar la anomalia esquelética de las ratas con la ausencia de esta proteína. En el animal de experimentación tratado con warfarina, al no haber BGP, precipitaria en mayor proporción la hidroxiapatita, con lo que se produce el exceso de mineralización observado. Estos resultados experimentales no van en contra de la hipótesis sostenida por algunos autores de que la BGP es una posible mediadora de la acción de la 1,25 $(OH)_2D_3$. Si la BGP inhibe la formación del tejido calcificado, podria contribuir a la acción del metabolito de la vitamina D que moviliza el calcio y retarda la mineralización en marcha. Por tanto la inhibición de la cristalización y mineralización ósea, podria se una de sus funciones biológicas (PRICE,1983), acción que dependeria de la concentración de BGP actuando sobre la cinética de la formación inicial y reduciendo el flujo de calcio del suero hacia el hueso, que de lo contrario se incorporaria a la formación ósea (PRICE,1985).

Hay autores que asignan a la BGP un posible papel hormonal, debido a ciertas características de su estructura (POSER ,1980). Existen a este respecto posiciones donde los aminoácidos básicos aparecen en secuencia de pares: 19-20 y 43-44. Este sistema de residuos de aminoácidos básicos se encuentra por ejemplo en la proinsulina. Otro rasgo conservado de la BGP de ternera y humana es, que un residuo de prolina precede inmediatamente a un aminoácido dibásico en posición 18. La secuencia Pro-Lys y Pro-Arg se han identificado como características estructurales esenciales

de varias hormonas peptídicas.

Trabajos muy recientes y de extraordinario interés parecen asignar a la BGP presente en la matriz ósea un papel fundamental en el conjunto de hechos implicados en la resorción del hueso. En primer lugar se ha demostrado "in vitro" que la BGP tiene una actividad quimiotáctica para los monocitos y los macrófagos, precursores de los osteoclastos (MUNDY ,1983; LIAN ,1984). De este modo la BGPs localizada sobre la superficie ósea, podria ser responsable de atraer células a las superficies endoteliales durante el remodelamiento óseo. De hecho cuando se implantan subcutaneamente a ratas normales "partículas de hueso de rata" deficientes en BGP (procedentes de ratas tratadas con warfarina durante 6 semanas), ese implante se reabsorbe un 40% menos que el de partículas óseas procedentes de ratas normales (LIAN,1984). Los implantes de partículas de hueso carentes de BGP provocan en las células de su entorno una respuesta muy reducida comparada con los implantes de partículas óseas normales, respuesta que se puede medir: por una invasión celular disminuida; por un descenso de la formación de células multinucleadas ; por una menor resorción de partículas, cuantificada por parámetros histomorfométricos de resorción o por la cantidad de calcio soluble remanente. Por tanto hay que tener en cuenta que la administración exógena de warfarina a la rata portadora del implante no afecta a la resorción de las "partículas óseas implantadas" normales.

Por tanto, y a modo de resumen, entre todos los

trabajos expuestos sobre el papel fisiológico de la BGP, nos parecen especialmente concluyentes los siguientes (TABLA II):

a) En experimentos animales realizados "in vitro", se ha observado que la BGP inhibe la precipitación de la hidroxiapatita en disoluciones sobresaturadas de calcio y fosfato (PRICE ,1976b); b) la ausencia de BGP en el hueso (en ratas tratadas durante 8 meses con warfarina) provoca un aumento excesivo de mineralización en el mismo (PRICE ,1982), hecho que corrobora "in vivo" el punto anterior, y c) la BGP es necesaria para la resorción ósea, como se deduce de que los implantes de hueso deficientes en BGP no se reabsorben normalmente (LIAN ,1984).

Todo ello parece indicar que la BGP actua en el hueso a dos niveles: a nivel celular facilitando la resorción y a nivel físico-químico evitando un exceso de mineralización.

4.4.1.La osteocalcina sérica como marcador del metabolismo óseo. La formación y la resorción, son los dos hechos básicos implicados en el metabolismo del hueso. Aparte de su posible importante papel en el metabolismo mineral, la BGP esta siendo utilizada como marcador del remodelamiento óseo.

La fosfatasa alcalina y la hidroxiprolina se han utilizado universalmente como marcadores bioquímicos de formación y resorción respectivamente, aunque ambas poseen importantes limitaciones.

Dado que la BGP es sintetizada tanto por el hueso en cultivo, como por células clonales de osteosarcoma con

fenotipo osteoblástico, es posible que su determinación refleje directamente la actividad metabólica de las células osteoblásticas y pueda ser utilizada como marcador específico de formación ósea, con grandes ventajas sobre la fosfatasa alcalina que no procede exclusivamente del hueso (RICO, 1985).

DELMAS (1984a) encuentra en pacientes con osteoporosis una correlación positiva entre los niveles de BGPs y la superficie relativa de osteoide. Los niveles de estos enfermos reflejan, por tanto, grados de formación ósea. En el mismo grupo de pacientes no se observa, sin embargo, correlación entre parámetros histomorfométricos e hidroxiprolina y fosfatasa alcalina. La BGP puede, por tanto, utilizarse como marcador de la actividad osteoblástica en la osteoporosis, con remodelamiento óseo. Muchos autores sostienen la hipótesis de que los niveles de BGPs se pueden utilizar como marcadores de formacion ósea (DELMAS ,1986b; COLE ,1986; LUKERT ,1986).

Sin embargo, la respuesta de la BGP al 1,25,$(OH)_2D_3$ y a los glucocorticoides (BERESFORD ,1984), y esencialmente su rápida respuesta a la calcitonina (DEFTOS, 1982), sugieren que la BGP podria reflejar resorción ósea.

En un reciente trabajo presentado por DE LA PIEDRA (1985a), encontraron una correlación directa de BGPs e hidroxiprolina urinaria en enfermos afectados de hiperparatiroidismo primario, lo cual parece indicar que la BGPs mide en ese caso, el grado de resorción ósea, no correlacionándose, sin embargo, con los niveles séricos de fosfatasa alcalina.

este hecho existe una gran controversia en la literatura (DEFTOS , 1983; DE LA PIEDRA , 1985b).

En el suero de pacientes sometidos a diálisis WEINSTEIN y GUNDBERG (1986) han encontrado diversas formas inmunoreactivas de BGP. De las investigaciones de dichos autores, se puede deducir que el análisis de fragmentos específicos de la BGP puede ser un marcador util de la resorción ósea, mientras que los niveles de BGP intacta reflejan formación ósea.

DE LA PIEDRA (1985a) ha encontrado unos niveles descendidos de BGPs en enfermos con hipercalcemia tumoral no paratiroidea. La disminución de los niveles de BGP en la hipercalcemia tumoral se podria relacionar con un posible papel de la BGP como factor aclopador entre formación y resorción óseas, ya que parece haberse demostrado que en esta entidad existe un desaclopamiento muy acusado entre la formación y resorción del hueso (STEWART ,1982), hecho que no ocurre en el hiperparatiroidismo primario.

De cualquier manera, parece interesante distinguir entre la BGP sérica, posible marcador del metabolismo ósec y BGP de la matriz ósea. A partir de los trabajos de GLOWACKI y LIAN (1985), mencionados anteriormente, parece claro que la BGP de la matriz ósea es necesaria para que se produzca la resorción del mismc, sin embargo, los niveles de BGPs quizás no reflejen en todos los casos los niveles de BGP del hueso, y en ese sentido la proporcionalidad BGPs/formación y/o resorción ósea es dificil de establecer en términos funcionales.

4.5.Osteocalcina. Niveles normales y en diferentes

patologías.

4.5.1. Técnicas de cuantificación de la osteocalcina.

La osteocalcina (BGP), se cuantifica mediante radioinmunoanalisis (RIA). Los RIA empleados para la medida de los niveles de BGP sérica (BGPs) en humanos estan basados en el hecho de que en el anticuerpo que se obtiene en el suero de conejo contra la BGP ,aislada de hueso de ternera tiene reacción cruzada con la BGP humana.

Estudios sobre el efecto de las proteasas sobre la inmunoreactividad de la BGP de ternera, han demostrado que los determinantes antigénicos de esta proteína se encuentran en la región C-terminal de la molécula. Como se podria esperar de los estudios de reactividad cruzada, las regiones C-terminales de la BGP de ternera y humana son idénticas. Desde un punto de vista práctico,es mucho más facil extraer la BGP de hueso de ternera que de hueso humano, y consecuentemente el RIA de BGP humana utilizada ha sido con estandar y trazador osteocalcina de ternera (PRICE ,1980 b). Por otra parte, para realizar estudios experimentales, se han desarrollado RIA específicos para la medida de BGP de rata (PRICE ,1980 d).

4.5.2. Niveles normales de osteocalcina.

Se ha extraido y purificado la BGP procedente de hueso humano, y se han encontrado niveles de 0.5-1 µg/mg de hueso en niños y de 0.2-0.5 µg/mg de hueso en adultos (GUNDBERG ,1985a).

Con respecto a los niveles de BGPs fetales, se ha

observado que las cifras de BGP en el cordón umbilical son aproximadamente el doble que las cifras de BGP maternas y no existe correlación entre ambas, hecho que sugiere que las BGP materna y fetal son de procedencia diferente (COLE, 1985b).

En niños menores de 10 años, los niveles medios de BGPs son de 15.6 ng/ml, con un rango entre 9-21 ng/ml (DE LA PIEDRA ,1987), aunque habrá variaciones, según el laboratorio donde se determinen las muestras. Estos niveles son más elevados que los de los adultos. Además, se ha observado variaciones con respecto a la alimentación, así LICHTENSTEIN (1987), describe concentraciones inferiores en niños alimentados con leche de fórmula en relación a los que ingieren lactancia materna, cuya explicación no está clara. En los varones existe una elevación de la BGPs alrededor de los 12 años, con un máximo sobre los 14 y desciende hasta los niveles de los adultos entre los 18 y 20 años. Las niñas muestran una elevación de la BGPs sobre los 10 años, alcanzando un máximo hacia los 12, aunque menos pronunciado que el de los varones. Estos valores descienden a los niveles normales de las mujeres adultas sobre los 16 años (COLE ,1985b). Es importante tener en cuenta que los niveles de BGPs en niños y adolescentes, tienen que ser interpretados en el contexto del crecimiento normal influido por la edad y el sexo.

Con respecto a las cifras normales de BGPs de los adultos, depende del RIA espécifico utilizado por cada grupo de autores. A este respecto existen en la actualidad diversos "kits" comerciales con unas cifras extremas de normalidad que oscilan entre 1.8 y 9.4 ng/ml (PRICE ,

1980d). En el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Granada, el rango normal de los valores de osteocalcina oscila entre 1.8-6.6 ng/ml.

Hay una gran controversia con respecto a las cifras normales de BGPs en adultos, en relación a la edad y al sexo. Autores como ORIMO (1984), CATHERWOOD (1985), LEON (1987a), RICO (1986a), no encuentran variaciones en las cifras de BGP en adultos sanos con respecto a la edad y el sexo, ni tampoco encuentran correlación entre la BGP y la fosfatasa alcalina. PRICE (1980c) y RICO, (1986a) encuentran valores de BGPs más elevados en los hombres que en las mujeres. Por otra parte, observan que la BGPs, desciende en las mujeres con la edad, existiendo en las premenopaúsicas un correlación negativa entre BGP y edad,lo que no encuentran en las postmenopaúsicas; mientras que en los hombres no existe correlación de BGPs y edad (PRICE , 1983), aunque si es referida por RICO (1986a) Estos autores observan también una correlación positiva entre los niveles de BGP y fosfatasa alcalina en varones, pero no en mujeres.

En una población de 174 mujeres de 30 a 94 años DELMAS (1983), encuentran que la BGPs aumenta desde 4.4 ± 0.4 ng/ml en la cuarta década, hasta 8.9 ± 0.9 ng/ml en la décima década. Este aumento de BGP se correlaciona inversamente con la disminución de la densidad mineral ósea en la columna vertebral. La fosfatasa alcalina sérica y la hidroxiprolina urinaria aumentan también con la edad en estos paciente y existe una correlación positiva entre estos parámetros y la BGP.

EPSTEIN (1984) ha realizado un estudio sobre los niveles de BGPs en 166 sujetos normales de ambos sexos y observa un aumento de la BGP con la edad, mayor en las mujeres que en los hombres, observando un mayor incremento en las primeras, a partir de los 50 años. La BGP se correlacionó positiva y significamente con la fosfatasa alcalina sérica, en este caso, en ambos sexos. Encuentra también una correlación entre BGPs y PTH entre las mujeres, pero no en los hombres. En trabajos previos de este mismo autor, habia señalado que la PTH sérica aumentaba con la edad, siendo este incremento más acusado en las mujeres normales que en los hombres (WISKE-EPSTEIN, 1979). Relacionando estos nallazgos con los niveles de BGP, EPSTEIN (1984) postula que este aumento de la PTH puede estar implicado en la pérdida de hueso que se produce con la edad. Al aumentar ésta, existe una disminución de la síntesis de 1,25 $(OH)_2D_3$, de modo que desciende la absorción intestinal de Ca y por consiguiente el Ca sérico. Esto estimularia la producción de PTH, lo cual promoveria el remodelamiento óseo, reflejado en un aumento de la BGP.

COUCH (1984), describe en individuos normales un descenso de la BGPs después de la maduración del esqueleto, y un aumento en las mujeres postmenopaúsicas. Por otra parte, obtiene variaciones estacionales y diurnas, encontrando un pico máximo nocturno con niveles de BGPs de 30.8 ng/ml. GUNDBERG (1985a), refiere un ritmo circadiano de 24 horas en los niveles de BGP circulante, encontrando niveles inferiores por la tarde y un máximo por la noche. SAGGESSE (1986), obtiene también una variación diurna-nocturna de BGP con un pico máximo a las 1

horas y un mínimo a las 8 horas. Su significación aun no esta clara, pero en lo posible, es importante unificar la hora de extracción de las muestras de sangre para la determinación de la BGPs (GUNDBERG, 1987).

4.5.3. Niveles de osteocalcina en diferemtes patologias.(TABLA III)

A partir del descubrimiento de la BGP, se han realizado un gran número de estudios con objeto de determinar la posible alteración de sus niveles en diferentes patologias del metabolismo mineral. La medida de la BGPs tiene interés desde un doble punto de vista: por su posible valor diagnóstico o de seguimiento de la enfermedad y porque el estudio de las alteraciones de la BGP en diferentes enfermedades del hueso, puede ayudar a esclarecer el papel fisiológico de esta proteína.

4.5.3.1. Enfermedad ósea de Paget. En esta patologia, caracterizada por un incremento del remodelamiento óseo, se han observado valores elevados de la BGPs (SLOVICK , 1984 ; DELMAS , 1986c ; LEON , 1987a). Estos valores descienden después del tratamiento con calcitonina de salmón (DEFTOS,1982). Aunque en general se correlacionan BGPs y fosfatasa alcalina en esta enfermedad, existen casos particulares de disociación. Dado que la vida media de la BGPs es menor que la de fosfatasa alcalina, la BGPs puede proporcionar un índice más rápido para cuantificar el metabolismo óseo que la fosfatasa alcalina y así, se ha revelado tras estímulos agudos con calcitonina (variaciones en 2 horas) en enfermos afectados de Paget (DEFTOS , 1982).

TABLA-III

OSTEOCALCINA

INTERVENCION EN DIFERENTES PATOLOGIAS

1.- ENFERMEDAD DE PAGET

2 - OSTEOPOROSIS POSTMENOPAUSICA

3.- FALLO RENAL CRONICO

4.- HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO

5.- HIPOPARATIROIDISMO PRIMARIO

6.- HIPERCALCEMIA TUMORAL

7.- SINDROME FETAL DE WARFARINA

8.- RAQUITISMO HIPOFOSFATEMICO
(resistente a vitamina D)

9.- HIPERTIROIDISMO

10.-HIPOTIROIDISMO

11.-SINDROME DE CUSHING

12.-DEFICIT DE HORMONA DE CRECIMIENTO

13.-DIABETES MELLITUS (tipo I)

14.- OTRAS ESTADOS FISIOPATOLOGICOS

GUNDBERG (1983c) encuentra niveles de BGPs tres veces superiores a los normales en estos enfermos, aunque la eliminación urinaria del aminoácido Gla es normal. Sin embargo, esto no es incompatible, ya que la BGP participa de manera mínima en los niveles urinarios del mismo, en comparación con las cantidades de este aminoácido procedentes de los factores de coagulación vitamina K-dependientes.

En un trabajo realizado por DE LA PIEDRA (1985b), en pacientes con esta enfermedad encontraron niveles de BGPs significativamente elevados frente a los controles. Sin embargo, no encuentran correlación entre BGPs y fosfatasa alcalina, ni entre BGPs y cociente urinario hidroxiprolina/creatinina.

Recientemente WILKINSON (1986), ha determinado además de los niveles de esta proteína, la fosfatasa alcalina sérica y la cantidad de masa ósea, obteniendo una mayor correlación entre BGPs-masa ósea (r=0.70) que entre fosfatasa alcalina-masa ósea (r= 0.55), aunque la BGPs se encontraba elevada en el 53% de los pacientes estudiados y la fosfatasa alcalina lo estaba en todos los pacientes menos en uno. A pesar de la mejor correlación BGPs-masa osea, este autor, al igual que RICO (1986b), sostiene que la cuantificación de los niveles de BGPs es menos valiosa para el diagnóstico de la enfermedad de Paget que la fosfatasa alcalina sérica; quizás debido al menor tamaño y menor vida media de la BGPs , que parece que se comporta como un parámetro más sensible.

4.5.3.2.Osteoporosis postmenopaúsica. Existe gran

controversia sobre las causas que producen la pérdida de hueso que caracteriza esta patologia . Para profundizar en la etiología de esta entidad, se han realizado numerosos trabajos en los que se mide, entre otros parámetros, la BGPs; los resultados obtenidos son contradictorios.

ORIMO y NAKAI (1984) refieren un descenso de la BGPs en la osteoporosis postmemopaúsica, además de una correlación positiva entre la 1,25 $(OH)_2D_3$ y esta proteína. Por el contrario, LEON (1985) la encuentra aumentada y GUNDBERG (1983b) obtiene niveles de BGPs similares en mujeres controles y postmenopaúsicas, aunque la eliminación urinaria de Gla aumenta en un 50% en estos pacientes frente a los controles. Para explicar esta posible contradicción, argumentan que la BGP puede ser degradada proteoliticamente durante la resorción ostoclástica, con aumento de la eliminación urinaria de Gla, sin el aumento concomitante de la BGPs.

Trás encontrar valores medios de BGPs similares en mujeres osteoporóticas postmenopaúsicas y en mujeres controles, aunque con una gran dispersión , DELMAS (1984b), agrupó a los pacientes en tres grupos en función del remodelamiento óseo. Encontró que la BGPs estaba significativamente elevada en el grupo con remodelamiento óseo aumentado y significativamente disminuida en el grupo con remodelamiento óseo bajo, siendo normal en los pacientes con remodelamiento óseo no alterado. Esta podria ser la explicación de la diversidad de valores de BGPs encontrados en la osteoporosis postmenopaúsica.

Una vez estudiados los valores de BGPs, se observó la

correlación entre esta proteína y parámetros histomorfométricos, y se encontró una correlación positiva entre BGPs-superficies relativas de osteoide y más aún trás ser corregidas con el volumen óseo trabecular. La BGPs se correlaciona con el grado de formación ósea, pero no con el grado de resorción; por lo que se deduce que la medida de la BGPs refleja formación y no resorción ósea (DELMAS , 1983b,1984a ; YASUMURA , 1987; SEICHI, 1987).

Al relacionar otros parámetros del metabolismo óseo, hidroxiprolina y fosfatasa alcalina con parámetros histomorfométricos, BROWN (1984), no encuentra correlación significativa alguna, por lo que la BGP, parece ser un índice muy adecuado para estudiar los pacientes con osteoporosis postmenopaúsica, así como para el seguimiento de los tratamientos que restauran la másа ósea (ISMAIL,1986;YASUMURA,1.987), al aumentar la formación del hueso.

PODENPHANT (1984), estudia la BGPs durante el tratamiento con estrógenos y calcio en mujeres postmenopaúsicas y señala las ventajas de esta proteína frente a otros marcadores del metabolismo óseo, como fosfatasa alcalina e hidroxiprolina, menos específicos que la BGP. Concluye, que la determinación de BGPs tiene un gran valor en el control del tratamiento profiláctico de esta patologia, indicando al igual que RICO (1986c), que la osteocalcina parece ser más un marcador "global" del remodelamiento óseo que de formación, aunque esto puede estar en discusión, como estamos viendo.

4.5.3.3. Fallo renal crónico. En 1983 WEINSTEIN y

GUNDBERG refieren niveles de BGPs elevados en pacientes con fallo renal crónico, que es más consecuencia de una deficiente degradación que de una escasa eliminación, demostrado a nivel experimental por FERRUGIA (1986). A pesar del descenso del aclaramiento renal de estos fragmentos, la BGPs se correlaciona positivamente con la superficie osteoide-osteoblástica y con los datos de formación ósea en pacientes con hemodiálisis crónica. Además, la medida de los niveles de BGPs puede contribuir a diferenciar entre sujetos dializados con remodelamiento óseo bajo y los pacientes con remodelamiento óseo aumentado.

Estos mismos autores en 1986 (GUNDBERG, 1986), publican que tras hacer biopsia ósea a diecinueve pacientes con hemodiálisis crónica, encuentran una correlación positiva entre los niveles de BGPs y los hallazgos histomorfométricos de formación ósea, superficie osteoide osteoblástica y la superficie resortiva osteoclástica. A la vez señalan que la correlación existente entre los niveles de BGPs y la resorción osteoclástica es positiva cuando los datos de formación ósea se mantienen constantes. GUNDBERG y WEINSTEIN, en este trabajo, uno de los más importantes estudios de la BGP, a nivel mundial, señalan que en la insuficiencia renal crónica, la osteocalcina es bastante heterogénea, lo que pone en duda afirmaciones en cuanto a su comportamiento en esta entidad (RICO ,1987e).

COLE (1985b) estudia los niveles de BGPs en dos grupos de niños con fracaso renal. Unos recibian hemodiálisis y otros diálisis peritoneal. A pesar de los distintos orígenes y complicaciones en el fracaso renal,

así como el estado de mineralización del hueso, los niños que recibian hemodiálisis tenian unos niveles de BGPs superiores, a los niños tratados con diálisis peritoneal. Una posible explicación está en los niveles de BGP en el dializado. Mientras que éste es rico en BGP o en un péptido inmunoreactivo estrechamente relacionado con ella, el hemodializado está libre de la proteína. Esta observación está de acuerdo con el supuesto de que las proteínas séricas que no son aclaradas por hemodiálisis, pueden ser aclaradas eficientemente por diálisis peritoneal. Otras proteínas de bajo peso molecular, incluyendo la insulina y la PTH, tambien son transportadas a través de la membrana peritoneal. COLE (1985b), señala también que la BGPs puede ser de gran utilidad en el estudio de la osteodistrofia renal, hecho igualmente indicado por MALLUCHE (1984), TORRES (1985) y DIAZ (1987) en el sentido de que los niveles de BGPs pueden ser más indicativos que la parathormona sérica, la 1,25 $(OH)_2D_3$ o la fosfatasa alcalina para predecir enfermedades óseas en pacientes urémicos. DEFTOS (1982) encuentra también niveles elevados de BGPs, así como de fosfatasa alcalina en pacientes con fallo renal crónico. Además, estos niveles permanecen elevados tras el tratamiento con hemodiálisis. También MIGUEL (1985) y BERNIS (1987) describen una correlación directa entre niveles de PTH y BGPs en pacientes con uremia.

4.5.3.4. Hiperparatiroidismo primario (HPP). Todos los estudios realizados sobre los niveles de BGPs e HPP muestran una elevación media de los mismos con respecto de los controles, aunque en algunos casos individuales se

mantienen dentro de la normalidad.

DEFTOS (1982), encuentra que trás la paratiroidectomia los niveles de BGPs que estaban elevados, descienden dentro del rango de normalidad ,siendo las cifras en mujeres con HPP superiores en relación a los hombres, hallando en las primeras una correlación positiva entre BGPs, fosfatasa alcalina y entre BGPs, calcemia , pero no en los segundos. SLOVIK (1984) encuentran también niveles elevados de BGPs tanto en el HPP como en el hiperparatiroidismo secundario, con aumento de la 1,25 $(OH)_2D_3$ secundario a las altas tasas de PTH. Que no es la acción directa de la PTH la que ocasiona la subida de la BGP, lo demuestra el hecho de que en en individuos con raquitismo resistente a la vitamina D y altos niveles de osteocalcina, éstos bajan tras la infusión de PTH (COLE, 1985a).

DE LA PIEDRA (1985a) y MUÑOZ (1987), hallan niveles de BGPs elevados en un grupo de pacientes con HPP confirmado quirurgicamente, así como una correlación lineal entre BGPs-calcemia y entre BGPs-parathormona sérica, aunque no encuentran correlación entre BGPs-fosfatasa alcalina en estos pacientes. Por otra parte, en otro trabajo de DE LA PIEDRA (1985b) dividen los enfermos con HPP en dos subgrupos, según los niveles del cociente urinario hidroxiprolina/creatinina fueran normales (I) o elevados (II). Los niveles de BGPs del subgrupo II eran significativamente superiores a los del I; estos últimos no diferian de los controles. Por otra parte describen una correlación lineal entre BGPs y cociente urinario

hidroxiprolina/creatinina en los pacientes con HPP.

En un reciente trabajo, STEPAN (1987), encuentra una elevación de BGP, en pacientes a las que se le ha realizado una ooferectomia y presentaban concomitante HPP, con una correlación significativa y positiva con la fosfatasa alcalina, siendo esta última elevación más marcada. Dato que refleja la utilidad clínica de la osteocalcina como marcador de la formación ósea, con significación similar , pero no idéntica a la fosfatasa alcalina, isoenzima ósea, pudiendo reflejar ambos parámetros, aspectos distintos del metabolismo óseo (TORRES, DE LA PIEDRA , 1987), sugiriendo una relación entre BGPs y acoplamiento formación-resorción ósea, ya que en aquellas patologias en que existe un aumento del remodelamiento y un equilibrio entre formación y resorción ósea como la enfermedad de Paget y el HPP, los niveles de BGPs se encuentran elevados y correlacionados con el cociente hidroxiprolina/creatinina y fosfatasa alcalina. Por el contrario las patologias con predominio de la resorción ósea, como la osteoporosis evolutiva y la hipercalcemia tumoral, presentan niveles de BGPs disminuidos, sín correlación significativa con los anteriores parámetros.

DELMAS (1984b,1986a) confirma datos referidos anteriormente, hallando niveles elevados de BGPs en el HPP y observando una correlación entre BGPs-calcemia, BGPs-PTH y BGPs-peso del adenoma.

4.5.3.5. Hipoparatiroidismo. Caracterizado por una disminución de la actividad ósea, existe un descenso de la BGPs no correlacionandose con la fosfatasa alcalina

(PRICE,1983). COLE (1985b) en un estudio realizado en niños confirma estos hallazgos, encontrando en aquellos que recibian vitamina D, niveles de BGPs semejantes a los controles. De todas formas, la osteocalcina sérica no aventaja a otros parámetros bioquímicos en el conocimiento y diagnóstico de la patologia de las paratiroides (MUÑOZ, 1987).

4.5,3.6. Hipertiroidismo e hipotiroidismo. Mientras que los niveles de BGPs en el hipertiroidismo se encuentran elevados (ORIMO ,1984; MARTINEZ , 1986a), los pacientes con hipotiroidismo muestran unos niveles similares a los del grupo control (MARTINEZ , 1986a). Datos que coinciden con los aportados por LEON (1987b), apoyando el uso de la determinación de BGP como parámetro del metabolismo óseo anormal.

4.5.3.7. Hipercalcemia tumoral (HT). En pacientes afectados de HT con metástasis óseas, los niveles de BGPs están elevados (DEFTOS, 1982; SLOVIK, 1984 y LEWENHAUPT,1985), retornando a la normalidad trás quimioterapia o tratamiento con calcitonina de salmón. Datos que no coinciden con los aportados por DELMAS (1984b,1986a), que encuentran niveles descendidos.

En un estudio realizado por DE LA PIEDRA (1985a) en siete enfermos afectados de HT, solo uno tenía una cifra normal de BGPs y los otros seis mostraban niveles indetectables (cuatro casos, de los cuales dos presentaban metástasis óseas) o claramente inferiores a los controles (dos casos), uno de ellos con metástasis ósea. En todos ellos, sin embargo, se encontraron elevados la fosfatasa

alcalina y el cociente urinario hidroxiprolina/creatinina. Los resultados obtenidos sugieren que la BGPs podría ser un parámetro único a la hora de diferenciar entre una hipercalcemia paratiroidea (en la que los niveles de BGPs se encuentran en general aumentados), y una hipercalcemia de origen no paratiroideo; diferenciación difícil en la clínica en muchas ocasiones.

4.5.3.8. Tratamiento crónico con warfarina y síndrome fetal. Como ya es sabido, la warfarina, antagonista de la vitamina K, inhibe la gammacarboxilación post-traduccional del ácido glutámico de todas las proteínas gammacarboxiladas vitamina K-dependientes, entre ellas la BGP (MENON, 1987).

En el feto humano se han observado graves defectos óseos en el denominado "síndrome fetal de la warfarina", en el que las mujeres que toman warfarina durante el primer trimestre del embarazo exponen a sus fetos a un desarrollo defectuoso del hueso con epífisis achatadas, calcificaciones punteales, nariz en silla de montar, abombamiento de la frente y otras anomalías óseas.

En la secuencia temporal del desarrollo fetal humano, los procesos dependientes de la vitamina K en el tejido óseo embrionario, en los que posiblemente esté implicada la osteocalcina, pueden ocurrir antes del desarrollo del sistema de la coagulación sanguínea dependiente de la vitamina K. Por ello el tratamiento con antagonistas de la vitamina K pueden provocar defectos óseos sín el desarrollo concomitante de un estado de hemorragia aguda. Sín embargo, hay que tener en cuenta que aunque el síndrome fetal de la

warfarina implica posiblemente un defecto en la biosíntesis de la BGP, ciertos defectos del transporte placentario pueden ser también vitamino K-dependientes. Quizás el transporte de calcio desde la circulación materna a la fetal a través de la barrera placentaria, sea sensible al antagonismo de la vitamina K, y el síndrome fetal de la warfarina pueda ser consecuencia en parte a la inhibición de proteínas gammacarboxiladas vitamina k-dependientes de la placenta (HALL , 1980).

4.5.3.9. Raquitismo hipofosfátemico resistente a la vitamina D. COLE y GUNDBERG (1985a) administran una infusión de parathormona a estos pacientes y observan un descenso del 35% en los niveles de BGPs, 15 minutos después de administrar la infusión y una normalización de los valores séricos a los 75 minutos, lo cual sugiere que la inhibición producida por la PTH sobre los niveles de BGP, reflejan una disminución de la actividad osteoblástica y que la BGP podria ser una herramienta util para medir la respuesta del hueso a la PTH.

4.5.3.10. Síndrome de Cushing. Una terapia crónica con corticosteroides produce un descenso de los niveles de BGPs (DELMAS, 1984b), mostrando la biopsia ósea iliaca, una correlación positiva entre BGPs y superficie osteoide, mientras que al relacionar esta proteína con la dosis de prednisona administrada, encontraron una correlación negativa. Estos autores concluyen que la BGP refleja el descenso de la actividad osteoblástica en pacientes sometidos a este tratamiento. REID (1986) obtiene los mismos resultados concluyendo con la hipótesis de que probablemente el descenso en los niveles séricos de la BGP

se deba a una reducción en los índices de formación ósea inducida por estas hormonas.

4.5.3.11. Osteocalcina y hormona de crecimiento (GH). DELMAS (1986b) estudian un grupo de niños deficientes en GH y observan el efecto del tratamiento sobre los mismos. Encuentran en los niños no tratados unos niveles séricos de BGP notablemente inferiores a los controles, mientras que los niños sometidos a una terapia con GH humana presentaban unos niveles de BGP superiores a los no tratados y sin diferencias con los controles. Tras repetidas experiencias observan que la BGP aumenta en la mayoria de los pacientes durante el tratamiento con GH humana, que el nivel de BGP en suero se correlaciona con la duración del tratamiento y que trás interrumpir la terapia , los niveles séricos de BGP decrecen a los niveles existente antes de administrar tratamiento alguno. Concluyen que los niveles de BGP son un marcador sensible del crecimiento del esqueleto de los niños y pueden ser utiles para vigilar el efecto de drogas que estimulan el crecimiento lineal y la maduración del hueso. Otra aportación en este mismo sentido, es el reciente trabajo de KRUSE (1987b), en el que demuestra una correlación lineal simple y directa entre los incrementos de los niveles séricos de osteocalcina y FA ($n:35$; $r:0.77$; $p<0.01$), en niños afectos de deficit de hormona de crecimiento trás la administración de HG biosintética a la dosis de 2 u/m², señalando la relación entre estos dos índices de formación ósea.

4.5.3.12. Diabetes méllitus insulinodependiente (DMID). PALUMMERI (1984) analizaron los niveles de BGPs en

28 pacientes diabéticos tipo II (no insulino dependientes) y en 12 de tipo I (DMID). Los niveles medios de BGPs fueron significativamente menores en ambos grupos comparados con sus respectivos controles, aunque existia una gran dispersión de valores. Estos resultados sugieren que la actividad metabólica ósea, al menos en una fracción de pacientes diabeticos es normalmente baja y confirman otros trabajos en los que se clasifica a la diabetes méllitus como un estado de bajo remodelamiento óseo. Los mismos autores encuentran una correlación inversa entre niveles de BGP y calcitonina en el suero de pacientes diabéticos.

RICO (1987a), encuentra asimismo, en este tipo de pacientes, niveles descendidos de BGP con contenido mineral óseo significativamente inferior, con relación a individuos normales, sugiriendo que ésto podria deberse a alteraciones en el metabolismo de la vitamina D observadas en este grupo de enfermos.

4.5.3.13. Osteocalcina y otras enfermedades óseas. Se ha estudiado la BGP en otras entidades caracterizadas por un aumento de la resorción ósea, como artritis reumatoide (RICO, 1987c), distrofia simpática refleja (RICO ,1986b) y osteogénesis imperfecta (CASTELLS ,1986a,1986b), demostrándose en todas ellas niveles elevados de osteocalcina, sin una clara correlación con la fosfatasa alcalina.

4.5.3.14. Osteocalcina en enfermedades no relacionadas con el metabolismo óseo. En un trabajo realizado por SLOVIK (1984) en 163 pacientes afectados de diversas patologias no relacionadas con el hueso (alcoholismo, enfermedades

hepáticas etc.) la concentración media de BGPs fue normal, salvo en un paciente afectado por una enfermedad neurológica y otro que presentaba alcoholismo crónico. Por lo tanto la BGP presenta ventajas frente a otros marcadores del metabolismo óseo, tales como la fosfatasa alcalina, dado que en aquellos casos en que coexista una enfermedad ósea con cualquier otra patología, la BGPs es lo suficientemente sensible y específica para determinar anomalías del hueso.

4.6. Osteocalcina en el periodo perinatal.

El papel de la BGP en el periodo perinatal no está nada claro. Si nos remontamos al embarazo, los cambios que suceden en este periodo de la vida en las hormonas calciotrópicas, pueden influir en los niveles de BGP. Así, se han reportado valores de osteocalcina más altos en el feto que en la madre (COLE ,1985b; RICO ,1987d), encontrándose en éstos, valores inferiores con relación a la población normal no gestante, sobre todo en el tercer trimestre (COLE , 1986). La elevación de los niveles de 1, 25 $(OH)_2D_3$, que como sabemos participa en la síntesis de BGP (BERESFORD , 1984), que se constatan en la gestante durante el tercer trimestre (REDDY , 1983; VIELAN , 1980), no estan relacionados con este descenso de la BGP.

Por otro lado, como ya se ha comentado, existe un hiperparatiroidismo fisiológico en el embarazo (CUSHARD , 1972; RICO ,1978; DRAKE , 1979), que contrasta con la elevación que se produce de la BGP en los hiperparatiroidismos, como hemos visto, lo que no puede ser causa de esta disminución.

El comportamiento de la calcitonina con relación a la BGP durante este periodo es contradictorio. Mientras unos autores la encuentran elevada (VIELAND, 1980; WHITEHEAD , 1981), otros normal (PITKIN , 1985; HILLMAN ,1978). Su elevación se ha interpretado como protectora del esqueleto materno, induciendo un menor "turnover" óseo, pero no justifica que la calcitonina se encuentre mucho más alta en el feto con relación a la madre (VIELAND , 1980; PITKIN , 1980).

Con respecto a los niveles de BGPs fetales, se ha observado que en el cordón umbilical, son aproximadamente el doble que las cifras de BGPs maternas, no existiedo correlación entre ambos hechos, sugiriendo que la BGP materna y fetal son de procedencia diferente (COLE , 1985b) y que el feto produce BGP (SHIMA , 1985), regulando su propio metabolismo óseo.

Por otro lado, la placenta puede producir BGP durante la gestación. Se ha comprobado que la producción de proteínas que contienen ácido gammacarboxiglutamico, dependiente de la vitamina K, tiene lugar en la placenta (FRIEDMAN , 1987). Sin embargo, todavia no se sabe si la proteína carboxilada producida por la placenta es idéntica a la BGP.

Por tanto en el periodo fetal y fase de crecimiento, los elevados niveles de BGP, fruto de la predominante formación ósea y de un elevado "turnover", puede ejercer a nivel hístico en un hueso aun no formado, un efecto inhibidor sobre la mineralización excesiva para permitir un crecimiento óseo normal (PEREZ CANO , 1987).

La disminución de la BGP en los estados tardíos del embarazo, cuando los requirimientos minerales del feto comienzan a aumentar sustancialmente, podria sugerir un descenso de la función ósea materna, provocandose un cierto bloqueo del remodelamiento óseo en la madre (MARTINEZ , 1985).

Con estos condicionamiento se enfrenta el RN a la vida extrauterina. Muy escasa bibliografia aporta datos sobre la osteocalcina en el periodo neonatal (SHIMA , 1985; SHEARER, 1982; COLE,1985b; AVRAMIDES , 1987 ; GRUSON , 1987 ; MARTIN, 1987; BAYES, 1988 ; NARBONA , 1988) .Su comportamiento durante este periodo y su relación con otros parámetros del metabolismo fosfocálcico, es el motivo del presente estudio.

5.- FOSFATASAS ALCALINAS EN EL PERIODO NEONATAL

La actividad de las fosfatasas alcalinas en el suero está compuesta de múltiples formas enzimáticas de procedencia diferente (hígado, hueso, tracto gastrointestinal, placenta y ciertos tumores). En el niño los patrones isoenzimáticos son un 20 % del intestino, un 15 % de hígado y un 65 % del hueso. Después de la adolescencia, la fracción hepática aumenta hasta un 65 % y la ósea disminuye a un 15 % (ROOT, 1976). Las fosfatasas alcalinas de procedencia ósea están producidas en su mayor parte por los osteoblastos, aunque también pueden proceder de los condrocitos y de las vesículas de la matriz ósea (AUERBACH, 1981). Su distinta movilidad electroforética y su mayor labilidad la distingue de la que procede del

hígado. Debido a esta multiplicidad de órganos que la producen, las fosfatasas alcalinas no reflejan especificamente la función ósea, aunque en condiciones normales es un parámetro de medida de remodelamiento óseo asociado a los procesos de mineralización (TRABA, 1987). Está descendida en la hipofosfatemia y aumentada en la enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo, fracturas óseas y en tirón de crecimiento puberal. En el feto se encuentran elevados niveles sanguíneos, al igual que ocurre en la mujer gestante, que descienden en los primeros dias de vida postnatal. El nivel sérico al nacer está cifrado entre 35 y 105 UI/L y de 70 a 250 UI/L durante el periodo neonatal (ROOT, 1976), mostrando por tanto una evolución superponible a los cambios del metabolismo fosfocálcico en este periodo de la vida (VILLANUEVA, 1987). Se ha utilizado en el control nutritivo de los prematuros con menos de 32 semanas de gestación, mostrando cifras superiores a 500 UI/L y aún por encima de las 1000 UI/L. Algunos autores han sugerido que estas cifras podrían indicar el comienzo de un raquitismo, aunque las concentraciones séricas de Ca y P fueran normales y no se apreciaran signos radiológicos compatibles con esta patología (KOOH, 1977; ROWE, 1987).

CAPITULO II

OBJETIVO II

OBJETIVOS.-

El crecimiento y longitud del feto y de los recién nacidos es "un complejo fenómeno" en el que, independientemente de los aportes plásticos y energéticos necesarios para que acontezca y condicionados por imperativos genéticos, tiene unos "periodos críticos de formación, crecimiento y desarrollo", con unos periodos filogenéticos perfectamente regidos por aquellos. El crecimiento y en definitiva la longitud del feto y del recién nacido van a depender, en gran medida, de los fenómenos de osteoformación que implica la condrogénesis y osteogénesis traducidos en lo que vendría a ser la formación ósea y su remodelamiento en los que están implicados la mineralización y la resorción ósea.

Aunque existen estudios e investigaciones en experimentación animal y en patología humana en otras edades de la vida, la " LA PERINATOLOGIA y LA NEONATOLOGIA" adolece, por razones obviamente ético-deontológicas, de estudios del metabolismo óseo "in vivo", por lo que las aportaciones bibliográficas, la mayor parte de las veces, hacen referencia a estudios e investigaciones de aspectos que reflejan sólo indirecta y parcialmente la realidad del crecimiento y desarrollo óseo en el periodo perinatal.

Se sabe de la regulación hormonal sobre el metabolismo óseo y se conoce la importancia metabólica que el hueso desempeña en la homeostasis del calcio y fósforo sanguíneo, pero el descubrimiento de un polipéptido gamma-carboxilado por HAUSCHKA y PRICE, denominado por GALLOP, de la

Universidad de Harvard, con el nombre de "OSTEOCALCINA", ha revolucionado los conocimientos que se tenían acerca del fenómeno del "REMODELAMIENTO OSEO".

Las relaciones entre la osteocalcina y la regulación hormonal del metabolismo fosfocálcico y óseo están siendo tan solo inicialmente estudiados. La bibliografía especializada ha reportado muy pocos estudios que hagan referencia a la infancia y son excepcionales los dedicados al periodo perinatal, por ello los objetivos del presente estudio son:

1) Realizar una revisión bibliográfica de puesta al dia, acerca de esta proteína no colágena sintetizada en el hueso y de características únicas por sus propiedades de unión con el calcio.

2) Montar y desarrollar una técnica de radioinmunoanálisis para la determinación cuantitativa de la actividad de osteocalcina en el suero.

3) Analizar en muestras obtenidas de cordón umbilical de recién nacidos, los valores séricos de : osteocalcina, parathormona, fosfatasa alcalinas (marcadores séricos de los cambios de la actividad ósea); calcemia y fosforemia (reflejo del estado del metabolismo fosfocálcico) y obtener unos valores patrones de referencia según la edad gestacional y el grado de estrés intraparto, que puedan posteriormente ser utilizados como datos de estudio y cotejo, en distintas situaciones fisiopatológicas.

4) Estudiar las modificaciones de los parámetros serobiológicos, antes mencionados, durante el periodo

neonatal, tanto en recién nacidos pretérminos como a término.

5) Estimar las interrelaciones entre los marcadores séricos de la actividad ósea (osteocalcina, parathormona y fosfatasas alcalinas) y las concentraciones séricas de calcio y fósforo, en cordón umbilical y en los periodos neonatales precoz y tardio en recién nacidos pretérmino y a término.

6) Establecer si existen relaciones entre los incrementos de longitud perinatal y cambios serobiológicos (marcadores séricos de actividad ósea y del estado metabólico fosfocálcico).

7) Comparar los resultados obtenidos en el presente estudio, con los aportados por otros autores en la bibliografia, discutiendo los más notables y que apoyen y justifiquen las conclusiones generales que se puedan desprender de este trabajo.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODO III

MATERIAL Y METODOS

A) CASUISTICA Y METODOLOGIA CLINICA.

Se estudian 176 recién nacidos (RN). Se analiza los niveles séricos de calcio (Ca) y fósforo inorgánico (P), como marcadores bioquímicos del metabolismo fosfocálcico y las concentraciones (o actividad) de osteocalcina (BGP), hormona paratiroidea (PTH) y fosfatasas alcalinas (FA), como marcadores séricos del "turnover" óseo.

En RN pretérminos, se analizar 25 muestras de cordón umbilical (CU), base de referencia bioquímica del equilibrio idóneo para esta edad gestacional (<37 semanas) y base de cotejo para los cambios que puedan acontecer en el periodo neonatal. En 31 casos se analizan muestras séricas, obtenidas en el contexto de un escrutinio biológico rutinario en la asistencia neonatal, en un estudio longitudinal a los 0.82 ± 0.13 dias de vida y a los 19.22 ±1.70 dias de vida. Las características de madurez fetal, tales como edad gestacional (EG), peso (P), longitud o talla (T) y perímetro cefálico (PC), se recogen en la TABLA IV.

En RN a término, se analizan 95 muestras obtenidas de CU en el momento del parto y en 25 casos se hace un seguimiento longitudinal con muestras obtenidas por venipuntura asimismo, en el curso de las determinaciones analíticas de obligado control biológico en el diagnóstico y/o evolución de la patología que hubiera motivado el ingreso en la unidad neonatal; una primera determinación se realiza a los 1.38 ± 0.93 dias de vida y una segunda a los 11.72 ± 1.27 dias de vida. Las características generales

TABLA IV. RECIEN NACIDOS PRETERMINO (edad gestacional <37 semanas). CASUISTICA.

	(n:25) CU	(n:31) PN	t	p
EG (dias)	235 ± 4.92(*)	237 ± 3.3	0.32	NS
PESO (gr)	2058 ± 116	1987 ± 72	0.42	NS
TALLA (cm)	45 ± 0.5	45 ± 0.6	0.50	NS
PC (cm)	31 ± 0.4	31 ± 0.3	0.86	NS

n: número de casos; (*) media ± SEM ; CU: cordón umbilical ; PN: periodo neonatal; EG: edad gestacional; t: t de Student; p: grado de significancia (grados de libertad= 54) : PC: perímetro cefálico ; NS: no significativo.

de edad gestacional y somatométricas, se recopilan en la TABLA V.

El grado de estrés intraparto se valora según el pH de arteria umbilical (pH_{AU}) que refleja la hipoxia intraparto (duración más intensidad de la misma), medido en un "Automatic Blood Gas System AVL-940".

B)METODO BIOQUIMICO

1.-PRINCIPIO DE LA TECNICA

1.1.-OSTEOCALCINA Y PTH.

1.1.1. Fundamento general del radioinmunoanálisis (RIA).

Las determinaciones de BGP y PTH, se han realizado por RIA, método basado en la unión de un antígeno radiomarcado (Ag*) y de una concentración conocida, con una cantidad de anticuerpo (Ac) preestablecida (Ac estandar) de alta especificidad y avidez por el Ag* en cuestión (Fig 9).

La mezcla de Ag* y Ac estandar, da lugar a complejos Ag*-Ac, que seran disociados por reacción con un Ag no marcado. La cuantificación de esta reacción se utiliza para la medición de la la sustancia no marcada (problema) que es añadida. Al establecerse esa competición por el "locus" antigénico del Ac estandar, cuanto mayor sea la cantidad de Ag* que permanezca unido al Ac estandar tanto menor sera, obviamente, la cantidad Ag no marcado que se ha unido a este último.

La técnica desarrollada por BERSON y YALLOW (1968) y ampliamente utilizada para la determinación de hormonas y

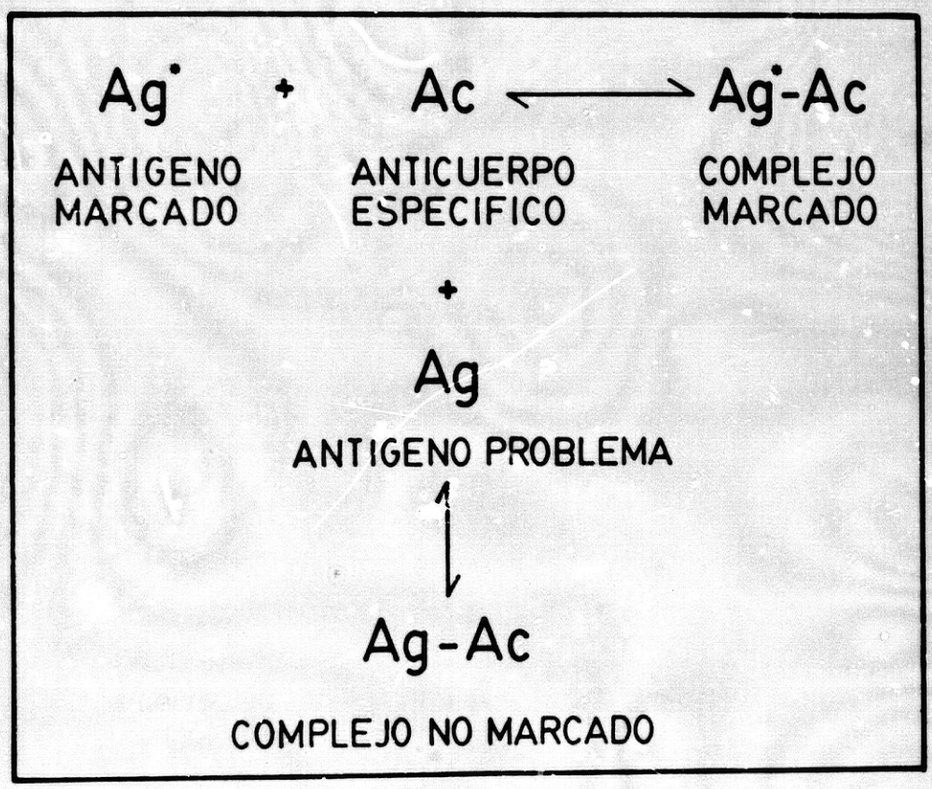
TABLA V. RECIEN NACIDOS A TERMINO (edad gestacional ≥ 37 semanas). CASUISTICA.

	(n:95) CU	(n:25) PN	t	p
EG (dias)	283 ± 4.63 (*)	274 ± 2.02	0.93	NS
PESO (gr)	3.350 ± 44	3.283 ± 105	0.65	NS
TALLA (cm)	51 ± 0.22	51 ± 0.60	0.17	NS
PC (cm)	35 ± 0.13	35 ± 0.36	1.07	NS

(*): media ± SEM ; CU: cordón umbilical ; PN: periodo neonatal; EG: edad gestacional; t: t de Student ; p: grados de significancia (grados de libertad= 118); PC: perímetro cefálico ; NS: no significativo; n: número de casos.

FIGURA 9

ESQUEMA GENERAL DEL RADIOINMUNOANALISIS



péptidos, no esta exenta de limitaciones (FELBER ,1978), siendo uno de los principales la solubilidad de algunos complejos Ag*-Ac estandar, que dificultan la precipitación de los mismos y la reacción competitiva del Ag libre (problema) por el locus al que se halla unido el Ag* en el Ac estandar. Para obviar estas dificultades, se han intentado diferentes modificaciones, como son las tecnicas del doble Ac (HALES y [illegible]NDLE, 1963) o la de ELISA (RIA en fase sólida) (NICHOLSON ,1980).

1.1.2. RIA de Osteocalcina. Su medida se realiza por RIA, segun la técnica del doble anticuerpo,donde se utiliza como estandar y trazador BGP bovina y como antisuero anti-BGP bovina de conejo. El antisuero anti-BGP bovino reconoce a la BGP humana de modo totalmente homólogo a la bovina (GUNDBERG et al.,1985). Los principios generales han sido mencionados anteriormente, basados en que la unión de un Ag marcado radiactivamente a una cantidad fija de Ac específico, se inhibe parcialmente por la adicción de Ag no marcado siendo el grado de esta inhibición, función de la concentración del material añadido sin marcar.

Si se hace reaccionar una cierta cantidad de osteocalcina marcada con I^{125} con un Ac específico anti-BGP, el resultado de esta reacción es la formación de un complejo Ag marcado-Ac. Si entonces se añade una cierta cantidad de osteocalcina no marcada al sistema, este Ag se une al Ac para formar un complejo Ag no marcado-Ac, reduciendo la cantidad de Ac que puede participar en la formación del complejo marcado. Esto da lugar a que la cantidad de osteocalcina marcada unida al Ac descienda en

proporción inversa a la cantidad de osteocalcina fija añadida al medio de la reacción. Este descenso de actividad es utilizada para el cálculo de la cantidad de osteocalcina añadida procedente de una muestra problema, por comparación con los resultados obtenidos por la adicción de cantidades conocidas de una osteocalcina estandar no marcada.

1.1.3. RIA de Parathormona. El valor de la medida de PTH en el diagnóstico de las alteraciones del calcio, se le ha dado quizás más importancia en teoria de la que tiene en la práctica. Esto es debido a las dificultades en su determinación. Estos problemas giran alrededor del Ac usado en el ensayo, si es directamente contra la molécula entera de PTH o parte de ella, concretamente el fragmento N-terminal (activo) y frente a [illegible]terminal (inactivo), de vida media más larga que el anterior. En adición, muchas de las técnicas empleadas no tienen la suficiente sensibilidad para determinar los bajos niveles de PTH en el plasma.

Esta serie de inconvenientes en la determinación de PTH, han sido resueltos recientemente con la aparición de una nueva técnica, que determina la PTH media molécula (PTH-MM). Ésta mide especificamente el fragmento de PTH humana, que contiene la secuencia de aminoácidos comprendida entre 44-68, basándose en un nuevo anticuerpo sensible a dicha región (AARON, 1981). El marcaje se realiza con I^{125} en una hormona humana sintética hPTH (Tyr 43)44-68, mediante una técnica de RIA, ya descrita anteriormente.

1.2.-CALCIO TOTAL. Se determinó mediante el método

complexo-fluorométrico (DIEHL y BILINGBOL, 1956), basado en el hecho de que el complejo formado por la calceina, un derivado de la fluoresceina y el calcio es fluorescente. Para ello se ha utilizado el analizador de calcio "Corning modelo 940", que mide la fluorescencia emitida por moléculas excitadas mediante una fuente de luz, con una longitud de onda que va desde 300 a 500 nanometros (nm), para excitar las moléculas en el fluorímetro. Un primer filtro o prisma (capaz de transformar la luz blanca o plicromática en luz monocromática), aisla la longitud de onda de la energia excitadora y un segundo filtro selecciona la longitud para ser medida. La intensidad de luz fluorescente que encuentra el detector es proporcional a la concentración del compuesto fluorescente en la cubeta.

1.3.-FOSFORO INORGANICO. Su determinación fue realizada mediante un método colorimétrico. Los fosfatos inorgánicos de un filtrado ácido libre de proteinas de suero o plasma, se unen al molibdato de amonio para formar un complejo fosfomolibdato de amonio, que con una solución de vanadato amónico como reductor, previa desproteinización con ácido tricloroacético (ZILVERSMIT, 1950), produce un complejo coloreado, cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad de fosfato en el suero.

1.4.-FOSFATASAS ALCALINAS. Estas enzimas catalizan una amplia variedad de ésteres de ácido fosfórico, en procesos fisiológicos y no fisiológicos en medio alcalino. El substrato natural de estos enzimas no ha sido todavia identificado. Una gran variedad de substratos sintéticos, se han empleado en los métodos de determinación de la fosfatasa alcalina por distintos autores. En este aspecto,

es importante la elección del "buffer", pues usando alcoholes amínicos se refuerza la actividad enzimática. BOWER y McCOMB (1966), introdujeron el uso de la 2 amino, 2 metil, 1 propanol (AMP) y p-nitrofenilfosfato.

Con estas premisas, se utiliza el método cinético-colorimétrico, basado en la formación de p-nitrofenilfosfato, catalizado por las fosfatasas alcalinas en medio alcalino (BESSEY, 1946). Siendo el fundamento de la reacción, el siguiente:

$$\text{p-nitrofenol} + H_2O \xrightarrow{FA} \text{nitrofenol} + \text{fosfato}.$$

El p- nitrofenol formado absorbe gran cantidad de luz a 405 nm. Este incremento de absorción, es directamente proporcional a la actividad de la fosfatasa alcalina contenida en la muestra.

2.-RECOGIDA DE MUESTRAS.-

2.1. Obtención. Todas las determinaciones se han realizado sobre suero, obteniéndose de los grupos de estudio anteriormente mencionados. Todos los recién nacidos ingresados en la unidad neonatal se mantuvieron en homeostasis metabólica.

2.2. Condiciones de extracción y transporte. Las muestras de cordón se recogieron inmediatamente después de clamparlo, por aspiración independiente de la arteria y vena umbilical. Las obtenidas en el periodo neonatal, se hicieron por punción venosa, siempre en el contexto de otras determinaciones analíticas y en su caso se recabó

autorización paterna. La extracción de las muestras se efectuó sin tener en cuenta horario alguno y la misma se hizo lo más lentamente posible para evitar el riesgo de hemólisis, capaz de introducir un factor de error en la cuantificación de los parámetros de estudio.

Posteriormente, era trasladada de forma inmediata al laboratorio de analísis bioquímico, donde se dejaba la muestra en reposo, para que tuviera lugar la retracción del coágulo. Después se sometia a centrifugación durante 5 minutos a 3.000 rpm, separando el suero sobrenadante.

2.2.3.-Condiciones de conservación. Para las técnicas que pueden realizarse dentro de las 24 horas siguientes a la extracción (calcio, fosfato y fosfatasa alcalina), el suero se conservó en nevera entre 0º y 5ºC; para el resto de las determinaciones en la que es necesario reunir un número mayor de muestras (determinaciones hormonales: osteocalcina y parathormona), se separaron alicuotas de suero y se sometieron a congelación a -20ºC.

3.-MATERIAL DE LABORATORIO PARA LAS DETERMINACIONES ANALITICAS.

3.1.-OSTEOCALCINA (BGP) y HORMONA PARATIROIDEA (PTH).

3.1.1. Material para el equipo de RIA: 1) Pipetas de 50, 200 y 1.000 microlitros; 2) agitador de tubos; 3) congelador a -30ºC; 4) cámara fría; 5) centrífuga con capacidad para 120 tubos; 6) contador multigamma LKB-1.260; 7) material fungible.

3.1.2. RIA de osteocalcina. Se utilizó un Kit de

radioinmunoensayo suministrado por "Inmuno Nuclear Corporation. (Cat. Nº. 1.5065. Stillwater, Minnesota 55082 USA)", que consta de los siguientes reactivos: 1) Osteocalcina estandar (BGP bovina) a distintas concentraciones para la constitución de la curva estandar. 2)Suero de conejo anti-osteocalcina (anti-BGP bovina de conejo). 3)Osteocalcina marcada con con I^{125}. 4) precipitante del complejo. 5) Suero control de osteocalcina.

3.1.3. RIA de parathormona. Se ha utilizado un Kit suministrado por INCSTAR PTH-MM (Cat. Nº 51065-51130, Stillwater, Minnesota 55082). El Kit esta compuesto de: 1) Estandares para la curva estandar, 2)suero anti PTH-MM, 3) hormona marcada con I^{125}, 4) complejo precipitante, 5) sueros control a dos niveles.

3.2.CALCIO TOTAL. Se ha utilizado el "Calcium analizer-940" de la casa Corning, empleando los reactivos siguientes: 1) Solución de hidróxido de potasio (KOH) 1M; 2) Etilenglicol bis (B-eter aminotil)N,N' ácido tetrácetico. Solución EGTA 0.04% peso/volumen; 3) Solución estandar de calcio 10.0 mg% (5 meq/L); 4) Indicador de calceina en polvo para su reconstitución.

3.3. FOSFORO INORGANICO. Fue analizado mediante el aparato:" Spectronic 70, Bausch Lomb. Lector automático-KLB ultrala system". Los Kits para la cuantificación de fósforo han sido suministrados por la casa comercial Boehringer Mannheim Gmb. Se han utilizado los siguientes reactivos: 1) Vanadato (vanadato amónico: 21 mmol/l; ácido nítrico: 0.28 N). 2) Molibdato (molibdato amónico: 40 mmol/l; ácido

sulfúrico: 2.5 N). 3) Estandar (fósforo: 0.5 mg/100 ml; ácido tricloroacético: 1.2 mol/l).

3.4. FOSFATASA ALCALINA. Se utiliza un espectrofotómetro, del tipo "Enzyme Activity Analizer system TR, Beckman". La fórmula empleada fue:1) p-nitrofenil fosfato: 1.465 gr. 2) buffer AMP, 625 M pH 10.25, hasta 250 ml.3) MgC12 1 M: 0.050 ml.

4.-METODO DE LABORATORIO. PROCEDIMIENTO.

4.1. OSTEOCALCINA. Se han descrito un gran número de procedimientos de RIA, diferenciándose principalmente en la técnica utilizada para separar el complejo anticuerpo-hormona, de la hormona libre (CASTILLO, 1979). En el método utilizado se emplea, un suero de cabra precipitante del complejo formado por un suero de conejo antiosteocalcina bovina. El proceso de la determinación, queda esquematizado en la TABLA VI.

4.2. HORMONA PARATIROIDEA. El procedimiento de laboratorio, queda sintetizado en la TABLA VII.

4.3. CALCIO. En esencia, consiste en tener en la cubeta una determinada fluorescencia. La dosificación se para cuando todo el calcio de la muestra añadida (100 µl, ha sido unida al EGTA y el nivel predeterminado de fluorescencia ha sido alcanzado. El fluorímetro define automáticamente el final del proceso y un calculador electrónico muestra la concentración de calcio.

Para comprobar el funcionamiento del equipo, técnica y reactivos, se emplean simultaneamente un suero control, una

TABLA VI-. PROCEDIMIENTO DE RIA PARA OSTEOCALCINA.

	Activ. total	NSB	OSTEOCALCINA ESTANDARES (Valores nominales)							CONTROL Y MUESTRAS DESCONOCIDAS	
			0	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	1	2
Tubo número	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	21-22
Estandar 0		50	50								
Estandares				50	50	50	50	50	50		
Control y muestras desconocidas										50	50
Suero de osteocalcina de conejo antibovino	¡----------200----------										
Suero de osteocalcina I^{125}	¡----------200----------										

Agitar suavemente. Incubar durante 16-24 h a 2-8 °C

Complejo precipitante de cabra anti-conejo (GAR-PPT)	¡----------500----------

Agitar suavemente. Incubar durante 2 h(+/-15 min), 2-8°C

Centrifugar 760xg durante 20 min. Decantar sobrenadante.

Contar cada tubo durante 60 segundos o más.

Todos los volumenes se dan en microlitros (µl).

TABLA VII-. PROCEDIMIENTO DE RIA PARA PTH-1.

	Activ. total	NSB	ESTANDARES pmol/L hPTH(Tyr^{43})44-68						CONTROL Y MUESTRAS DESCONOCIDAS	
			0	A	B	C	D	E	F	1	2
Tubo número	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	21-22
Estandar 0		100	100								
standares				100	100	100	100	100	100		
Control y muestras desconocidas										100	100
Suero anti-PTH de pollo		¡----------200----------									
		Agitar suavemente. Incubar durante 15+/-5min, 20-25^{o}C									
I^{125}PTH-MM		¡----------200----------									
		Agitar suavemente. Incubar 2h +/-15 min a 20-25^{0}C									
Complejo precipitante de cabra anti-pollo (GAC-PPT)		¡----------500----------									
		Agitar suavemente. Incubar 15 min +/-5 min a 20-25C									
		Centrifugar 760xg , 20 min. Decantar sobrenadante.									
		Contar cada tubo durante 60 segundos o más.									

Todos los volumenes se dan en microlitros (µl).

solución estandar de calcio, junto con las muestras desconocidas, en paralelo durante todo el ciclo.

4.4. FOSFORO INORGANICO. Brevemente, consiste en una desproteinización con ácido tricloroácetico, seguido de la reacción con molibdato y vanadato de amonio, medido a una longitud de onda de 405 nm. El proceso es el siguiente: a) Desproteinización: en un tubo de centrífuga, se pipetean 0.2 ml de muestra y 2 ml de tricloroacético (1.2 mol/l); se agita y deja en reposo durante 10 minutos a 20-25 ºC, para centrifugar después durante 10 minutos y extraer el sobrenadante. b) Reacción con molibdato y vanadato de amonio: pipetear el tubo de ensayo de la siguiente forma,

Reactivos	Blanco	Prueba
Sobrenadante de la desproteinización.	---	1.0 ml
Ac. tricloroacético.	1.0 ml	---
Vanadato amónico.	1.0 ml	1.0 ml
Molibdato amónico.	1.0 ml	1.0 ml

Después de realizar la mezcla, se esperan 10 minutos y se colorimetra el problema a 405 nm, frente al blanco. Pararelamente se colorimetra un patrón de concentración conocida (5 mg/dl) frente al blanco. Para el cálculo se aplica la siguiente fórmula:

$$[\text{Fósforo}] = \frac{\text{Do del problema}}{\text{Do del blanco}} \times \text{patrón.}$$

(*Do densidad óptica*)

4.5. FOSFATASA ALCALINA. El procedimiento para su determinación, es el siguiente: 1) en un espectrofotómetro

de longitud de onda de 405 nm, se ajusta la absorción a 0 con una cubeta conteniendo agua destilada. 2) En la otra cubeta limpia y seca, se pone 1 ml de reactivo y se calienta a 37ºC. 3) Adicionar 0.050 ml de muestra en la cubeta, mezclar vigorosamente e incubar un minuto exacto, leer y anotar la absorción (A_1). 4) Incubar dos minutos más y hacer una segunda lectura (A_2).

El cálculo se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Fosfatasa alcalina (UI/L)} = \frac{*A / \text{min}}{\text{Absortividad}} \times \frac{Vt}{Vs} \times 1.000.$$

$$*A = \frac{A^2 - A^1}{2};$$ Vt= volumen total= 1.05 ; Vs: volumen de la muestra= 0.05

Absortividad= absorción de una solución milimolar de p-nitrofenol a 405 nm: 18.8.

$$\text{Fosfatasa alcalina (UI/L)} = \frac{*A / \text{min}}{\text{Absortividad}} \times \frac{1.05}{0.05} \times 1.000 =$$

$$= \frac{*A/\text{min}}{18.8} \times \frac{1.05}{0.05} \times 1.000 = *A/\text{min} \times 1.117.$$

La unidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 µmol de p-nitrofenol por minuto en las condiciones antes especificadas.

5.-VALORACION DE LAS TECNICAS.

5.1. HORMONA PARATIROIDEA. En la TABLA VIII se exponen los datos de los resultados obtenidos de un RIA en el que se puede apreciar los distintos valores obtenidos para la actividad total, blanco, referencia y las distintas concentraciones de los estandares en los tubos comprendidos del 1 al 18.

TABLA VIII. PARATHORMONA. VALORACION DE LA TECNICA. RESULTADOS OBTENIDOS DE UN RIA EN EL QUE SE PUEDE APRECIAR LOS DISTINTOS VALORES OBTENIDOS PARA LA ACTIVIDAD TOTAL, BLANCO, REFERENCIA Y LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DE LOS ESTANDARES EN LOS TUBOS COMPRENDIDOS DEL 1 AL 18.

SEC	COD	T	CPM	CONC	%CV
1	Total	60	12465.8		
2	Total	60	12839.8		
PROM			12652.8		
3	blanco	60	1248.8		
4	blanco	60	987.2		
PROM			1118.0		
5	referencia	60	8019.8		
6	referencia	60	8081.4		
PROM			8050.6		
7	estandar	60	7610.8	0.620	
8	estandar	60	7574.4	0.620	
PROM			7592.6	0.620	
9	estandar	60	6899.8	1.250	
10	estandar	60	7087.1	1.250	
PROM			6993.5	1.250	
11	estandar	60	5984.6	2.550	
12	estandar	60	5807.2	2.550	
PROM			5895.9	2.550	
13	estandar	60	4378.9	5.550	
14	estandar	60	4158.3	5.550	
PROM			4268.6	5.550	
15	estandar	60	2895.8	11.000	
16	estandar	60	2489.8	11.000	
PROM			2692.8	11.000	
17	estandar	60	1848.2	22.000	
18	estandar	60	1953.1	22.000	
PROM			1900.6	22.000	

CHEQUE INTERNO DEL CONTADOR DE CENTELLEO

ESTANDAR	CONC.	CAL.CONC.	RESP.	%CV (CPM)	%CV(CONC)
0.1	0.00	0.045	6901.80		
0.2	0.00	0.000	6963.40		
PROM	*********	0.000	6932.600	****0.54	
1.1	0.62	0.599	6492.80		
1.2	0.62	0.640	6456.40		
PROM	*********	0.620	6474.60	****0.34	4.69

SEQ: secuencia; COD: código; T: tiempo; CPM: cuentas por minuto; CONC: concentración; %CV: coeficiente de variación; PROM: promedio; CAL CONC: cálculo de concentración; RES: respuesta.

En la notación de 0.1 a 0.6, se expresan las concentraciones teóricas de cada estandar y en la columna siguiente las concentraciones reales que se obtienen (columna cal. conc.), en la columna siguiente la respuesta y finalmente en las dos últimos, los coeficientes de variación de (cpm) y de la concentración. Los resultados se representan graficamente en una curva estandar (Figura 10) y finalmente los cpm, concentración y coeficiente de variación de cada una de las muestras. Los valores normales proporcionados por dicho Kit oscilan entre 29 y 85 pmol/l.

5.2. OSTEOCALCINA. El mismo procedimiento se ha seguido para la medida de osteocalcina, en la que los valores de referencia suministrados para este kit se encuentran entre 1.8 y 6.6 ng/ml. La curva estandar se representa en la Figura 11.

5.3. CALCIO TOTAL. El coeficiente de variación (CV%), define el control de calidad:

$$CV(\%) = \frac{\text{Desviación típica}}{\text{Media aritmética}} \times 100.$$

Las determinaciones repetidas diariamente usando sueros control, han dado resultados alrededor del 3%, que estan dentro de los límites de error permitidos, que son de 6% para el calcio. Los valores de referencia del laboratorio se encuentran entre 8.8 y 10.5 mg/dl.

5.4. FOSFORO INORGANICO. El rango normal considerado fue: 2.5-5 mg/dl.

5.5. FOSFATASA ALCALINA. La precisión del método se ha

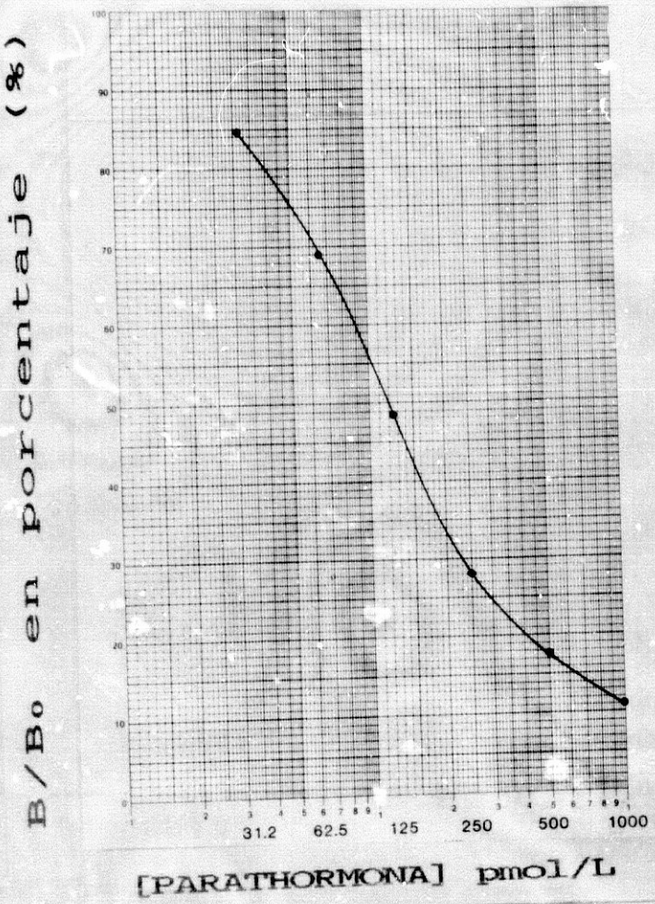


FIGURA 10.- Curva estándar para la cuantificación de parathormona media molécula (PTH-MM). Concentraciones (eje de abscisas) en picomoles por litro (pmol/L). B/Bo= Relación por cociente de las CPM (cuentas por minuto) de la muestra (B) y de las CPM del estandar (eje de ordenadas).

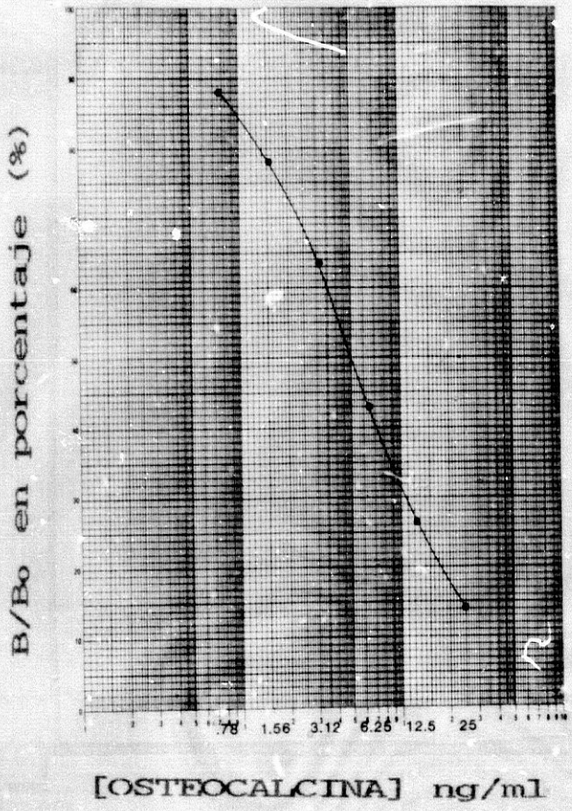


FIGURA 11.- Curva estándar para la cuantificación de osteocalcina (BGP). Concentraciones (eje de abscisas) en nanogramos por mililitro (ng/ml). B/Bo= Relación por cociente de las CPM (cuentas por minuto) de la muestra (B) y de las CPM del estandar (eje de ordenadas).

investigado con sueros control con valores medios de 23-90 y 206 UI/L, que para una precisión de +1 DS, fueron de 5.5, 2.4 y 1.1, dentro de los límites permitidos en esta técnica. Los valores de referencia se situaban entre 34-108 UI/L.

C) METODO BIOESTADISTICO.-

Se cotejan los datos paramétricos de la casuística y los resultados de laboratorio, aplicándose para su tabulación y análisis (SOKAL, 1979· MARTIN, 1986), el programa estadístico "ABSTAT" utilizado en un ordenador AMSTRAD PC1512DD y una calculadora programada Hewlett-Packard HP-97 con programas para ajuste de curvas y otros cálculos necesarios para la tabulación de los resultados.

TEST APLICADOS: Media (x), Desviación estandar (DS) y Error estandar de la media (SEM); test de rechazo de muestras extremas; analisis de la varianza (ANOVA) , test de Student y test de Welch, cuando existió diferencias entre las varianzas de las medias que se comparan); comparación de medias entre muestras apareadas; correlación lineal simple de Pearson; correlación lineal múltiple (método de mínimos cuadrados). Comparación de dos coeficientes de correlación mediante el test de transformación de "z" de "r" de Fisher (CARRASCO, 1983). Programa para funciones curvilineas (HEWLETT-PACKARD,1976). El nivel de significancia admitido fué de $p<0.05$.

METODOLOGIA DEL ESTUDIO ESTADISTICO (Ver diagrama adjunto)

1.- De acuerdo con el apartado 3) de objetivos, se obtienen los valores medios (± SEM) de arteria y vena

umbilical y se comparan mediante un test de muestras apareadas. Se hace un análisis de correlación entre los valores bioquímicos de arteria y vena y se estudia la regresión entre los mismos (DIAGRAMA -1-).

2.- Como indica el apartado 4) de objetivos, se subdivide la muestra de arteria umbilical en dos subgrupos, en función de la madurez fetal, según la gestación fuera menor de 37 semanas (DIAGRAMA -2-) o igual o mayor a 37 semanas (DIAGRAMA -3-). Se establecen los valores medios y el SEM de las características de madurez y somatométricas básicas (edad gestacional, peso, talla o longitud y perímetro cefálico) y se fijan los valores medios y el SEM, base referencial para posteriores tabulaciones de los valores serobiológicos objeto de estudio.

Como muestra el DIAGRAMA, los valores referidos como 4 y 6, corresponden a una muestra de recién nacidos de menos de 37 semanas de gestación y los referidos como 5 y 7, a una muestra de neonatos de 37 semanas o más de gestación. Mediante un análisis de la varianza (ANOVA), test de Bonferroni y/o Welch, se comparan y se establecen las características diferenciales entre los grupos siguientes: 2 versus (vs) 3, 4 vs 5, 6 vs 7, 4 vs 2, 6 vs 2, 5 vs 3 y 7 vs 3. Y mediante un test de Student para muestras apareadas, se estudian las características diferenciales entre: 6 vs 4 y 7 vs 5.

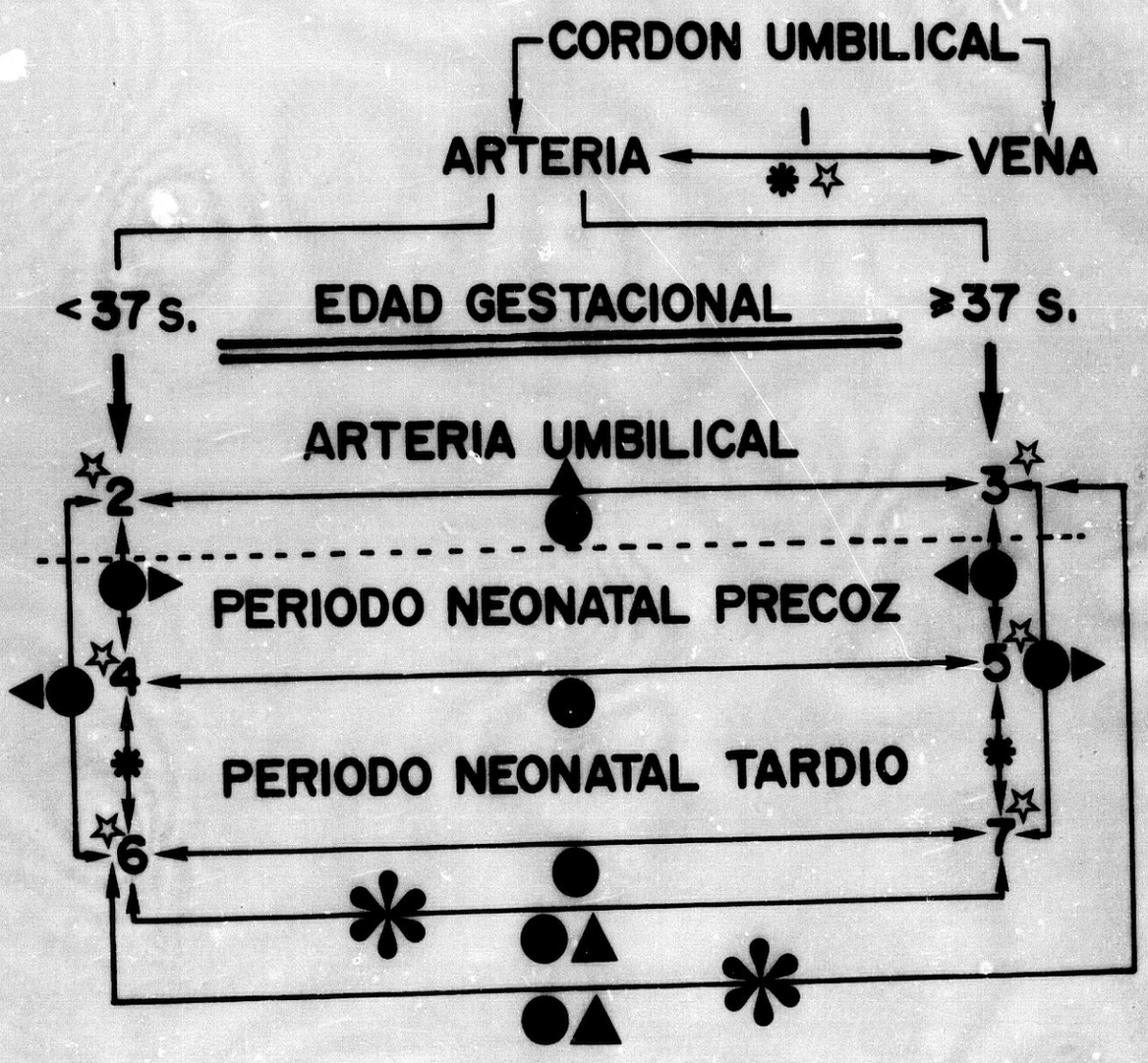
3.- Como se indica en el punto 5) de objetivos, se analizan y comparan las intercorrelaciones y regresiones de la madurez fetal con los factores serobiológicos estudiados, en los grupos: 2 vs 3, 4 vs 2, y 6 vs 2 y

también entre 5 vs 3, y 7 vs 3 . Aplicandose una correlación "r" de Pearson y el test de transformación "z" de "r" de Fisher, para la comnparación de correlaciones que resultaron significativas.

4.- Como señala el punto 6) de objetivos, la muestra 3 se toma como base de referencia de equilibrio serobiológico y crecimiento idóneo (parámetros bioquímicos de arteria umbilical de niños a término) y se homogeiniza mediante un test de rechazo de muestras extremas para la edad postconcepcional, con la muestra 6 de neonatos nacidos pretérmino, con un crecimiento y desarrollo postnatal entre 8 y 30 dias de vida, con el fin de establecer las características diferenciales (ANOVA, test de Welch, análisis de correlación y regresión y comparación de las correlaciones mediante el test de transformación "z" de "r" de Fisher), que muestran estos últimos respecto al crecimiento y desarrollo intrauterino.

Se analizan los incrementos de talla y las modificaciones séricas de los parámetros serobiológicos en los grupos 6 y 7 del DIAGRAMA, en el periodo neonatal y se establecen las características diferenciales mediante una comparación de medias (ANOVA y test de Welch), para una edad postnatal homogénea (test de rechazo de muestras extremas). Se estudian las correlaciones y regresiones en ambos grupos y se comparan las correlaciones significativas mediante un test de transformación "z" de "r" de Fisher. Aplicando un test de regresión lineal múltiple, se estudian los factores serobiológicos analizados que influyen en el crecimiento postnatal en ambos tipos de recién nacidos.

DIAGRAMA DEL ESTUDIO ESTADISTICO



TEST APLICADOS:

✱ datos apareados ("t" de STUDENT)

● análisis de la varianza (ANOVA)

☆ análisis de correlación ("r" PEARSON)/regresión

▲ comparación de correlaciones (transformación "z" de "r" de FISHER)

✱ CRECIMIENTO/FACTORES BIOLOGICOS

CAPITULO IV

RESULTADOS IV

A).- RESULTADOS DEL ANALISIS EN MUESTRAS DE CORDON UMBILICAL.

1) VALORES BIOQUIMICOS SERICOS GLOBALES DE LOS MARCADORES DE LOS ESTADOS DEL "TURNOVER" ÓSEO (BGP, PTH Y FA) Y METABOLICO FOSFOCALCICO (CA Y P).

En el conjunto de las 120 muestras obtenidas de la arteria umbilical, de neonatos cuyas características clínicas son: edad gestacional: rango: 25-42.7 semanas y coeficiente de variación (CV): 1.16; peso al nacimiento: rango: 800-4650 gramos y CV: 22.83; talla o longitud: rango: 41-62 centímetros y CV: 6.88 y perímetro cefálico: rango: 28-39 centímetros y CV: 5.96; las concentraciones de BGP fueron de: rango: 0.02-9.63 ng/ml y CV: 84.47; los niveles de PTH resultaron de: rango 30-260 pmol/L y CV: 61.71; la actividad de FA fue: rango: 40-400 UI/L y CV: 39.64; y el índice BGP/PTH osciló entre: rango: $2 \cdot 10^{-4}$ - $4.29 \cdot 10^{-1}$ y CV: 112.1. La calcemia resultó de: rango: 7.6-12.2 mg/dl y CV: 24.46; la fosforemia de: rango: 3.8-13 mg/dl y CV: 8.86 y el índice Ca/P de: rango: 0.69-2.55 y CV: 26.77.

2) COMPARACION DE LOS VALORES BIOQUIMICOS SERICOS, MARCADORES DE LOS ESTADOS DEL "TURNOVER" OSEO (BGP, PTH Y FA) Y METABOLICO FOSFOCALCICO (CA Y P) DE ARTERIA Y VENA UMBILICAL (AU Y VU, RESPECTIVAMENTE).

En la tabla IX, se recopilan los valores (media ± SEM) y se comparan (test t de muestras apareadas) los marcadores bioquímicos séricos de los estados del "turnover" óseo (BGP, PTH y FA) y metabólico fosfocálcico (Ca y P) de AU y VU. Cabe destacar que las concentraciones

TABLA IX. COMPARACION DE LOS VALORES BIOQUIMICOS SERICOS (MARCADORES DEL "TURNOVER" OSEO: OSTEOCALCINA, PARATHORMONA, FOSFATASA ALCALINA; Y DEL ESTADO METABOLICO FOSFOCALCICO: CALCEMIA Y FOSFOREMIA) DE VENA (VU) Y ARTERIA (AU) UMBILICAL (EDAD GESTACIONAL: 26-42 SEMANAS).

	CORDON UMBILICAL				
	AU	VU	gl	t	p
BGP (ng/ml)	2.46 ± 0.18 (*) (120) ($)	3.08 ± 0.23 (120)	119	4.40	<0.0005
PTH (pmol/L)	67.50 ± 4.12 (102)	61.63 ± 3.42 (102)	101	1.52	NS
FA (UI/L)	105.97 ± 4.28 (96)	102.28 ± 3.46 (96)	93	0.69	NS
BGP/PTH	0.05 ± 0.006 (102)	0.06 ± 0.006 (102)	101	1.25	NS
Ca (mg/dl)	9.85 ± 0.08 (120)	9.78 ± 0.09 (120)	119	0.71	NS
P (mg/dl)	7.01 ± 0.15 (120)	6.88 ± 0.15 (120)	119	1.25	NS
Ca/P	1.49 ± 0.03 (120)	1.48 ± 0.03 (120)	119	0.24	NS

BGP: osteocalcina ; PTH: hormona paratiroidea ; Ca: calcemia ; P: fosforemia ; FA: fosfatasas alcalinas ; UI: unidades internacionales ; (*): media ± SEM ; ($): número de casos; t: test t de Student (datos apareados); p: nivel de significancia; NS: no significativo.

de BGP de VU resultaron significativamente más elevadas que las de AU ($p<0.005$). Las figuras 12 y 13 muestran graficamente los valores séricos de BGP, PTH y FA, Ca y P, de arteria y vena umbilical, respectivamente y la comparación de los valores medios en cordón umbilical.

3) ANALISIS DE CORRELACION Y REGRESION DE LOS VALORES BIOQUIMICOS SERICOS DE LOS ESTADOS DEL "TURNOVER" OSEO (BGP, PTH Y FA) Y METABOLICO FOSFOCALCICO (CA Y P) ENTRE ARTERIA Y VENA UMBILICAL (AU Y VU, RESPECTIVAMENTE).

La tabla X recoge los valores del índice de correlación y la tabla XI muestra los resultados del análisis de regresión. Las figuras 14-20, representan de forma gráfica las regresiones establecidas.

4) ANALISIS DE LA INTERCORRELACION Y REGRESION ENTRE PARAMETROS DE MADUREZ FETAL (EG), EL GRADO DE ACIDOSIS INTRAPARTO (pH_{AU}), LOS MARCADORES SERICOS (AU) DE LOS ESTADOS DEL "TURNOVER" OSEO (BGP, PTH Y FA) Y METABOLICO FOSFOCALCICO (CA Y P).

En la tabla XII (matriz de intercorrelación), se recopilan los valores de los coeficientes de correlación determinados y en la tabla XIII, se recoge el resultado del análisis de regresión, representado graficamente mediante las figuras 21-31.

Destaca la correlación lineal simple e inversa entre madurez fetal (EG) y las concentraciones de BGP ($n:120$, $r:-0.23$, $t: 2.50$, $p<0.05$); y las correlaciones lineales simples, directa e inversa respectivamente, entre la madurez fetal (EG) y las concentraciones séricas de Ca (n:

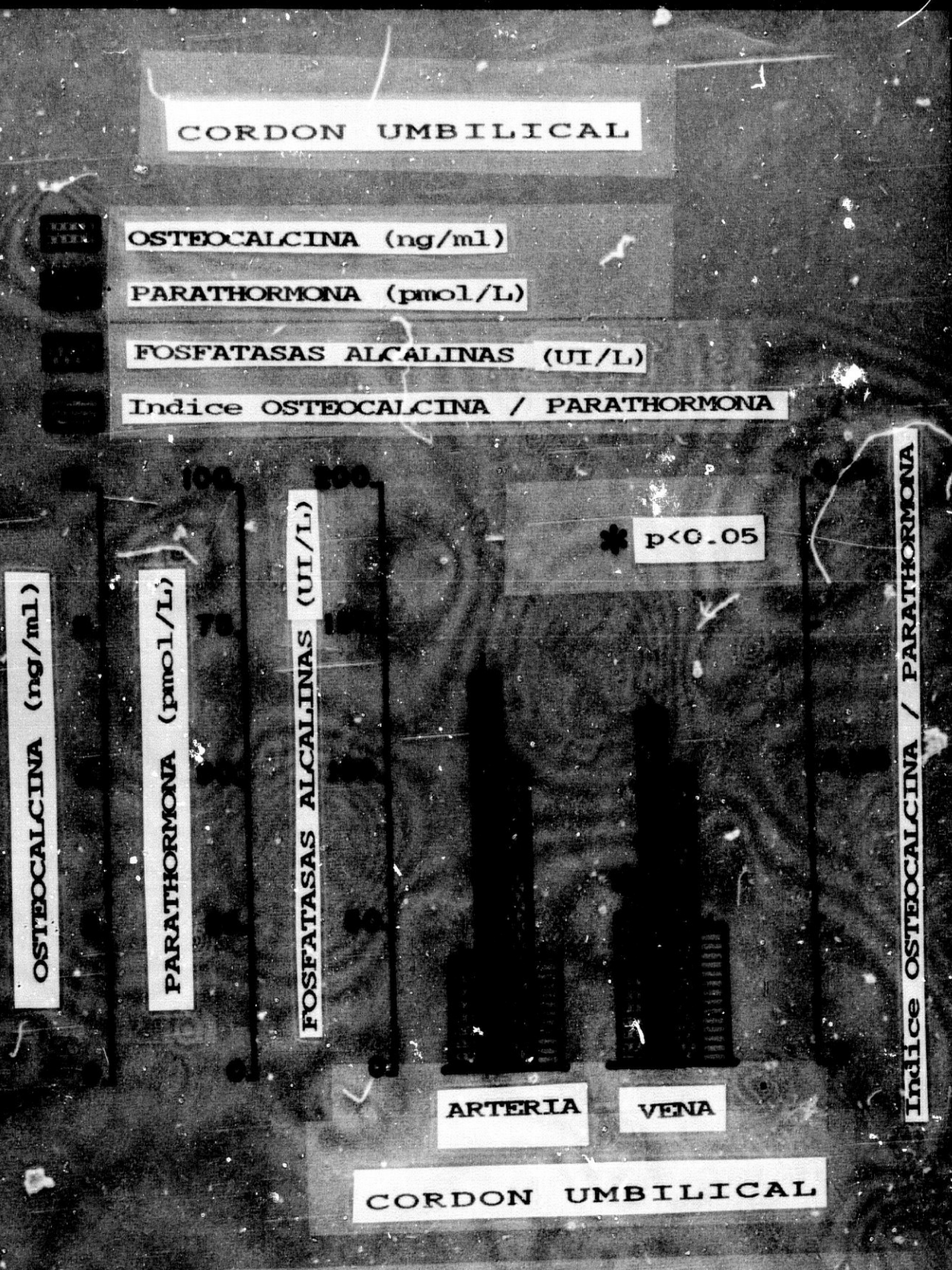


FIGURA 12.- Comparación de las concentraciones séricas de osteocalcina (n: 120), parathormona (n: 102), fosfatasas alcalinas (n: 96) e índice osteocalcina/parathormona (n: 102) de arteria y vena umbilical.

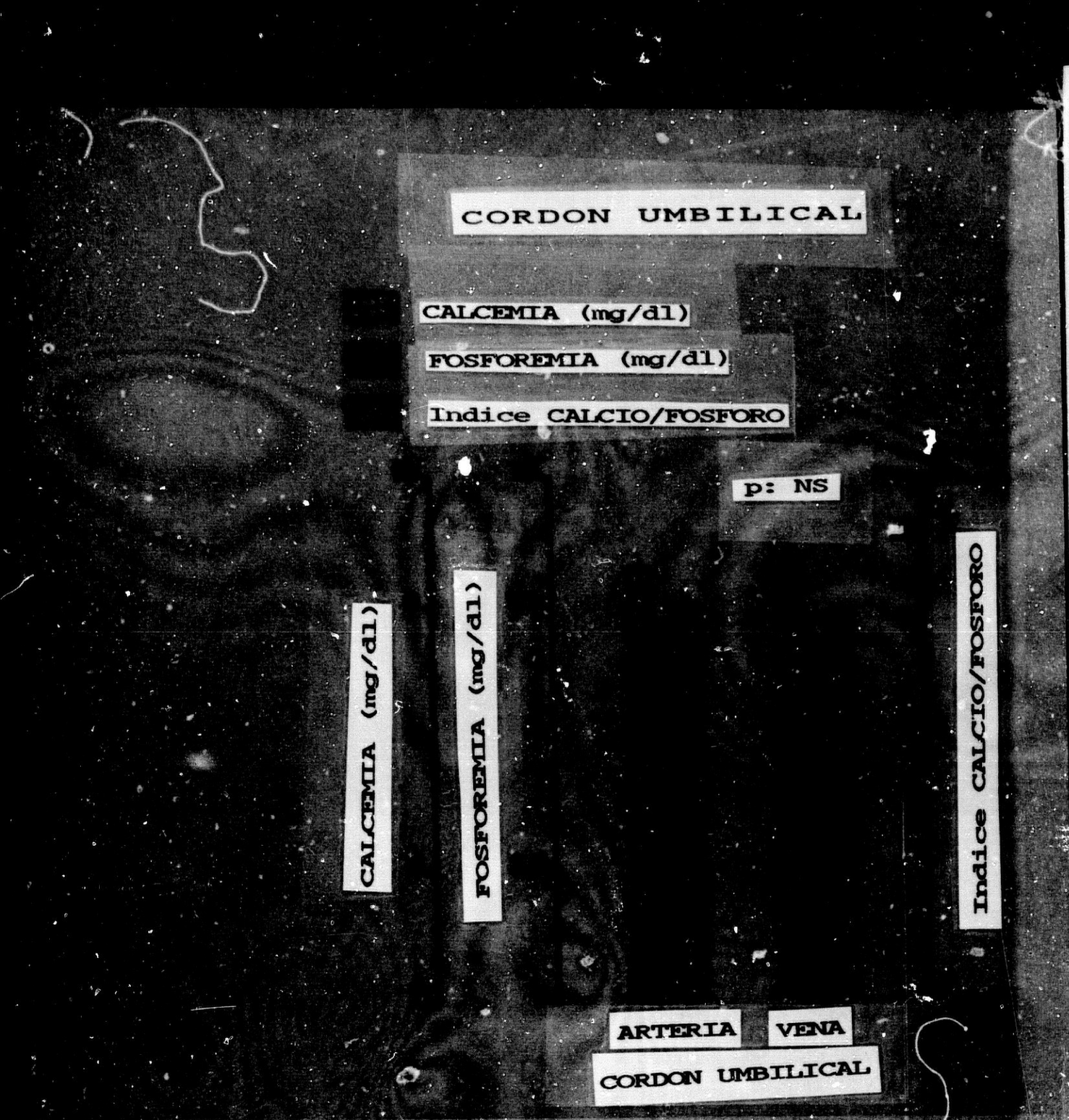


FIGURA 13.- Comparación de las concentraciones séricas de calcio (n: 120), fósforo (n: 120) e índice calcio/fósforo en arteria y vena umbilical.

TABLA X. MATRIZ DE CORRELACION DE LOS MARCADORES SERICOS DEL "TURNOVER OSEO (OSTEOCALCINA, PARATHORMONA Y FOSFATASAS ALCALINAS Y ESTADO METABOLICO FOSFOCALCICO (CALCEMIA Y FOSFOREMIA) ENTRE MUESTRAS DE ARTERIA (AU) Y VENA UMBILICAL (VU).

BGPa	1.00 (*)						
	(120) ($)						
PTHa	-0.20	1.00					
	(102)	(102)					
FAa	0.11	-0.02	1.00				
	(96)	(83)	(96)				
Caa	-0.20	-0.24	-0.01	1.00			
	(120)	(102)	(96)	(120)			
Pa	-0.18	0.23	0.08	-0.23	1.00		
	(120)	(102)	(96)	(120)	(120)		
BGP/PTHa	0.64	-0.35	0.05	0.08	-0.21	1.00	
	(102)	(102)	(83)	(102)	(102)	(102)	
Ca/Pa	0.12	-0.30	0.10	0.43	-0.90	0.23	1.00
	(120)	(102)	(96)	(120)	(120)	(102)	(120)
BGPv	0.79	-0.21	0.11	-0.14	-0.29	0.52	0.22
	(120)	(102)	(96)	(120)	(120)	(102)	(120)
	1.00						
	(120)						
PTHv	-0.09	0.51	-0.05	-0.26	0.19	-0.20	-0.26
	(103)	(102)	(83)	(103)	(103)	(102)	(103)
	-0.15	1.00					
	(103)	(103)					
FAv	0.07	-0.12	0.38	0.07	-0.06	0.01	0.10
	(99)	(84)	(94)	(99)	(99)	(84)	(99)
	0.05	-0.07	1.00				
	(99)	(84)	(99)				
Cav	-0.003	-0.22	0.07	0.48	-0.19	0.13	0.25
	(120)	(102)	(96)	(120)	(120)	(102)	(120)
	0.08	-0.24	0.18	1.00			
	(120)	(103)	(99)	(120)			
Pv	-0.14	0.27	0.11	-0.25	0.61	-0.35	-0.62
	(120)	(102)	(96)	(120)	(120)	(102)	(120)
	-0.23	0.002	0.05	-0.12	1.00		
	(120)	(103)	(99)	(120)	(120		
BGP/PTHv	0.63	-0.30	0.12	-0.02	-0.36	0.48	0.31
	(103)	(102)	(83)	(103)	(103)	(102)	(103)
	0.87	-0.36	0.03	0.22	-0.29	1.00	
	(103)	(103)	(84)	(103)	(103)	(103)	
Ca/Pv	0.20	-0.34	0.12	0.37	-0.73	0.31	0.75
	(120)	(102)	(96)	(120)	(120)	(102)	(120)
	0.27	-0.36	0.18	0.54	-0.75	0.41	1.00
	(120)	(103)	(99)	(120)	(120)	(103)	(120)
	BGPv	PTHv	FAv	Cav	Pv	BGP/PTHv	Ca/Pv

BGP: osteocalcina ; PTH: parathormona; FA: fosfatasas alcalinas ; Ca: calcemia; P: fosforemia; BGP/PTH: índice osteocalcina / parathormona; Ca/P: índice calcio / fósforo; a: arteria umbilical; v:vena umbilical; (*): r: coeficiente de correlación; ($): número de casos.

TABLA XI. ANALISIS DE REGRESION DE LOS MARCADORES SERICOS DE ACTIVIDAD OSEA (OSTEOCALCINA, PARATHORMONA Y FOSFATASA ALCALINA) Y ESTADO METABOLICO FOSFOCALCICO (CALCEMIA, FOSFOREMIA), ENTRE MUESTRAS DE ARTERIA (AU)(y) Y VENA UMBILICAL (VU)(x).

	n	r	cd	a	b	F	t	p
BGP	120	0.80	0.63	0.64	0.46	204.80	14.31	<0.0005
PTH	102	0.51	0.26	0.61	29.72	35.56	5.96	<0.0005
FA	94	0.38	0.15	0.46	58.20	16.24	4.03	<0.0005
Ca	120	0.48	0.23	0.39	5.96	36.97	6.08	<0.0005
P	120	0.61	0.37	0.60	2.87	69.96	8.36	<0.0005
BGP/PTH	102	0.48	0.23	0.47	0.026	31.36	5.59	<0.0005
Ca/P	120	0.75	0.56	0.75	0.36	153.74	12.38	<0.0005

BGP: osteocalcina; PTH: parathormona; FA: fosfatasas alcalinas; Ca: calcemia total; P:fosforemia; r: coeficiente de correlación; cd: coeficiente de determinación; a: coeficiente de regresión; b: termino independiente; n: número de casos; F: F de Snedecor (ANOVA de la regresión); t: t de Student; p: nivel de significancia. Expresión de la regresión: $y = a \cdot x + b$.

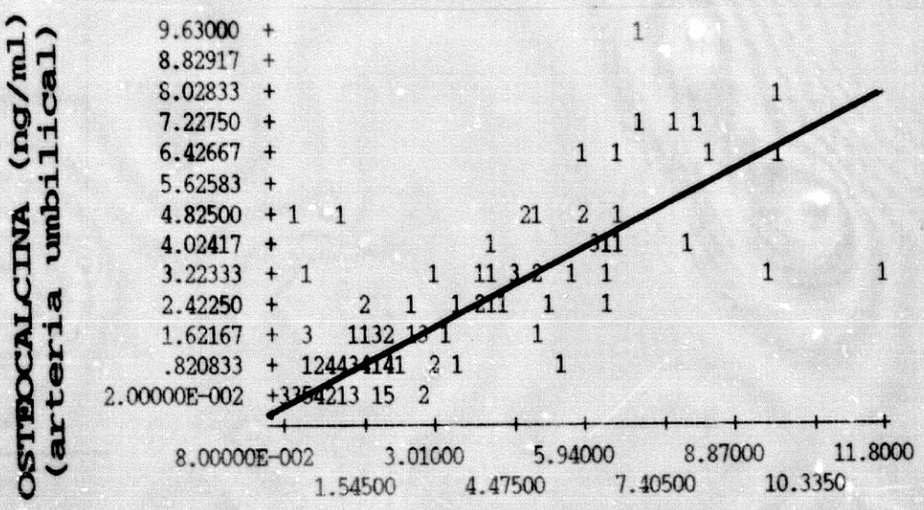
FIGURA 14.- Representación gráfica de la regresión de los niveles séricos de "OSTEOCALCINA" en vena y arteria umbilical de recién nacidos (n:120) entre las 26.7 y 42.7 semanas de edad gestacional.

FIGURA 15.- Representación gráfica de la regresión de los niveles séricos de "PARATHORMONA" en vena y arteria umbilical de recién nacidos (n:102) entre las 26.7 y 42.7 semanas de edad gestacional.

CORDON UMBILICAL

FIGURA 14

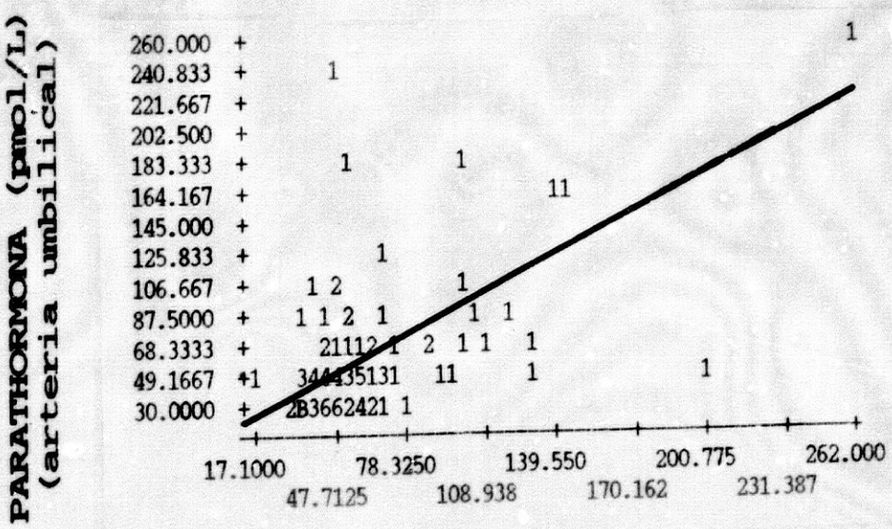
n: 120
r: 0.80
$F_{1,118}$= 204.80
t: 14.31
p<0.0005
y= 0.64-x + 0.46



OSTEOCALCINA (ng/ml)
(vena umbilical)

FIGURA 15

n: 102
r: 0.51
$F_{1,100}$= 35.56
t: 5.96
p<0.0005
y= 0.61-x + 29.72



PARATHORMONA (pmol/L)
(vena umbilical)

FIGURA 16.- Representación gráfica de la regresión de los niveles séricos de "FOSFATASAS ALCALINAS" en vena y arteria umbilical de recién nacidos (n:94) entre las 26.7 y 42.7 semanas de edad gestacional.

FIGURA 17.- Representación gráfica de la regresión del "Indice OSTEOCALCINA (BGP)/PARATHORMONA (PTH)" en vena y arteria umbilical de recién nacidos (n:102) entre las 26.7 y 42.7 semanas de edad gestacional.

CORDON UMBILICAL

FIGURA 16

n: 94
r: 0.38
$F_{1,92}$= 35.56
t: 5.96
p<0.0005
y= 0.46·x + 58.20

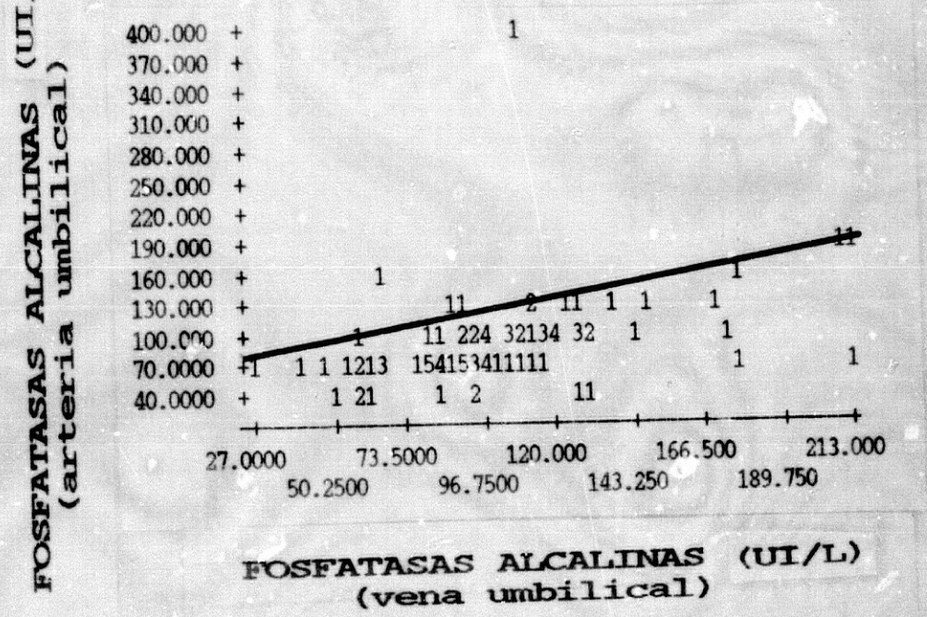


FIGURA 17

n: 102
r: 0.48
$F_{1,100}$= 31.36
t: 5.59
p<0.0005
y= 0.47·x + 0.026

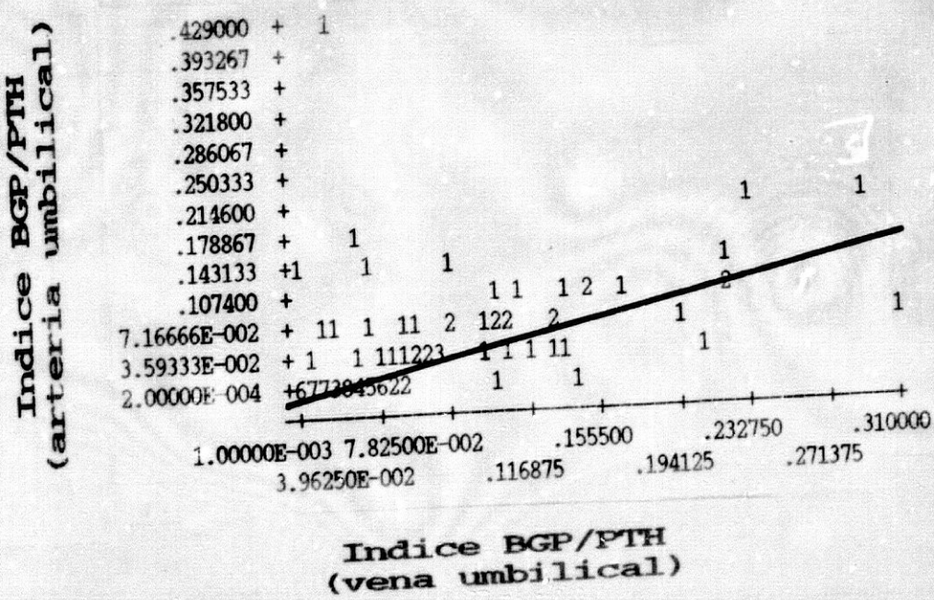


FIGURA 18.- Representación gráfica de la regresión de los niveles séricos de "CALCIO" en vena y arteria umbilical de recién nacidos (n:120) entre las 26.7 y 42.7 semanas de edad gestacional.

FIGURA 19.- Representación gráfica de la regresión de los niveles séricos de "FOSFORO" en vena y arteria umbilical de recién nacidos (n:120) entre las 26.7 y 42.7 semanas de edad gestacional.

CORDON UMBILICAL

FIGURA 18

n: 120
r: 0.48
$F_{1,118}$= 36.97
t: 6.08
p<0.0005
y= 0.23-x + 0.3

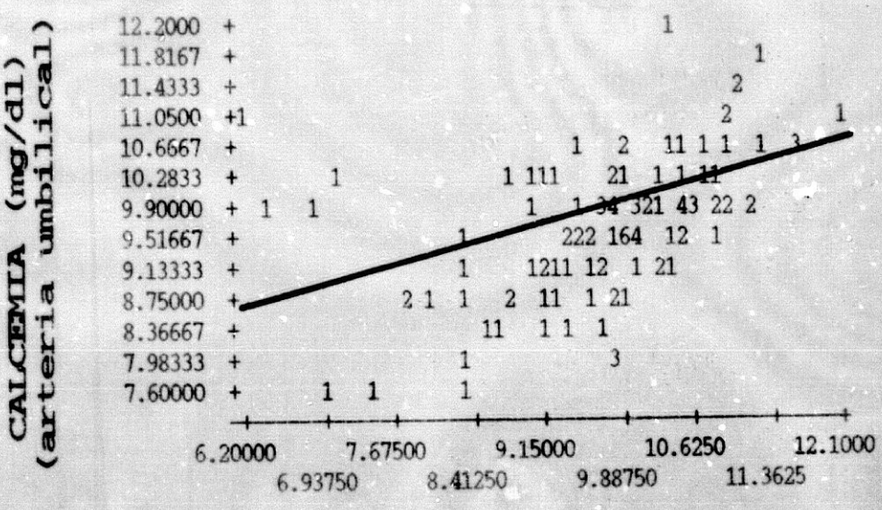


FIGURA 19

n: 120
r: 0.61
$F_{1,118}$= 69.96
t: 8.36
p<0.0005
y= 0.60-x + 2.87

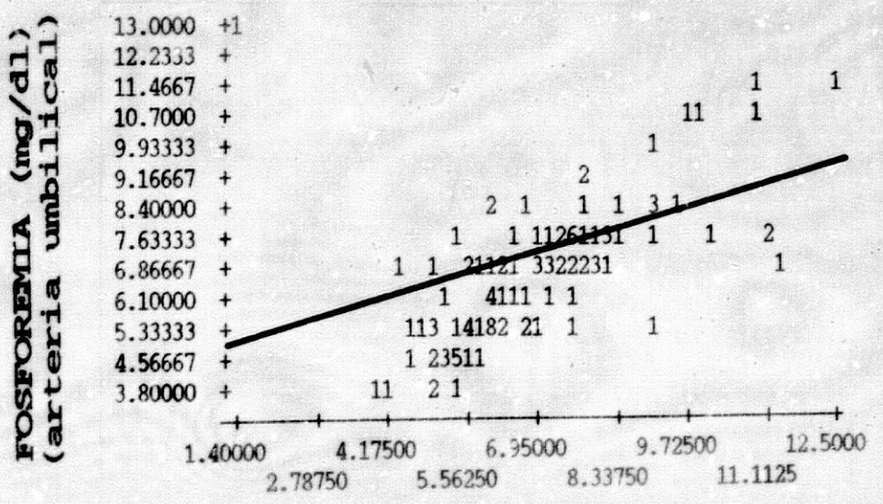


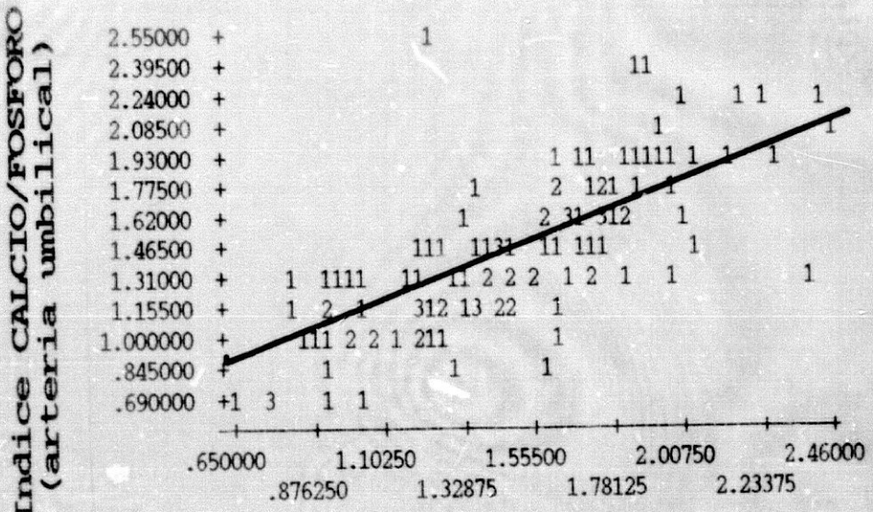
FIGURA 20.- Representación gráfica de la regresión del "Indice CALCIO/FOSFORO" en vena y arteria umbilical de recién nacidos (n:120) entre las 26.7 y 42.7 semanas de edad gestacional.

FIGURA 21.- Representación gráfica de la regresión de los niveles séricos de "OSTEOCALCINA" de arteria umbilical y la edad gestacional en recién nacidos (n:120) entre las 26.7 y 42.7 semanas de gestación.

CORDON UMBILICAL

FIGURA 20

n: 120
r: 0.75
$F_{1,118}$= 153.74
t: 12.38
p<0.0005
y= 0.75·x + 0.36



ARTERIA UMBILICAL

FIGURA 21

n: 120
r:-0.23
$F_{1,118}$= 6.29
t: 2.51
p<0.01
y= −0.02·x + 8.21

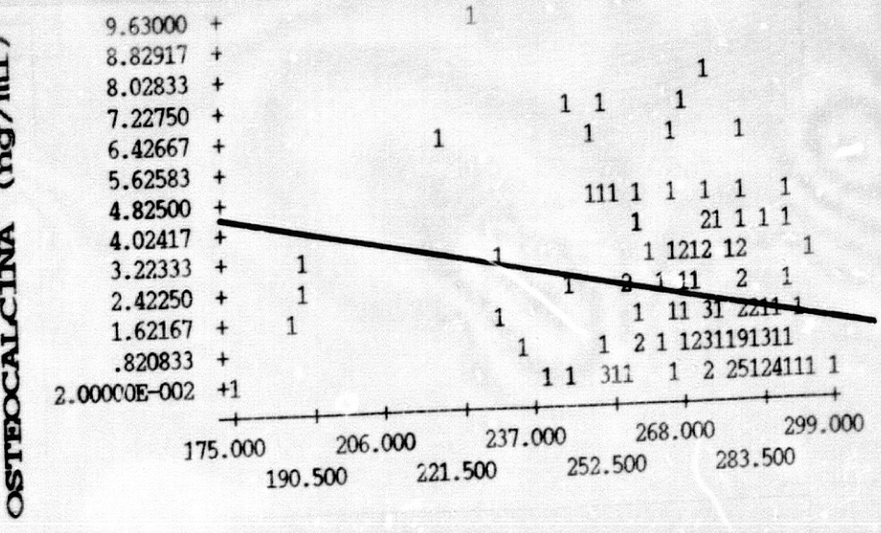


TABLA XII.MATRIZ DE INTERCORRELACION DE LA MADUREZ FETAL (edad gestacional), GRADO DE ACIDOSIS INTRAPARTO (pH de arteria umbilical), LOS MARCADORES SERICOS DEL "TURNOVER" OSEO (OSTEOCALCINA, HORMONA PARATIROIDEA Y FOSFATASAS ALCALINAS), LOS MARCADORES SERICOS DEL ESTADO DEL METABOLISMO FOSFOCALCICO (CALCEMIA Y FOSFOREMIA) Y DE LOS INDICES BGP/PTH Y Ca/P, EN MUESTRAS DE ARTERIA UMBILICAL.

EG	1.00 (*) (120) ($)								
BGP	-0.22 (120)	1.00 (120)							
PTH	-0.10 (102)	-0.20 (102)	1.00 (102)						
FA	-0.01 (96)	0.12 (96)	-0.02 (83)	1.00 (96)					
P	-0.34 (120)	-0.18 (120)	0.23 (102)	-0.09 (96)	1.00 (120)				
Ca	0.46 (120)	-0.20 (120)	-0.24 (102)	-0.01 (96)	-0.23 (120)	1.00 (120)			
BGP/PTH	0.004 (102)	0.64 (102)	-0.35 (102)	0.05 (83)	-0.21 (102)	-0.01 (102)	1.00 (102)		
Ca/P	0.40 (120)	0.13 (102)	0.30 (102)	0.10 (96)	-0.90 (120)	0.47 (120)	0.23 (120)	1.00 (120)	
pH	-0.01 (120)	0.04 (120)	0.05 (102)	0.15 (96)	-0.08 (120)	-0.20 (120)	0.05 (102)	0.05 (120)	1.00 (120)

EG: edad gestacional; BGP: osteocalcina; PTH: parathormona; FA: fosfatasas alcalinas; Ca: calcemia; P: fosforemia; (*): r: coeficiente de correlación; ($): número de casos correlacionados.

TABLA XIII. ANALISIS DE REGRESION DE LA MADUREZ FETAL (edad gestacional), EL GRADO DE ACIDOSIS INTRAPARTO (pH de arteria umbilical), LOS MARCADORES SERICOS DE LA ACTIVIDAD OSEA (OSTEOCALCINA, PARATHORMONA, Y FOSFATASAS ALCALINAS) Y LOS MARCADORES SERICOS DEL ESTADO METABOLICO FOSFOCALCICO (CALCEMIA Y FOSFOREMIA), DE ARTERIA UMBILICAL.

REGRESION (x,y)	n	r	cd	a	b	F	t	α	p
(EG, BGP)	120	-0.23	0.05	-0.02	8.21	6.29	2.50	<0.05	#
(EG, Ca)	120	0.46	0.21	0.02	4.90	31.94	5.65	<0.0005	*
(EG, P)	120	-0.35	0.12	-0.03	14.31	16.11	4.0	<0.0005	*
(EG, Ca/P)	120	0.39	0.15	0.007	-0.42	21.14	4.59	<0.0005	*
(Ca, BGP)	120	-0.21	0.04	-0.50	7.29	5.22	2.28	<0.05	#
(Ca, PTH)	102	-0.24	0.06	-11.59	180.84	6.15	2.48	<0.01	*
(Ca, Ca/P)	120	0.47	0.22	0.22	-0.64	34.14	5.84	<0.0005	*
(P, Ca/P)	120	-0.90	0.81	-0.21	2.97	513.60	22.66	<0.0005	*
(PTH, BGP)	102	-0.20	0.04	-0.01	3.38	4.22	2.05	<0.05	#
(PTH, P)	102	0.23	0.05	5.39	29.07	5.61	2.36	<0.01	*
(Ca/P, PTH)	102	-0.30	0.09	-31.09	112.96	10.22	3.19	<0.005	*
(pH, Ca)	120	-0.21	0.04	-2.61	28.75	5.42	2.32	<0.01	*

EG: edad gestacional; BGP: osteocalcina; PTH: parathormona; Ca: calcemia total; P:fosforemia; r: coeficiente de correlación; cd: coeficiente de determinación; a: coeficiente de regresión; b: término independiente; n: número de casos; F: F de Snedecor (ANOVA de la regresión); t: t de Student; $\alpha = 0.05/v$ siendo v el número de correlaciones en las que interviene una de las variables analizadas y * $p = \alpha / v < 0.0125$; p: nivel de significancia. #: no significativo. Expresion de la regresión: $y = a \cdot x + b$.

FIGURA 22.- Representación gráfica de la regresión de los niveles séricos de "CALCIO" de arteria umbilical y la edad gestacional en recién nacidos (n:120) entre las 26.7 y 42.7 semanas de gestación.

FIGURA 23.- Representación gráfica de la regresión de los niveles séricos de "FOSFORO" de arteria umbilical y la edad gestacional en recién nacidos (n:120) entre las 26.7 y 42.7 semanas de gestación.

ARTERIA UMBILICAL

FIGURA 22

n: 120
r: 0.46
$F_{1,118}$= 31.94
t: 5.65
p<0.0005
y= 0.02·x + 4.90

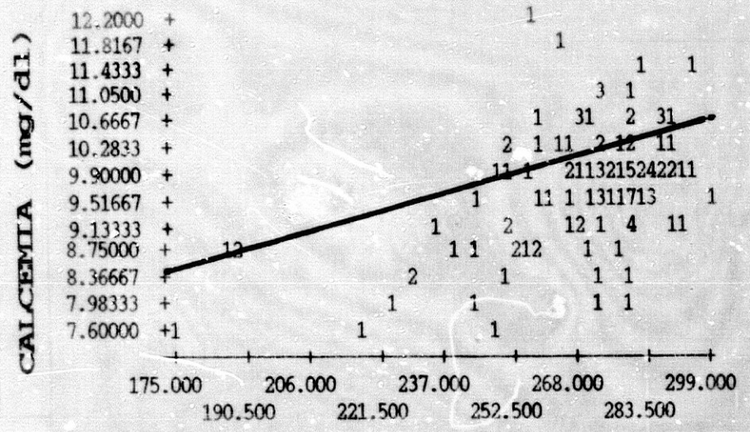


FIGURA 24.- Representación gráfica de la regresión del "Indice CALCIO/FOSFORO" de arteria umbilical y la edad gestacional en recién nacidos (n:120) entre las 26.7 y 42.7 semanas de gestación.

ARTERIA UMBILICAL

FIGURA 23

n: 120
r: −0.35
$F_{1,118}$= 16.11
t: 4.01
p<0.0005
y= −0.03·x + 14.31

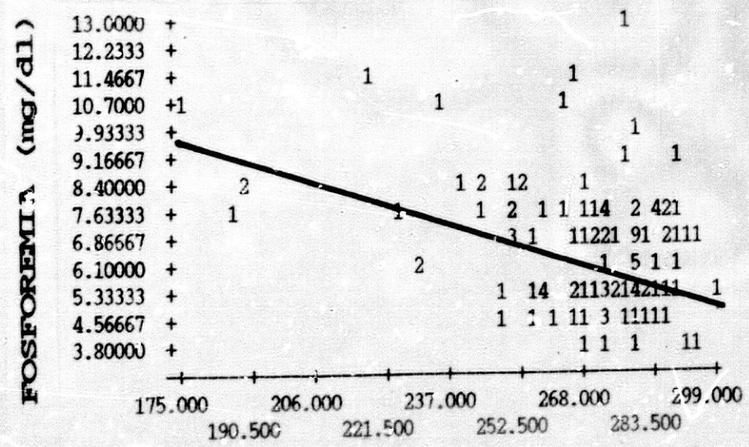
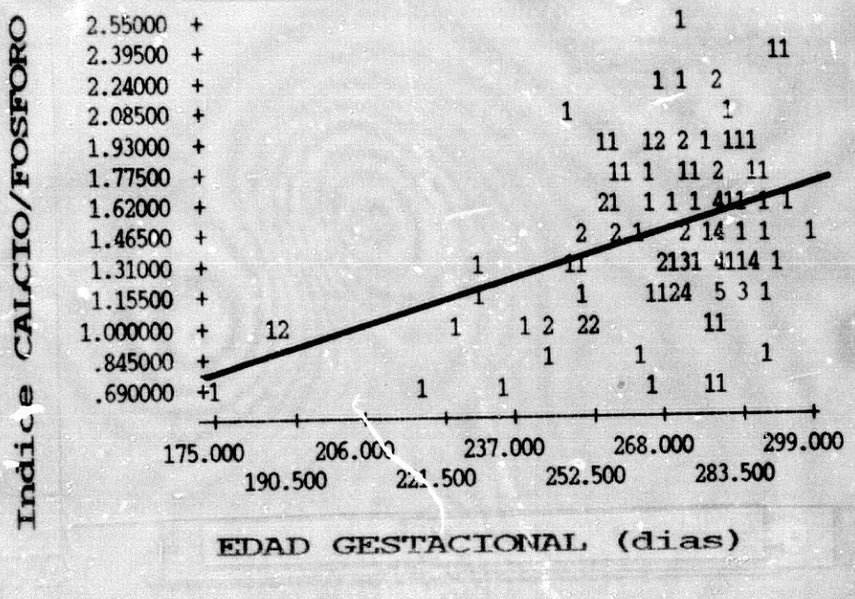


FIGURA 25.- Representación gráfica de la regresión de los niveles séricos de "CALCIO" y "OSTEOCALCINA" de arteria umbilical de recién nacidos (n:120) entre las 26.7 y 42.7 semanas de gestación.

ARTERIA UMBILICAL

FIGURA 24

n: 120
r: 0.39
$F_{1,118}$= 21.15
t: 4.60
p<0.0005
y= 0.007-x - 0.42



ARTERIA UMBILICAL

FIGURA 25

n: 120
r: −0.21
$F_{1,118}$= 5.22
t: 2.28
p<0.05
y= −0.49-x + 7.29

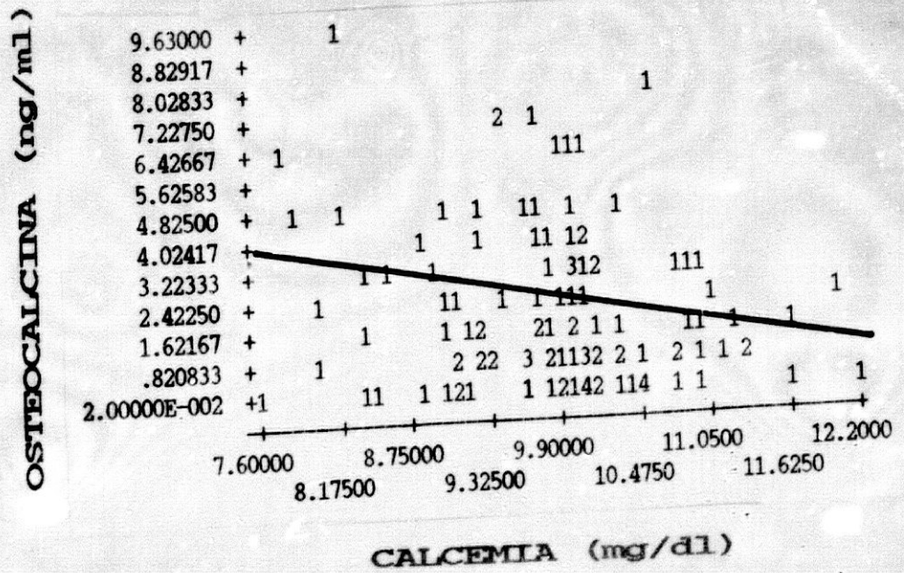


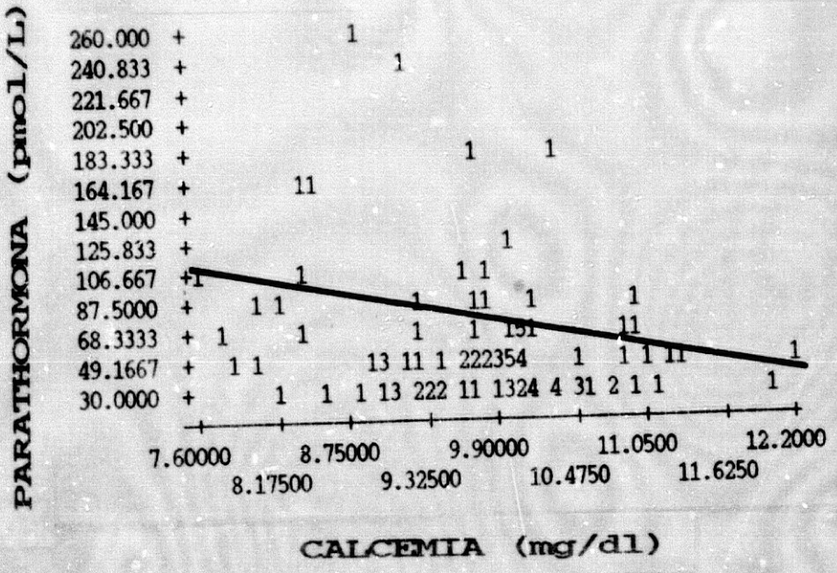
FIGURA 26.- Representación gráfica de la regresión de los niveles séricos de "CALCIO" y "PARATHORMONA" de arteria umbilical de recién nacidos (n:102) entre las 26.7 y 42.7 semanas de gestación.

FIGURA 27.- Representación gráfica de la regresión de los niveles séricos de "CALCIO" e "Indice CALCIO/FOSFORO" de arteria umbilical de recién nacidos (n:120) entre las 26.7 y 42.7 semanas de gestación.

ARTERIA UMBILICAL

FIGURA 26

n: 102
r: −0.24
$F_{1,100}$ = 6.15
t: 2.48
p<0.05
y= −11.60·x + 180.84



ARTERIA UMBILICAL

FIGURA 27

n: 120
r: 0.47
$F_{1,118}$ = 34.14
t: 5.84
p<0.0005
y= 0.29·x − 0.64

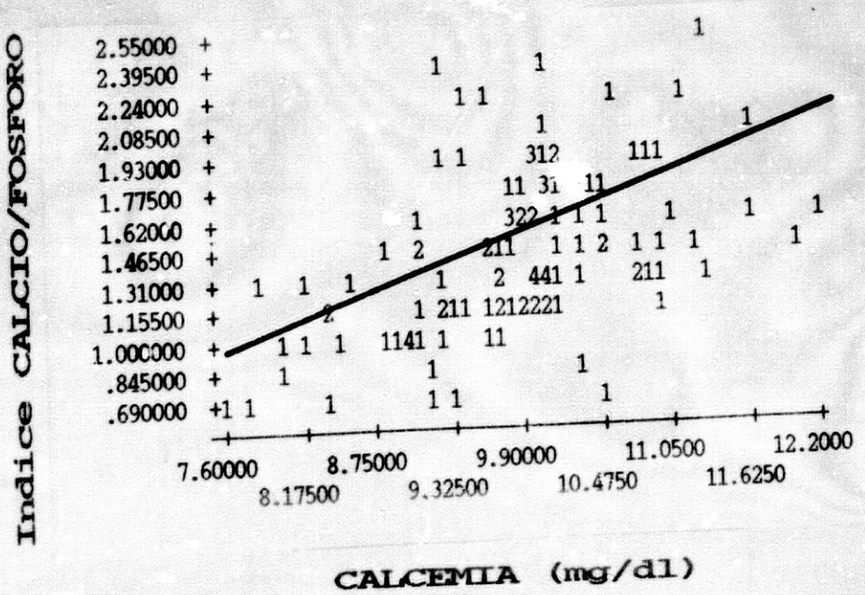


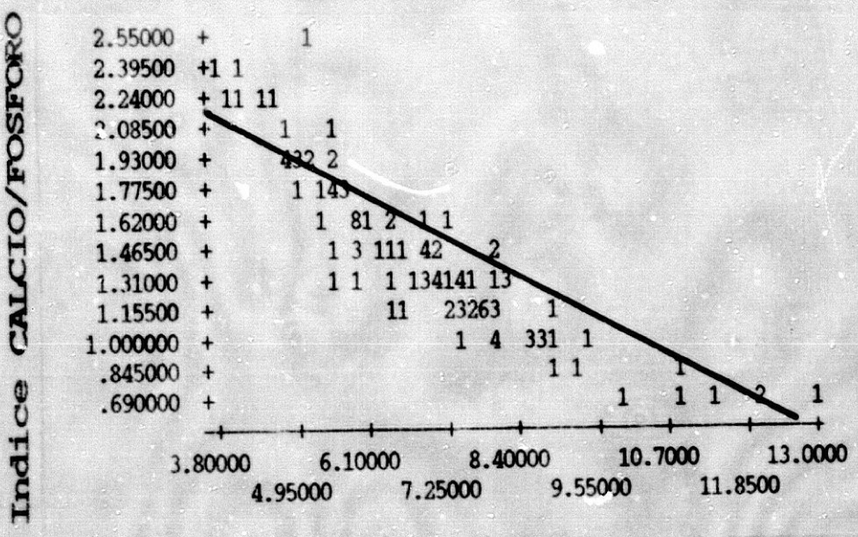
FIGURA 28.- Representación gráfica de la regresión de los niveles séricos de "FOSFORO" e "Indice CALCIO/FOSFORO" de arteria umbilical de recién nacidos (n:120) entre las 26.7 y 42.7 semanas de gestación.

FIGURA 29.- Representación gráfica de la regresión de los niveles séricos de "PARATHORMONA" y "OSTEOCALCINA" de arteria umbilical de recién nacidos (n:102) entre las 26.7 y 42.7 semanas de gestación.

ARTERIA UMBILICAL

FIGURA 28

n: 120
r:-0.90
$F_{1,118}$= 513,60
t: 22.66
p<0.0005
y= −0.21·x + 2.97



ARTERIA UMBILICAL

FIGURA 29

n: 120
r:-0.20
$F_{1,118}$= 4.22
t: 2.05
p<0.05
y= −0.01·x + 3.38

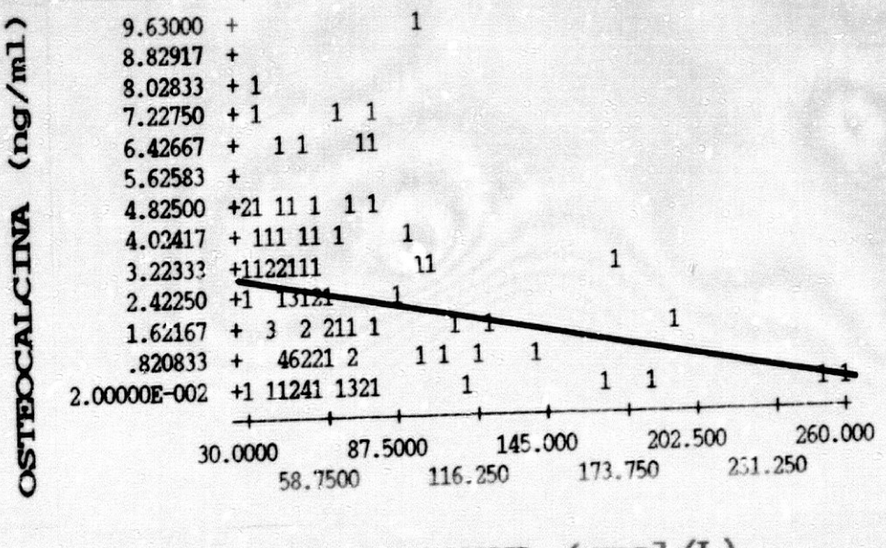


FIGURA 30.- Representación gráfica de la regresión del "Indice CALCIO/FOSFORO" y las concentraciones séricas de "PARATHORMONA" de arteria umbilical de recién nacidos (n:102) entre las 26.7 y 42.7 semanas de gestación.

FIGURA 31.- Representación gráfica de la regresión entre el "GRADO DE ACIDOSIS INTRAPARTO" (pH de arteria umbilical)" y las variaciones en las tasas séricas de "CALCIO" de arteria umbilical de recién nacidos (n:120) entre las 26.7 y 42.7 semanas de gestación.

ARTERIA UMBILICAL

FIGURA 30

n: 102
r:-0.30
$F_{1,100}$= 10.22
t: 3.20
p<0.001
y= −31.09-x + 112.96

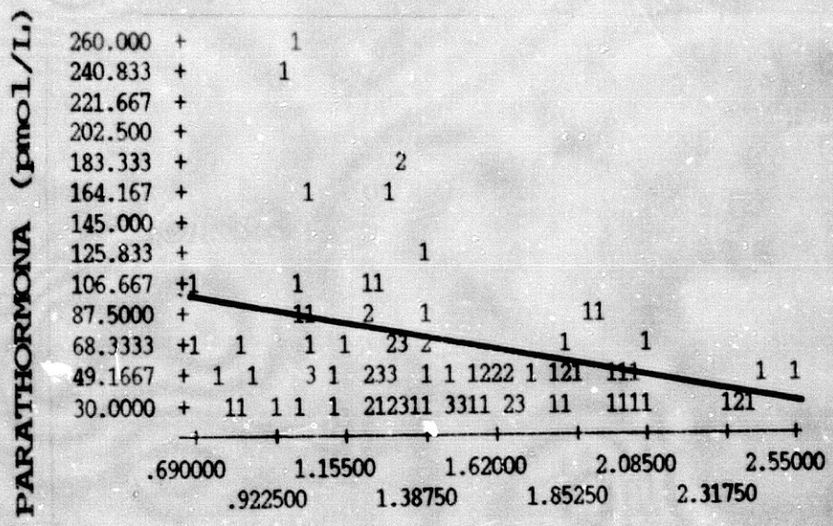
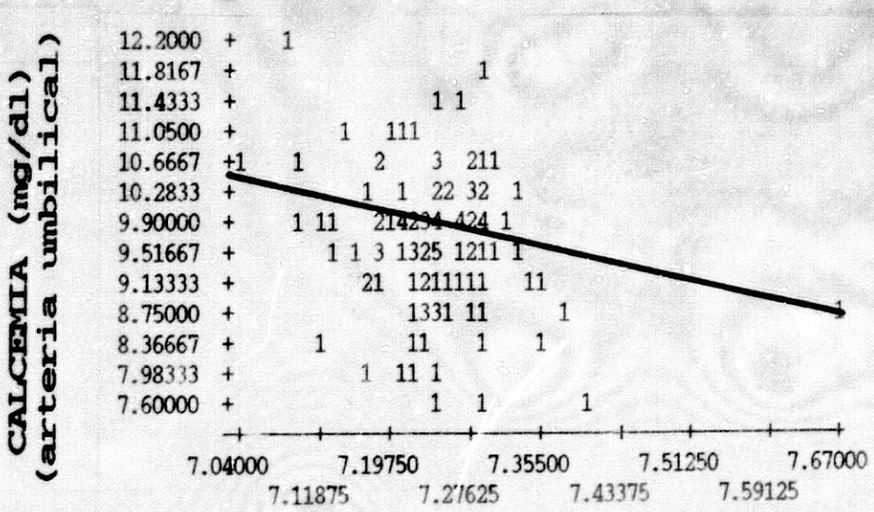


FIGURA 31

n: 120
r: −0.21
$F_{1,118}$= 5.42
t: 2.39
p<0.05
y= −2.60-x + 28.75

ARTERIA UMBILICAL



120, r: 0.46, t: 5.65, p<0.0005) y P (n: 120, r: -0.35, t: 4.00, p< 0.0005).

Existe una correlación simple, en los límites de la significación estadística, entre las variaciones de PTH y BGP (n: 102, r: -0.20, t: 2.05, p<0.05).

Se constata una correlación simple e inversa entre las concentraciones séricas de Ca y los niveles séricos de BGP (n: 120, r: -0.21, t: 2.28, p<0.05) y de PTH (n: 102, r: -0.24, t: 2.48, p<0.05).

5) COMPARACION DE LOS VALORES BIOQUIMICOS SERICOS (ARTERIA UMBILICAL) DE LOS MARCADORES DE LOS ESTADOS DEL "TURNOVER" OSEO (BGP, PTH Y FA) Y METABOLICO FOSFOCALCICO (Ca Y P), ENTRE RECIEN NACIDOS PRETERMINO (edad gestacional <37 semanas) Y A TERMINO (edad gestacional ≥37 semanas).

En la tabla XIV se expresan los valores bioquímicos séricos (media ± SEM), marcadores de los estados del "turnover" óseo (BGP, PTH y FA) y metabólico fosfocálcico (Ca y P) y se comparan (ANOVA y test de Welch), según la madurez del feto al nacer.

Marcadores séricos del "turnover" óseo. (Figura 32)

Las concentraciones séricas de BGP en RN pretérminos, resultaron más elevadas que en RN a término, aunque esta diferencia no fué estadisticamente significativa. Los niveles séricos de PTH fueron significativamente más altos en los RN pretérminos (p<0.0005) y la actividad de FA resultó semejante en ambos grupos de edad (p:NS). El índice BGP/PTH no mostró diferencias significativas (p:NS).

TABLA XIV. COMPARACION DE LOS VALORES BIOQUIMICOS SERICOS DE ARTERIA UMBILICAL (MARCADORES DEL "TURNOVER" OSEO: OSTEOCALCINA, PARATHORMONA, FOSFATASA ALCALINA Y DEL ESTADO METABOLICO FOSFOCALCICO: CALCEMIA Y FOSFOREMIA), ENTRE RECIEN NACIDOS A TERMINO (edad gestacional ≥37 semanas) Y PRETERMINO (edad gestacional < 37 semanas).

EDAD GESTACIONAL (semanas)	≥37 (n:95)	<37 (n:25)	t	p
BGP (ng/ml)	2.26 ± 0.18(*)	3.21 ± 0.56	1.57	NS
PTH (pmol/L)	64.12 ± 4.35	77.92 ± 10.0	3.97	<0.0005
FA (UI/L)	106.81 ± 5.70	103.60 ± 3.11	0.26	NS
BGP/PTH	0.05 ± 0.007	0.04 ± 0.007	0.45	NS
Ca (mg/dl)	10.06 ± 0.08	9.12 ± 0.20	5.41	<0.005
P (mg/dl)	6.73 ± 0.16	8.06 ± 0.34	2.58	<0.05
Ca/P	1.57 ± 0.03	1.18 ± 0.06	0.26	NS

BGP: osteocalcina ; PTH: hormona paratiroidea ;Ca: calcemia ; P: fosforemia ; FA: fosfatasas alcalinas ; UI: unidades internacionales ;(*): media ± SEM ; n: número de casos; t: test t de Student; p: nivel de significancia; NS: no significativo.

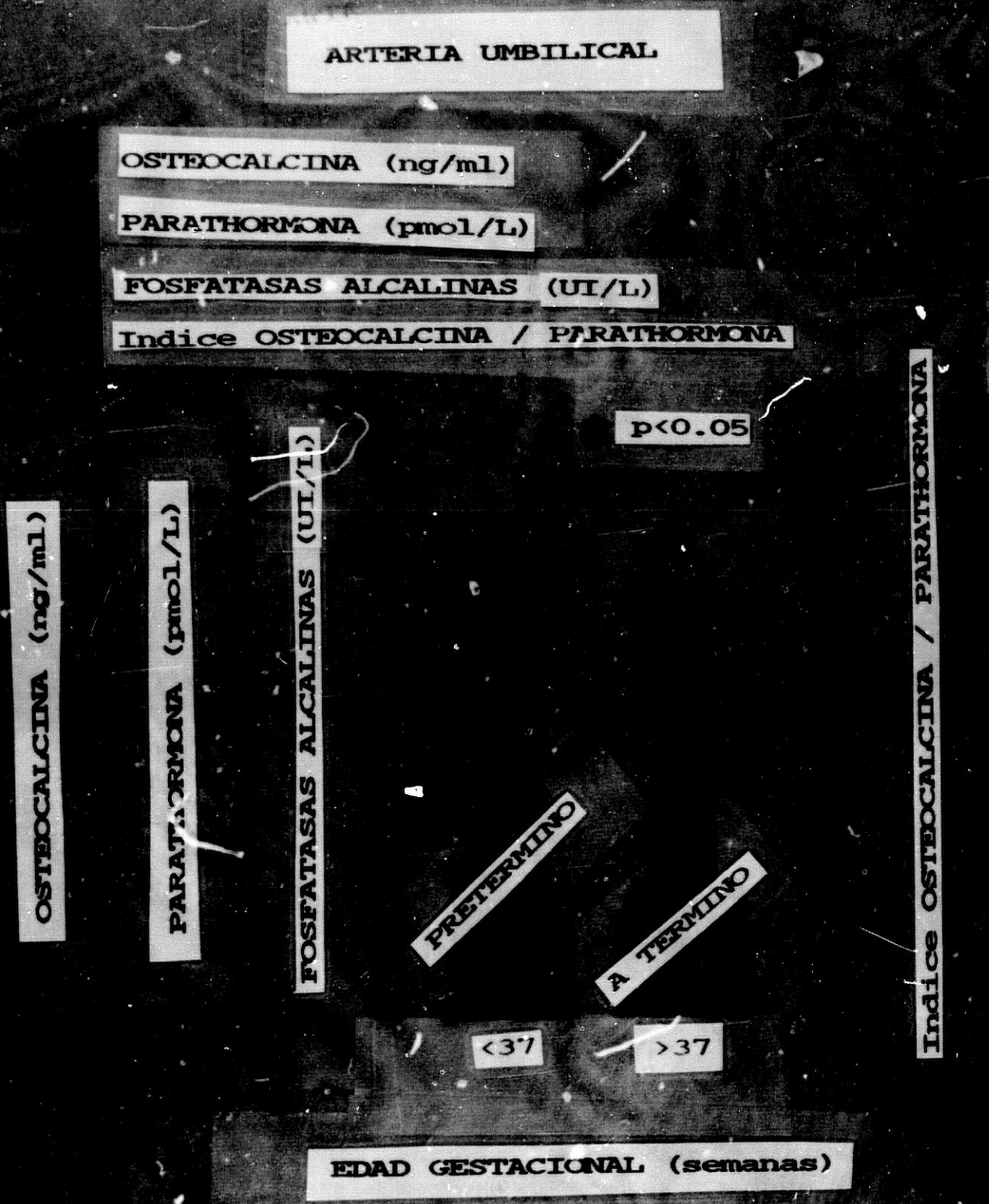


FIGURA 32.- Comparación de las concentraciones séricas en arteria umbilical de osteocalcina, parathormona, fosfatasas alcalinas e índice osteocalcina/parathormona entre recién nacidos pretérmino (n: 25) y recién nacidos a término (n: 95).

Marcadores séricos del estado metabólico fosfocálcico. (Figura 33).

Los RN pretérminos tienen concentraciones séricas de Ca significativamente más bajas que los nacidos a término ($p<0.005$). El índice Ca/P resultó más bajo en los nacidos pretérmino, aunque la diferencia no fué estadisticamente significativa.

B) RESULTADO DEL ANALISIS EN EL PERIODO NEONATAL

1) ANALISIS COMPARATIVO ENTRE LOS VALORES BIOQUIMICOS SERICOS DE LOS ESTADOS DEL "TURNOVER" OSEO (BGP, PTH Y FA) Y METABOLICO FOSFOCALCICO (Ca Y P) ENTRE LOS PERIODOS NEONATAL PRECOZ (I) Y TARDIO (II), FRENTE A LOS DE ARTERIA UMBILICAL (AU) E INTERPERIODOS NEONATALES EN RECIEN NACIDOS PRETERMINOS (edad gestacional <37 semanas).

La tabla XV recoge los valores bioquímicos séricos (media ± SEM) de los marcadores de los estados del "turnover" óseo y metabólico fosfocálcico en RN pretérmino (EG< 37 semanas) determinados en AU y en los periodos neonatal precoz (I) y tardío (II). Asimismo, se comparan cada uno de los valores resultantes en los periodos I y II respecto a las determinaciones en AU (ANOVA y test de Welch) y entre el periodo I y II (estudio longitudinal; test t de muestras apareadas), con expresión de las diferencias estadisticamente significativas. (Figuras 34-40).

Cabe destacar:

1.1) Respecto a los marcadores bioquímicos séricos del estado del "turnover" óseo que, entre los niveles de

FIGURA 33.- Comparación de las concentraciones séricas en arteria umbilical de calcio, fósforo e índice calcio/fósforo entre recién nacidos pretérmino (n: 25) y recién nacidos a término (n: 95).

TABLA XV. RESULTADOS DEL ESTUDIO BIOQUIMICO SERICO DE LOS FACTORES REGULADORES (O MARCADORES) DEL "TURNOVER" OSEO (OSTEOCALCINA, PARATHORMONA Y FOSFATASA ALCALINA) Y DEL ESTADO METABOLICO FOSFOCALCICO (CALCEMIA Y FOSFOREMIA), EN RECIEN NACIDOS PRETERMINO (edad gestacional <37 semanas), EN MUESTRAS DE ARTERIA UMBILICAL (AU) Y EN LOS PERIODOS NEONATAL PRECOZ (I) Y TARDIO (II).

	n:25	n:31	
		PERIODO NEONATAL	
	AU	I	II
Dias de vida	0	0.82 ± 0.13(*)	19.22 ± 1.70
BGP (ng/ml)	3.21 ± 0.56	3.44 ± 0.51	9.93 ± 1.10 $#
PTH (pmol/L)	77.92 ± 10.00	87.13 ± 6.67	79.07 ± 6.43
FA (UI/L)	103.60 ± 3.11	87.83 ± 14.00	151.23 ± 13.00 $#
BGP/PTH	0.04 ± 0.007	0.04 ± 0.08	0.17 ± 0.02 $#
Ca (mg/dl)	9.12 ± 0.20	8.66 ± 0.14	9.18 ± 0.12 #
P (mg/dl)	8.06 ± 0.34	6.92 ± 0.17$	6.96 ± 0.30
Ca/P	1.18 ± 0.06	1.26 ± 0.03	1.37 ± 0.07

BGP: osteocalcina ; PTH: parathormona ;Ca: calcemia total ; P: fosforemia ; FA: fosfatasas alcalinas ; UI: unidades internacionales ; (*): media ± SEM ;n: número de casos; $: comparación de medias frente a CU (ANOVA y test de STUDENT). #: comparación por datos apareados de los periodos I y II ; $,#: p< 0.05.

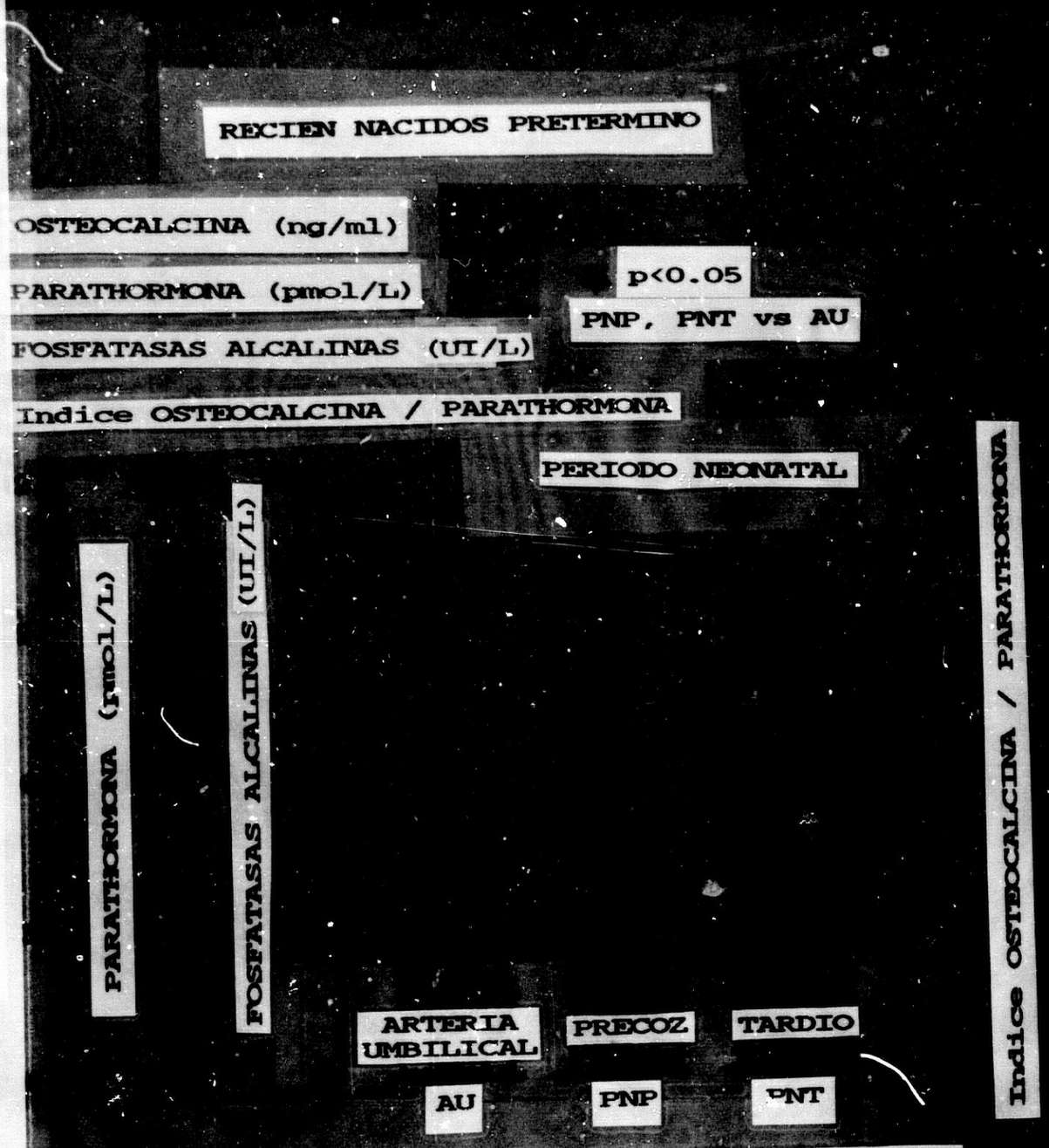
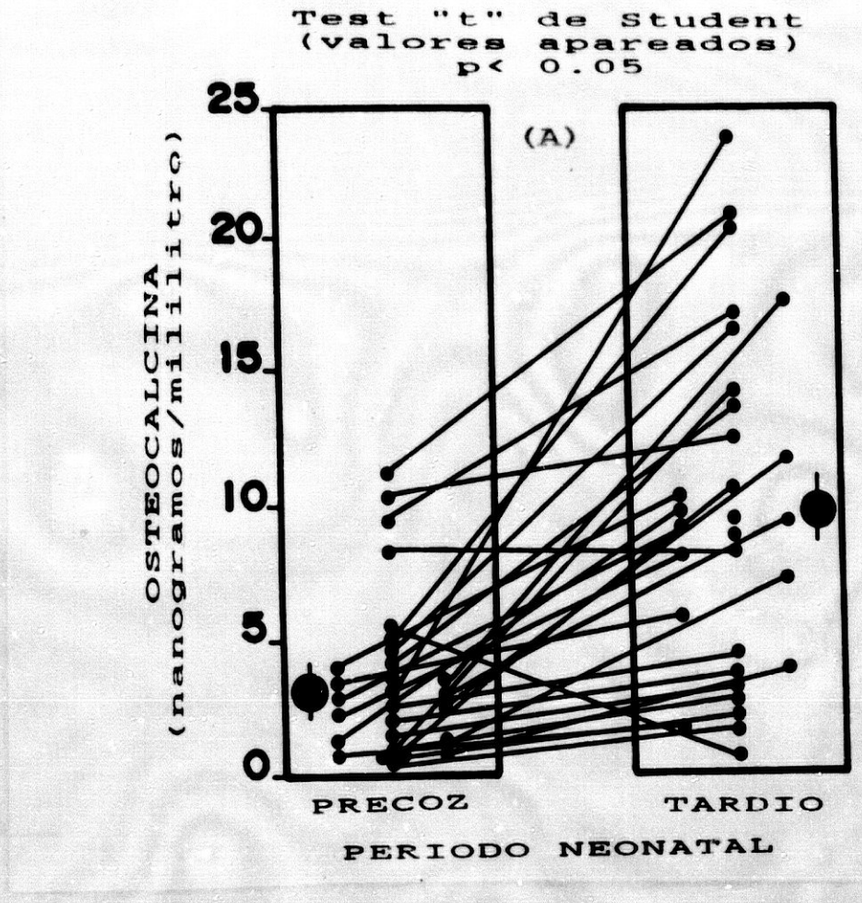


FIGURA 34.- Comparación de las concentraciones séricas de osteocalcina, parathormona, fosfatasas alcalinas e índice osteocalcina/parathormona en arteria umbilical (n: 25) y periodos neonatal precoz y tardío (n: 31) en recién nacidos pretérmino.

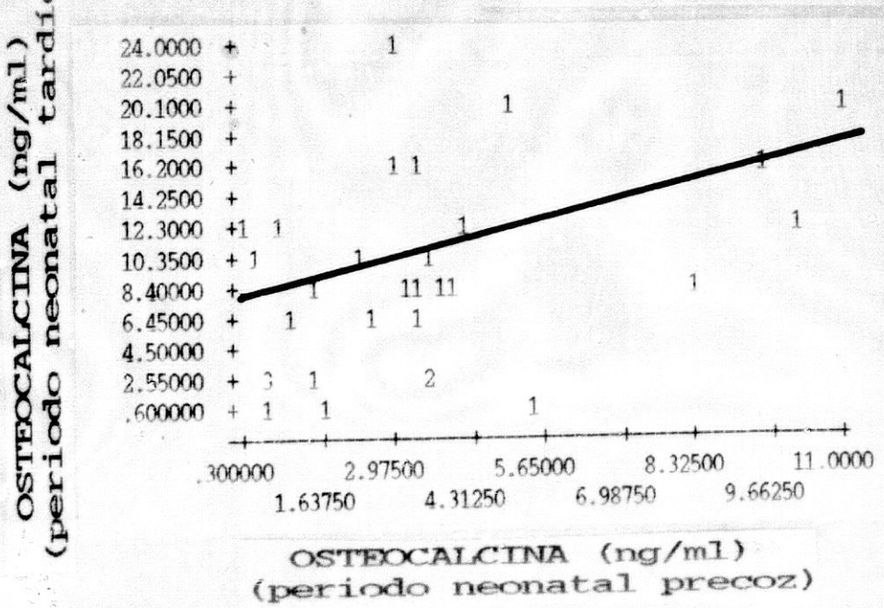
FIGURA 36.- (A) Comparación de las concentraciones séricas de osteocalcina (valores apareados) en los periodos neonatal precoz (a los 0.82 ± 0.13 dias de vida postnatal) y tardío (a los 19.22 ± 1.70 dias de vida postnatal) en recién nacidos pretérmino (33.57 ± 0.70 semanas de gestación). (B) Correlación lineal simple de los valores de osteocalcina en el periodo neonatal tardío con los del periodo neonatal precoz.

RECIEN NACIDOS PRETERMINO



(B)

n: 31
r: 0.39
$F_{1,29}$= 5.42
t: 2.32
p< 0.01
y= 0.85-x + 6.98



RECIEN NACIDOS PRETERMINO

Test "t" de Student
(valores apareados)
p< 0.05

OSTEOCALCINA
(nanogramos/mililitro)

PRECOZ

TARDIO

PERIODO NEONATAL

FIGURA 36.- Comparación de las concentraciones séricas de "osteocalcina" (valores apareados) en los periodos neonatal precoz (a los 0.82 ± 0.13 dias de vida postnatal) y tardío (a los 19.22 ± 1.70 dias de vida postnatal), en recién nacidos pretérmino (33.57 ± 0.70 semanas de gestación).

FIGURA 37.- (A) Comparación de las concentraciones séricas de parathormona (valores apareados) en los periodos neonatal precoz (a los 0.82 ± 0.13 dias de vida postnatal) y tardío (a los 19.22 ± 1.70 dias de vida postnatal) en recién nacidos pretérmino (33.57 ± 0.70 semanas de gestación). (B) Correlación lineal simple de los valores de parathormona en el periodo neonatal tardío con los del periodo neonatal precoz.

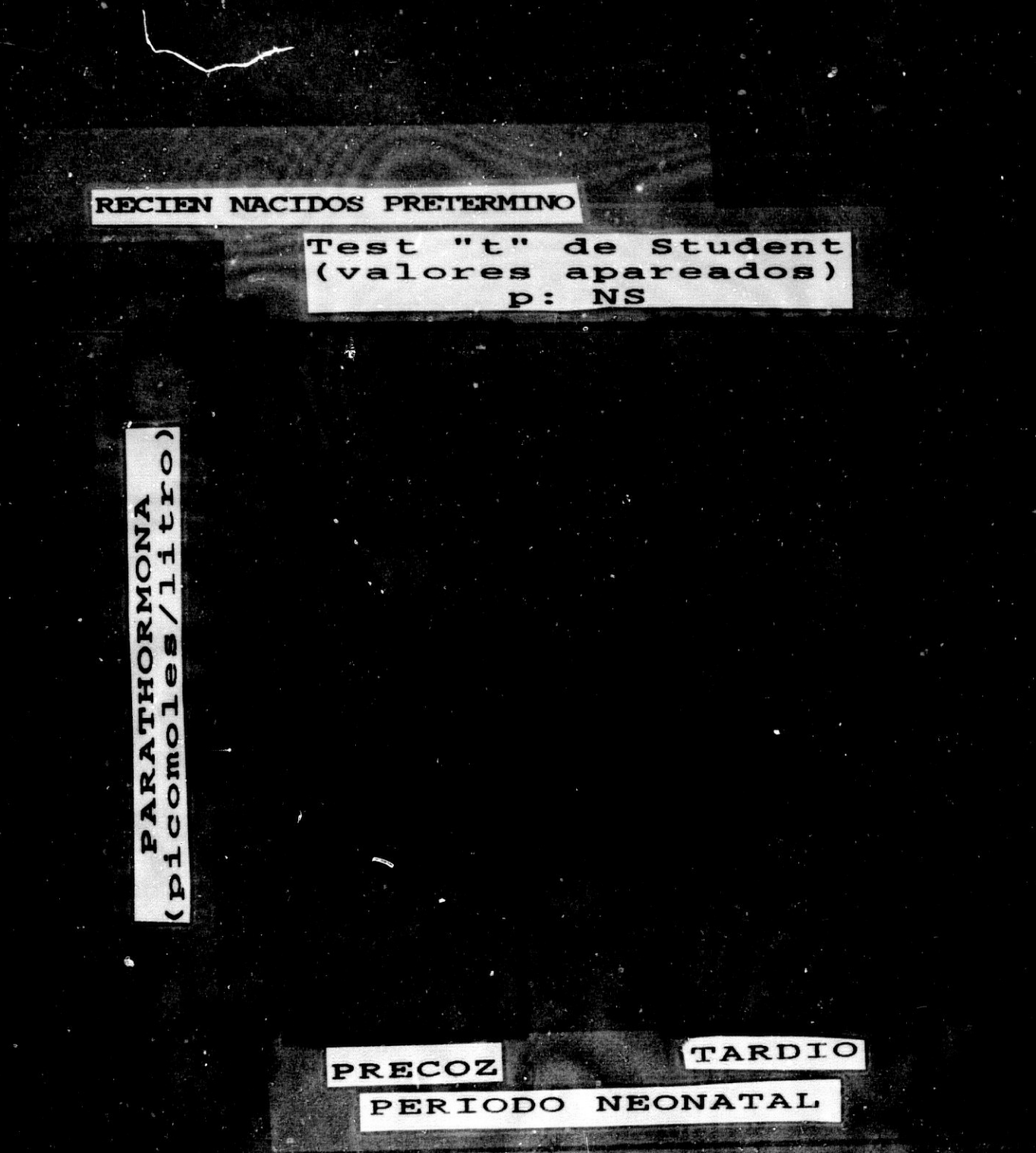
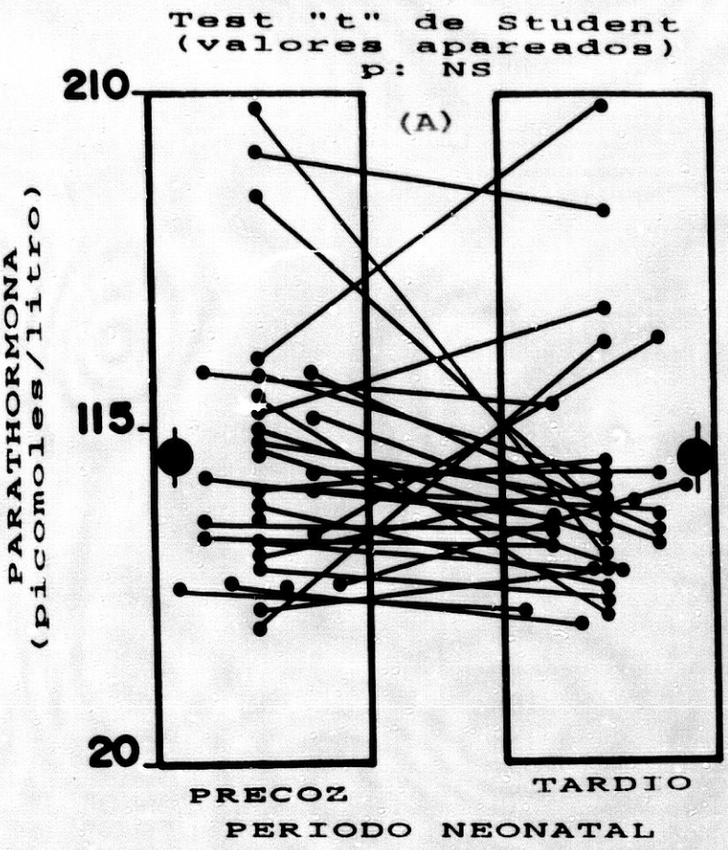


FIGURA 37.- Comparación de las concentraciones séricas de "parathormona" (valores apareados) en los periodos neonatal precoz (a los 0.82 ± 0.13 dias de vida postnatal) y tardío (a los 19.22 ± 1.70 dias de vida postnatal), en recién nacidos pretérmino (33.57 ± 0.70 semanas de gestación).

RECIEN NACIDOS PRETERMINO



(B)

n: 31
r: 0.28
$F_{1,29}$= 2.57
t: 1.60
p: NS
y= 0.27·x + 55.08

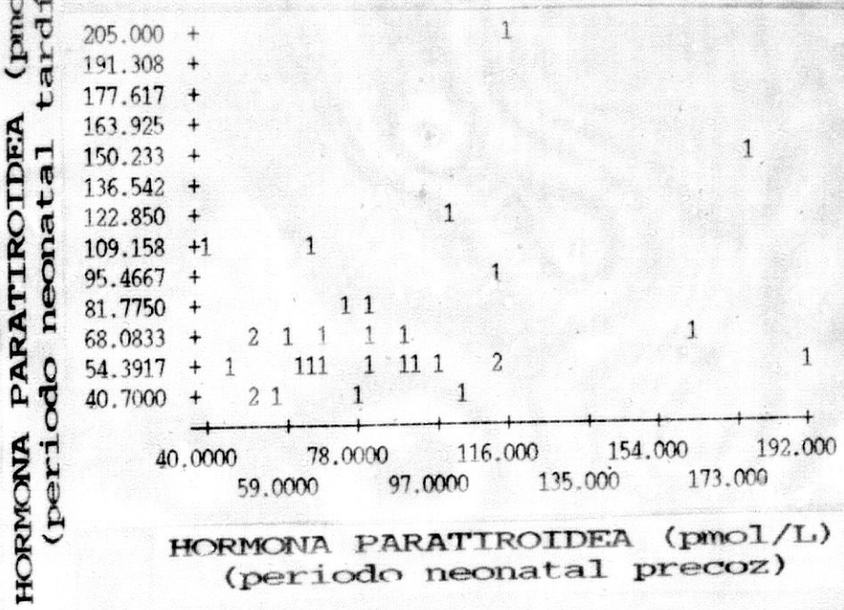
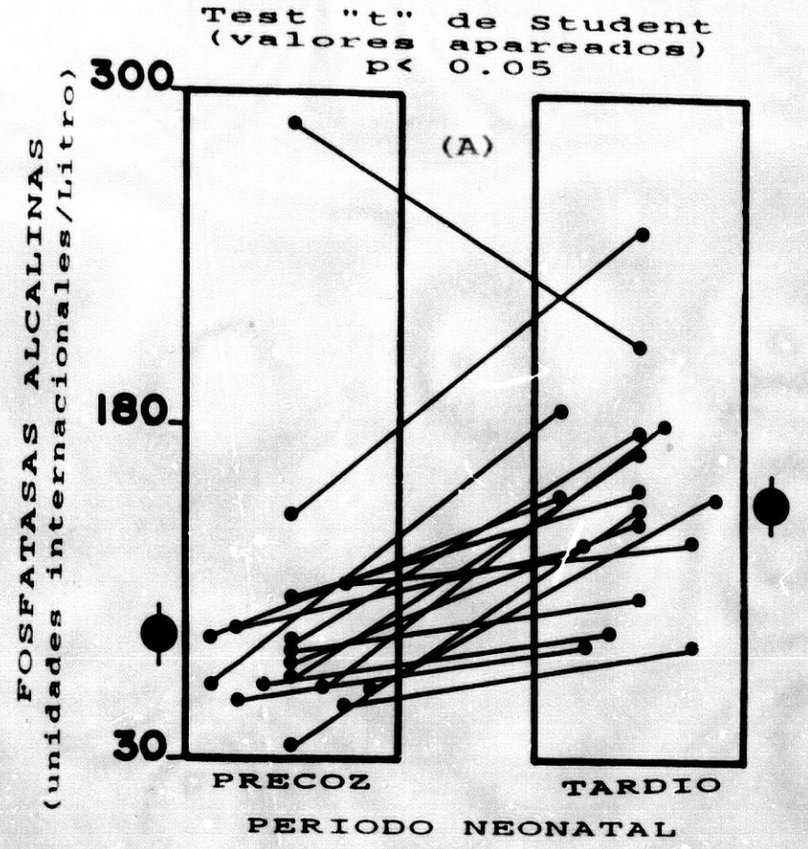


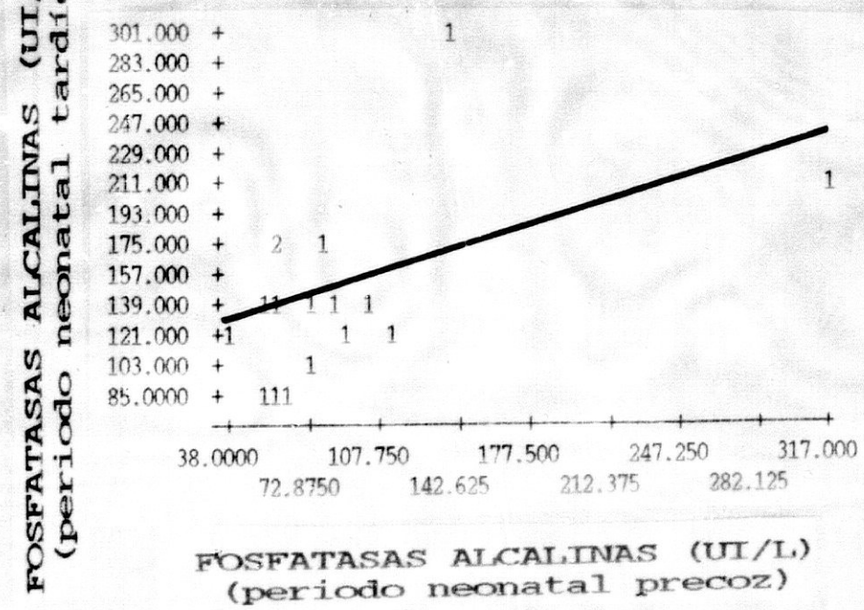
FIGURA 38.- (A) Comparación de las concentraciones séricas de fosfatasas alcalinas (valores apareados) en los periodos neonatal precoz (a los 0.82 ± 0.13 dias de vida postnatal) y tardío (a los 19.22 ± 1.70 dias de vida postnatal) en recién nacidos pretérmino (33.57 ± 0.70 semanas de gestación). (B) Correlación lineal simple de los valores de fosfatasas alcalinas en el periodo neonatal tardío con los del periodo neonatal precoz.

RECIEN NACIDOS PRETERMINO



(B)

n: 17
r: 0.51
$F_{1,15}$= 5.30
t: 2.30
p< 0.01
y= 0.43·x + 112.12



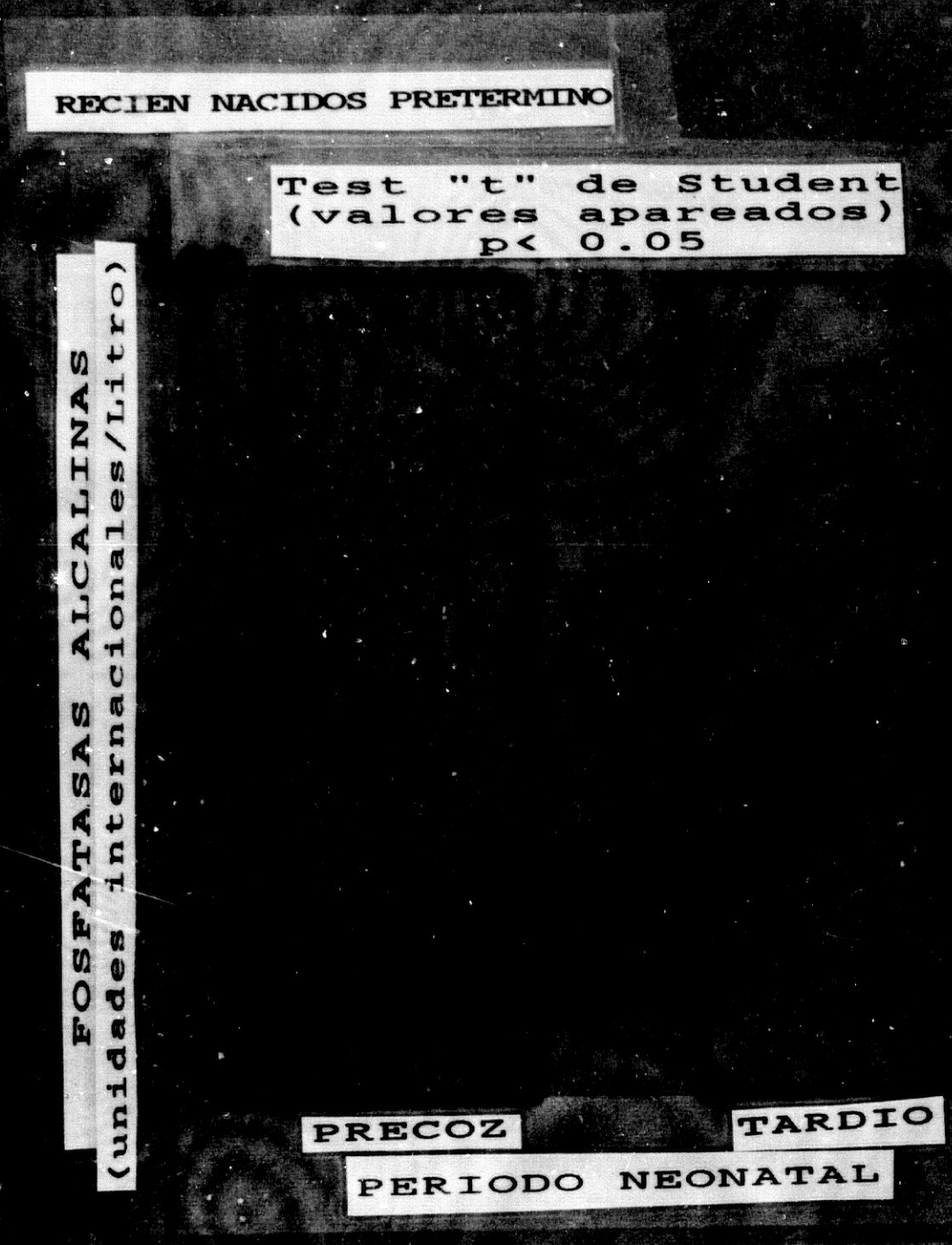


FIGURA 38.- Comparación de las concentraciones séricas de "fosfatasas alcalinas" (valores apareados) en los periodos neonatal precoz (a los 0.82 ± 0.13 dias de vida postnatal) y tardío (a los 19.22 ± 1.70 dias de vida postnatal), en recién nacidos pretérmino (33.57 ± 0.70 semanas de gestación).

FIGURA 39.- (A) Comparación de las concentraciones séricas de calcio (valores apareados) en los periodos neonatal precoz (a los 0.82 ± 0.13 dias de vida postnatal) y tardío (a los 19.22 ± 1.70 dias de vida postnatal) en recién nacidos pretérmino (33.57 ± 0.70 semanas de gestación). (B) Correlación lineal simple de los valores de calcio en el periodo neonatal tardío con los del periodo neonatal precoz.

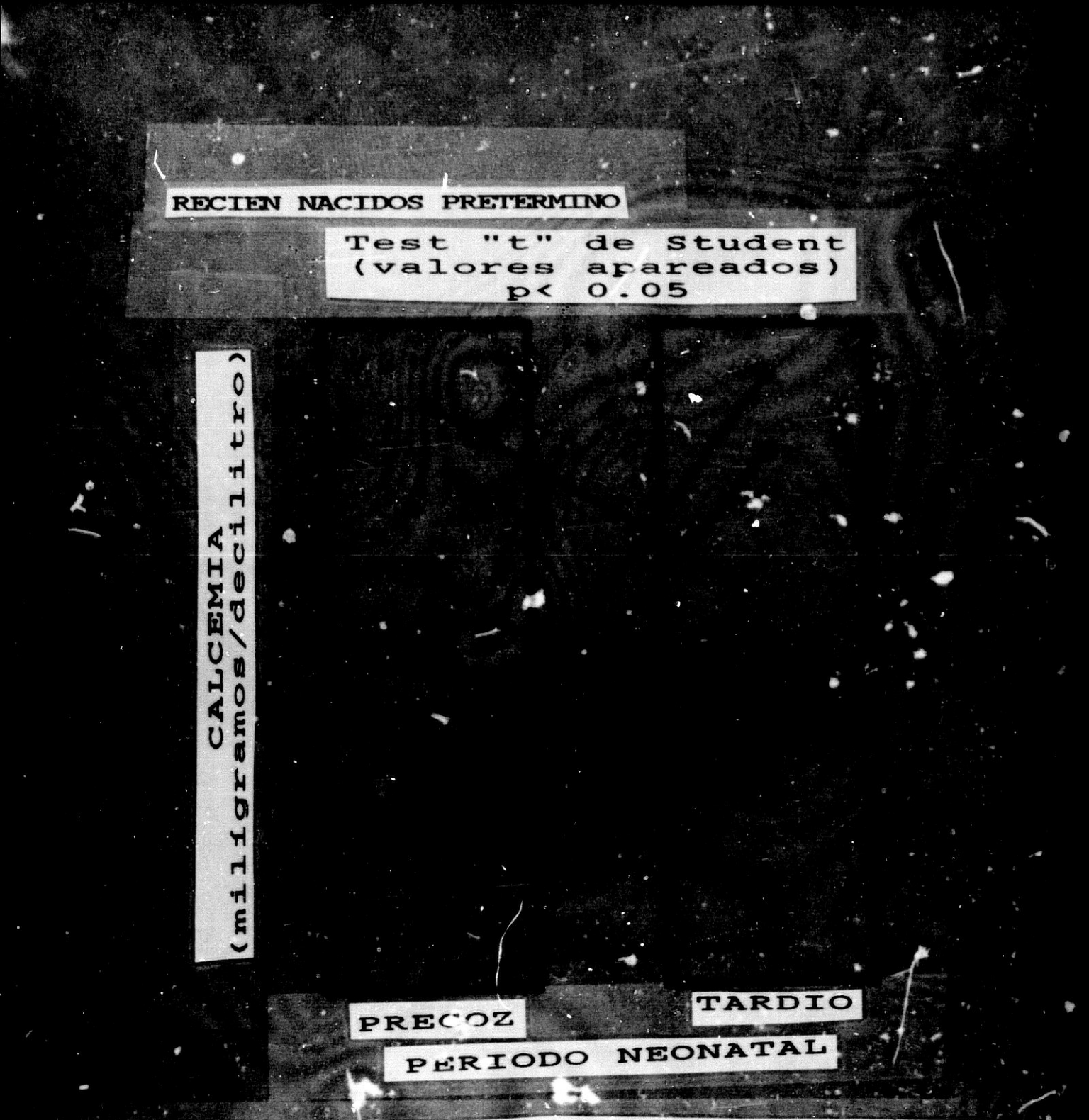
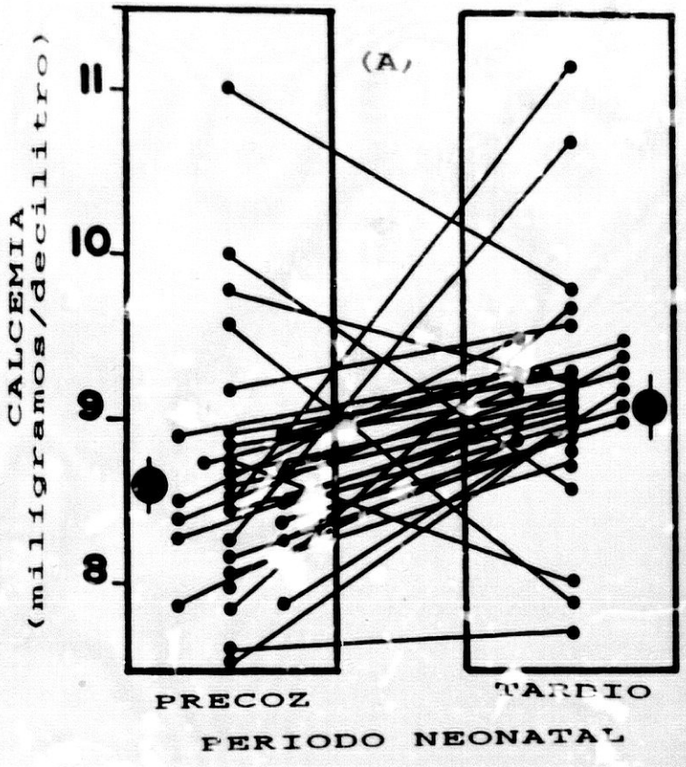


FIGURA 39.- Comparación de las concentraciones séricas de "calcio" (valores apareados) en los periodos neonatal precoz (a los 0.82 ± 0.13 dias de vida postnatal) y tardío (a los 19.22 ± 1.70 dias de vida postnatal), en recién nacidos pretérmino (33.57 ± 0.70 semanas de gestación).

RECIEN NACIDOS PRETERMINO

Test "t" de Student
(valores apareados)
p< 0.05



(B)

n: 31
r: 0.12
$F_{1,29}$= 0.47
t: 0.68
p: NS
y= 0.10-x + 8.26

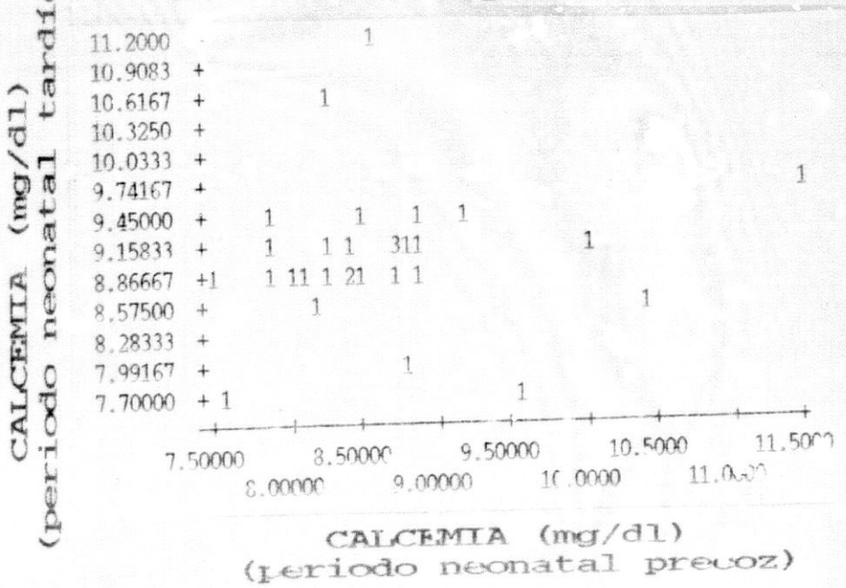
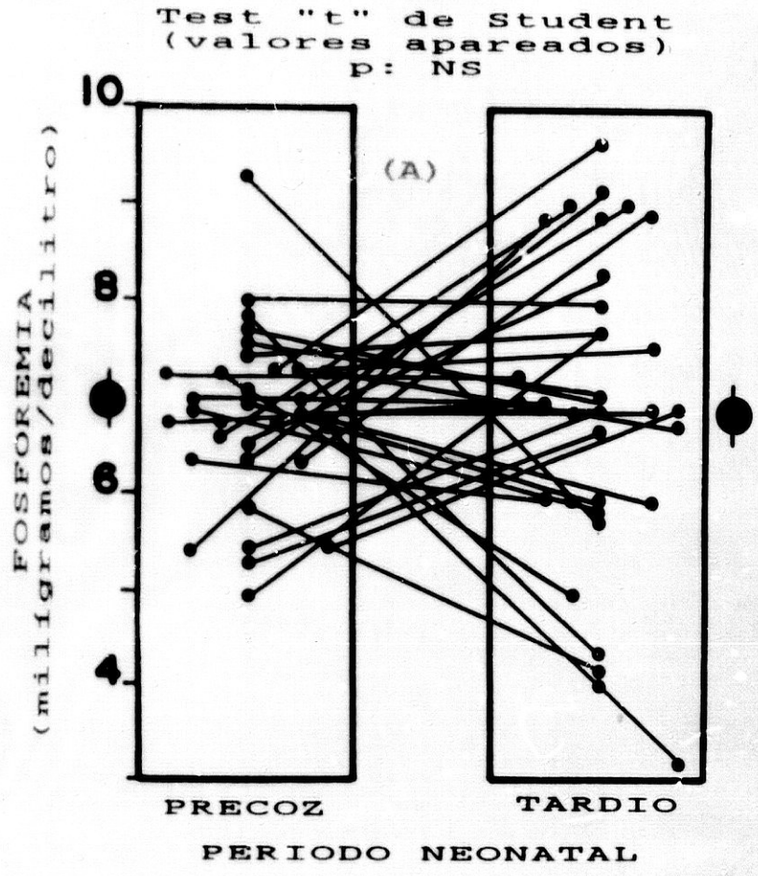


FIGURA 40.- (A) Comparación de las concentraciones séricas de fósforo inorgánico (valores apareados) en los periodos neonatal precoz (a los 0.82 ± 0.13 dias de vida postnatal) y tardío (a los 19.22 ± 1.70 dias de vida postnatal) en recién nacidos pretérmino (33.57 ± 0.70 semanas de gestación). (B) Correlación lineal simple de los valores de fósforo inorgánico en el periodo neonatal tardío con los del periodo neonatal precoz.

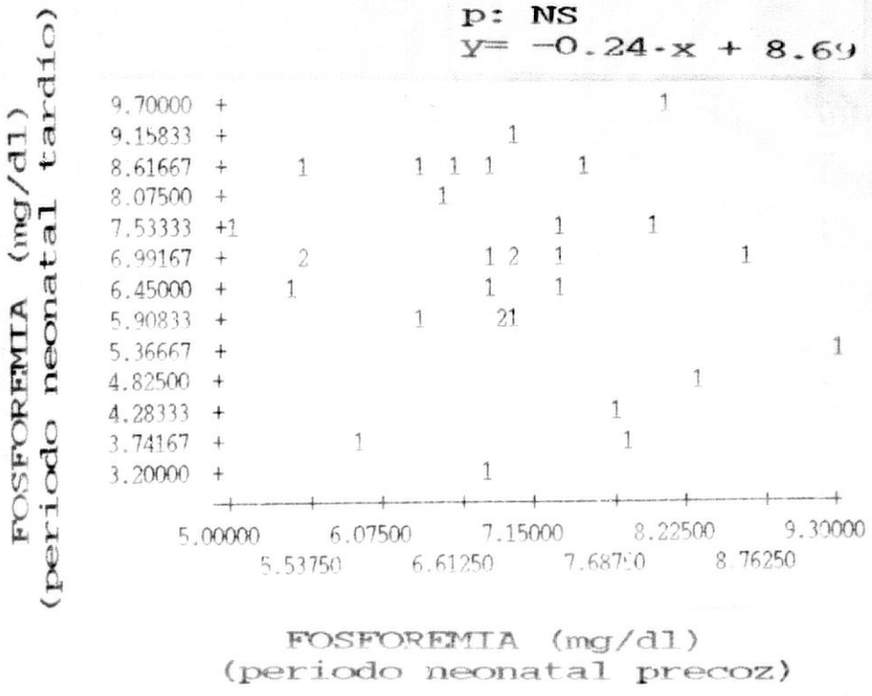
FIGURA 40.- Comparación de las concentraciones séricas de "fósforo" (valores apareados) en los periodos neonatal precoz (a los 0.82 ± 0.13 dias de vida postnatal) y tardío (a los 19.22 ± 1.70 dias de vida postnatal), en recién nacidos pretérmino (33.57 ± 0.70 semanas de gestación).

RECIEN NACIDOS PRETERMINO



(B)

n: 31
r: −0.14
$F_{1,29}$= 0.63
t: 0.79
p: NS
y= −0.24-x + 8.69



BGP del periodo neonatal precoz (I) y los de AU no hay diferencias significativas; que este marcador asciende, estando significativamente elevado en el periodo neonatal tardío (II), respecto a los de AU ($p<0.05$, ANOVA y test de Welch) y I ($p<0.05$, test t de Student para muestras apareadas), que las tasas séricas de PTH no se modifican significativamente en los periodos I y II, comparadas con las de AU o entre ambos periodos; que las FA sufren un descenso en el periodo I respecto a los de AU, pero este descenso no es estadisticamente significativo (p:NS) y ascienden posteriormente hasta el periodo II, mostrando diferencias significativas respecto a la AU, asimismo este incremento de FA en el periodo II es significativo respecto al periodo I ($p<0.05$, test de la t de Student para muestras apareadas).

1.2) Respecto a los marcadores séricos del estado metabólico fosfocálcico que, se produce un descenso, aunque no significativo estadisticamente, de los niveles de calcemia en el I respecto a AU, con una elevación posterior entre los periodos I y II ($p<0.05$, test de t de Student para muestras apareadas) equiparándose a los valores de AU. Los niveles séricos de fósforo inorgánico, muestran un descenso entre los niveles determinados en AU y el I ($p<0.05$, ANOVA y test de Welch), manteniéndose estabilizados entre los periodos I y II (p:NS).

2).- ANALISIS COMPARATIVO ENTRE LOS VALORES BIOQUIMICOS DE LOS ESTADOS DEL "TURNOVER" OSEO (BGP, PTH Y FA) Y METABOLICO FOSFOCALCICO (Ca Y P), EN LOS PERIODOS NEONATAL PRECOZ (I) Y TARDIO (II), FRENTE A LA ARTERIA UMBILICAL (AU) E INTERPERIODOS NEONATALES EN RECIEN NACIDOS

A TERMINO (edad gestacional ≥37 semanas).

La tabla XVI recopila los valores bioquímicos séricos (media ± SEM) de los marcadores del "turnover" óseo y del estado del metabolismo fosfocálcico en RN a término (EG≥37 semanas) analizados en en AU y en los periodos neonatal precoz (I) y tardío(II). Asimismo, recoge la comparación de los valores bioquímicos determinados en los periodos I y II respecto a los de AU (ANOVA y test de Welch) y el resultado de la comparación entre el periodo I y II (test t de Student para muestras apareadas), señalando explicitamente las diferencias estadísticas significativas (Figuras 41-47).

Cabe destacar:

2.1) Respecto a los marcadores bioquímicos séricos del estado del "turnover" óseo, que existe una elevación de BGP en el periodo neonatal precoz (I) respecto a los valores de AU ($p<0.05$, ANOVA y test de Welch) y sigue aumentando en el tardío (II) respecto a los de AU (ANOVA y test de Welch), y respecto al periodo I ($p<0.05$, test t de Student para muestras apareadas); que los niveles séricos de PTH apenas se modifican en los periodos I y II versus (vs) AU y tampoco muestran diferencias significativas entre ambos periodos; que las FA descienden significativamente en el periodo I frente a los valores de AU ($p<0.05$, ANOVA y test de Welch), constatándose una elevación significativa en el periodo II vs periodo I ($p<0.05$, test t de Student para muestras apareadas). El índice BGP/PTH se eleva significativamente en el periodo II respecto al determinado en AU ($p<0.05$, ANOVA y test de Welch) y al fijado en el

TABLA XVI. RESULTADOS DEL ESTUDIO BIOQUIMICO SERICO DEL METABOLISMO FOSFOCALCICO Y FACTORES REGULADORES (O MARCADORES) DEL "TURNOVER" OSEO EN RECIEN NACIDOS A TERMINO (edad gestacional ≥ 37 semanas), EN MUESTRAS DE CORDON UMBILICAL (CU) Y EN LOS PERIODOS NEONATAL PRECOZ (I) Y TARDIO (II).

	n:95	n:25	
		PERIODO NEONATAL	
	AU	I	II
Dias de vida	0	1.38 ±	*)11.72 ± 1.27
BGP (ng/ml)	2.26 ± 0.18	3.69 ± 0.93 $	8.91 ± 1.14 $#
PTH (pmol/L)	64.12 ± 4.35	68.44 ± 6.30	67.06 ± 6.05
FA (UI/L)	106.81 ± 5.70	82.54 ± 5.45 $	110.13 ± 7.79 #
BGP/PTH	0.05 ± 0.007	0.07 ± 0.01	0.14 ± 0.02 $#
Ca (mg/dl)	10.06 ± 0.08	8.77 ± 0.16 $	9.26 ± 0.08 $
P (mg/dl)	6.73 ± 0.16	6.93 ± 0.23	7.82 ± 0.25 $
Ca/P	1.57 ± 0.03	1.27 ± 0.05 $	1.19 ± 0.04 $

BGP: osteocalcina ; PTH: hormona paratiroidea ; Ca: calcemia ; P: fosforemia ; FA: fosfatasas alcalinas ; UI: unidades internacionales ; (*): media ± SEM ; n: número de casos; $: comparación de medias frente a CU (ANOVA y test de WELCH); #: comparación por datos apareados de los periodos I y II; $,#: p< 0.05.

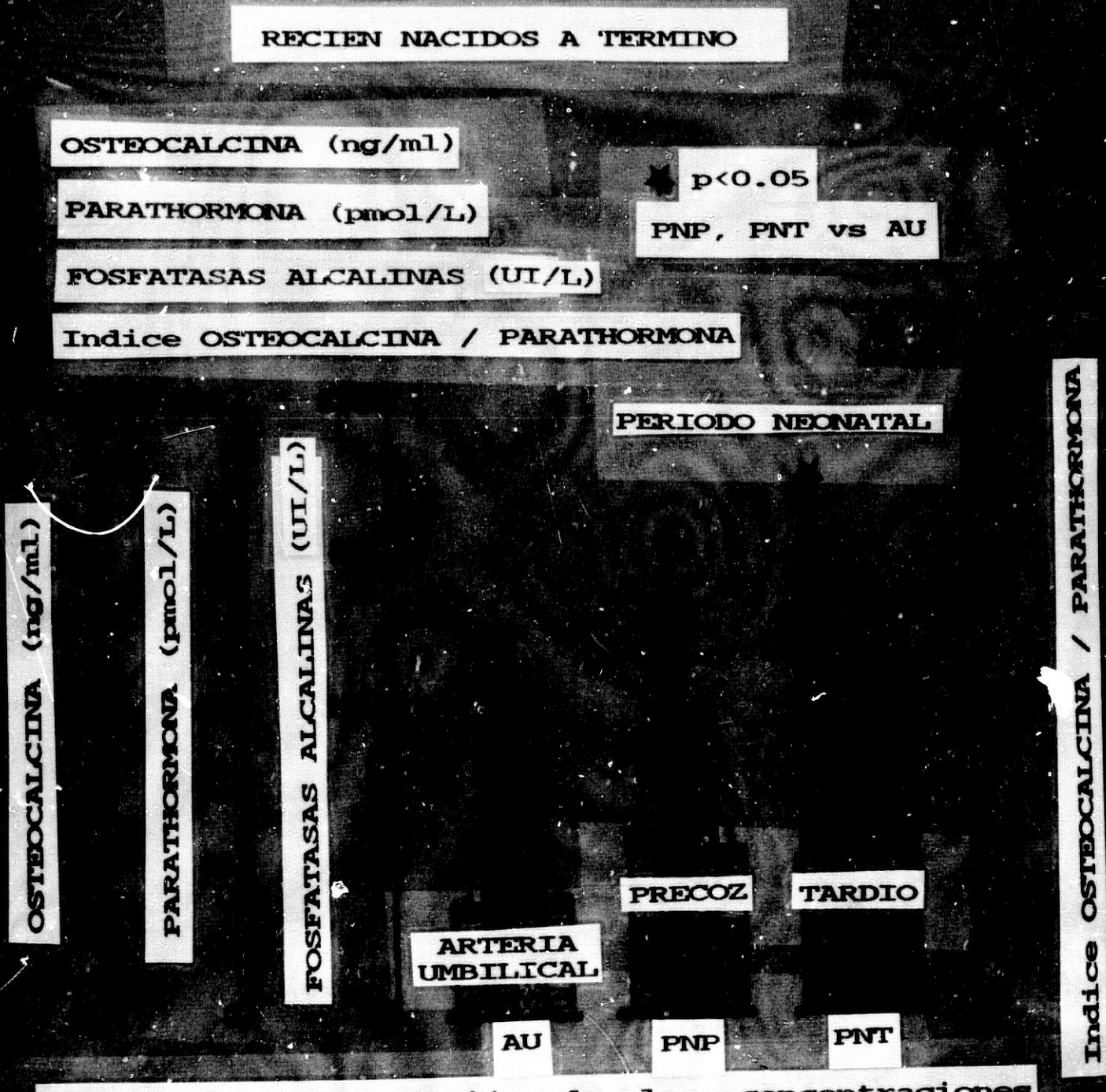


FIGURA 41.- Comparación de las concentraciones séricas de osteocalcina, parathormona, fosfatasas alcalinas e índice osteocalcina/parathormona en arteria umbilical (n: 95) y periodos neonatal precoz y tardío (n: 25) en recién nacidos término.

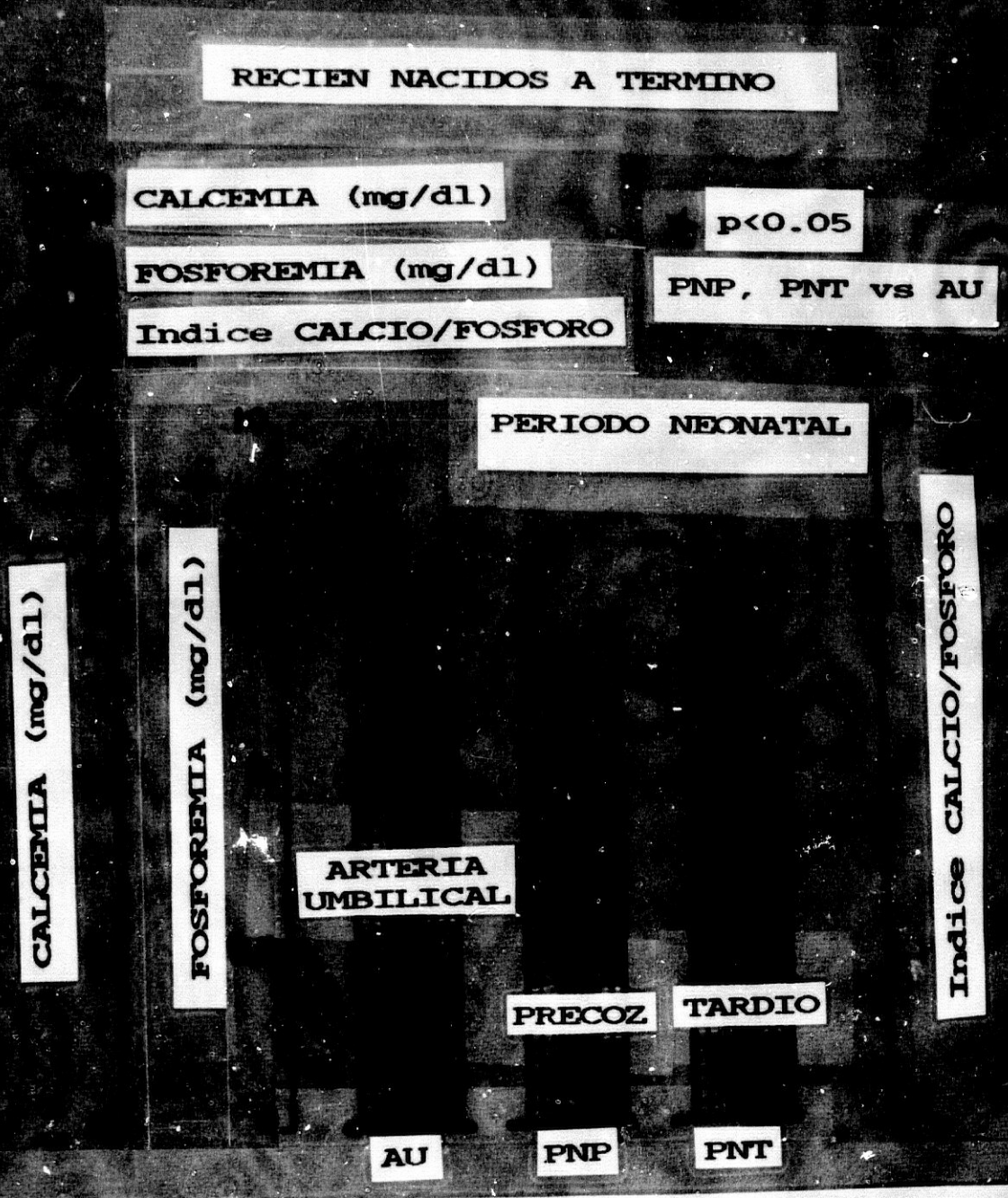


FIGURA 42.- Comparación de las concentraciones séricas de calcio, fósforo e índice calcio/fósforo en arteria umbilical (n: 95) y periodos neonatal precoz y tardío (n: 25) en recién nacidos término.