

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**

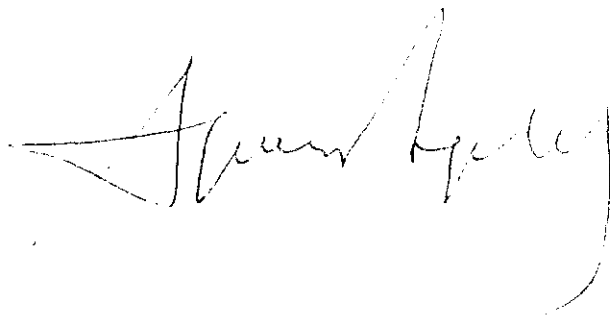
METABOLISMO OSEO EN EL LACTANTE
**Su relación con la alimentación, aportes de vitamina D,
e influencia estacional**

**Tesis Doctoral
Gustavo Lorenzo Sanz
MADRID 1993**

D. ANGEL NOGALES ESPERT, CATEDRATICO DE
PEDIATRIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID

HACE CONSTAR: que D. GUSTAVO LORENZO SANZ ha
realizado bajo su dirección, el trabajo titulado:
*"METABOLISMO OSEO EN EL LACTANTE. Su
relación con la alimentación, aportes de vitamina
D, e influencia estacional"*, para ser presentado
como Tesis Doctoral.

Madrid, veintiocho de Junio de mil novecientos
noventa y tres.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Angel Nogales Espert', written in a cursive style.

Fdo.: Prof. D. Angel Nogales Espert

D. ENRIQUE CASADO DE FRIAS, CATEDRATICO DIRECTOR
DEL DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA DE LA UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID

HACE CONSTAR: que D. GUSTAVO LORENZO SANZ ha
realizado bajo la dirección del Prof. D. Angel
Nogales Espert, el trabajo titulado:
*"METABOLISMO OSEO EN EL LACTANTE. Su
relación con la alimentación, aportes de vitamina
D, e influencia estacional"*, para ser presentado
como Tesis Doctoral.

Madrid, veintiocho de Junio de mil novecientos
noventa y tres.



Fdo.: Prof. D. Enrique Casado de Frias

A mi mujer
A Nacho
A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Nogales, mentor y director de esta Tesis, por su ayuda, dedicación y paciencia; por hacerme ver la luz donde sólo veía sombras.

A Luisa Larrodera, muchas son las cosas que debo agradecerla, pues sin su colaboración no hubiese podido sacar adelante este trabajo, pero me gustaría destacar sobre todo un aspecto personal, y es su sincera amistad.

A la casa NESTLE, por su inestimable colaboración desinteresada, y aportación de todos los productos alimenticios necesarios para poder realizar este estudio.

A Luisa, que realizó las extracciones de los niños.

A todo el personal del Laboratorio de Bioquímica de la Sección de Hormonas, por su amable colaboración.

A ti Conchi, compañera inseparable, que en todo momento me has ayudado y alentado a terminar este proyecto.

A mi hijo, por saberme perdonar todo el tiempo que le he estado robando.

A mis padres, por su incondicional apoyo a lo largo de todos estos años necesarios para que haya llegado este momento.

Por último quiero dar las gracias a todos los niños que han configurado este trabajo, así como a sus padres por su colaboración.

INDICE

INTRODUCCION

1. Aspectos históricos de la vitamina D	2
2. Metabolismo de la vitamina D	5
2.1 Regulación del metabolismo del 25-hidroxiciferol	9
2.2 Regulación del metabolismo del 1,25-dihidroxiciferol	12
3. Funciones biológicas del 1,25-dihidroxiciferol	13
4. Hormona paratiroidea	16
4.1 Mecanismo de regulación	16
4.2 Metabolismo	17
4.3 Mecanismo de acción	18
5. Osteocalcina	20
6. Vitamina D en el niño: suplementos vitamínicos, radiación solar, o ambos	21

OBJETIVOS

Objetivos	28
---------------------	----

MATERIAL Y METODOS

1. Población estudiada	30
2. Determinación de hormona paratiroidea	41
3. Determinación de osteocalcina	42
4. Método de determinación de 25-hidroxiciferol	43
5. Método de determinación de 1,25-dihidroxiciferol	44
6. Otras determinaciones analíticas	47
7. Valoración de masa ósea	48
8. Método estadístico	50

RESULTADOS

1. Desarrollo somático	52
2. Nivel sanguíneo de calcio iónico	56
3. Concentración sérica de calcio	58
4. Concentración sérica de fósforo	60
5. Concentración sérica de fosfatasa alcalina	62
6. Calcio/creatinina en orina	64
7. Fósforo/creatinina en orina	66
8. Concentración sérica de hormona paratiroidea	69
9. Concentración sérica de osteocalcina	72
10. Concentración sérica de 25-hidroxiciferol	75

11. Concentración sérica de 1,25-dihidroxiciferol	78
12. Masa ósea	81

DISCUSION

1. Desarrollo somático	83
2. Nivel sanguíneo de calcio iónico	84
3. Concentración sérica de calcio	86
4. Concentración sérica de fósforo	87
5. Concentración sérica de fosfatasa alcalina	88
6. Calcio/creatinina en orina	89
7. Fósforo/creatinina en orina	90
8. Concentración sérica de hormona paratiroidea	91
9. Concentración sérica de osteocalcina	93
10. Concentración sérica de 25-hidroxiciferol	96
11. Concentración sérica de 1,25-dihidroxiciferol	100
12. Masa ósea	103

CONCLUSIONES

Conclusiones	105
------------------------	-----

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía	109
------------------------	-----

INTRODUCCION

1. ASPECTOS HISTORICOS DE LA VITAMINA D

Aunque el raquitismo era conocido desde la antigüedad y fue claramente descrito en 1645 (1), no es hasta principios de este siglo cuando adquiere relevancia esta enfermedad, ya que coincidiendo con la revolución industrial, el raquitismo apareció en proporciones epidémicas en el norte de Europa, norte de Estados Unidos y norte de Asia. La rápida transformación de una sociedad agraria en urbanizada con la reducción de exposición solar que conllevaría y el aumento de la polución atmosférica que limitaría la llegada de luz ultravioleta a la piel humana, fueron los factores que probablemente precipitaron esta alta incidencia de raquitismo (2). Lógicamente esta interpretación sólo pudo ser realizada años más tarde una vez descubierta la vitamina D, su síntesis y su metabolismo.

En 1919, Huldshinsky demostró que niños con raquitismo se curaban mediante la exposición a la luz solar o a la luz ultravioleta inducida artificialmente (3). Posteriormente, Mc Collum y cols. (4) en un estudio realizado en ratas en crecimiento, demostraron que mediante oxidación del aceite de hígado de bacalao, éste perdía la actividad de la vitamina A, permaneciendo el poder antirraquítico. Esta actividad antirraquítica fue atribuída a una nueva vitamina que se denominó vitamina D.

El hecho de que el factor antirraquítico pudiera generarse en la piel tras la exposición a la luz solar, radiación ultravioleta o ingerirse en la dieta, obligó a pensar que podía tratarse de factores diferentes. Powers y cols. (5) realizaron un experimento en dos grupos de ratas raquíticas a las que trataron con aceite de hígado de bacalao o con radiación ultravioleta, y obtuvieron los mismos resultados en ambos.

Steenbock y Black (6) y Hess y Weinstock (7), demostraron que la irradiación de muchos alimentos con una lámpara de cuarzo con vapor de mercurio, proporcionaba propiedades antirraquíticas a los mismos.

La primera vitamina aislada por irradiación del ergosterol se denominó vitamina D₁, identificándose posteriormente como una mezcla de lumisterol y ergocalciferol. Años más tarde se consiguió aislar la primera vitamina D conocida como ergocalciferol o vitamina D₂, que fue utilizada durante muchos años como preparado sintético para la prevención y curación del raquitismo en el hombre. En 1935 Windaws y cols. (8) sintetizaron químicamente el 7-dehidrocolesterol o provitamina D₃, y demostraron que su irradiación con luz ultravioleta daba origen a la vitamina D₃ o colecalciferol (Figura 1).

La vitamina D₂ es de 10 a 20 veces menos activa que la vitamina D₃ en pollos, sin embargo en mamíferos, incluido el hombre, tienen el mismo potencial biológico y metabolismo similar.

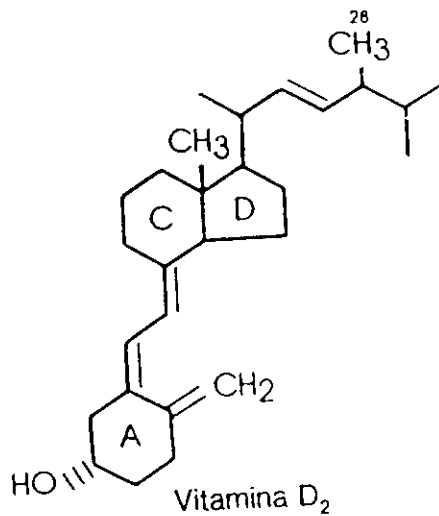
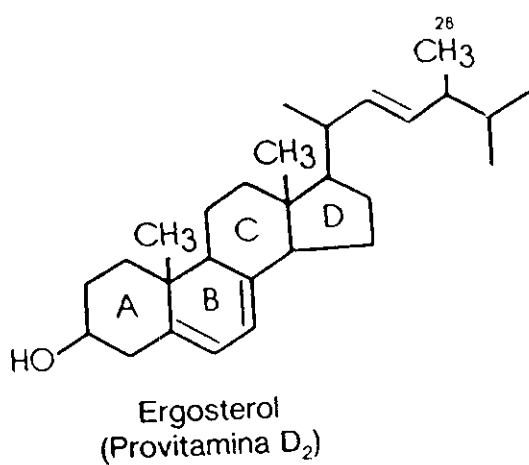
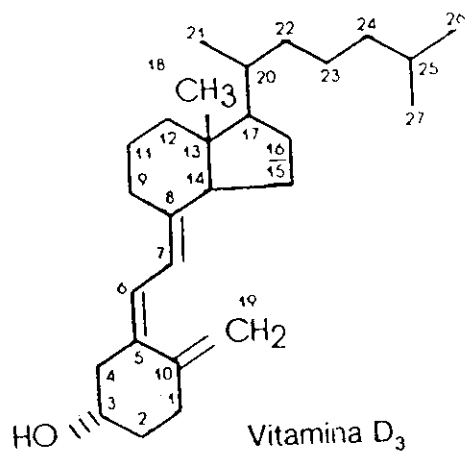
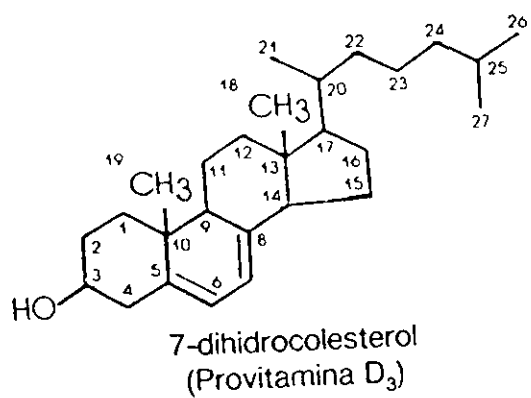


Fig 1. Estructura de la vitamina D₂ y vitamina D₃ y sus precursores

2 . METABOLISMO DE LA VITAMINA D

La síntesis a nivel de la piel, es la vía principal de obtención de vitamina D para la mayoría de los individuos. Cuando la piel se expone a la luz solar o a ciertas luces artificiales, la radiación ultravioleta penetra en la epidermis y ocasiona diversas reacciones fotoquímicas (9); una de ellas es la transformación del 7-dehidrocolesterol en vitamina D₃. Las radiaciones con longitud de onda comprendida entre 290 y 315nm se absorben por los enlaces conjugados dobles en posición C₅ y C₇ del 7-dehidrocolesterol, fragmentando el anillo B entre C₉ y C₁₀ y produciendo 9,10-secoesterol o previtamina D₃ (Figura 2).

La previtamina D₃ es biológicamente inerte pero termolábil y sufre una reorganización molecular espontánea en función de la temperatura, transformándose en un compuesto termoestable que es la vitamina D₃. A la temperatura corporal se tarda aproximadamente tres días en la conversión completa de la previtamina D₃ en vitamina D₃.

A pesar de que la melanina de la piel compite con el 7-dehidrocolesterol por los fotones ultravioleta, y por tanto, puede limitar la síntesis de previtamina D, la isomerización fotoquímica de la previtamina D hacia dos productos biológicamente inertes (lumisterol y taquisterol), constituye un mecanismo importante para impedir la producción exagerada de previtamina D durante las exposiciones prolongadas al sol (10). De los distintos metabolitos formados en la piel, únicamente la vitamina D₃ tiene alta afinidad para la proteína plasmática de transporte de vitamina D por lo que pasa preferentemente a la circulación.

La alimentación es otra fuente de aporte de vitamina, pocos alimentos la contienen de forma natural, a excepción de el hígado, yema de huevo y aceite de hígado de

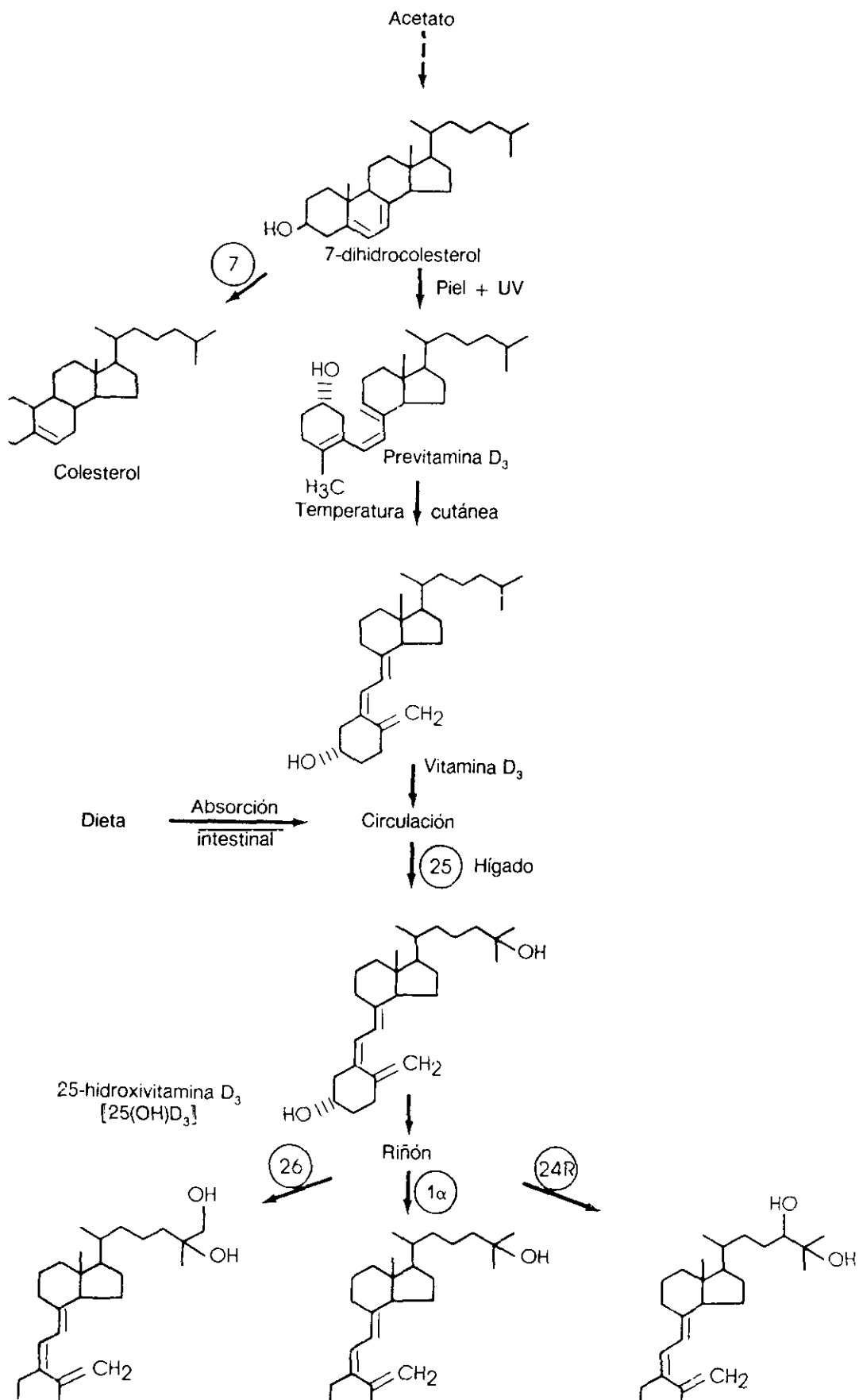


Fig. 2.- Metabolismo de la vitamina D

pescado. Una vez que la vitamina D ha sido ingerida, sus componentes liposolubles se incorporan a la fracción de quilomicrones y son absorbidos por el conducto linfático. A las 4 horas de la ingestión de 50.000 UI de vitamina D₂ se observa un incremento significativo de la concentración de vitamina D, que es máximo a las 12 horas y va descendiendo a las 72 horas (11).

La vitamina D sintetizada en la piel o ingerida en la dieta junto con los metabolitos, pasan a la circulación, y se unen a las proteínas ligadoras (DBP). El complejo vitamina D-DBP es transportado al hígado donde la vitamina D se hidroxila en los hepatocitos mediante la 25-hidroxilasa localizada en mitocondrias y microsomas del parénquima celular hepático (12). El 25-hidroxicalciferol (25(OH)D) es uno de los metabolitos circulantes principales de la vitamina D; su vida media es de 21 días, y su concentración plasmática es un buen reflejo del aporte dietético de vitamina D y de la exposición a la luz solar.

La vitamina D de la dieta se absorbe en el intestino y es rápidamente captada por el hígado. En contra, la vitamina D formada en la piel difunde lentamente hacia la sangre, con lo que la captación hepática y su conversión a 25(OH)D es también más lenta. El suministro gradual de vitamina D₃ al hígado permite la producción continua y prolongada de 25(OH)D, y de esta forma, la conversión plasmática del metabolito se mantiene aún cuando la exposición de la piel a luz solar ocurra sólo de manera intermitente.

Desde el punto de vista filogenético, los procesos de hidroxilación hepática tienen lugar en el periodo fetal y neonatal, y la eficacia de esta hidroxilación se correlaciona con la edad gestacional (13,14,15).

La conversión de vitamina D hacia 25(OH)D se altera en enfermedades hepáticas colestásicas o parenquimatosas severas, por reducción de las reservas de 25-hidroxilasa-vitamina D y por malabsorción intestinal (16).

Los pacientes con síndrome nefrótico con una proteinuria mayor de 4 g/día, suelen presentar niveles reducidos de 25(OH)D, como consecuencia de la pérdida urinaria de las proteínas ligadoras de vitamina D y de 25(OH)D, de un peso molecular similar al de la albúmina (17).

El 25(OH)D tiene actividad a concentraciones elevadas *in vitro* pero carece de efectos biológicos *in vivo* a concentraciones fisiológicas. Después de su formación en hígado el 25(OH)D se une a las proteínas transportadoras de vitamina D y es conducido hasta el riñón donde sufre una hidroxilación estereoespecífica sobre C₁ y C₂₄ (18). En la mayoría de los mamíferos, el riñón desempeña un papel esencial en el metabolismo del 25(OH)D y su conversión hacia el metabolito biológicamente activo. Durante el embarazo la placenta juega un papel importante en el mantenimiento de concentraciones adecuadas de 1,25-dihidroxicalciferol (1,25(OH)₂D) (19).

La 25(OH)D-1 α -hidroxilasa es una enzima mitocondrial citocromo p450 dependiente. Para realizar esta hidroxilación necesita oxígeno molecular, que se incorpora en el esteroide en posición C₁ o C₂₄, y NADP reducido que puede obtenerse del succinato mitocondrial o de la oxidación de malato a isocitrato (20). Estudios realizados en microsecciones de segmentos de nefronas confirman la presencia de dos formas diferentes de 1 α -hidroxilasa. Los enzimas del tubo contorneado proximal se activan por la hormona paratiroidea a través del AMPc, los de la pars recta son estimulados por la calcitonina en un proceso AMPc independiente; para algunos autores esto es importante durante la etapa fetal, donde al estar suprimida la hormona paratiroidea, se necesitan otros mecanismos de producción de 1,25(OH)₂D (21).

2.1 REGULACION DEL METABOLISMO DEL 25(OH)D

No se conoce con precisión el mecanismo por el que la hormona paratiroidea influye sobre el metabolismo renal del 25(OH)D. La producción renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se correlaciona con el efecto hipofosfatemizante de la hormona paratiroidea y probablemente, con la concentración intracelular de fosfato.

En estudios realizados en sujetos sanos, la restricción de fósforo produce un aumento de la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ un 80% por encima de los valores basales, y esto se correlaciona con un aumento de la síntesis más que con una disminución del aclaramiento (22). Estos datos sugieren que la regulación del fósforo sérico es el factor más importante para estimular la actividad de la 1α -hidroxilasa.

Aunque se ha demostrado que la hipocalcemia estimula la 1α -hidroxilasa renal, parece que este efecto es secundario a la acción de la hormona paratiroidea (PTH) que estimula la adenilciclase del tubo contorneado proximal desencadenando toda la cascada que conduce al aumento de la absorción renal de calcio, secreción tubular de fosfato y producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (23).

La PTH es muy importante en la regulación de la 1α -hidroxilasa renal, pero en este proceso enzimático influyen otros factores (Figura 3). Durante el embarazo, la lactancia y las fases de crecimiento esquelético rápido, el organismo se adapta al aumento de las necesidades de calcio facilitando su absorción intestinal, a través del aumento de la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ característico de estas situaciones. Los estrógenos, la prolactina

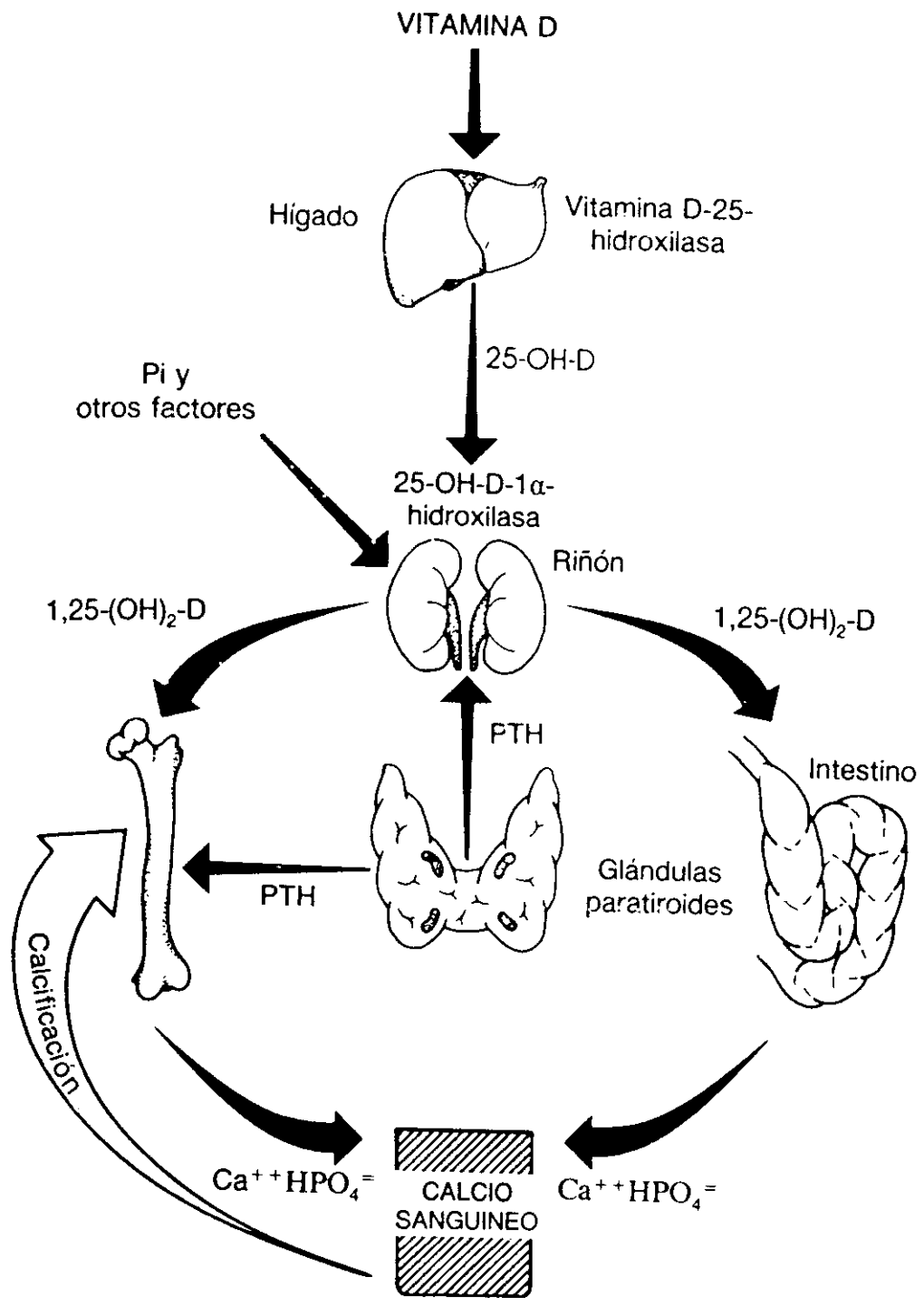


Fig. 3.- Mecanismos de regulación de la 25(OH)D-1α-hidroxilasa

y la hormona de crecimiento aumentan la producción renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, de forma directa e indirecta en modelos experimentales de animales *in vivo* e *in vitro* (24).

2.2 METABOLISMO ALTERNATIVO DEL 25(OH)D Y 1,25(OH)₂D

El 24,25-dihidroxiciferol (24,25(OH)₂D) es un metabolito circulante del 25(OH)D que tiene una concentración sérica de 0.5 a 5 ng/mL y es un buen reflejo de la concentración de 25(OH)D (12). Se produce fundamentalmente a nivel renal aunque hay otros tejidos que poseen receptores nucleares para el 1,25(OH)₂D y enzimas para sintetizar este metabolito (25). A concentraciones fisiológicas, en estudios realizados en ratas anéfricas, se ha demostrado que no aumenta el transporte intestinal de calcio ni la movilización de calcio óseo (26).

El 24,25(OH)₂D también sirve de sustrato a la 25(OH)D-1 α -hidroxilasa renal, y se transforma en 1 α ,24,25-trihidroxivitamina D. Aunque en cultivos celulares aumenta el transporte de calcio, si bien con menor potencia que el 1,25(OH)₂D, no se sabe si posee alguna función fisiológica en la homeostasis de este ión (27).

En condiciones fisiológicas el 25(OH)D se metaboliza en C₂₆ para formar el 25S,26-dihidroxivitamina D₃ [25,26(OH)₂D₃]. La concentración sérica de este metabolito va a reflejar también la situación nutricional de 25(OH)D en el hombre. La hidroxilación del 25(OH)D en C₂₃ da lugar al 23S,25-dihidroxivitamina D₃, y este metabolito es precursor del 25-hidroxivitamina D₃-23,26-lactona.

Hasta este momento, se han identificado más de 20 metabolitos de la vitamina D, todos se originan a partir del 25(OH)D o 1,25(OH)₂D. La mayoría de los metabolitos son productos de degradación y sin actividad biológica significativa (28).

3 . FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL 1,25(OH)₂D

Los estudios realizados en los últimos años, demuestran que la vitamina D actúa como una prohormona y el 1,25(OH)₂D como la verdadera hormona, que se vierte a la sangre para alcanzar los órganos efectores, donde media las respuestas biológicas atribuidas a la vitamina D. La respuesta biológica mejor conocida de la vitamina D consiste en estimular la absorción intestinal de calcio.

La administración de 1,25(OH)₂D₃ marcado radiactivamente permite comprobar su localización, al cabo de cuatro horas, en el núcleo de las células del epitelio intestinal después de haberse fijado a una fracción proteica y soluble del citoplasma, denominada receptor. Una vez que el 1,25(OH)₂D₃ se encuentra unido a la cromatina, se detecta una activación de la síntesis de ARN y la producción de una proteína transportadora de calcio intracelular (CaBP). La cantidad formada de esta proteína es proporcional a la del 1,25(OH)₂D₃ localizada en la mucosa intestinal, y se correlaciona con la actividad de la 1 α -hidroxilasa renal y con el transporte intestinal de calcio mediado por la vitamina D. Existe unanimidad en que las acciones celulares del 1,25(OH)₂D se inician por interacción de la hormona con un receptor o proteína ligadora específica (29). Los receptores son proteínas intracelulares similares a las de las hormonas esteroideas. El receptor nuclear del 1,25(OH)₂D descrito por Brumbaugh y Haussler (30) y por Kream y cols. (31), presenta alta afinidad y alta selectividad para el 1,25(OH)₂D en comparación con otros esteroides y metabolitos de la vitamina D (32).

Tras la unión de la hormona al receptor se produce una fosforilación y aumenta la afinidad del receptor para su unión al núcleo y al ADN (33). El complejo hormona-receptor a nivel nuclear, va a regular la transcripción de los ARN mensajeros específicos que gobiernan la traslación de las proteínas.

Como respuesta a la interacción entre la hormona y el receptor se forman una serie de proteínas; en el hueso la osteocalcina, y en el intestino la proteína ligadora de calcio (CaBP) descubierta por Wasserman y Taylor (34).

Es posible que la unión del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ al receptor citosólico controle los efectos no mediados por el núcleo, mientras que la unión de la hormona con los receptores nucleares controle los efectos que requieren transcripción génica. La población de receptores citoplasmáticos puede representar a aquellos que previamente estuvieron unidos al núcleo, y que ya están en proceso de catabolización (35).

A nivel intestinal, el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ estimula el transporte de calcio y fósforo desde la luz del intestino delgado hacia la circulación (36). El aumento de resorción ósea producido por el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ probablemente ocurra de forma sinérgica con la PTH. Los osteoclastos maduros no poseen receptores para la hormona paratiroidea ni para el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Sin embargo, existen pruebas que sugieren que ambas hormonas aumentan la actividad de resorción ósea estimulando las células precursoras osteoclásticas. Estas células precursoras si poseen receptores para dichas hormonas, y al ser estimuladas, podrían transformarse en osteoclastos maduros y/o interaccionar con los osteoclastos, los cuales liberarían citoquinas y aumentarían la actividad de las células maduras (37). La función del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sobre la regulación renal del calcio y fósforo no se conoce con precisión.

La acción de la vitamina D junto con la PTH, va a ser fundamental para mantener los niveles plasmáticos de calcio y fósforo y garantizar una adecuada mineralización

ósea. Esta función va a ser tanto más importante, cuanto más rápida sea la velocidad de crecimiento y desarrollo del niño, por lo que su actuación durante el primer año de la vida adquiere capital importancia. La ya comentada elevada incidencia de raquitismo a principios de siglo, influyó para que los investigadores de la época estudiaran el por qué de esta enfermedad, así como posibles formas de prevenirla, entre las que incluía la medida de suplementar la leche y otros alimentos con vitamina D.

4 . HORMONA PARATIROIDEA

La PTH es un péptido de 84 aminoácidos que se sintetiza a partir de dos precursores, la pre-pro-PTH, y la pro-PTH. La síntesis de la pre-pro-PTH en las glándulas paratiroides se realiza en los ribosomas, dentro de la matriz celular. Cuando la cadena peptídica tiene una longitud de 20-30 aminoácidos, el N-amino terminal emerge del ribosoma y continúa creciendo, uniéndose a la membrana del retículo endoplásmico. La pre-pro-PTH tiene 115 aminoácidos y una estructura similar a la pro-PTH, más un péptido de 25 aminoácidos en el extremo amino terminal. Su vida media es corta, pierde los 25 aminoácidos para formar la pro-PTH y se incorpora al aparato de Golgi. La pro-PTH es un péptido de 90 aminoácidos de estructura similar a la PTH, pero con 6 aminoácidos más en el extremo NH₂-terminal. La función de la pro-PTH es transportar el péptido hasta el aparato de Golgi donde se pierden los 6 aminoácidos del extremo NH₂-terminal para formar la PTH, que se acumula en gránulos secretorios, quedando almacenada para su posterior secreción. La existencia de esta ruta de síntesis mediante divisiones de un gran precursor, indica que estas fases son reguladas y sirven de control para modificar la síntesis de PTH en función de las demandas, y además condiciona a este péptido como hormona de exportación, es decir, de utilización fuera de su lugar de síntesis (38).

4.1 MECANISMO DE REGULACION

El calcio plasmático es el principal regulador de la síntesis y secreción de PTH;

mientras la hipocalcemia estimula la secreción de PTH, la hipercalcemia la disminuye. La relación entre la concentración de PTH y de calcio es de tipo sigmoide, de tal forma, que la respuesta de la PTH se produce en unos límites estrechos de la concentración sérica de calcio (9-10 mg/dL), y cambios de calcemia por encima o por debajo de dichos límites apenas modifican la respuesta de la PTH.

El magnesio también puede modificar la secreción de PTH, y se ha comprobado que la hipomagnesemia estimula la liberación de PTH.

4.2 METABOLISMO

El péptido segregado por las paratiroides, a nivel hepático se divide en dos fragmentos: el NH₂-terminal y el COOH-terminal. El fragmento NH₂-terminal, de 34 aminoácidos es el que tiene actividad biológica, pero su vida media es corta y su concentración sérica es baja; sin embargo, el fragmento COOH-terminal, que es inactivo, tiene una vida media larga, y representa el 80% del material inmunorreactivo que indica la tasa de secreción de PTH (39).

Los órganos que intervienen en el metabolismo periférico de la PTH son el hígado y el riñón (40,41). El hígado capta la PTH intacta, pero no los fragmentos, rompe la molécula y libera fragmentos COOH-terminales a la circulación. El filtrado glomerular parece ser la única vía de eliminación de fragmentos COOH-terminales; los fragmentos pequeños se filtran mientras que los grandes se reabsorben. En insuficiencia renal crónica los fragmentos COOH-terminales se degradan en el retículo endoplásmico.

4.3 MECANISMO DE ACCION

La acción principal de la PTH es mantener la calcemia de forma directa o indirecta, actuando en los órganos diana: riñón, intestino y hueso. En el riñón, aumenta la excreción de fósforo, sodio, bicarbonato y aminoácidos, y disminuye la de calcio y magnesio. Por otra parte, activa la 1α -hidroxilasa renal, facilitando el paso de $25(\text{OH})\text{D}$ a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. En el intestino, su acción fundamental es promover la absorción de calcio. A nivel óseo, inicialmente, facilita la liberación de calcio al líquido extracelular, sin aumentar la de hidroxiprolina, lo que indica que hay una liberación del contenido mineral, pero no una destrucción de la matriz ósea. Sin embargo, el aumento prolongado de PTH moviliza el contenido mineral de la matriz ósea, aumenta la liberación de hidroxiprolina y estimula la formación de nuevos osteoclastos, produciendo a largo plazo un aumento de la función osteoblástica (42). Por tanto, la PTH a nivel del hueso tiene un doble efecto, dependiendo de su concentración y del tiempo que ejerce su actuación.

Estudios realizados sobre receptores específicos de PTH en células óseas, han demostrado que el osteoblasto es la principal célula diana de esta hormona, y que algún producto resultante de esta acción podría actuar como mensajero local modificando la actividad osteoclástica (43). Se desconoce si el activador es una prostaglandina, interleukina 1, leucotrieno o la propia osteocalcina.

Recientemente, se han descubierto una serie de Péptidos relacionados con la PTH (PrPTH), que tienen similitudes estructurales y funcionales con la PTH, aunque sus acciones no son totalmente conocidas (44). Se codifican por un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 12, en posición homóloga a la del gen que codifica la PTH en el cromosoma 11, que puede sintetizar 3 tipos de moléculas de 139, 141 y 173 aminoácidos.

Existe un fuerte homología en los primeros 34 aminoácidos del extremo NH₂-terminal de la PTH y de los PrPTH, lo que hace que tengan efectos similares y que interaccionen con los mismos receptores. Estos PrPTH parecen ser la PTH fetal, que se sintetizan en queratinocitos y paratiroides. Se sabe que en el hueso actúan sobre los osteoblastos, aumentando la resorción ósea. En la placenta van a facilitar el transporte de calcio y magnesio al feto.

Las glándulas paratiroides del feto secretan PrPTH a una concentración plasmática de calcio un 30% superior a la del adulto; presumiblemente, el feto tiene un dintel más alto que el adulto para la inhibición por el calcio, y así, los PrPTH se inhiben con concentraciones de calcio superiores que la PTH. Por todo ello, el feto va a tener niveles séricos de calcio superiores al adulto, posiblemente porque necesite mayor cantidad de calcio para la formación rápida de hueso. No se conoce con exactitud el momento en el que deja de sintetizarse los péptidos y comienza a sintetizarse PTH; tal vez ocurra cerca del parto. Tampoco se conocen los factores humorales o neuronales que actúan en el cromosoma 12 para dejar de sintetizar PrPTH, y en el cromosoma 11 para comenzar a sintetizar PTH.

5 . OSTEOCALCINA

La osteocalcina, también conocida como BGP (Bone-Gla-Protein), es una proteína no colágena ósea, cuya síntesis y liberación por los osteoblastos se estimula por el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Está presente en la matriz ósea, donde constituye el 10-20% de las proteínas no colágenas (45).

Sus acciones fisiológicas aún no están bien establecidas. Sus niveles plasmáticos están aumentados en situaciones donde hay un elevado remodelamiento óseo, siendo a la vez marcador de formación y resorción de hueso (46,47,48). Cuando se produce resorción ósea los osteoclastos liberan osteocalcina al suero y es aclarada por el riñón.

En el proceso de osteosíntesis se libera a la sangre principalmente la molécula completa de osteocalcina, mientras que en situaciones de resorción ósea se liberan sobre todo fragmentos de esta proteína. La mayoría de los métodos utilizados en el laboratorio detectan los fragmentos de osteocalcina, por lo que los resultados en general van a ser mejor reflejo de resorción que de síntesis ósea. No obstante, la heterogeneidad de la osteocalcina circulante sugiere que existe un metabolismo periférico que dificulta la interpretación de los resultados (49).

6. VITAMINA D EN EL NIÑO: SUPLEMENTOS VITAMINICOS, RADIACION SOLAR, O AMBOS

En 1928, Hess y Lewis estudiaron la práctica de suplementar la leche con vitamina D para prevenir el raquitismo en los niños (50). Posteriores trabajos trataron de delimitar la dosis recomendable de estos suplementos vitamínicos (51,52). En 1966, Fomon y cols. (53) realizaron un estudio en tres grupos de niños utilizando dosis diarias de 300 UI, 350 a 550 UI y 1380 a 2170 UI de vitamina D₂ y no hubo diferencias en el peso, la talla ni la concentración sérica de calcio.

En 1973, la Academia Nacional de las Ciencias de Alimentación y Nutrición de los Estados Unidos, estableció la dosis recomendada de vitamina D para prevenir el raquitismo en 400 UI/día (54).

Numerosos trabajos han demostrado que la concentración plasmática de 25(OH)D varía con la estación, alcanzándose valores más elevados en verano y más bajos en invierno (55,56,57,58); este patrón está relacionado con la intensidad de la radiación ultravioleta B solar de 290 a 320 nm en regiones geográficas templadas, y es independiente del aporte de vitamina D por la dieta (59,60).

También hay diferentes estudios en adultos, privados de exposición a la luz ultravioleta solar, que recibieron 2,5 µg (100 UI)/día de vitamina D en la dieta, en los que se observó una disminución significativa de los niveles plasmáticos de 25(OH)D (61,62,63).

Las alteraciones del metabolismo óseo, osteopenia y raquitismo, han sido bien documentadas en el niño pretérmino (64,65,66,67). Durante el último trimestre de vida

intrauterina se produce una rápida mineralización ósea, aumentando de forma exponencial la velocidad de aposición ósea de la 24 a la 36 semana de gestación. De la 34 a la 36 semana gestacional se produce un aporte al feto, mediante transporte activo a través de la placenta, de 120 a 150 mg/Kg/día de calcio y 75 mg/Kg/día de fósforo (68). También se ha observado que los niños pretérmino tienen una capacidad limitada para sintetizar 25(OH)D (69). En estudios realizados en ratas se ha visto que la vitamina D y el 25(OH)D atraviesan fácilmente la placenta (70), comprobándose que la concentración sérica de 25(OH)D del recién nacido se correlaciona intensamente con la de la madre (71,72). Estos datos sugieren que los requerimientos fetales de 25(OH)D van a obtenerse directamente de los depósitos maternos. Puede comprenderse, que si se interrumpe bruscamente este aporte de minerales y vitaminas al feto entre la 24 y la 36 semana de gestación, se altere seriamente su mineralización ósea definitiva.

No obstante, los suplementos minerales no han reducido la incidencencia de raquitismo en el prematuro, por lo que se piensa que algún factor relacionado con la leche materna pueda jugar un papel importante en el raquitismo del prematuro, o bien que los suplementos minerales de calcio y fósforo tal y como son administrados no se retengan (73).

En estudios previos se ha comprobado que niños de muy bajo peso al nacer alimentados con lactancia materna (74,75,76) o con fórmulas fortificadas con 400 UI/L de vitamina D (77,78,79), pueden desarrollar osteopenia o raquitismo.

Rowe J.C. y cols. (80) en un trabajo de recién nacidos pretérminos de muy bajo peso al nacimiento alimentados con una fórmula especial, con un contenido de 1350 mg/L de calcio y 700 mg/L de fósforo, consiguen parámetros de mineralización ósea adecuados, pero evidencian una elevada excreción de calcio y una alta reabsorción tubular de fosfato con niveles normales de fosfatasa alcalina. Este patrón también ha sido observado por

otros autores (81,82).

Gross S.J. (83) en tres grupos de niños pretérmino sanos, de muy bajo peso al nacimiento, alimentados con lactancia materna exclusiva, con lactancia materna con suplementos minerales y con fórmula adaptada, no observó diferencias entre los tres grupos en las concentraciones de calcio sérico en ningún momento del estudio; los niveles séricos de fósforo fueron mayores en los niños alimentados con fórmula y en los que recibieron lactancia materna suplementada, y a las 44 semanas de edad postconcepcional no hubo diferencias de contenido mineral, medido en húmero, ni entre los tres grupos ni comparando con niños nacidos a término. Sin embargo otros autores mantienen que los suplementos de minerales y vitamina D son necesarios para prevenir raquitismo y/o fracturas en el recién nacido pretérmino (84,85,86).

La práctica de suplementar rutinariamente con vitamina D a todos los niños ha sido muy debatida en las dos últimas décadas (87,88,89,90,91,92,93), sobre todo a raíz de casos publicados de raquitismo nutricional (94,95,96,97,98,99). Si bien es cierto que estos niños no recibieron suplementos de vitamina D, también lo es que existían otros factores que podrían haber jugado un papel importante en la etiología de dichos casos de raquitismo. Además se da la circunstancia de que en muchos de estos casos conflúan varios factores: bajo nivel socioeconómico, dieta vegetariana estricta (95,97,98) y todos los niños eran de raza negra (97,98,99). Por otro lado, también fue referida una elevada incidencia de raquitismo en inmigrantes de India y Paquistán en el Reino Unido (100).

Basándose en el trabajo de Adams y cols. (101), en el que se determinan los valores circulantes y vida media de vitamina D tras una exposición corporal total de luz ultravioleta que causa moderado eritema (1 DME : 33-36 mJ/cm²), diferentes autores han estudiado la influencia del factor racial en la síntesis de vitamina D en la piel por la acción

de la luz ultravioleta (102,103,104). En estos y otros trabajos se demuestra que los individuos de raza negra y los procedentes de Asia del Sur (India, Pakistán) no tienen disminuida la capacidad de producir vitamina D₃ en la piel (105,106), pero requieren una dosis de radiación ultravioleta mayor, sobre todo los individuos de raza negra, para conseguir unos niveles circulantes de vitamina D similares a los individuos de raza caucásica y naturales de Asia del Este (China, Japón) (18).

También es bien conocida la mayor incidencia de raquitismo en países de latitud norte, durante o inmediatamente después del invierno que en primavera o verano. Se ha demostrado en Boston (42° N), que durante los meses de Noviembre a Marzo la síntesis de vitamina D₃ es mínima (107).

Los alimentos que en condiciones naturales contienen mayores cantidades de vitamina D son las grasas y aceites de pescado, huevos, hígado y leche. La leche de vaca aporta por término medio 40 UI/L de vitamina D (108), y la leche humana contiene de 15 a 80 UI/L de vitamina D (109,110). Lakdawala y cols., pensaban que el contenido de vitamina D de la leche humana era suficiente para prevenir el raquitismo en los niños alimentados al pecho (111), aunque ellos sugerían que había mayor cantidad en forma de sulfato de vitamina D hidrosoluble, y en estudios posteriores no se ha corroborado dicha afirmación (112,113). También se han visto factores raciales a este respecto, ya que madres de raza blanca tienen mayor actividad de vitamina D en la leche que madres de raza negra (114).

Se ha establecido que las necesidades diarias para prevenir una deficiencia de vitamina D son de 100 a 400 UI/día (115), por lo que parece difícil pensar que la leche pueda proporcionar dichos requerimientos. En trabajos experimentales ha podido comprobarse, que una breve exposición al sol de la cara, brazos y manos puede ser equivalente a la ingestión

de 200 UI de vitamina D, y una exposición corporal total que cause mínimo eritema puede elevar la concentración plasmática de 25(OH) tanto como la ingestión prolongada de 10000 UI/día de vitamina D (116). Sin embargo, es habitual que en las primeras semanas de vida los lactantes no sean expuestos a la luz solar, por lo que sus necesidades de vitamina D no serían cubiertas ni por la dieta ni por la radiación ultravioleta, y dependerían de su depósito de reserva previo al nacimiento, que como ya comentamos anteriormente está estrechamente correlacionado con el depósito materno (21). También en este sentido se han demostrado diferencias raciales, pues se ha documentado que madres de raza blanca tienen unos niveles de 25-Hidroxivitamina D y D₃, y sus metabolitos, significativamente mayores que madres de raza negra (117).

La mayor incidencia de raquitismo en inmigrantes asiáticos en el Reino Unido se ha relacionado además, con una ingesta importante de cereales en la dieta (118,119). En estudios realizados en pollos (120) y en vacas (121), se ha visto que una dieta rica en cereales disminuye los niveles de vitamina D; y se piensa que puede ser debido a una alteración del metabolismo hepático de la vitamina D, ya que se ha demostrado que el cereal de la dieta es capaz de modificar la lipogénesis hepática (122).

Se ha publicado un caso de sobredosificación crónica de vitamina D por mal uso de un preparado polivitamínico (123). Recientemente, Jacobus y cols. (124) han publicado 8 casos de hipervitaminosis D por fortificación excesiva de la leche con vitamina D. Holick y cols. (125) han analizado el contenido de vitamina D de diferentes fórmulas maternizadas y han demostrado que todas las muestras analizadas contienen mayor cantidad de vitamina D que la que indicaban las tablas de composición.

A pesar de lo expuesto, hay autores que basándose en que las dosis fisiológicas recomendadas no revisten riesgos de efectos secundarios y que no se han publicado casos de

raquitismo en niños que recibían suplementos de vitamina D, son partidarios de suplementar rutinariamente a todos los niños (126,127,128). Otros opinan que podría limitarse a determinadas zonas geográficas (129,130), o durante el invierno (131,72); y existe un tercer grupo que piensa que la suplementación rutinaria quizás no fuese necesaria, y que la forma natural de obtener las necesidades de vitamina D sea a través de la exposición a la luz solar (132,133).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El propósito de este trabajo es valorar el metabolismo óseo en la infancia durante el primer año de vida.

Pretendemos investigar la influencia de la alimentación, viendo si existen diferencias en el metabolismo óseo entre niños que reciben lactancia materna exclusiva, niños alimentados con lactancia materna que reciben suplementos de vitamina D, y niños con lactancia artificial. Y ello, en orden a considerar la conveniencia o no, de suplementar sistemáticamente la alimentación de los lactantes con vitamina D.

Igualmente, pretendemos estudiar la posible influencia estacional sobre este metabolismo óseo. Pensamos realizar la valoración de la mineralización ósea, estudiando los metabolitos de la vitamina D, tanto el 25(OH)D como el 1,25(OH)₂D, así como, los principales parámetros bioquímicos que influyen en el equilibrio mineral; entre los que incluiremos la concentración sérica de calcio iónico, calcio total, fósforo y fosfatasa alcalina, excreción urinaria de calcio y fósforo, y la concentración sérica de hormona paratiroidea y de osteocalcina.

Por último, pretendemos conocer la resultante final de todos estos factores, valorando la masa ósea en el conjunto de niños estudiados.

MATERIAL Y METODOS

1 . POBLACION ESTUDIADA

Para realizar este trabajo se hizo un seguimiento clínico, bioquímico y valoración de masa ósea, a un grupo de niños desde el nacimiento hasta los diez meses y medio de vida. Los niños fueron seleccionados al azar en la Maternidad del Hospital "12 de Octubre", entre hijos de madre sana, con embarazo controlado sin complicaciones y parto a término, así como con peso adecuado para la edad gestacional.

Se eligieron 100 niños en dos momentos diferentes, informando adecuadamente a los padres y obteniendo su consentimiento para llevar a cabo el estudio. Se confeccionaron dos grupos: 40 niños nacidos en el mes de Julio de 1989 (Grupo I), y 60 niños nacidos en el mes de Diciembre de 1989 (Grupo II). Atendiendo al tipo de alimentación, y si percibían o no suplementos vitamínicos, se realizaron tres subgrupos: lactancia materna exclusiva, lactancia materna con suplementos de vitamina D y fórmula adaptada.

Se perdieron 25 niños de la muestra inicial; uno presentó hepatitis connatal, otro fue remitido a estudio por vómitos de repetición, diez abandonaron el estudio, y trece fueron descartados por no cumplir adecuadamente el seguimiento.

De los 75 restantes, 29 pertenecían al Grupo I y 46 al Grupo II. El grupo de niños nacidos en verano (Grupo I) quedó compuesto de 7 niños que recibieron lactancia materna exclusiva, 7 que recibieron lactancia materna con suplementos de vitamina D y 15 que recibieron fórmula adaptada. Y el grupo de niños nacidos en invierno (Grupo II), de 12 niños alimentados con lactancia materna exclusiva, 16 con lactancia materna con suplementos de vitamina D y 18 con fórmula adaptada.

La lactancia materna se mantuvo, exceptuando casos aislados que recibían alguna toma en el quinto y sexto mes, hasta el cuarto mes.

Se utilizó una fórmula maternizada que contiene 400 UI/L de vitamina D (ver composición en Tabla I y Tabla II).

A los cuatro meses se introdujeron cereales, dos tomas al día, empleándose un preparado de cereales sin gluten, que contiene 250 UI de vitamina D por cada 100 g. de producto (ver composición en Tabla III y Tabla IV). A los seis meses, se dieron cereales con gluten (ver composición en Tabla III y Tabla IV) y se introdujeron alimentos sólidos mediante un preparado comercial de 200 g cuya composición detallada puede verse en la Tabla V y Tabla VI. A los ocho meses, se pasó a otro alimento preparado de 250 g (ver composición en Tabla VII y Tabla VIII).

Para los niños que recibieron suplementos de vitamina D se empleó un complejo polivitamínico que contenía $41.67 \mu\text{g}$ de vitamina D / cm^3 , recomendándose una dosis de 400 UI de vitamina D al día desde el mes de vida; a partir de los cuatro meses, la dosis se redujo a 200 UI/día, suspendiéndose todo suplemento a los seis meses, una vez iniciada la diversificación.

Los niños fueron examinados clínicamente a las tres semanas, mes y medio, tres meses, cuatro meses y medio, seis meses, siete meses y medio, nueve meses y diez meses y medio; siempre por el mismo explorador, valorándose el desarrollo somático (talla, peso y perímetro craneal) mediante un tallímetro y báscula de precisión manuales (SECA) y una cinta métrica inextensible. En cada visita, se comprobó que el crecimiento era adecuado mediante una tabla de percentiles (134) y se efectuó un examen físico completo con especial énfasis en la búsqueda de posibles signos de raquitismo.

A las tres semanas, tres, seis y nueve meses, se realizó también una extracción

de sangre para determinar calcio iónico y niveles séricos de 25(OH)D, 1,25(OH)₂D, hormona paratiroidea, osteocalcina, fosfatasa alcalina, calcio, fósforo, creatinina y proteínas totales, así como una muestra de orina para determinar calcio, fósforo y creatinina.

A los diez meses se practicó una radiografía de la mano izquierda, centrada en el segundo metacarpiano, para determinación de masa ósea.

Tabla I. Composición de las fórmulas adaptadas NIDINA 1 y NIDINA 2

CONTENIDO EN VITAMINAS Y ELEMENTOS MINERALES (100 g polvo)					
	NIDINA 1	NIDINA 2		NIDINA 1	NIDINA 2
Vitamina A (U.I.)	1520	1430	Sodio (mg)	120	240
Vitamina D (U.I.)	300	290	Potasio (mg)	460	720
Vitamina E (mg)	6	6	Cloro (mg)	320	540
Vitamina K (µg)	42	39	Calcio (mg)	310	570
Vitamina C (mg)	41	39	Fósforo (mg)	158	440
Vitamina B ₁ (µg)	300	300	Magnesio (mg)	33	52
Vitamina B ₂ (µg)	700	600	Hierro (mg)	6	9
Vitamina PP (mg)	3,8	3,6	Yodo (µg)	26	24
Vitamina B ₆ (µg)	400	400	Cobre (µg)	300	300
Ac. Fólico (µg)	46	43	Zinc (mg)	3,8	3,6
Ac. Pantoténico (mg)	2,3	2,1	Manganeso (µg)	36	34
Vitamina B ₁₂ (µg)	1,1	1,1	Ca/P	2,0	1,3
Biotina (µg)	11	11	K/Na	3,8	3,0
Colina (mg)	38	36	Carga renal (mOsm)	72	108
Inositol (mg)	23	21	Osmolaridad (mOsm)	-	-

Tabla II. Composición de las fórmulas adaptadas NIDINA 1 y NIDINA 2

LIPIDOGRAMA (g/100 g ácidos grasos)					
	NIDINA 1	NIDINA 2		NIDINA 1	NIDINA 2
Ac. Butírico	2,4	2,4	Ac. Esteárico	9,9	9,9
Ac. Caprónico	0,8	0,8	Ac. Palmitoleico	3,6	3,6
Ac. Caprílico	0,8	0,8	Ac. Oleico	32,2	32,2
Ac. Cáprico	2,4	2,4	Ac. Linoleico	13,2	13,2
Ac. Láurico	1,6	1,6	Ac. Linolénico	1,1	1,1
Ac. Mirístico	8,3	8,3	Ac. Araquidónico	0,8	0,8
Ac. Palmítico	22,9	22,9			

AMINOGRAMA (g/100 g polvo)					
	NIDINA 1	NIDINA 2		NIDINA 1	NIDINA 2
Histidina	0,29	0,41	Valina	0,69	1,02
Isoleucina	0,70	0,91	Arginina	0,42	0,53
Leucina	1,25	1,49	Alanina	0,42	0,52
Lisina	1,09	1,32	Ac. Aspártico	1,22	1,21
Metionina	0,25	0,39	Ac. Glutámico	2,47	3,51
Cistina	0,23	0,14	Glicocola	0,21	0,30
Fenilalanina	0,42	0,74	Prolina	0,83	1,76
Tirosina	0,44	0,71	Serina	0,61	0,85
Treonina	0,64	0,67	Taurina	0,04	
Triptófano	0,21	0,25			

Tabla III. Composición de las papillas NESTLE NESTUM (cereales sin gluten) y NESTLE CRECIMIENTO

CONTENIDO EN VITAMINAS Y ELEMENTOS MINERALES (100 g producto)					
	NESTUM	CRECIMIENTO		NESTUM	CRECIMIENTO
Vitamina A (U.I.)	700	700	Magnesio (mg)	40	60
Vitamina D (U.I.)	250	250	Inositol (mg)	10	10
Vitamina E (mg)	5	5	Sodio (mg)	35	30
Vitamina C (mg)	65	65	Potasio (mg)	150	350
Vitamina B ₁ (mg)	0,5	0,5	Cloro (mg)	75	90
Vitamina B ₂ (mg)	0,2	0,2	Calcio (mg)	110	180
Vitamina PP (mg)	8	8	Fósforo (mg)	90	160
Vitamina B ₆ (mg)	0,2	0,2	Hierro (mg)	18,5	18,5
Ac. Fólico (μg)	19	19	Yodo (μg)	10	10
Ac. Pantoténico (mg)	0,5	0,5	Cobre (μg)	400	350
Vitamina B ₁₂ (μg)	0,01	0,01	Zinc (mg)	0,5	1
Biotina (μg)	37	37	Manganeso (μg)	1000	1000

Tabla IV. Composición de las papillas de cereales NESTLE NESTUM (cereales sin gluten) y NESTLE CRECIMIENTO

COMPOSICION DE HIDRATOS DE CARBONO (g/100 g producto)					
	NESTUM	CRECIMIENTO		NESTUM	CRECIMIENTO
Glucosa	19,5	10,9	Lactosa	0	0
Fructosa	0,2	0,2	Dextrinomaltosa	30,4	20,1
Sacarosa	0,6	15,3	Almidón	33,2	31,9
Maltosa	2,8	1,5	Total H. de C.	86,7	79,9

AMINOGRAMA (mg/100 g producto)					
	NESTUM	CRECIMIENTO		NESTUM	CRECIMIENTO
Histidina	160	260	Triptófano	90	140
Isoleucina	290	470	Valina	400	570
Leucina	580	910	Arginina	530	730
Lisina	250	500	Alanina	400	560
Metionina	150	180	Ac. Aspártico	670	1070
Cistina	100	170	Ac. Glutámico	1350	2000
Fenilalanina	340	520	Glicocola	300	450
Tirosina	220	380	Prolina	330	610
Treonina	230	400	Serina	320	540

Tabla V. Composición de los TARRITOS NESTLE "JUNIOR" (200 g)

VITAMINAS Y ELEMENTOS MINERALES (tarro)				
	Pollo con arroz	Menestra de cordero	Menestra de verduras	Postre de 6 frutas
Vitamina A (U.I.)	700	600	1000	300
Vitamina D (U.I.)	80	20	20	40
Vitamina E (mg)	0,4	0,4	0,6	0,8
Vitamina C (mg)	2	4	4	60
Vitamina B ₁ (mg)	0,02	0,02	0,04	0,04
Vitamina B ₂ (mg)	0,2	0,2	0,4	0,4
Vitamina PP (mg)	0,8	1,6	1	0,6
Vitamina B ₆ (mg)	0,1	0,1	0,1	0,2
Pantotenato (mg)	0,4	0,2	0,3	0,1
Vitamina B ₁₂ (µg)	0,8	0,6	0,2	0,8
Sodio (mg)	215	245	215	65
Potasio (mg)	100	210	300	300
Cloro (mg)	660	670	700	40
Calcio (mg)	180	40	40	20
Fósforo (mg)	120	70	400	30
Magnesio (mg)	20	20	20	20
Hierro (mg)	0,6	0,8	0,6	1,4
Cobre (µg)	220	100	130	140
Zinc (mg)	1,2	0,4	0,8	0,4
Manganeso (µg)	120	80	150	240
Fluor (mg)	40	30	100	120

Tabla VI. Composición de los TARRITOS NESTLE "JUNIOR" (200 g)

AMINOGRAMA (mg/tarro)				
	Pollo con arroz	Menestra de cordero	Menestra de verduras	Postre de 6 frutas
Histidina	120	160	80	50
Isoleucina	240	280	150	50
Leucina	400	440	260	90
Lisina	320	440	240	70
Metionina	120	120	40	30
Cistina	60	60	30	20
Fenilalanina	220	240	170	60
Tirosina	180	200	100	40
Treonina	180	260	140	50
Triptófano	60	80	50	20
Valina	280	300	180	70
Arginina	260	400	240	90
Alanina	180	340	170	80
Ac. Aspártico	420	540	450	210
Ac. Glutámico	820	900	530	230
Glicocola	200	300	140	70
Prolina	280	300	140	70
Serina	220	260	180	60

HIDRATOS DE CARBONO (g/tarro)				
	Pollo con arroz	Menestra de cordero	Menestra de verduras	Postre de 6 frutas
Glucosa	0,4	0,2	1	8
Fructosa	0,2	-	1	10
Sacarosa	0,4	-	2	28
Lactosa	0,3	-	-	-
Polisacáridos	12,5	13,4	16,2	6,8
Total H. de C.	13,8	13,6	20,2	52,8

Tabla VII. Composición de los TARRITOS NESTLE "JUNIOR" (250 g)

VITAMINAS Y ELEMENTOS MINERALES (tarro)				
	Pollo con verduras y arroz	Ternera a la jardinera	Menestra de cordero	Postre de 6 frutas
Vitamina A (U.I.)	625	1250	750	380
Vitamina D (U.I.)	50	50	25	50
Vitamina E (mg)	1,3	1,3	0,5	1
Vitamina C (mg)	2,5	6,3	5	75
Vitamina B ₁ (mg)	0,05	0,05	0,03	0,05
Vitamina B ₂ (mg)	1,3	0,2	0,2	0,5
Vitamina PP (mg)	1,3	1,5	2	0,8
Vitamina B ₆ (mg)	0,05	0,2	0,2	0,3
Pantotenato (mg)	1,3	0,3	0,3	0,2
Vitamina B ₁₂ (μg)	0,3	1,3	0,8	1
Sodio (mg)	300	320	305	80
Potasio (mg)	300	300	265	375
Cloro (mg)	225	800	840	50
Calcio (mg)	75	40	50	25
Fósforo (mg)	50	125	90	40
Magnesio (mg)	20	25	25	25
Hierro (mg)	0,8	1	1	1,8
Cobre (μg)	100	100	125	175
Zinc (mg)	2,5	1,8	0,5	0,5
Manganeso (μg)	200	100	100	300
Fluor (mg)	75	40	40	150

Tabla VIII. Composición de los TARRITOS NESTLE "JUNIOR" (250 g)

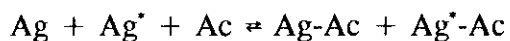
AMINOGRAMA (mg/tarro)				
	Pollo con verduras y arroz	Ternera a la jardinera	Menestra de cordero	Postre de 6 frutas
Histidina	200	250	200	60
Isoleucina	430	370	350	60
Leucina	650	620	550	110
Lisina	580	620	550	90
Metionina	190	200	150	40
Cistina	80	100	70	30
Fenilalanina	380	350	300	80
Tirosina	310	270	250	50
Treonina	330	350	320	60
Triptófano	80	100	100	30
Valina	450	400	370	90
Arginina	440	470	500	110
Alanina	310	420	420	100
Ac. Aspártico	750	720	670	260
Ac. Glutámico	1250	1250	1120	290
Glicocola	380	320	370	90
Prolina	400	350	370	90
Serina	350	320	320	80

HIDRATOS DE CARBONO (g/tarro)

	Pollo con verduras y arroz	Ternera a la jardinera	Menestra de cordero	Postre de 6 frutas
Glucosa	0,3	0,8	0,3	10
Fructosa	0,3	0,8	-	12,5
Sacarosa	0,5	-	-	35
Lactosa	1,5	-	-	-
Polisacáridos	17,4	13,7	16,7	4,7
Total H. de C.	20	15,3	17	62,2

2. DETERMINACION DE HORMONA PARATIROIDEA

Se ha realizado mediante radioinmunoanálisis (135). La técnica se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, en la que dos antígenos (el presente en los sueros problema y el marcado), compiten por los lugares de unión al anticuerpo.



En este método se utilizan dos anticuerpos, uno procedente de cabra dirigido contra el fragmento 44-68 de la hormona paratiroidea (C-terminal/media molécula) y otro de equino unido a polietilenglicol como precipitante (NICHOLS INSTITUTE DIAGNOSTICS. San Juan Capistrano, CA 92675 U.S.A.) (136,137,138,139). Los resultados se expresan en pg/mL.

3 . DETERMINACION DE OSTEOCALCINA

La determinación de osteocalcina sérica se ha realizado mediante un radioinmunoanálisis en fase homogénea, que utiliza un doble anticuerpo (Osteocalcina OSCAtest. HENNING BERLIN GMBH) (140,141,142,143,144).

En este análisis, la osteocalcina presente en el suero compite con un análogo marcado radiactivamente, por los sitios de unión de un anticuerpo específico. El complejo antígeno-anticuerpo se separa de la fracción libre de trazador, mediante una solución de polietilenglicol y un segundo anticuerpo dirigido contra el primero. Después de eliminar el sobrenadante se mide la radiactividad del precipitado. Los resultados se expresan en ng/mL.

4 . METODO DE DETERMINACION DE 25(OH)D

Se ha llevado a cabo mediante un ensayo de fijación competitiva que emplea una proteína ligadora de vitamina D obtenida de suero humano, que presenta una gran afinidad para el 25(OH)D (NICHOLS INSTITUTE DIAGNOSTICS. San Juan Capistrano, CA 92675 U.S.A.) (145,146,147,148).

En este método se realiza una extracción previa mediante alcohol (Etanol:Metanol:Isopropanol 90:5:5) que facilita la separación del 25(OH)D de sustancias interferentes en la determinación (149). A diferencia de otros métodos, no necesita de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la extracción (150,151,152).

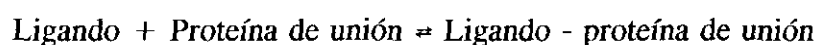
Mediante carbón activo recubierto con dextrano se consigue la separación del 25(OH)D tritiado unido a la proteína ligadora del 25(OH)D libre, determinando la radiactividad en el sobrenadante en ng/mL frente a una curva de calibración.

5. METODO DE DETERMINACION DE 1,25(OH)₂D

La determinación de 1,25(OH)₂D se ha realizado mediante una técnica de unión competitiva que utiliza una proteína ligadora obtenida de timo de ternera (NICHOLS INSTITUTE DIAGNOSTICS. San Juan Capistrano, CA 92675 U.S.A.) (145,153,154).

La técnica consta de tres etapas (Figura 4):

1. **Extracción.** Facilita la eliminación de proteínas y lípidos interferentes.
2. **Purificación.** Mediante cartuchos de Sep-pak C_{18-OH}, permite separar el 1,25(OH)₂D del resto de metabolitos de la vitamina D.
3. **Ensayo de fijación.** Basado en la unión reversible y no covalente de un ligando con una proteína de unión específica.



Tras un periodo de incubación de los estándares de 1,25(OH)₂D no marcados y las muestras con la proteína ligadora, se añade el ligando marcado [³H-25,26-1,25(OH)₂D]. La separación del ³H-25,26-1,25(OH)₂D fijado, y el libre, se realiza mediante carbón recubierto con dextrano y centrifugación. La concentración de 1,25(OH)₂D del suero se determina por comparación de las desintegraciones por minuto del suero del paciente, en relación a la curva estándar. Los resultados se expresan en pg/mL de suero, después de hacer las correcciones del factor de concentración de la muestra y de la recuperación obtenida a través de la columna de cromatografía.

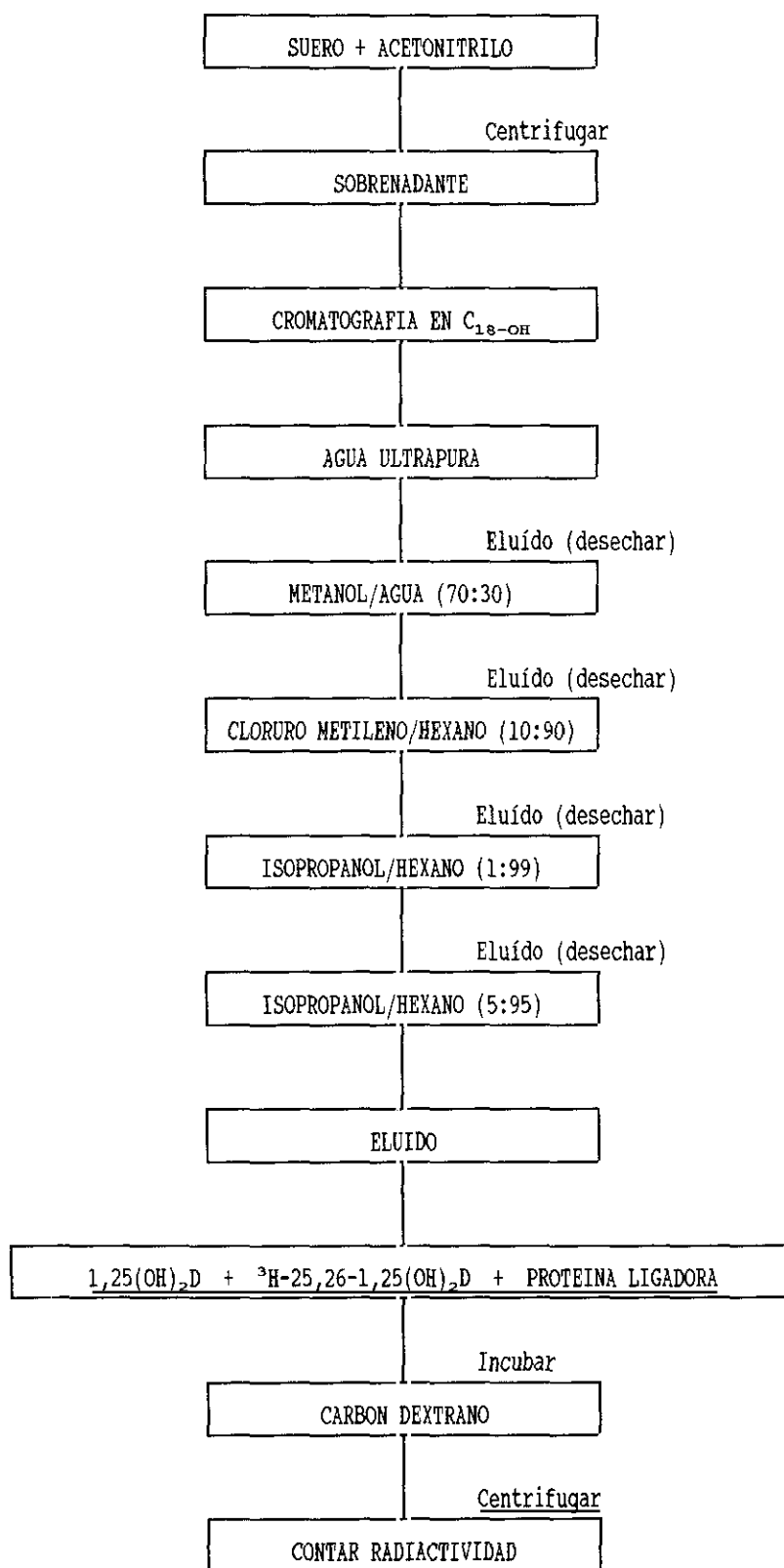


Fig. 4.- Método de determinación de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

Este método tiene la ventaja de precisar un volumen de muestra relativamente pequeño (1mL), en comparación con los métodos que utilizan la HPLC para el proceso de purificación y/o cuantificación del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (155,156). Por ello, la cuantificación de este metabolito mediante proteínas ligadoras, puede ser un método idóneo para el estudio del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en la población infantil (145).

Las determinaciones de PTH, osteocalcina, $25(\text{OH})\text{D}$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica. Sección Hormonas (Dra. L. Larrodera). Hospital "12 de Octubre".

6 . OTRAS DETERMINACIONES ANALITICAS

La determinación de creatinina, proteínas totales y actividad de fosfatasa alcalina en plasma, y la creatinina en orina, se realizaron automáticamente en un analizador multicanal SMAC System (TECHNICON).

La concentración de calcio y fósforo en plasma y orina se determinó en un autoanalizador GENESIS 21 (IZASA).

La determinación de calcio iónico se realizó sobre una muestra de sangre total, recogida en condiciones anaeróbicas, en un aparato de electrodo selectivo ICA2 (RADIOMETER).

Todas las determinaciones se efectuaron el mismo día de la recogida de las muestras, en el Laboratorio de Urgencias del Hospital "12 de Octubre".

7. VALORACION DE MASA OSEA

Para determinar la masa ósea, a los 10 meses de edad, utilizamos la radiogrametría. En una radiografía de la mano centrada en el segundo metacarpiano, se mide la longitud entre ambas epífisis y se halla el punto medio del metacarpiano. Mediante una lupa milimetrada se mide la cortical, y se determina el diámetro diafisario externo (D), y el diámetro diafisario interno (d), calculándose posteriormente el índice de masa ósea del metacarpiano. ($IMO = [(D^2 - d^2) / D^2]$) (157,158,159).

Se realizaron cuatro mediciones para cada diámetro, por el mismo examinador, en cuatro días diferentes, siendo D y d, la media resultante de las cuatro medidas efectuadas.

Se utilizó una lupa de siete aumentos, con una regla milimetrada adaptada (Eschenbach Optik. Germany), con un poder de resolución de 1/10 mm (Figura 5)

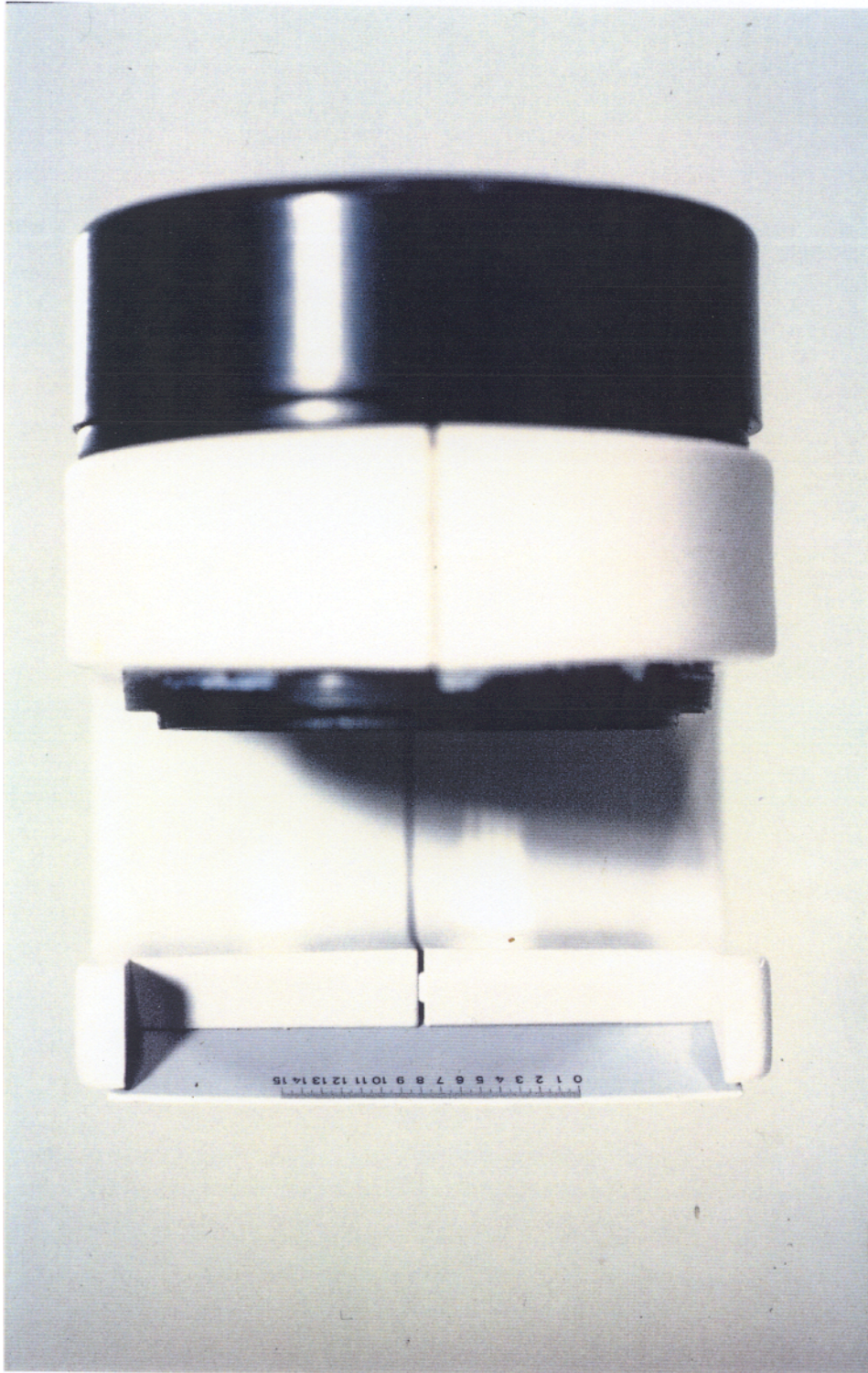


Fig. 5.- Lupa milimetrada de 7 aumentos (Eschenbach Optik)

8 . METODO ESTADISTICO

Para definir la muestra se utilizó la media y la desviación típica. La estimación de la población a partir de la muestra se efectuó mediante el error estándar y posterior corrección con la *t* de Student. Para valorar la homogeneidad de las muestras se realizó el Análisis de la Varianza y posterior comparación mediante la F de Snedecor. Los datos fueron analizados con el programa estadístico RSIGMA BASE DE DATOS BIOESTADISTICA, HORUS HARDWARE S.A., en un ordenador personal (Tandom 386™/25 MHz).

RESULTADOS

1. DESARROLLO SOMATICO

No hubo diferencia de peso, talla o perímetro craneal al nacimiento, entre el grupo de niños nacidos en verano y el grupo de niños nacidos en invierno. (Tablas IX, XI, XIII)

La tasa de crecimiento de peso, talla y perímetro craneal también fue similar en los niños nacidos en verano (Grupo I) y en los niños nacidos en invierno (Grupo II) (Tablas IX, XI, XIII), y no se observaron diferencias respecto a la alimentación (Tablas X, XII, XIV).

Tabla IX.- Evolución del peso en los niños nacidos en verano (Grupo I) y en los niños nacidos en invierno (Grupo II) (gr)

	GRUPO I n=29	GRUPO II n=46	ANOVA
Recién nacido	3258 ± 311	3296 ± 328	NS
3 semanas	3906 ± 347	3941 ± 407	NS
1 ^{1/2} mes	4808 ± 344	4852 ± 448	NS
3 meses	6144 ± 552	6076 ± 578	NS
4 ^{1/2} meses	7135 ± 709	7085 ± 659	NS
6 meses	8002 ± 865	7795 ± 750	NS
7 ^{1/2} meses	8726 ± 956	8389 ± 815	NS
9 meses	9328 ± 1140	8979 ± 808	NS
10 ^{1/2} meses	9849 ± 1151	9533 ± 835	NS

Tabla X.- Evolución del peso en los niños con lactancia materna, lactancia materna con suplementos de vitamina D y fórmula adaptada (gr)

	MATERNA	MAT + D	FORMULA	ANOVA
	n=19	n=23	n=33	
Recién nacido	3352 ± 300	3288 ± 307	3236 ± 340	NS
3 semanas	3997 ± 429	3974 ± 348	3855 ± 377	NS
1 ^{1/2} mes	4877 ± 441	4902 ± 452	4764 ± 357	NS
3 meses	6070 ± 613	6107 ± 615	6118 ± 515	NS
4 ^{1/2} meses	7093 ± 743	7069 ± 713	7136 ± 624	NS
6 meses	7906 ± 912	7802 ± 776	7907 ± 762	NS
7 ^{1/2} meses	8563 ± 1143	8370 ± 772	8598 ± 793	NS
9 meses	9191 ± 1234	8897 ± 734	9220 ± 920	NS
10 ^{1/2} meses	9675 ± 1264	9451 ± 753	9786 ± 926	NS

Tabla XI.- Evolución de la talla en los niños nacidos en verano (grupo I) y en los niños nacidos en invierno (Grupo II) (cm)

	GRUPO I n= 29	GRUPO II n=46	ANOVA
Recién nacido	49,6 ± 1,4	49,4 ± 1,2	NS
3 semanas	52,9 ± 1,9	52,1 ± 1,5	NS
1 ^{1/2} mes	56,3 ± 1,5	55,8 ± 1,5	NS
3 meses	60,7 ± 1,5	59,9 ± 1,6	NS
4 ^{1/2} meses	63,9 ± 1,4	63,8 ± 1,6	NS
6 meses	67,1 ± 1,6	67,1 ± 1,8	NS
7 ^{1/2} meses	69,6 ± 1,8	69,3 ± 2	NS
9 meses	72,1 ± 2,1	71,6 ± 2,1	NS
10 ^{1/2} meses	74,4 ± 2,2	73,7 ± 2,1	NS

Tabla XII.- Evolución de la talla en los niños con lactancia materna, lactancia materna con suplementos de vitamina D y fórmula adaptada (cm)

	MATERNA n=19	MAT + D n=23	FORMULA n=33	ANOVA
Recién nacido	49,4 ± 0,9	49,4 ± 1,3	49,3 ± 1,4	NS
3 semanas	52,7 ± 1,2	52,7 ± 1,7	52,2 ± 1,8	NS
1 ^{1/2} mes	56,2 ± 0,9	56,2 ± 1,8	55,8 ± 1,5	NS
3 meses	60,1 ± 1,4	60,4 ± 1,8	60,1 ± 1,6	NS
4 ^{1/2} meses	63,7 ± 1,3	64,1 ± 1,8	63,8 ± 1,4	NS
6 meses	67,3 ± 1,8	67,1 ± 2	67,1 ± 1,7	NS
7 ^{1/2} meses	69,4 ± 1,9	69,5 ± 2,1	69,5 ± 1,8	NS
9 meses	71,5 ± 2	71,8 ± 2,3	72,1 ± 2	NS
10 ^{1/2} meses	73,6 ± 2	74,1 ± 2,4	74,2 ± 2	NS

Tabla XIII.- Evolución del perímetro craneal en los niños nacidos en verano (Grupo I) y en los niños nacidos en invierno (Grupo II) (cm)

	GRUPO I n=29	GRUPO II n=46	ANOVA
Recién nacido	34,7 ± 0,8	34,7 ± 0,8	NS
3 semanas	36,5 ± 1	36,7 ± 0,8	NS
1 ^{1/2} meses	38,6 ± 0,8	38,7 ± 0,8	NS
3 meses	41,1 ± 0,9	41,1 ± 0,9	NS
4 ^{1/2} meses	42,7 ± 0,9	42,7 ± 0,9	NS
6 meses	44,1 ± 1	43,9 ± 0,8	NS
7 ^{1/2} meses	45,1 ± 1	44,9 ± 0,8	NS
9 meses	45,9 ± 0,9	45,7 ± 0,8	NS
10 ^{1/2} meses	46,5 ± 1	46,5 ± 0,9	NS

Tabla XIV.- Evolución del perímetro craneal en los niños con lactancia materna, lactancia materna con suplementos de vitamina D y fórmula adaptada (cm)

	MATERNA n=19	MAT + D n=23	FORMULA n=33	ANOVA
Recién nacido	34,9 ± 0,7	34,8 ± 0,8	34,5 ± 0,8	NS
3 semanas	36,8 ± 0,6	36,8 ± 0,8	36,4 ± 1,1	NS
1 ^{1/2} mes	38,7 ± 0,6	38,8 ± 0,8	38,5 ± 0,9	NS
3 meses	40,8 ± 0,7	41,2 ± 0,8	41,1 ± 1	NS
4 ^{1/2} meses	42,5 ± 0,6	43,1 ± 1	42,6 ± 0,8	NS
6 meses	43,7 ± 0,7	44,3 ± 0,9	43,9 ± 0,9	NS
7 ^{1/2} meses	44,7 ± 0,8	45,3 ± 1	44,9 ± 0,9	NS
9 meses	45,5 ± 0,7	46,1 ± 0,9	45,7 ± 0,9	NS
10 ^{1/2} meses	46,2 ± 0,8	46,8 ± 1	46,4 ± 0,8	NS

2 . NIVEL SANGUINEO DE CALCIO IONICO

A las 3 semanas, los niños nacidos en verano (Grupo I) tuvieron unos niveles sanguíneos de calcio iónico inferiores a los niños nacidos en invierno (Grupo II); sin embargo, a los 9 meses, la concentración de calcio iónico en sangre en el grupo de niños nacidos en verano, fue superior a la del grupo de niños nacidos en invierno ($p < 0,01$) (Tabla XV).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de calcio iónico en sangre, entre los niños alimentados con lactancia materna exclusiva, los niños alimentados con lactancia materna con suplementos de vitamina D, y los niños alimentados con fórmula adaptada, a los 3, 6 y 9 meses; pero a las 3 semanas, los niños que recibían fórmula adaptada tuvieron unos niveles sanguíneos de calcio iónico menores que los niños que recibían lactancia materna (Tabla XVI).

Tabla XV.- Nivel sanguíneo de calcio iónico en los niños nacidos en verano (Grupo I) y en los niños nacidos en invierno (GrupoII) (mmol/L)

	GRUPO I n=29	GRUPO II n=46	ANOVA
3 semanas	1,28 ± 0,05	1.31 ± 0,04	p<0,01
3 meses	1,30 ± 0,02	1,30 ± 0,02	NS
6 meses	1,30 ± 0,04	1,30 ± 0,04	NS
9 meses	1,30 ± 0,03	1,24 ± 0,03	p<0,01

Tabla XVI.- Nivel sanguíneo de calcio iónico en los niños con lactancia materna, lactancia materna con suplementos de vitamina D y fórmula adaptada (mmol/L)

	MATERNA n=19	MAT + D n=23	FORMULA n=33	ANOVA
3 semanas	1,31 ± 0,03 [†]	1,31 ± 0,03 [‡]	1,29 ± 0,04 ^{†‡}	^{†‡} p<0,01
3 meses	1,31 ± 0,03	1,30 ± 0,02	1,30 ± 0,02	NS
6 meses	1,29 ± 0,04	1,29 ± 0,03	1,32 ± 0,04	NS
9 meses	1,25 ± 0,04	1,25 ± 0,05	1,28 ± 0,04	NS

3 . CONCENTRACION SERICA DE CALCIO

Los niveles séricos de calcio fueron significativamente menores en el grupo de niños nacidos en verano, que en el grupo de niños nacidos en invierno a las 3 semanas, 6 meses y 9 meses ($p < 0,01$) (Tabla XVII).

En relación con la alimentación, no observamos diferencias significativas en ninguno de los tres grupos (Tabla XVIII).

Tabla XVII.- Concentración sérica de calcio en los niños nacidos en verano (Grupo I) y en los niños nacidos en invierno (Grupo II) (mmol/L)

	GRUPO I n=29	GRUPO II n=46	ANOVA
3 semanas	$2,57 \pm 0,15$	$2,70 \pm 0,12$	$p < 0,01$
3 meses	$2,55 \pm 0,07$	$2,57 \pm 0,15$	NS
6 meses	$2,55 \pm 0,12$	$2,72 \pm 0,12$	$p < 0,01$
9 meses	$2,57 \pm 0,12$	$2,70 \pm 0,12$	$p < 0,01$

Tabla XVIII.- Concentración sérica de calcio en los niños alimentados con lactancia materna, lactancia materna con suplementos de vitamina D y fórmula adaptada (mmol/L)

	MATERNA n=19	MAT + D n=23	FORMULA n=33	ANOVA
3 semanas	2,67 ± 0,17	2,65 ± 0,12	2,65 ± 0,17	NS
3 meses	2,52 ± 0,12	2,55 ± 0,12	2,60 ± 0,15	NS
6 meses	2,67 ± 0,15	2,70 ± 0,15	2,62 ± 0,12	NS
9 meses	2,67 ± 0,10	2,62 ± 0,12	2,65 ± 0,12	NS

4 . CONCENTRACION SERICA DE FOSFORO

A las 3 semanas, los niveles séricos de fósforo en los niños nacidos en verano (Grupo I) fueron superiores que los de los niños nacidos en invierno (Grupo II) ($p < 0,01$), no observándose diferencias significativas a los 3, 6 y 9 meses (Tabla XIX).

Respecto a la alimentación, los niños alimentados con lactancia materna exclusiva, tuvieron una concentración sérica de fósforo, menor que los niños alimentados con lactancia materna con suplementos de vitamina D y los niños alimentados con fórmula adaptada a los 3 meses ($p < 0,05$), y a los 6 meses ($p < 0,01$) (Tabla XX).

Tabla XIX.- Concentración sérica de fósforo en los niños nacidos en verano (Grupo I) y en los niños nacidos en invierno (Grupo II) (mmol/L)

	GRUPO I n=29	GRUPO II n=46	ANOVA
3 semanas	$2,45 \pm 0,13$	$2,29 \pm 0,13$	$p < 0,01$
3 meses	$2,16 \pm 0,16$	$2,09 \pm 0,13$	NS
6 meses	$1,97 \pm 0,13$	$1,97 \pm 0,13$	NS
9 meses	$1,90 \pm 0,13$	$1,93 \pm 0,16$	NS

Tabla XX.- Concentración sérica de fósforo en los niños alimentados con lactancia materna, lactancia materna con suplementos de vitamina D y fórmula adaptada (mmol/L)

	MATERNA n=19	MAT + D n=23	FORMULA n=33	ANOVA
3 semanas	2,32 ± 0,19	2,35 ± 0,16	2,35 ± 0,10	NS
3 meses	2,00 ± 0,16 [†]	2,13 ± 0,16 [‡]	2,13 ± 0,13 [†]	[†] p<0,05
6 meses	1,90 ± 0,13 [§]	2,00 ± 0,13 [§]	2,00 ± 0,10 [‡]	[§] p<0,01
9 meses	1,90 ± 0,16	1,93 ± 0,13	1,93 ± 0,13	NS

5. CONCENTRACION SERICA DE FOSFATASA ALCALINA

No hubo diferencias significativas en los niveles de fosfatasa alcalina, entre los niños nacidos en verano (Grupo I) y los niños nacidos en invierno (Grupo II) (Tabla XXI).

La concentración sérica de fosfatasa alcalina fue similar en los niños alimentados con lactancia materna exclusiva, los niños alimentados con lactancia materna con suplementos de vitamina D y los niños alimentados con fórmula adaptada (Tabla XXII).

Tabla XXI.- Concentración sérica de fosfatasa alcalina en los niños nacidos en verano (Grupo I) y en los niños nacidos en invierno (Grupo II) (U/L)

	GRUPO I n=29	GRUPO II n=46	ANOVA
3 semanas	331 ± 71	313 ± 90	NS
3 meses	325 ± 80	315 ± 76	NS
6 meses	312 ± 70	275 ± 95	NS
9 meses	282 ± 78	318 ± 87	NS

Tabla XXII.- Concentración sérica de fosfatasa alcalina en los niños alimentados con lactancia materna, lactancia materna con suplementos de vitamina D y fórmula adaptada (U/L)

	MATERNA n=19	MAT + D n=23	FORMULA n=33	ANOVA
3 semanas	323 ± 72	320 ± 84	319 ± 91	NS
3 meses	333 ± 85	299 ± 73	324 ± 75	NS
6 meses	279 ± 114	273 ± 95	307 ± 61	NS
9 meses	303 ± 109	312 ± 94	300 ± 66	NS

La actividad enzimática de la fosfatasa alcalina en la población total tiende a disminuir de las 3 semanas a los 9 meses, objetivándose un descenso significativo de los 3 a los 6 meses ($p < 0,05$) (Figura 6).

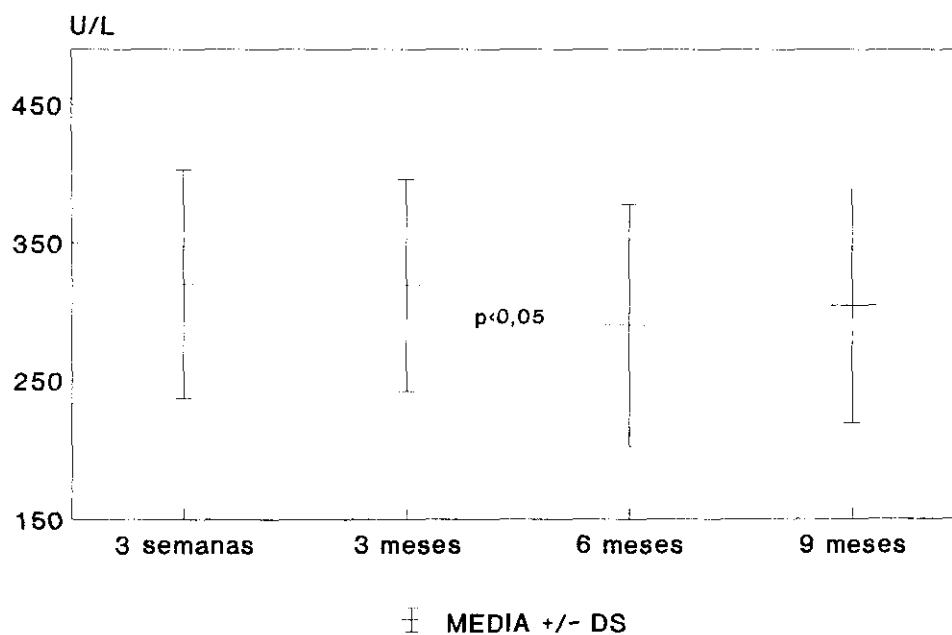


Fig. 6.- Evolución de la concentración sérica de la fosfatasa alcalina en la población total de las 3 semanas a los 9 meses

6. CALCIO/CREATININA EN ORINA

El cociente calcio/creatinina en orina fue similar entre el grupo de niños nacidos en verano y el grupo de niños nacidos en invierno (Tabla XXIII).

No hubo diferencias significativas en el cociente de calcio/creatinina en orina, respecto a la alimentación, en ninguno de los tres grupos (Tabla XXIV).

Tabla XXIII.- Calcio/creatinina en orina en los niños nacidos en verano (Grupo I) y en los niños nacidos en invierno (Grupo II)

	GRUPO I n=29	GRUPO II n=46	ANOVA
3 semanas	0,46 ± 0,27	0,44 ± 0,32	NS
3 meses	0,43 ± 0,26	0,48 ± 0,28	NS
6 meses	0,31 ± 0,16	0,31 ± 0,21	NS
9 meses	0,15 ± 0,11	0,11 ± 0,08	NS

Tabla XXIV.- Calcio/creatinina en orina en los niños alimentados con lactancia materna, lactancia materna con suplementos de vitamina D y fórmula adaptada

	MATERNA n=19	MAT + D n=23	FORMULA n=33	ANOVA
3 semanas	0,40 ± 0,34	0,40 ± 0,31	0,51 ± 0,27	NS
3 meses	0,40 ± 0,27	0,47 ± 0,27	0,49 ± 0,29	NS
6 meses	0,30 ± 0,18	0,33 ± 0,23	0,30 ± 0,17	NS
9 meses	0,12 ± 0,11	0,13 ± 0,07	0,13 ± 0,11	NS

7. FOSFORO/CREATININA EN ORINA

El cociente fósforo/creatinina en orina fue significativamente menor en los niños nacidos en invierno (Grupo II) a las 3 semanas ($p < 0,01$), 3 meses ($p < 0,01$) y 6 meses ($p < 0,01$) (Tabla XXV).

Los niños alimentados con lactancia materna exclusiva y los niños alimentados con lactancia materna con suplementos de vitamina D, tuvieron a las 3 semanas, un cociente fósforo/creatinina en orina menor que los niños alimentados con fórmula adaptada ($p < 0,01$) (Tabla XXVI).

A los 3 meses, en los niños alimentados con lactancia materna exclusiva, el cociente fósforo/creatinina en orina fue inferior que en los que tomaban suplementos de vitamina D y fórmula adaptada ($p < 0,01$); también observamos diferencias significativas entre los alimentados con lactancia materna que recibían suplementos de vitamina D y los que tomaban fórmula adaptada ($p < 0,01$) (Tabla XXVI).

A los 6 meses, el cociente fósforo/creatinina en orina fue significativamente menor en los niños alimentados con lactancia materna exclusiva, que en los que recibían lactancia materna más suplementos de vitamina D y fórmula adaptada ($p < 0,01$) (Tabla XXVI).

Tabla XXV.- Fósforo/creatinina en orina en los niños nacidos en verano (Grupo I) y en los niños nacidos en invierno (Grupo II)

	GRUPO I n=29	GRUPO II n=46	ANOVA
3 semanas	1,08 ± 0,77	0,57 ± 0,56	p<0,01
3 meses	0,84 ± 0,67	0,48 ± 0,35	p<0,01
6 meses	0,47 ± 0,33	0,34 ± 0,18	p<0,01
9 meses	0,37 ± 0,15	0,38 ± 0,25	NS

Tabla XXVI.- Fósforo/creatinina en orina en los niños alimentados con lactancia materna, lactancia materna con suplemento de vitamina D y fórmula adaptada

	MATERNA n=19	MAT + D n=23	FORMULA n=33	ANOVA
3 semanas	0,53 ± 0,51 [†]	0,53 ± 0,51 [†]	1,10 ± 0,73 [†]	[†] p<0,01
3 meses	0,32 ± 0,30 ^{††}	0,53 ± 0,67 ^{†§}	0,88 ± 0,42 ^{†§}	^{††§} p<0,01
6 meses	0,29 ± 0,15 [†]	0,42 ± 0,30 [§]	0,42 ± 0,26 ^{†§}	^{†§} p<0,01
9 meses	0,42 ± 0,21	0,39 ± 0,27	0,34 ± 0,17	NS

En la población global, la relación fósforo/creatinina en orina disminuye paulatinamente de las 3 semanas a los 9 meses, siendo significativo este descenso de los 3 a los 6 meses ($p < 0,001$) (Figura 7).

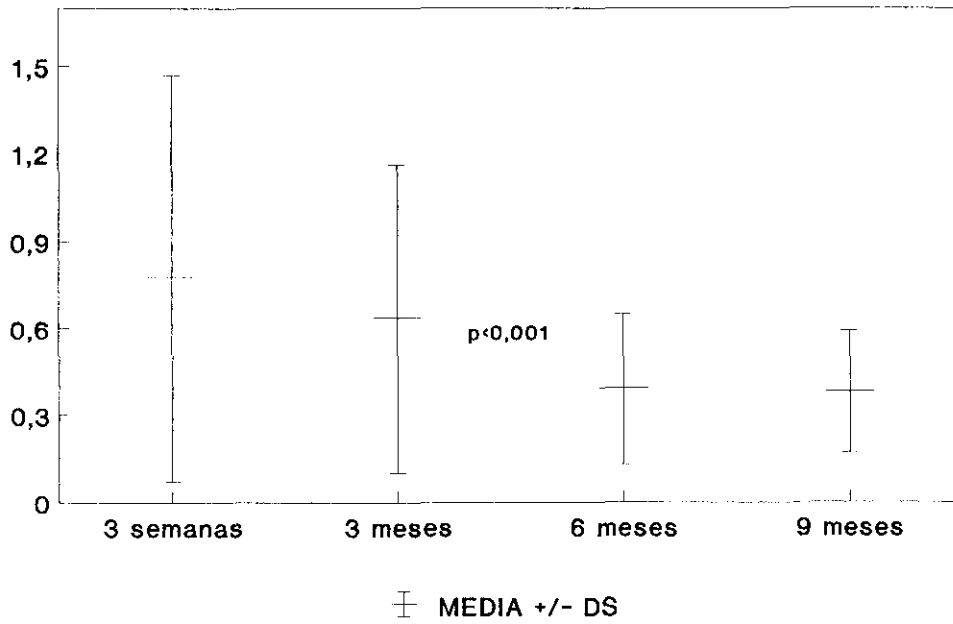


Fig. 7.- Evolución de la relación fósforo/creatinina en orina en la población total de las 3 semanas a los 9 meses

8 . CONCENTRACION SERICA DE HORMONA PARATIROIDEA

Los niños nacidos en verano (Grupo I), tuvieron una concentración sérica de hormona paratiroidea superior a la de los niños nacidos en invierno (Grupo II), a las 3 semanas ($p < 0,01$), y a los 6 meses ($p < 0,01$) (Tabla XXVII).

La concentración sérica de hormona paratiroidea a los 9 meses, fue menor en los niños alimentados con fórmula adaptada que en los niños alimentados con lactancia materna exclusiva y en los niños alimentados con lactancia materna con suplementos de vitamina D ($p < 0,01$); así mismo, dicha concentración fue significativamente menor, en los niños que tomaban lactancia materna exclusiva, respecto a los niños que tomaban lactancia materna con suplementos de vitamina D ($p < 0,05$) (Tabla XXVIII)

Tabla XXVII.- Concentración sérica de hormona paratiroidea en los niños nacidos en verano (Grupo I) y en los niños nacidos en invierno (Grupo II) (pg/mL)

	GRUPO I n=29	GRUPO II n=46	ANOVA
3 semanas	212,5 ± 47,1	173,4 ± 57,2	p<0,01
3 meses	163,6 ± 32,3	177,3 ± 39,3	NS
6 meses	181,8 ± 47,7	156,7 ± 25,1	p<0,01
9 meses	152,9 ± 36,5	147,5 ± 41,3	NS

Tabla XXVIII.- Concentración sérica de hormona paratiroidea en los niños alimentados con lactancia materna, lactancia materna con suplementos de vitamina D y fórmula adaptada (pg/mL)

	MATERNA n=19	MAT + D n=23	FORMULA n=33	ANOVA
3 semanas	175,8 ± 48,9	202,4 ± 75,3	186,5 ± 43,1	NS
3 meses	184,8 ± 47,1	168,6 ± 35,3	167,1 ± 30,9	NS
6 meses	154,2 ± 27,6	171,5 ± 33,3	170,2 ± 44,1	NS
9 meses	154,2 ± 39,1 [†]	164,4 ± 38,9 [§]	137,4 ± 36,9 [§]	[†] p<0,05 [§] p<0,01

Los niveles séricos de PTH en el total de la población estudiada, disminuyen progresivamente de las 3 semanas a los 9 meses; siendo significativo este descenso entre las 3 semanas y los 3 meses ($p < 0,05$) y entre los 6 y 9 meses de vida ($p < 0,01$) (Figura 8).

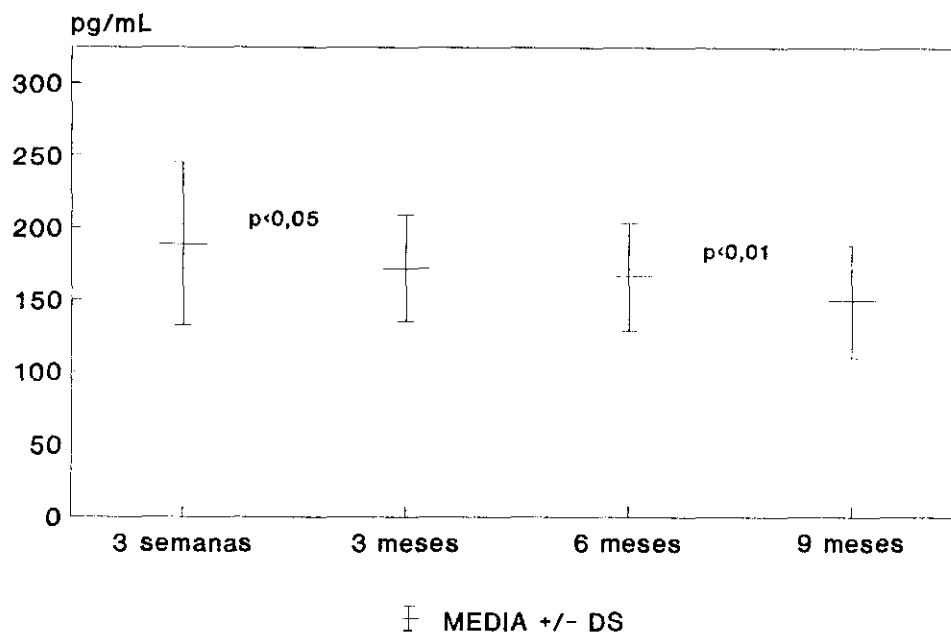


Fig. 8.- Evolución de la concentración sérica de hormona paratiroidea en la población total de las 3 semanas a los 9 meses

9. CONCENTRACION SERICA DE OSTEOCALCINA

Observamos diferencias significativas a las 3 semanas y a los 9 meses ($p < 0,01$) entre el Grupo I y el Grupo II (Tabla XXIX).

Dependiendo del tipo de alimentación hubo diferencias significativas entre los niños alimentados con lactancia materna exclusiva respecto a los que recibieron lactancia materna más suplementos de vitamina D y los alimentados con fórmula adaptada ($p < 0,01$) (Tabla XXX).

Tabla XXIX.- Niveles séricos de osteocalcina en los niños nacidos en verano (Grupo I) y los niños nacidos en invierno (Grupo II)(ng/mL)

	GRUPO I n=29	GRUPO II n=46	ANOVA
3 semanas	15,4 ± 4,6	23,8 ± 11,3	p<0,01
3 meses	28,6 ± 12,8	33,4 ± 15,8	NS
6 meses	28,8 ± 9	28,1 ± 8,9	NS
9 meses	26,6 ± 11,2	20,2 ± 9,4	p<0,01

Tabla XXX.- Niveles séricos de osteocalcina en los niños alimentados con lactancia materna, lactancia materna con suplementos de vitamina D y fórmula adaptada (ng/mL)

	MATERNA n=19	MAT + D n=23	FORMULA n=33	ANOVA
3 semanas	20,1 ± 3,6	21,3 ± 14,2	20,6 ± 9,7	NS
3 meses	38,8 ± 20,4 ^{†§}	30,2 ± 14,4 [†]	28,4 ± 9,5 [§]	^{†§} p<0,01
6 meses	28,1 ± 10,3	27,3 ± 8,4	29,4 ± 8,4	NS
9 meses	22,2 ± 10,4	19,6 ± 8,8	24,9 ± 11,4	NS

La concentración sérica de osteocalcina en la población global estudiada, muestra un incremento significativo de las 3 semanas a los 3 meses ($p < 0,001$), así como un descenso, también significativo, de los 6 a los 9 mese de edad ($p < 0,001$) (Figura 9).

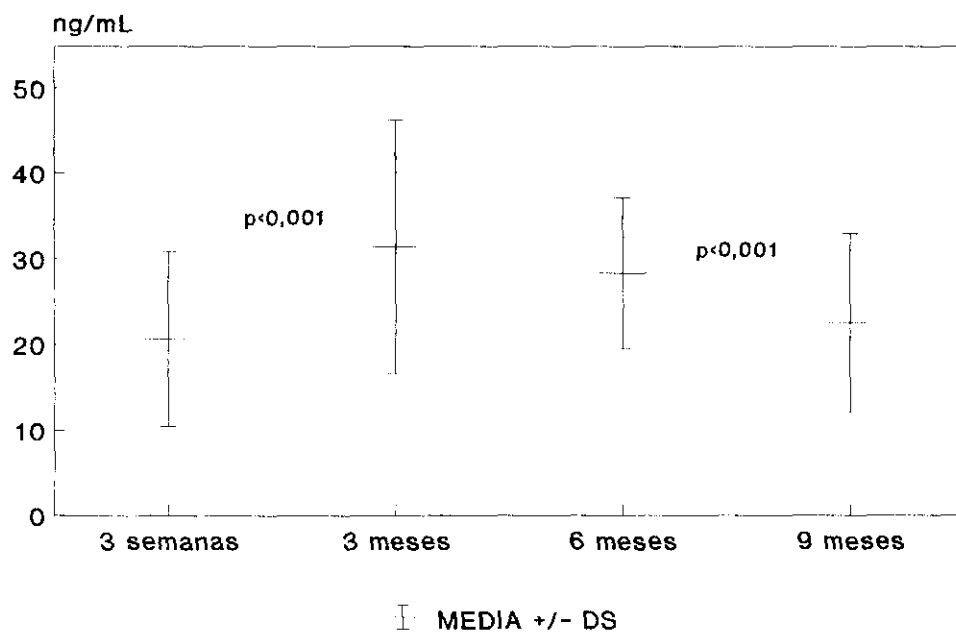


Fig. 9.- Evolución de la concentración sérica de osteocalcina en la población total de las 3 semanas a los 9 meses

10. CONCENTRACION SERICA DE 25(OH)D

La concentración sérica de 25(OH)D a las 3 semanas fue significativamente mayor en los niños nacidos en verano (Grupo I) que en los niños nacidos en invierno (Grupo II) ($p < 0,01$); sin embargo, a los 6 y 9 meses los niveles séricos de 25(OH)D de los niños del Grupo I, fueron menores que los de los niños del Grupo II ($p < 0,01$). No hubo diferencias significativas a los 3 meses (Tabla XXXI).

A las 3 semanas, los niños alimentados con lactancia materna exclusiva y los alimentados con lactancia materna más suplementos de vitamina D, tuvieron una concentración sérica de 25(OH)D menor que los niños alimentados con fórmula adaptada ($p < 0,01$) (Tabla XXXII).

A los 3 meses, los niveles séricos de 25(OH)D de los niños con lactancia materna exclusiva, fueron inferiores que los de los niños con lactancia materna más suplementos de vitamina D y fórmula adaptada ($p < 0,01$); sin embargo a los 6 y 9 meses no observamos diferencias significativas (Tabla XXXII).

Tabla XXXI.- Niveles séricos de 25(OH)D en los niños nacidos en verano (Grupo I) y en los niños nacidos en invierno (Grupo II)

	GRUPO I n=29	GRUPO II n=46	ANOVA
3 semanas	30,2 ± 11,5	17,1 ± 8,0	p<0,01
3 meses	33,9 ± 11	32,2 ± 10,4	NS
6 meses	32,8 ± 10,1	52,8 ± 16,3	p<0,01
9 meses	33,2 ± 10,1	49,4 ± 13,8	p<0,01

Tabla XXXII.- Niveles séricos de 25(OH)D en los niños alimentados con lactancia materna, lactancia materna más suplementos de vitamina D y fórmula adaptada

	MATERNA n=19	MAT + D n=23	FORMULA n=33	ANOVA
3 semanas	17,3 ± 8,6 [†]	17,5 ± 9,1 [§]	26,5 ± 12,4 ^{†§}	^{†§} p<0,01
3 meses	24,9 ± 8,9 ^{††}	36,4 ± 11,7 [†]	35,0 ± 10,0 [†]	^{††} p<0,01
6 meses	40,3 ± 16,7	49,0 ± 17,1	45,2 ± 17,3	NS
9 meses	47,7 ± 14,3	41,0 ± 13,0	42,0 ± 15,9	NS

En el grupo de niños nacidos en invierno, encontramos un incremento significativo de la concentración sérica de 25(OH)D de las 3 semanas a los 3 meses ($p < 0,001$), y de los 3 meses a los 6 meses ($p < 0,001$); no hubo diferencias de los 6 a los 9 meses. Por el contrario, los niños nacidos en verano, tuvieron unos niveles séricos de 25(OH)D similares en todas las determinaciones (Figura 10)

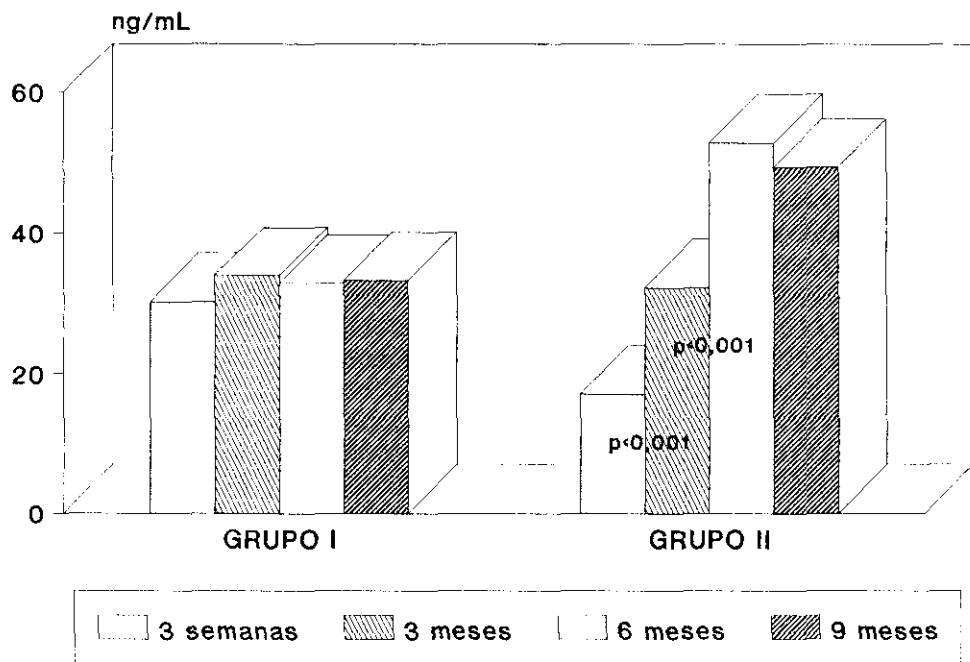


Fig. 10.- Evolución de la concentración sérica de 25(OH)D en los niños nacidos en verano (Grupo I) y en los niños nacidos en invierno (Grupo II)

11. CONCENTRACION SERICA DE 1,25(OH)₂D

No hubo diferencias significativas en los niveles séricos de 1,25(OH)₂D a las 3 semanas, ni a los 3 meses, entre los niños nacidos en verano (Grupo I) y los niños nacidos en invierno (Grupo II); sin embargo a los 6 y 9 meses, los niños del Grupo II tuvieron niveles séricos de 1,25(OH)₂D mayores que los del Grupo I ($p < 0,01$) (Tabla XXXIII).

La concentración sérica de 1,25(OH)₂D a las 3 semanas, 3 meses, 6 meses y 9 meses fue similar en los niños con lactancia materna exclusiva, lactancia materna con suplementos de vitamina D y fórmula adaptada (Tabla XXXIV).

Tabla XXXIII.- Niveles séricos de 1,25(OH)₂D en los niños nacidos en verano (Grupo I) y en los niños nacidos en invierno (Grupo II)

	GRUPO I n=29	GRUPO II n=46	ANOVA
3 semanas	43,3 ± 17,5	43,0 ± 14,8	NS
3 meses	58,6 ± 10,8	61,8 ± 14,2	NS
6 meses	58,4 ± 15,4	72,2 ± 16,8	p<0,01
9 meses	54,5 ± 10,9	79,4 ± 15,6	p<0,01

Tabla XXXIV.- Niveles séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en los niños alimentados con lactancia materna, lactancia materna más suplementos de vitamina D y fórmula adaptada

	MATERNA n=19	MAT + D n=23	FORMULA n=33	ANOVA
3 semanas	42,1 ± 16,4	41,8 ± 15,8	44,6 ± 15,7	NS
3 meses	56,0 ± 14,7	62,4 ± 14,0	61,9 ± 16,0	NS
6 meses	64,8 ± 17,8	69,4 ± 16,2	66,3 ± 18,6	NS
9 meses	75,2 ± 17,3	68,9 ± 17,6	67,3 ± 19,6	NS

Hemos observado un incremento significativo de los niveles séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, en los niños nacidos en invierno (Grupo II), de las 3 semanas a los 3 meses ($p < 0,001$), de los 3 a los 6 meses ($p < 0,001$), y de los 6 a los 9 meses ($p < 0,001$); sin embargo en el grupo de niños nacidos en verano sólo hubo diferencias estadísticamente significativas de las 3 semanas a los 3 meses, manteniéndose estable la concentración sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ de los 3 a los 9 meses. (Figura 11).

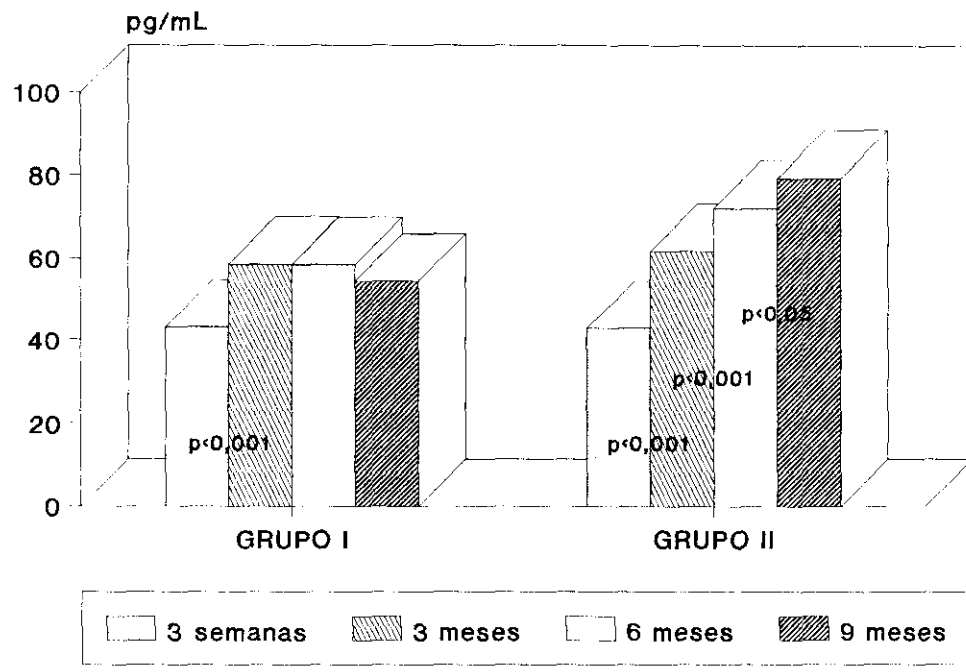


Fig. 11.- Niveles séricos de $1,25(OH)_2D$ en los niños nacidos en verano (Grupo I) y en los niños nacidos en invierno (Grupo II)

12. MASA OSEA

No hubo diferencias de masa ósea entre los niños nacidos en verano (Grupo I) y los nacidos en invierno (Grupo II) (Tabla XXXV), ni tampoco entre los niños alimentados con lactancia materna exclusiva, los niños alimentados con lactancia materna con suplementos de vitamina D y los niños alimentados con fórmula adaptada (Tabla XXXVI).

Tabla XXXV.- Índice de masa ósea en los niños nacidos en verano (Grupo I) y en los niños nacidos en invierno (Grupo II) [$IMO = (D^2 - d^2) / D^2$]

GRUPO I n=29	GRUPO II n=46	ANOVA
0,448 ± 0,062	0,450 ± 0,057	NS

Tabla XXXVI.- Índice de masa ósea en los niños alimentados con lactancia materna exclusiva, lactancia materna con suplementos de vitamina D y fórmula adaptada [$IMO = (D^2 - d^2) / D^2$]

MAT n=19	MAT + D n=23	FORMULA n=33	ANOVA
0,441 ± 0,048	0,449 ± 0,049	0,453 ± 0,070	NS

DISCUSSION

1 . DESARROLLO SOMATICO

Al igual que en otros trabajos publicados al respecto (88,90), no hemos visto diferencias en la evolución del peso, la talla o el perímetro craneal entre los niños alimentados con lactancia materna exclusiva, lactancia materna con suplementos de vitamina D y fórmula adaptada (Tablas X, XII, XIV), ni tampoco respecto a la estación en que nacieron dichos niños (Tablas IX, XI, XIII).

2. NIVEL SANGUINEO DE CALCIO IONICO

Aunque en otros trabajos no se han demostrado diferencias estacionales en la concentración de calcio iónico (89,160), nosotros hemos observado, que los niños nacidos en invierno (Grupo II), tienen unos niveles séricos de calcio iónico a las 3 semanas de edad, más altos que los niños nacidos en verano (Grupo I) ($p < 0,01$) (Tabla XV). Estos niveles podrían estar en relación con la concentración de calcio total que presentan ambos grupos (Tabla XVII).

También hemos visto, que a los 9 meses, los niños nacidos en invierno tienen unos niveles séricos menores que los niños nacidos en verano ($p < 0,01$) (Tabla XV). Pensamos que este descenso de la concentración sérica de calcio iónico, podría ser una respuesta al aumento mantenido de la concentración de calcio total que presentan los niños del Grupo II (Tabla XVII), en relación con la elevación progresiva de los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Figura 11).

Además, si observamos la Tabla XXIX, podemos ver como los niños nacidos en invierno (Grupo II), a los 9 meses de edad tienen unos niveles séricos de osteocalcina menores que los niños nacidos en verano (Grupo I) ($p < 0,01$), lo que estaría indicando que estos niños del Grupo II tienen una menor remodelación ósea y apoyaría el hecho anteriormente comentado.

En relación con la alimentación, hemos visto que a las 3 semanas de vida, los niños con fórmula adaptada tienen una concentración sérica de calcio iónico menor que los

niños con lactancia materna (Tabla XVI). Este hallazgo corrobora la observación de otros autores (161), que piensan que este hecho podría ser un factor desencadenante de hipocalcemia neonatal tardía.

3 . CONCENTRACION SERICA DE CALCIO

En otros trabajos no se refieren diferencias con la estación ni con la alimentación en la concentración sérica de calcio (130,162), nosotros tampoco hemos observado diferencias respecto a la alimentación, pero sí estacionales.

Los niños nacidos en invierno (Grupo II), a las 3 semanas de vida, tienen unos niveles séricos de calcio significativamente más altos que los niños nacidos en verano (Grupo I) ($p < 0,01$), que se correlaciona con que también presentan una concentración sérica de fósforo más baja (Tabla XIX).

Pensamos que la diferente concentración sérica de calcio observada a las 3 semanas entre los niños del Grupo I y los niños del Grupo II (Tabla XVII), pudiera estar relacionada, como comentaremos posteriormente, con la presencia plasmática de Péptidos relacionados con la PTH (PrPTH) en los niños nacidos en invierno.

En cambio, el incremento de la concentración sérica de calcio en los niños nacidos en invierno, respecto a los niños nacidos en verano, a los 6 y 9 meses de vida ($p < 0,01$), creemos que podría deberse a los mayores niveles séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ que presentan los niños del Grupo II a estas edades (Tabla XXIII).

4 . CONCENTRACION SERICA DE FOSFORO

Al igual que otros autores (160), hemos observado que los niños alimentados con formula adaptada, y con lactancia materna que reciben suplementos de vitamina D, mantienen una concentración sérica de fósforo más alta que los niños alimentados con lactancia materna exclusiva a los 3 y 6 meses de vida (Tabla XX).

Tambien hemos encontrado otra diferencia, y es que los niños nacidos en invierno (Grupo II), a las 3 semanas de vida, tienen unos niveles plasmáticos de fósforo significativamente más bajos que los niños nacidos en verano (Grupo I) ($p < 0,01$) (Tabla XIX).

Pensamos que esta "hipofosforemia relativa", desplazaría la relación $25(\text{OH})\text{D} \rightarrow 1,25(\text{OH})_2\text{D}$, estimulando la 1α -hidroxilasa renal, cuya actividad aumenta cuanto más baja sea la concentración sérica de fósforo, consiguiendo que los niños nacidos en invierno, a las 3 semanas de vida, mantengan unos niveles séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ similares a los niños nacidos en verano.

5 . CONCENTRACION SERICA DE FOSFATASA ALCALINA

No hemos observado diferencias significativas en los niveles séricos de fosfatasa alcalina, respecto a la estación en que nacieron los niños, ni en relación con la alimentación (Tablas XXI, XXII), hecho que concuerda con la opinión de otros autores (89,162).

Valorando la concentración sérica de fosfatasa alcalina de todo el grupo estudiado (Figura 6), podemos ver como ésta va disminuyendo de las 3 semanas a los 9 meses de vida, siendo significativo este descenso de los 3 meses a los 6 meses. Este hecho sugeriría, que los niños no se encontraron evolutivamente en situación de osteopenia bioquímica.

6 . CALCIO/CREATININA EN ORINA

No hemos encontrado diferencias significativas en la excreción de calcio por la orina, entre los niños con lactancia materna exclusiva, lactancia materna con suplementos de vitamina D y fórmula adaptada, ni tampoco respecto a la estación (Tablas XXIII, XXIV).

Sin embargo, Hillman y cols. refieren que los niños con lactancia materna con suplementos de vitamina D tienen una mayor excreción urinaria de calcio que los niños con fórmula adaptada, que la atribuyen a la mejor absorción del calcio de la leche materna (162).

7. FOSFORO/CREATININA EN ORINA

Hemos observado que los niños nacidos en invierno (Grupo II) tienen una eliminación de fósforo por orina menor que los niños nacidos en verano (Grupo I).

No podemos comparar nuestros resultados con otros trabajos de la literatura, ya que no hemos encontrado ningún estudio que haya realizado grupos estacionales para valorar la excreción de fósforo en orina. Sin embargo, creemos que esta menor excreción de fósforo, podría estar relacionada con que los niños del Grupo II, tienen una concentración sérica de PTH menor que los niños del Grupo I globalmente (Tabla XXVII), y por tanto una mayor reabsorción de fosfatos a nivel del túbulo proximal.

Por otro lado, al igual que otros autores (162), hemos visto que los niños alimentados con fórmula adaptada, tienen una excreción de fósforo por la orina mayor que los niños con lactancia materna (Tabla XXVI), que está relacionado en parte, con los niveles séricos de fósforo que presentan los tres grupos de alimentación (Tabla XX). Los niños que tienen una mayor concentración sérica de fósforo, son los que tienen una excreción del mismo más alta.

8 . CONCENTRACION SERICA DE HORMONA PARATIROIDEA

Aunque en otros trabajos no han observado cambios en la concentración de PTH (89,160,162), nosotros hemos encontrado diferencias estacionales y en relación con la alimentación.

Creemos que el descenso de los niveles de PTH observado en los niños nacidos en invierno (Grupo II), respecto a los niños nacidos en verano (Grupo I), a las 3 semanas y 6 meses de vida (Tabla XXVII), podría estar relacionado con una mayor y prolongada presencia plasmática de Péptidos relacionados con la PTH (PrPTH). Se ha visto que estos PrPTH requieren niveles séricos de calcio más altos para ser frenados, por lo que se desprende que su misión principal pudiera ser mantener una calcemia más alta, y secundariamente podrían originar un descenso de los niveles plasmáticos de PTH, ya que como es conocido la elevación de la concentración sérica de calcio disminuye la liberación de PTH.

No obstante, esta interpretación no es más que una hipótesis teórica, ya que la técnica empleada en nuestro estudio para determinar la PTH no permite medir estos PrPTH, pero valorando nuestros resultados, puede verse que los niños de Grupo II a las 3 semanas y 6 meses tienen unos niveles plasmáticos de PTH más bajos (Tabla XXVII), y de calcio sérico más altos (Tabla XXVII), que los niños del Grupo I. Esta hipótesis, nos ayudaría a entender por qué este grupo de niños nacidos en invierno, que tienen unas reservas menores de vitamina D, son capaces de mantener unos niveles séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ similares a los niños nacidos en verano. La presencia de estos PrPTH permitiría "aprovechar"

mejor estas menores reservas, ya que como hemos comentado anteriormente, producirían una sobrelevación de los niveles séricos de calcio y secundariamente originarían una disminución del fósforo sérico para mantener constante el producto iónico. Este descenso de la concentración sérica de fósforo estimularía la 1α -hidroxilasa renal con lo que aumentaría la concentración plasmática de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

Los niños que recibieron fórmula adaptada han mantenido fosfaturias más altas que los niños alimentados con lactancia materna a las 3 semanas y a los 3 meses (Tabla XXVI), pero manteniendo una concentración sérica de fósforo similar a los alimentados con lactancia materna con suplementos de vitamina D, lo que sugiere que han recibido un mayor aporte de fósforo. A los 6 meses, cuando se han introducido alimentos sólidos, la excreción de fósforo en los niños con lactancia materna suplementados con vitamina D y los niños con fórmula adaptada, se igualan. Pensamos que el descenso de la PTH a los 9 meses, en los niños alimentados con fórmula adaptada respecto a los alimentados con lactancia materna exclusiva y con suplementos de vitamina D (Tabla XXVIII), podría ser una respuesta "excesiva" a la disminución del aporte de fósforo, como si estos niños hubieran pasado a encontrarse en una situación de "hipofosforemia" transitoria. Al disminuir la PTH, que inhibe la reabsorción de fosforo en el túbulo proximal, aumentaría la concentración de sérica fosforo.

Por otro lado, al observar la concentración sérica de PTH globalmente (Figura 8), vemos que dicha concentración disminuye progresivamente de las 3 semanas a los 9 meses, de forma similar a lo que ocurre con la excreción de fósforo por la orina (Figura 7).

9 . CONCENTRACION SERICA DE OSTEOCALCINA

Los niveles séricos de osteocalcina van a ser reflejo por un lado de la síntesis ósea por los osteoblastos, y por otro de la resorción ósea. Cuando aumenta la síntesis ósea por los osteoblastos, la osteocalcina es liberada a la sangre fundamentalmente como molécula intacta, mientras que cuando aumenta la resorción ósea, lo que se libera a la sangre son sobre todo fragmentos de osteocalcina.

La metodología utilizada por nosotros no permite diferenciar molécula intacta de fragmentos de osteocalcina, por lo que los niveles determinados van a ser el resultado global de la remodelación ósea que se haya producido, si bien van a ser mejor reflejo de resorción que de síntesis ósea, ya que con la técnica utilizada en nuestro trabajo medimos principalmente fragmentos de osteocalcina.

No podemos comparar nuestros resultados con otros trabajos publicados, ya que no han utilizado este marcador de metabolismo óseo; sin embargo, las diferencias observadas en la concentración sérica de osteocalcina, creemos que apoyan la influencia estacional y de la alimentación que estamos discutiendo en nuestro estudio.

Pensamos que la diferencia observada a las 3 semanas de vida entre los niños nacidos en invierno (Grupo II) y los nacidos en verano (Grupo I) (Tabla XXIX), es el reflejo del incremento de remodelación ósea que presentan los niños del Grupo II para mantener unos niveles de calcio sérico más elevados que los niños del grupo I ($p < 0,01$) (Tabla XVII).

Como discutiremos más adelante, en los niños nacidos en invierno, se produce

un aumento progresivo de la concentración de 25(OH)D, probablemente como respuesta a las menores reservas que estos presentan al nacimiento en relación con los niños nacidos en verano. En estos niños del Grupo II, se observa un incremento significativo en la concentración de 25(OH)D de las 3 semanas a los 3 meses ($p < 0,01$), y de los 3 a los 6 meses de vida ($p < 0,01$), estabilizándose a los 9 meses (Figura 10). Este hecho podría estar indicándonos, que a partir de los 6 meses tal vez se hubiese llegado a una situación de estabilización de las reservas de vitamina D, con lo que disminuiría la remodelación ósea, y por tanto, la liberación de osteocalcina. Esta hipótesis nos llevaría a pensar, que los niños nacidos en invierno, han estado sometidos a una mayor remodelación ósea de las 3 semanas a los 6 meses de vida que los niños nacidos en verano, lo que se confirma con sus niveles plasmáticos de osteocalcina, ya que globalmente son más altos en este periodo (Tabla XXIX), y pudiera ser que una vez que se han "estabilizado las reservas", hubiese un descenso significativo de remodelación ósea. Esta circunstancia permitiría explicar por qué los niños que nacieron en invierno (Grupo II), a los 9 meses de vida, tienen unos niveles séricos de osteocalcina menores que los niños que nacieron en verano (Grupo I) ($p < 0,01$) (Tabla XXIX).

Respecto a la alimentación hemos objetivado que los niños con lactancia materna exclusiva, tienen unos niveles séricos de osteocalcina significativamente mayores que los niños con lactancia materna más suplementos de vitamina D y los niños con fórmula adaptada. Esta observación guarda relación inversa con la concentración de 25(OH)D, ya que este grupo de niños alimentados con lactancia materna exclusiva, tiene unos niveles séricos de 25(OH)D significativamente menores ($p < 0,01$), que los otros dos grupos a los 3 meses de vida (Tabla XXXII), y podría indicarnos que en estos niños hay un aumento de remodelación ósea para mantener los niveles plasmáticos adecuados de calcio y fósforo.

Por otro lado, las diferencias observadas en el total de la muestra estudiada, guardan relación con el periodo de máximo crecimiento de los niños, entre los 0 y los 6 meses, en el que se produce un aumento del 100% de la masa corporal. Como vemos en la Figura 9, los niveles de osteocalcina aumentan significativamente de las 3 semanas a los 3 meses ($p < 0,001$), se mantienen estables hasta los 6 meses de vida, y disminuyen significativamente de los 6 a los 9 meses ($p < 0,001$).

10. CONCENTRACION SERICA DE 25(OH)D

Los niveles séricos de 25(OH)D se han mantenido dentro del rango considerado normal en el adulto, en todos los niños y en todas las determinaciones (145), excepto en algunos niños nacidos durante el invierno en la determinación de las 3 semanas.

Respecto a la estación hemos encontrado claras diferencias. La concentración sérica de 25(OH)D observada durante la época estival ha sido mayor que la observada durante el invierno.

Así, a las 3 semanas de vida, los niños nacidos en verano (Grupo I), presentan niveles de 25(OH)D significativamente mayores que los niños nacidos en invierno (Grupo II) ($p < 0,01$). Esta concentración sérica de 25(OH)D a las 3 semanas no sólo nos indica las diferentes reservas de vitamina D de los niños que nacen en verano y en invierno, sino que por su proximidad al nacimiento, también van a ser un reflejo de los niveles séricos y los depósitos de vitamina D de sus madres. Como ellas no recibieron suplementos de vitamina D durante el embarazo, la diferencia observada en la concentración de 25(OH)D a las 3 semanas sería reflejo única y exclusivamente de la diferente exposición materna a la luz solar.

A medida que los niños crecen, naturalmente van cambiando de estación, de modo que a los 6 meses de edad, los niños que nacieron en verano (Grupo I), se encuentran en invierno, mientras que los nacidos en invierno (Grupo II), viven en verano. Así pues, respecto a la estación, la situación de los grupos se ha invertido, y por ello los niños del Grupo I tienen unos niveles séricos de 25(OH)D significativamente más bajos que los del

Grupo II ($p < 0,01$). Estos datos son concordantes con la opinión generalizada de que los niveles séricos de 25(OH)D siguen un claro patrón estacional, objetivándose niveles más altos en verano y más bajos en invierno (163,164,165,166).

Por otra parte, en nuestra serie llama la atención el comportamiento diferente, a lo largo del estudio, que sigue la evolución de la concentración de 25(OH)D según la estación de nacimiento (Figura 10), similar a lo observado por Lichtenstein y cols. (167). De este modo, podemos ver, que mientras la concentración sérica de 25(OH)D de los niños nacidos en verano (Grupo I) se mantiene estable de las 3 semanas a los 9 meses, en los niños que nacieron en invierno (Grupo II) se produce un incremento significativo de las 3 semanas a los 3 meses ($p < 0,001$) y de los 3 a los 6 meses ($p < 0,001$) estabilizándose de los 6 a los 9 meses. Creemos que este incremento en la concentración de 25(OH)D podría estar relacionado con una mayor actividad de la 25-hidroxilasa-vitamina D hepática. En efecto, se ha visto, que la eficacia de esta enzima es mayor cuando las reservas de vitamina D están deplecionadas (168,169), y ésta precisamente, podría ser la situación en que se encuentran los niños nacidos durante el invierno (Grupo II). Por otra parte, también se ha comprobado que su actividad va disminuyendo a medida que se incrementan los suplementos de sustrato, colecalciferol o ergocalciferol (20,170,171), lo que explicaría la estabilización de la concentración sérica de 25(OH)D de los 6 a los 9 meses. Estos datos son corroborados con estudios experimentales, donde se ha observado que el homogenado hepático de animales deficientes de vitamina D presenta actividad de 25-hidroxilasa-vitamina D hepática, no apareciendo dicha actividad en homogenado hepático de animales con niveles séricos normales de vitamina D (172).

Otro aspecto que llama la atención, es la evolución tan estable de los niveles séricos de 25(OH)D en los niños nacidos durante el verano (Grupo I), y que no desciendan

al llegar el invierno, como sería de esperar. Pensamos que este hecho quizás no ha ocurrido, por que cuando dichos niños llegan al periodo invernal han estado recibiendo aportes extraordinarios de vitamina D, bien con la fórmula adaptada, bien con los suplementos de vitamina D del complejo polivitamínico o con la alimentación complementaria.

Las diferencias observadas según la alimentación de los niños, a las 3 semanas y 3 meses, son concordantes con los resultados de otros trabajos (87,88,89,90).

A las 3 semanas, los niños que han estado recibiendo fórmula adaptada desde el nacimiento, tienen ya unos niveles séricos de 25(OH)D más altos que el total de niños que han recibido lactancia materna ($p < 0,01$), ya que los suplementos no se recomendaron hasta pasada esta primera visita a las 3 semanas de vida. A los 3 meses, tanto los alimentados con lactancia materna suplementados con 400 UI/día de vitamina D, como los alimentados con fórmula adaptada, tuvieron una concentración de 25(OH)D significativamente más alta que los niños con lactancia materna exclusiva ($p < 0,01$). Sin embargo, después de la diversificación, en que ya se han introducido pequeñas cantidades de vitamina D en la leche y cereales para preparación de las papillas, los niveles séricos de 25(OH)D se igualan en los 3 grupos de alimentación y no existen diferencias significativas (Tabla XXXII).

El hecho de que los niños que no reciben suplementos de vitamina D presenten unos niveles séricos de 25(OH)D menores que los que sí los reciben, a pesar de que mantengan un desarrollo somático y niveles plasmáticos de calcio, fósforo y fosfatasa alcalina, así como niveles séricos de 1,25(OH)₂D similares a los niños que reciben suplementos vitamínicos, ha suscitado una gran polémica en torno a la práctica de suplementar rutinariamente a todos los niños que reciben lactancia materna exclusiva.

Así, Greer y cols. en 1981 (89), basándose en esta circunstancia, y en que el grupo de niños con lactancia materna exclusiva estudiado por ellos también presentaba una

menor densidad ósea, propusieron que debía realizarse suplementación habitual a todos los niños con lactancia materna. No obstante, este mismo grupo de autores, en 1989, ha realizado un estudio similar en el que siguen observando diferencias en la concentración de 25(OH)D respecto al tipo de alimentación, aunque no demuestran diferencias de mineralización ósea, y concluyen que quizás los suplementos rutinarios no sean necesarios (160).

Sobre este punto, también es de destacar un trabajo realizado por Buffenstein y cols. en *Cryptomys damarensis*, que es una especie de rata estrictamente subterránea, en el que investigan los efectos de la suplementación con vitamina D₃ (173). En este estudio diseñan 3 grupos; uno que no recibe suplementos de vitamina D₃, otro que recibe dosis fisiológicas y otro que recibe dosis suprafiológicas, y encuentran que el grupo que no ha recibido suplementos de vitamina D₃, efectivamente, presenta unos niveles indetectables de 25(OH)D, significativamente menores que el grupo que sí los recibe. No obstante, estas ratas que reciben dosis fisiológicas de vitamina D₃ aumenta su ingesta de alimentos 1,8 veces respecto a las que no reciben suplementos, y sin embargo no se observan diferencias de masa corporal, lo que sugiere que el aumento de aporte energético es desaprovechado en procesos catabólicos. Por otro lado, el grupo que recibe dosis suprafiológicas, desarrolla hipercalcemia, aumento de la concentración de creatinina y un marcado incremento de los niveles de fosfatasa alcalina.

11. CONCENTRACION SERICA DE 1,25(OH)₂D

En todos los niños y en todas las determinaciones, los niveles séricos de 1,25(OH)₂D han permanecido dentro o por encima de los límites considerados como normales en el adulto (145,174,175,176).

Al igual que otros autores (160) no hemos observado diferencias significativas entre los niños que tomaron lactancia materna y los que tomaron fórmula adaptada, ni entre los que recibieron suplementos de vitamina D respecto a los que no los recibieron. Sin embargo Hillman LS y cols. encuentran que a los 6 meses, un grupo de niños alimentados con fórmula maternizada fortificada con vitamina D, tiene unos niveles séricos de 1,25(OH)₂D significativamente mayores que otro grupo de niños alimentados con lactancia materna que recibían un aporte suplementario de 400 UI de vitamina D al día (162). Ellos piensan que esta diferencia estaría relacionada con la excelente absorción intestinal del calcio que contiene la leche humana, que condicionaría que estos niños con lactancia materna tuviesen unas necesidades menores de 1,25(OH)₂D para mantener los niveles séricos de calcio.

En términos generales se considera que los niveles séricos de 1,25(OH)₂D no van a modificarse con la estacionalidad (18). Sin embargo, Lichtenstein y cols. (167) han encontrado una disminución significativa de la concentración sérica de 1,25(OH)₂D en un grupo de niños en verano respecto a un grupo de niños en invierno. Dichos autores piensan que este descenso podría considerarse un mecanismo de adaptación del organismo para prevenirse de una posible intoxicación de vitamina D, al tener los niveles de 25(OH)D más

elevados durante el verano. No obstante, en su misma serie encuentran que los niños alimentados con fórmula adaptada tienen una concentración sérica de 25(OH)D y 1,25(OH)₂D más alta que los niños alimentados con lactancia materna sin suplementos de vitamina D.

Nosotros no hemos observado diferencias estacionales significativas en la concentración sérica de 1,25(OH)₂D a las 3 semanas de vida. Sin embargo, a los 6 y 9 meses de edad los niveles séricos de 1,25(OH)₂D son significativamente superiores en los niños del Grupo II que en los del Grupo I ($p < 0,01$), lo que a nuestro entender no estaría indicando una diferencia estacional, sino un comportamiento o adaptación diferente de los niños nacidos en invierno respecto a los nacidos en verano.

En nuestra serie llama la atención la distinta evolución de los niveles séricos de 1,25(OH)₂D entre los niños nacidos en verano y los niños nacidos en invierno (Figura 11), similar a la observada por otros autores (167). En ambos grupos se observa un incremento significativo de la concentración de 1,25(OH)₂D de las 3 semanas a los 3 meses de edad ($p < 0,001$). Pensamos que dicho incremento, podría estar relacionado con el aumento de las necesidades de calcio y fósforo, para mantener una adecuada mineralización ósea en esta edad de rápido crecimiento. No obstante, mientras en el Grupo I los niveles séricos de 1,25(OH)₂D se estabilizan a partir de los 3 meses, en el Grupo II se produce un incremento significativo de dichos niveles de los 3 a los 9 meses ($p < 0,001$). Creemos que este incremento mantenido de la concentración sérica de 1,25(OH)₂D en los niños nacidos en invierno, podría deberse a la estimulación crónica de la 1 α -hidroxilasa-vitamina D renal, como seguidamente comentamos.

Los niños nacidos durante el invierno (Grupo II) presentaron unos niveles de 25(OH)D a las 3 semanas significativamente más bajos que los niños nacidos en verano (Grupo I), lo que nos indicaría que la reserva de vitamina D de los niños del Grupo II sería

menor. Se ha visto que en sujetos deficientes o con escasas reservas de vitamina D, se produce una elevación significativa y mantenida de la concentración sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, tanto por estimulación por luz ultravioleta como por la ingesta de pequeñas dosis orales de vitamina D, y se piensa que este incremento de la concentración sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ podría ser debido a un hiperparatiroidismo secundario que produciría una estimulación mantenida de la 1α -hidroxilasa-vitamina D renal (101).

12. MASA ÓSEA

Los resultados de la valoración de mineralización ósea, en niños alimentados con lactancia materna exclusiva y niños que reciben suplementos de vitamina D con la dieta, son contradictorios en la literatura; ya que hay trabajos que demuestran que niños alimentados con lactancia materna exclusiva tienen menor masa ósea, que niños alimentados con lactancia materna con suplementos de vitamina D o fórmula adaptada (89), mientras que en otros trabajos no se observan diferencias significativas (88,160).

Nosotros no hemos observado diferencias de masa ósea entre los niños alimentados con lactancia materna exclusiva, lactancia materna con suplementos de vitamina D ni fórmula adaptada.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Al estudiar el metabolismo y mineralización ósea en la infancia durante el primer año de vida, y valorada la influencia estacional, de la alimentación y de los suplementos de vitamina D, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1.- La concentración de calcio sérico es significativamente más alta en los niños nacidos durante el invierno, desde las 3 semanas a los 9 meses de vida, no existiendo diferencias respecto al tipo de alimentación ni al suplemento de vitamina D. Posiblemente ello sea debido a la especial situación metabólica que presentan estos niños.

2.- Hemos encontrado influencia tanto estacional como de la alimentación sobre la concentración sérica de fósforo. Respecto a la estación, los niños que nacen en invierno tienen unos niveles séricos de fósforo más bajos. En cuanto a la alimentación, los niños que reciben lactancia materna con suplementos de vitamina D y los que reciben fórmula adaptada tienen, a los 3 y 6 meses de edad, una concentración sérica de fósforo significativamente más alta que los niños con lactancia materna exclusiva.

3.- También hemos encontrado influencia estacional y de la alimentación en la excreción urinaria de fósforo. De forma, que los niños que nacen en verano, mantienen una fosfaturia

significativamente más alta que los niños nacidos en invierno, de las 3 semanas a los 6 meses de vida. Por otro lado, los niños alimentados con lactancia materna con suplementos de vitamina D y, sobre todo, los niños alimentados con fórmula adaptada, tienen una mayor excreción de fósforo por orina que los niños alimentados con lactancia materna exclusiva. Ello ocurre durante los primeros 6 meses de vida, cuando la leche es el único o principal alimento de los lactantes.

4.- Los niveles séricos de PTH de los niños nacidos en invierno son significativamente menores que los de los niños nacidos en verano, a las 3 semanas y 6 meses de edad. Igualmente son más bajos en los niños alimentados con fórmula adaptada, que en los niños alimentados con lactancia materna exclusiva y lactancia materna con suplementos de vitamina D, a los 9 meses de vida.

5. Los niños alimentados con lactancia materna exclusiva tienen, a los 3 meses de edad, una concentración sérica de osteocalcina significativamente mayor que los alimentados con lactancia materna con suplementos de vitamina D y los que recibían fórmula adaptada.

6.- La concentración sérica de 25(OH)D demuestra una clara influencia estacional; de tal forma, que tanto los niños nacidos en verano, como los nacidos en invierno, tienen durante los meses de estío unos niveles séricos de 25(OH)D significativamente más altos.

7.- La evolución en el tiempo de la concentración sérica de 25(OH)D en los dos grupos estacionales es completamente diferente. Mientras en los niños que nacen en verano se mantiene estable de las 3 semanas a los 9 meses, en los niños que nacen en invierno aumenta

progresivamente de las 3 semanas a los 6 meses y se estabiliza a los 9 meses.

8.- Los niños que reciben aportes extraordinarios de vitamina D, ya sea con la fórmula adaptada o como suplementación de la lactancia materna tienen, a las 3 semanas y 3 meses, una concentración sérica de 25(OH)D significativamente más alta que los niños con lactancia materna exclusiva.

9.- No hay claras diferencias estacionales en los niveles de 1,25(OH)₂D. Sin embargo, al igual que ocurre con la concentración sérica de 25(OH)D, la evolución en el tiempo de los niveles séricos de 1,25(OH)₂D difiere entre los niños que nacieron en verano y los que nacieron en invierno. Así, la concentración sérica de 1,25(OH)₂D de los niños nacidos en verano, aumenta de las 3 semanas a los 3 meses y posteriormente se mantiene estable hasta los 9 meses de edad, mientras que en los niños nacidos en invierno aumenta progresivamente desde las 3 semanas a los 9 meses de vida.

10.- No hemos observado diferencias de masa ósea a los 10 meses de edad, entre los niños alimentados con lactancia materna exclusiva, con lactancia materna suplementada con vitamina D, y con los alimentados con fórmula adaptada.

11.- En vista de todo lo anterior, nos parece que no está justificado, en nuestro medio, recomendar suplementos sistemáticos de vitamina D a todos los lactantes.

BIBLIOGRAFIA

1. Whistler D. The morbo puerly anglorum, quem patrio idiomatic indigenae vocant "The rickets" (Lugduni, Batavorum 1645).(As cited by Smerdon, GT, Daniel Whistler and the english disease. A translation and biographical note). *J His Med* 1950;5:397-415.
2. DeLuca HF. The vitamin D history. A success os basic science in the treatment of disease. In *Metabolic bone disease in children*. By Castells S, Finberg L. Ed Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. 1990 p:1-41.
3. Huldshinsky K. Heiulung von rachitis durch künstliche höhensonne. *Deutsch Med Wochschr* 1919;45:712-713.
4. McCollum EV, Simmonds N, Becker JE, Shipley PG. Studies on experimental rickets. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J Biol Chem* 1922;53:293-312.
5. Powers GF, Park EA, Shipley PG. The prevention of rickets in the rat by the means of radiation with the mercury vapor quartz lamp. *Proc Soc Exp Biol Med* 1921;19:120-121.
6. Steenbock H, Black A. The induction of growth-promotin and calcifying properties in a ration by exposure to ultraviolet light. *J Biol Chem* 1924;61:408-422.
7. Hess AF, Weinstock M. Antirachitic properties imparted to inert fluids and green vegetables by ultraviolet irradiation. *J Biol Chem* 1924;62:301-313.

8. Windaus A, Lettre h, Schenck F. 7-dehydrocholesterol. *Ann* 1935;98:98-106
9. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB. Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and the physiologic consequences. *Science* 1980;210:203-205.
10. Holick MF, MacLaughlin JA, Doppelt SH. Factors that influence the cutaneous photosynthesis of previtamin D₃. *Science* 1981;211:590-593.
11. Lo CW, Paris PW, Clemens TL. Vitamin D absorption in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption syndromes. *Am J Clin Nutr* 1985;42:644-649.
12. DeLuca HF. Vitamin D metabolism and function. In Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York 1979.
13. Martial J, Plourde V, Gascon-Barre M. Sequestration of ³H-vitamin D₃ by the fetal and neonatal liver. *Biol Neonate* 1985;48:21-28.
14. Plourde V, Haddad P, Gascon-Barre M. Microsomal C-25 hydroxylation of [³H]-vitamin D₃ by the fetal and neonatal rat liver. *Pediatr Res* 1985;19:1206-1209.
15. Hollis BW, Pittard WB. Evidence for a maturational change in the ability to convert vitamin D to 25-hydroxyvitamin D in neonate. *Pediatr Res* 1986;20:412A.

16. Long RG, Skinner RK, Meinhard E. Serum 25-hydroxyvitamin D values in liver disease and hepatic osteomalacia. *Gut* 1976;17:824-827.
17. Pietrek J, Kokot F. Serum 25-hydroxyvitamin D in patients with chronic renal disease. *Eur J Clin Invest* 1977;7:283-287.
18. Gray TK, Lester GE, Lorenc RS. Evidence for extrarenal 1-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃ in pregnancy. *Science* 1979;204:1311-1313.
19. Fraser DR. Regulation of the metabolism of vitamin D. *Physiol Rev* 1980;60:551-613.
20. Chesney RW, Zelikovic I. The metabolism of vitamin D and the renal handling of calcium and phosphate. In *Metabolic bone disease in children*. By Castells S and Finberg. Ed Marcel Dekker Inc. New York and Basel 1990; p 43-70.
21. Portale AA, Halloran BP, Murphy MM, Morris RC Jr. Oral Intake of phosphorus can determine de serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D by determining its production rate in humans. *J Clin Invest* 1986;77:7-12
22. Habener JF, Potts JT. Fundamental considerations in the physiology, biology, and biochemistry of parathyroid hormone. In *Metabolic bone disease and clinically related disorders*. Avioli & Krane 2nd ed. Ed WB Saunders Company. 1990; p 69-130.

23. Adams ND, Garthwite TL, Gray RW. The interrelationship among prolactin, 1,25-dihydroxyvitamin D and parathyroid hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;49:628-630.
24. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Eng J Med* 1989;320:980-991.
25. Onisko BL, Schnoes HK, DeLue HF, Glover RS. Metabolism and biological activity of 25-fluorocholecalciferol, 24-dehydrocholecalciferol and 25-dehydrocholecalciferol in the rat. *Biochem J* 1979;182:1-9.
26. Reddy GS, Tserng KY. Isolation and identification of 1,24,25-trihydroxyvitamin D₂, 1,24,25,28-tetrahydroxyvitamin D₂, and 1,24,25,26-tetrahydroxyvitamin D₂: new metabolites of 1,25-dihydroxyvitamin D₂ produced in rat kidney. *Biochemistry* 1986;25:5328-5333.
27. Reddy GS, Tserng KY. Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ through C-24 oxidation pathway. *Biochemistry* 1989;28:1763-1769.
28. Pike JW, Donaldson CA, Marion SL, Haussler MR. Development of hybridomas secreting monoclonal antibodies to de chicken intestinal 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:7719-7723.
29. Braumbaugh PF, Haussler MR. Nuclear and cytoplasmic binding components for vitamin D metabolites. *Life Sci* 1975;16:353-362.

30. Kream BE, Reynolds RD, Knutson JC, Eisman JA, DeLuca HF. Intestinal cytosol binders of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃. *Arch Biochem Biophys* 1976;176:779-787.
31. Holick MF, Kleiner-Bassaller A, Schnoes HK, Kasten PM, Boyle IT, DeLuca HF. 1,24,25-trihydroxyvitamin D₃: a metabolite of vitamin D₃ effective on intestine. *J Biol Chem* 1973;248:6691-6696.
32. Orti E, Bodwell JE, Munck A. Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocrine Reviews* 1992;13:105-128.
33. Wasserman RH, Taylor AN. Vitamin D₃-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science* 1966;152:791-793.
34. Pike JW. Intracellular receptors mediated the biological action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Nutr Rev* 1985;43:161-168.
35. Haussler MR, McCain TA. Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action (first of two parts). *N Eng J Med* 1977;297:974-983.
36. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine Reviews* 1992;13:66-80.

37. Armitage EK. Parathyrin (parathyroid hormone): metabolism and methods for assay. *Clin Chem* 1986;32:418-424.
38. Canterburg JM, Bricker LA, Levey GS. Metabolism of bovine parathyroid hormone. Immunological and Biological characteristic of fragments generated by liver perfusión. *J Clin Invest* 1975;55:1245-1253.
39. Martin K, Hruska K, Greenwalt A, Klahr S, Slatopolsky E. Selective uptake of intact parathyroid hormone by the liver. Differences between hepatic and renal uptake. *J Clin Invest* 1976;58:781-788.
40. Segre GV, Perkins AS, Witters LA, Potts JT. Metabolism of parathyroid hormone by isolated rat Kupffer cells and hepatocytes. *J Clin Invest* 1981;67:449-457.
41. Potts JT, Kronenberg HM, Roseblatt M. Parathyroid hormone: Chemistry, biosynthesis, and mode of action. *Adv Protein Chem* 1982;35:323-396.
42. Reeve J, Zanelle JM. Parathyroid hormone and bone. *Clin Sci* 1986;71:231-238.
43. Mallette LE. The parathyroid polyhormones: New concepts in the spectrum of peptide hormone action. *Endocrine Rev* 1991;12:110-117.

44. Price PA, Otsuka AS, Poser JW, Kristaponis A, Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:3374-3375.
45. León M. Estudio de los valores de osteocalcina en enfermedades metabólicas óseas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 1988.
46. Almoguera I, Cabranes JA, Rico H, Millan V, Rodriguez C, del Olmo J. Osteocalcina: un nuevo y específico marcador del turnover óseo. *Rev Esp Med Nucl* 1985;4:295-300.
47. Bianco P, Hayashi Y, Silvestrini G, Termini JD, Bunnocci E. Ultrastructural localization of osteonectin and Gla-protein in calf bone. *Calcif Tiss Int* 1984;36(suppl 2):92.
48. Lian JB, Gumbert CM. Osteocalcin. Biochemical consideration and clinical application. *Clin Orthop Relat Res* 1988;226:267-291.
49. Hess AF, Lewis JM. Clinical experience with irradiated ergosterol. *JAMA* 1928;91:783-796.
50. Huldshinski K. Heilung von rachitis durch künstliche Hohensonne. *Deutsche Med Wochenschr* 1919;45:712-713.

51. Ross SG. Vitamin D intoxication in infancy. *J Pediatr* 1952; 41:815-822.
52. Committee on hypercalcemia, British Paediatric Association. Hypercalcemia in infants and vitamin D. *Br Med J* 1956;2:149-155.
53. Fomon SJ, Younoszai MK, Thomas LN. Influence of vitamin D on linear growth of normal full-term infants. *J Nutr* 1966; 88:345-350.
54. Food and Nutrition Board, National Academy of Sciences National Research Council, 1973.
55. McLaughlin M, Raggatt PR, Fairney A, Brown DJ, Lester E, Willis LR. Seasonal variations in serum 25 hydroxycholecalciferol in healthy people. *Lancet* 1974;1:536-538.
56. Stamp TCB, Round JM. Seasonal changes in human plasma levels of 25 hydroxyvitamin D. *Nature* 1974;247:563-565.
57. Strydom RP, Hilbertson TJ, Brunden MN. A seasonal variation study of 25 hydroxyvitamin D₃ serum level in normal humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;48:771-775.
58. Holmberg I, Larsson A. Seasonal variation of vitamin D₃ and 25 hydroxyvitamin D₃ in human serum. *Clin Chim Acta* 1980;100:173-174.

59. Johnson FS, Mo T, Green AES. Average latitudinal variation in ultraviolet radiation at the earth's surface. *Photochem Photobiol* 1976;23:179-188.
60. Beadle PC, Burton JL, Leach JF. Correlation of seasonal variation of 25-hydroxycalciferol with UV radiation dose. *Br J Dermatol* 1980;102:289-293.
61. Fairney A, Fry J, Lipscomb A. The effect of darkness on vitamin D in adults. *Postgrad Med J* 1979;55:248-250.
62. Davies DM, Morris JEW. Carbon dioxide and vitamin D effects on calcium metabolism in nuclear submarines: a review. *Undersea Biomed Rs* 1979 (Submarine Suppl): S 71-80.
63. Leach CS, Rambaut PC. Biochemical responses of the Skylab crewmen: an overview. In Johnston RS, Dietlein LF. Ed *Biomedical Results from Skylab*. Washington DC, NASA 1977;204-216.
64. Hoff N, Haddad J, Teitelbaum S, McAlister W, Hilman L. Serum concentrations of 25 hydroxyvitamin D in rickets of extremely premature infants. *J Pediatr* 1979;94:460-466.
65. Kulkarni PB, Hall RT, Rhodes PG, Sheeham MB, Calenbach JC, Germann DR, Abramson SJ. Rickets in very low-birth-weight infants. *J Pediatr* 1980;96:249-255.
66. Steichen JJ, Gratton TL, Tsang RC. Osteopenia of prematurity: The cause and possible treatment. *J Pediatr* 1980;96:528-534.

67. Calenbach JC, Sheeham MB, Abramson SJ, Hall RT. Etiologic factors in rickets of very low-birth-weight infants. *J Pediatr* 1981; 98:800-805.
68. Campbell DE, Feischman AR. Rickets of prematurity: Controversies in causation and prevention. *Clin Perinatol* 1988;15:879-890.
69. Hillman LS, Haddad JG. Human perinatal vitamin D metabolism II: Serial 25-hydroxyvitamin D concentrations in sera of term and premature infants. *J Pediatr* 1975;86:928-935.
70. Haddad JG, Boisseau V, Avioli LV. Placental transfer on vitamin D₃ and 25-hydroxycholecalciferol in the rat. *J Lab Clin Med* 1971; 77:908-915.
71. Hillman LS, Haddad JG. Human perinatal vitamin D metabolism I: 25-hydroxyvitamin D in maternal and cord blood. *J Pediatr* 1974; 84:742-749.
72. Hoogenboezem T, Degenhart HJ, De Muinck Keizer-Schrama SMPF, Bouillon R, Grose WFA, Hackeng WHN, Visser HKA. Vitamin D metabolism in breast-fed infants and their mothers. *Pediatr Res* 1989;25:623-628.
73. McIntosh N, De Curtis M, Williams J. Failure of mineral supplementation to reduce incidence of rickets in very-low-birthweight infants. *Lancet* 1986;1:981-982

74. Atkinson SA, Radde IC, Anderson GH. Macromineral balances in premature infants fed their own mothers milk or formula. *J Pediatr* 1983;102:99-106.
75. Hillman LS, Salmons SJ, Slatoplosky E, McAlister W. Serial serum 25-hydroxivitamin D and mineral homeostasis in very premature infants fed preterm human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985;4:762-770.
76. Rowe JC, Wood DH, Rowe DW, Raisz LG. Nutritional hipophosphatemic rickets in a premature infant fed breast milk. *N Engl J Med* 1977; 300: 293-296.
77. Cifuentes RF, Kooh SW, Radde IC. Vitamin D deficiency in a calcium-supplemented very low-birth-weight infant. *J Pediatr* 1980;96:252-255.
78. Senterre J, Putet G, Salle B, Rigo J. Effects of vitamin D and phosphorus supplementation on calcium retention in preterm infants fed banked human milk. *J Pediatr* 1983;103:305-307.
79. Senterre J, Salle B. Calcium and phosphorus economy of the preterm infant and its interaction with vitamin D and its metabolites. *Acta Paediatr Scand (Suppl)* 1982;296:85-92.
80. Rowe JC, Goetz CA, Carey DE, Horak E. Achievement of in utero retention of calcium and phosphorus accompanied by high calcium excretion in very low birth weight infants fed a fortified formula. *J Pediatr* 1987;110:581-585.

81. Chessex P, Pineault M, Zebiche H, Ayotte RA. Calciuria in parenterally fed preterm infants: Role of phosphorus intake. *J Pediatr* 1985;107:794-796.
82. Greer FR, McCormick A, Loker J. Improved bone mineral content (BMC) without correction of urinary signs of "phosphate deficiency syndrome" in preterm infants fed own mother's fortified milk. *Clin Res* 1984;32:806A.
83. Gross SJ. Bone mineralization in preterm infants fed human milk with and without mineral supplementation. *J Pediatr* 1987;111:450-458.
84. Koo WWK, Sherman R, Succop P, Ho M, Buckley D, Tsang RC. Serum vitamin D metabolites in very low birth weight infants with and without rickets and fractures. *J Pediatr* 1989;114:1017-1022.
85. Mawer EB, Stanbury SW, Robinson MJ, James J, Close C. Vitamin D nutrition and vitamin D metabolism in the premature human neonate. *Clin Endocrinol* 1986;25:641-649.
86. Pittard WB, Geddes KM, Hulsey TC, Hollis BW. How much vitamin D for neonates. *Am J Dis Child* 1991;145:1147-1149.
87. Birkbeck JA, Scott HF. 25-Hydroxycholecalciferol serum levels in breast-fed infants. *Arch Dis Child* 1980;55:691-695.

88. Roberts CC, Chan GM, Folland D, Rayburn C, Jackson R. Adequate bone mineralization in breast-fed infants. *J Pediatrics* 1981;90:192-196.
89. Greer FR, Searey JE, Levin RS, Steichen JJ, Steichen-Asche PS, Tsang RC. Bone mineral content and serum 25-hydroxyvitamin D concentration in breast-fed infants with and without supplemental vitamin D. *J Pediatr* 1981;98:696-701.
90. Greer FR, Searey JE, Levin RS, Steichen JJ, Steichen-Asche PS, Tsang RC. Bone mineral content and serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in breast-fed infants with and without supplemental vitamin D: One-year follow-up. *J Pediatr* 1982;100:919-922.
91. Rothberg AD, Pettifor JM, Desmond FC, Sonnendecker EWW, Ross FP. Maternal-infant vitamin D relationships during breast-feeding. *J Pediatr* 1982;101:500-503.
92. Ala-Houhala M, Koskinen T, Terho A, Koivula T, Visakorpi J. Maternal compared with infant vitamin D supplementation. *Arch Dis Child* 1986;61:1159-1163.
93. Ala-Houhala M, Koskinen T, Parviainen MT, Visakorpi JK. 25-Hydroxyvitamin D and vitamin D in human milk: effects of supplementation and season. *Am J Clin Nutr* 1988;48:1057-1060.
94. O'Connor P. Vitamin D-deficiency rickets in two breast-fed infants who were not receiving vitamin D supplementation. *Clin Pediatr* 1977;16:361-367.

95. Dwyer JT, Ddietz WH JR, Hass G, Suskind R. Risk of nutritional rickets among vegetarian children. *Am J Dis Child* 1979;133:134-138.
96. Fomon SJ, Strauss RG. Nutrient deficiencies in breast-fed infants. *N Engl J Med* 1978;299:355-361.
97. Bachrach S, Fisher J, Parks JS. An outbreak of vitamin D deficiency rickets in a susceptible population. *Pediatr* 1979;64:871-877.
98. Edidin DV, Levitsky LL, Schey W, DumbovicN, Campos A. Resurgence of nutritional rickets associated with breast-feeding and special dietary practices. *Pediatr* 1980;65:232-235.
99. Bhowmick SK, Johson KR, Rettig KR. Rickets causer by vitamin D deficiency in breast-fed infants in the Southern United States. *Am J Dis Child* 1991;145:127-130.
100. Editorial. Metabolic bone disease in Asians. *Br Med J* 1976;2:442.
101. Adams JS, Clemens TL, Parrish JA, Holick MF. Vitamin D synthesis and metabolism after ultraviolet irradiation of normal and vitamin D deficient subjects. *N Engl J Med* 1982;306:722-725
102. Matsuoka LY, Wortsman J, Haddad JG, Kolm P, Hollis BW. Racial pigmentation and the cutaneous synthesis of vitamin D. *Arch Dermatol* 1991;127:536-538.

103. Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of the skin to synthesize vitamin D. *Lancet* 1982;1:74-76.
104. Lo W, Paris PW, Holick MF. Indian and Pakistani immigrants have the same capacity as Caucasians to produce vitamin D in response to ultraviolet irradiation. *Am J Clin Nutr* 1986;44:683-685.
105. Dunningan MG, Childs WC, Smith CM, McIntosh WB, Ford JA. The relative roles of ultraviolet deprivation and diet in the aetiology of Asian rickets. *Scott Med J* 1975;20:217-218.
106. O'Hara-May J, Widdowson EM. Diets and living conditions of Asian boys in Coventry with and without signs of rickets. *Br J Nutr* 1976;36:23-26.
107. Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D₃. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:373-378.
108. Leerbeck E, Sondergaard H. The total content of vitamin D in human milk and cow's milk. *Br J Nutr* 1980;44:7-12.
109. Greer FR, Reeve LE, Chesney RW, DeLuca HF. Water-soluble vitamin D in human milk. *Pediatrics* 1982;29:238-240.

110. Reeve LE, Chesney RW, De Luca HF. Vitamin D in human milk: identification of biologically active forms. *Am J Clin Nutr* 1982;36:122-126.
111. Lakdawala DR, Widdowson EM. Vitamin D in human milk. *Lancet* 1977;1:167-168.
112. Hollis BW, Roos BA, Draper HH, Lambert PW. Occurrence of vitamin D sulfate in human milk whey. *J Nutr* 1981;109:384-390.
113. Reeve LE, Jorgensen NA, deLuca HF. Vitamin D compounds in cow's milk. *J Nutr* 1982;112:667-672.
114. Speker BL, Tsang RC, Hollis BW. Effect of race and diet on human milk vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Am J Dis Child* 1985;139:1134-1137.
115. Committee on hypercalcemia. British Paediatric Association. Hypercalcemia in infants and vitamin D. *Br Med J* 1956;2:149-155.
116. Stamp TCB, Haddad JG, Twigg CA. Comparison of oral 25-hydroxycholecalciferol, vitamin D, and ultraviolet light as determinants of circulating 25-hydroxyvitamin D. *Lancet* 1977;1:1341-1343.
117. Hollis BW, Pittard WB. Evaluation of the total fetomaternal vitamin D relationships at term: evidence for racial differences. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:652-657.

118. Robertson I, Ford JA, McIntosh WB, Dunnigan MG. The role of cereals in the aetiology of nutritional rickets: the lesson of the Irish National Nutrition Survey 1943-1948. *Br J Nutr* 1981;45:17-22.
119. Setephens WP, Kliniuk PS, Warrington S, Taylor JI. Observations on the dietary practices of asians in the United Kingdom. *Human Nutr. Appl Nutr* 1982;36A:438-444.
120. MacAuliffe T, Pietraszek A, McGinnis J. Variable raquitogenic effects of grain and alleviation by extraction or supplementation with vitamin D fat and antibiotics. *Poultry Sci* 1976;55:2142-2147.
121. Hidioglou M, Ivan M, Proulx JG. Lessard JR. Effect of a single intramuscular dose of vitamin D on concentrations of liposoluble vitamins in the plasma of heifers winterfed oat silage, grass silage or hay. *Can J Animal Sci* 1980;60:311-318.
122. Maurice DV, Hensen LS. Hepatic lipid metabolism in domestic fowl as influenced by dietary cereal. *J Nutr* 1979;109:872-882.
123. Liberman MM, Salzman M. Chronic vitamin D overdose: a reminder. *Arch Dis Child* 1991;66:1002.
124. Jacobus CH, Holick MF, Shao Q. Hypervitaminosis D associated with drinking milk. *N Eng J Med* 1992;326:1173-1177.

125. Holick MF, Shao Q, Liu WW, Chen TC. The vitamin D content of fortified milk and infant formula. *N Eng J Med* 1992;326:1178-1181.
126. Chesney RW. Requirements and upper limits of vitamin D intake in the term neonate, infant and older child. *J Pediatr* 1980;116:159-166.
127. Haddad JG. Vitamin D. Solar rays, the milky way, or both?. *N Eng J Med* 1992;326:1213-1215.
128. Bhowmick SK, Jonhson KR, Rettig KR. Call for clarification of vitamin D recomendations. In reply. *Am J Dis Child* 1992;146:14.
129. Ho ML, Yen HG, Tsang RC, Spiker BL, Chen XC, Nichols BL. Randomized study of sunshine exposure and serum 25-OHD in breast-fed infants in Beijing, China. *J Pediatr* 1985;107:928-931.
130. Specker BL, Ho ML, Oestreich A, Yin TA, Shui QM, Chen XC. Prospective study of vitamin D supplementation and rickets in China. *J Pediatr* 1992;120:733-739.
131. Markestad T. Effect of season and vitamin D supplementation on plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in norwegian infants. *Acta Paediatr Scan* 1983;72:817-821.
132. Fraser DR. La economía fisiológica de la vitaina D. *Lancet (Ed Esp)* 1983;3:199-203.

133. Specker BL, Valinis B, Hertzberg V, Edwards N, Tsang R. Sunshine exposure and serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in exclusive breast-fed infants. *J Pediatr* 1985;107:372-376.

134. M Hernandez, J Castellet, M García, JL Narvaíza, JM Rincón, I Ruiz, E Sánchez, B Sobradillo, A Zurimendi. Estudio longitudinal de Crecimiento, curvas de 0 a 2 años. Instituto de Investigación sobre crecimiento y desarrollo. Fundación Orbegozo. Bilbao.

135. Berson SA, Yalow RS, Aurbach GD, Potts JT Jr. Immunoassay of bovine and human parathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1963;49:613-620.

136. Mallette LE, Tuma SN, Berger RE, Kirkland JL. Radioimmunoassay for the middle region of human parathyroid hormone using an homologous antiserum with a carboxyl-terminal-fragment of bovine parathyroid hormone as radioligand. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;54:1017-1024

137. Mallette LE. Use of homologous antisera for radioimmunoassay of human parathyroid hormone. *Ligand Rev* 1979;18:1-12

138. Wood WG, Butz R, Casaretto M. Preliminary results on the use of an antiserum to human parathyrin in a homologous radioimmunoassay. *L Clin Chem Clin Biochem* 1980;18:789-795

139. Kao PC, Jiang NS, Klee GG, Purnell DC. Development and validation of a new radioimmunoassay for parathyrin (PTH). *Clin Chem* 1982;28:69-78
140. Slovik DM, Gundberg CM, Neer RM, Lian JB. Clinical evaluation of bone turnover by serum osteocalcin measurements in a hospital setting. 1984;59:228-230.
141. Brown JP, Malaval L, Chapuy MC, Delmas PD, Edouard C, Meunier PJ. Serum bone Gla-Protein: A specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1984;I:1091-1096
142. Gundberg CM, Wilson PS, Gallop PM, Parffit AM. Determination of osteocalcin in human serum: results with two kits compared with those by a well-characterized assay. *Clin Chem* 1985;31:1720-1734.
143. Price Pa, Parthemore JG, Deftos LJ. New Biochemical marker for bone metabolism: measurement by radioimmunoassay of bone Gla-protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J Clin Invest* 1980;66:878-893.
144. Gundberg CM, Lian JB, Gallop PM. Measurements of gamma-carboxyglutamate and circulating osteocalcin in normal children and adults. *Clin Chim Acta* 1983;128:1-16.
145. García Lacalle C. Marcadores bioquímicos del metabolismo óseo en lactantes: validación de los métodos de cuantificación de los metabolitos 25(OH)D y 1,25(OH)₂D. Tesis Doctoral (pendiente de lectura). Universidad Complutense de Madrid. 1993.

146. Bayard F, Bee P, Louvet P. Measurement of Plasma 25-hydroxycholecalciferol in man. *Europ J Clin Invest* 1972;19722:195-198.
147. Morris JF, Peacock M. Assay of plasma 25-hydroxyvitamin D. *Clin Chim Acta* 1976;72:383-391.
148. Bouillon R, Herck E, Jans I, Tan BK, Baelen H, De Moor P. Two direct (non chromatographic) assays for 25-hydroxyvitamin D. *Clin Chem* 1984;30:1731-1736.
149. Belsei RE, DeLuca HF, Potts T. A rapid assay for 25-hydroxyvitamin D₃ without preparative chromatographic. *J Clin Endocrinol Metab* 1974;38:1046-1061.
150. Hughes MR, Baylink DJ, Jones PG, Haussler MR. Radioligand receptor assay for 25-hydroxyvitamin D₂/D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₂/D₃. *J Clin Invest* 1976;58:61-70.
151. Shepard RM, Horst RL, Hamstra AJ, DeLuca HF. Determination of Vitamin D and its metabolites in plasma from normal and anephric man. *Biochem J* 1979;182:55-69.
152. Bishop JE, Norman AW, Coburn JW, Roberts PA, Henry HL. Studies on the metabolism of calciferol vitamin D XVI. Determination of the concentration of 25-hydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D, and 1,25-dihydroxyvitamin D in a single two-milliliter plasma sample. *Mineral Electrolyte Metab* 1980;3:181-189.

153. Reinhardt TA, Horts RL, Orf JW, Hollis BW. A microassay for 1,25-dihydroxyvitamin D not requiring high performance liquid chromatographic: application to clinical studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;58:91-98.
154. Hollis BW. Assay of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D involving a novel single-cartridge extraction and purification procedure. *Clin Chem* 1986;32:2060-2063.
155. Eisman JA, Hamstra AJ, Kream BE, DeLuca HF. A sensitive, precise, and convenient method for determination of 1,25-dihydroxyvitamin D in human plasma. *Arch Biochem Biophys* 1976;176:235-243.
156. Breslau NA, Zerwekh JE, Nicar MJ, Pak CYC. Effects of short term glucocorticoid administration in primary hyperparathyroidism: comparison to sarcoidosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;54:824-830.
157. Bonnard GD. Cortical thickness and diaphysial diameter of the metacarpal bones from the age of three months to eleven years. *Helv Paediat Acata* 1968;5:445-463.
158. Berdun E, Arana T, López FJ, Ferrandez A. Valores del espesor de la cortical y del diámetro de los metacarpianos de niños aragoneses normales en los cuatro primeros años de vida. Estudio longitudinal. *An Esp Pediatr* 1988;28:201-204.
159. Bustos G. Valoración de la masa ósea en niños diabéticos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 1988.

160. Greer FR, Marshall S. Bone mineral content serum vitamin D metabolite concentrations, and ultraviolet B light exposure in infants fed human milk and without vitamin D₂ supplements. *J Pediatr* 1989;114:204-212.
161. Specker BL, Tsang RC, Ho ML, Landi TM, Gratton TL. Low serum calcium and high parathyroid hormone levels in neonates fed "humanized" cow's milk-based formula. *Am J Dis Child* 1991;145:941-945.
162. Hillman LS, Chow W, Salmons SS, Weaver EE, Erickson M, Hansen J. Vitamin D metabolism, mineral homeostasis, and bone mineralization in term infants fed human milk, cow milk-based formula, or soy based formula. *J Pediatr* 1988;112:864-874.
163. Sanchez ML, Borque M, Del Olmo J, Rubio P. Influencia de los cambios estacionales y de la edad sobre los niveles plasmáticos de 25-hidroxicolecalciferol en adultos normales. *N Arch Fac Med* 1984;42:248-252.
164. Mclaughlin M, Fairney A, Lester E, Raggatt PR, Brown DJ, Wills MR. Seasonal variations in serum 25-hydroxycholecalciferol in healthy people. *Lancet* 1974;I:536-538.
165. Juttman JR, Visser TJ, Burman C. Seasonal fluctuations in serum concentrations of vitamin D metabolites in normal subjects. *Br Med J* 1981;282:1349-1352.
166. Tjellesen L, Christiansen C. Vitamin D metabolites in normal subjects during one year. A longitudinal study. *Scand J Clin Lab Invest* 1983;43:85-88.

167. Lichtenstein P, Specker BL, Tsang RC, Mimouni F, Gormley C. Calcium-regulating hormones and minerals from birth to 18 months of age: a cross sectional study. I. Effects of sex, race, age, season and diet on vitamin D status. *Pediatrics* 1986;77:883-890.
168. Bhattacharyya MH, DeLuca HF. The regulation of rat liver calciferol-25-hydroxylase. *J Biol Chem* 1973;248:969-973.
169. Bhattacharyya MH, DeLuca HF. Comparative studies on the 25-hydroxylation of vitamin D and dihydrotachysterol. *J Biol Chem* 1973;248:2974-2977.
170. Fukushima M, Nishii Y, Suzuki M, Suda T. Comparative studies on the 25-hydroxylations of cholecalciferol and 1- α -hydroxicholecalciferol in perfused rat liver. *Biochem J*, 1978;170:495-502.
171. Haddad JG, Stamp CB. Circulating 25-hydroxyvitamin D in man. *Am J Med* 1974;57:57-62.
172. Bhattacharyya MH, DeLuca HF. The regulation of calciferol-25-hydroxylase in the chick. *Biochem Biophys Res Commun.* 1974;59:734-731.
173. Buffenstein R, Skinner DC, Yahav S, Moodley GP, Cavaleros M, Zachen D, Ross FP, Pettifor JM. Effect of oral cholecalciferol supplementation and physiological and supraphysiological doses in naturally vitamin D₃-deficient subterranean damara mole rats (*Cryptomys damarensis*). *J Endocrinol* 1991;131:197-202.

174. Markestad T. Plasma concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D, and 25,26-dihydroxyvitamin D in the first year of life. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:755-759.

175. Sheino Y, Shimotsuji K, Yamaoka K, Ishida T, Matsuda S, Ikehara C, Yabuuchi H, Dokoh S. Plasma 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations in cords, newborns, infants and children. *Calcif Tissue Int* 1980;30:1-14.

176. De Leenheer AP, Brauwens RM. Radioimmunoassay for 1,25-dihydroxyvitamin D in serum or plasma. *Clin Chem* 1985;31:142-146.