

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**

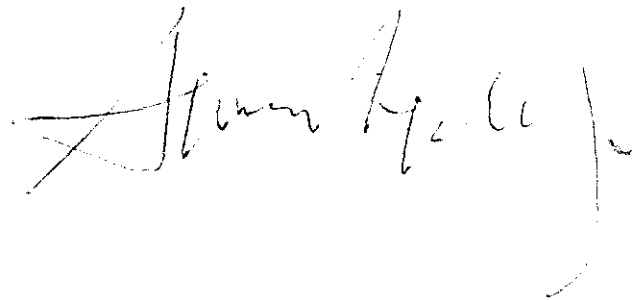
MARCADORES BIOQUIMICOS DEL METABOLISMO OSEO EN LACTANTES
*Validación de los métodos de cuantificación de los
metabolitos 25-hidroxiciferol y 1,25-dihidroxiciferol*

**Tesis Doctoral
Concepción García Lacalle
MADRID 1993**

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

HACE CONSTAR: que Dña. CONCEPCION GARCIA LACALLE
ha realizado bajo su dirección, el trabajo titulado:
*"MARCADORES BIOQUIMICOS DEL
METABOLISMO OSEO EN LACTANTES.
Validación de los métodos de cuantificación de
los metabolitos 25(OH)D y 1,25(OH)₂D"*, para ser
presentado como Tesis Doctoral.

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



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 Dña. CONCEPCION GARCIA LACALLE
ha realizado bajo la dirección del Prof. D. Angel
Nogales Espert, el trabajo titulado:
*"MARCADORES BIOQUIMICOS DEL
METABOLISMO OSEO EN LACTANTES.
Validación de los métodos de cuantificación de
los metabolitos 25(OH)D y 1,25(OH)₂D"*, para ser
presentado como Tesis Doctoral.

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



Fdo.: Prof. D. Enrique Casado de Frias

A Gustavo
A Nacho
A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Quiero en estas líneas expresar mi testimonio de gratitud a todas las personas, que con su participación hicieron posible la realización de este trabajo.

Al Profesor Nogales, director de esta Tesis y espíritu permanente de trabajo y rectitud científica, por sus enseñanzas, consejos y la ayuda prestada en todo momento

A Luisa Larrodera, hace unos años en el mes de Abril, entraste en mi vida, ahora ya no puedes salir de mi corazón. Muchas gracias por todo.

A la casa NESTLE que ha proporcionado los productos infantiles para la alimentación de los niños.

A todo el personal que trabaja en la Sección de Hormonas del laboratorio de Bioquímica, en especial a Juan y M^a Angeles, por su desinteresada colaboración y estímulo constante.

A Luisa, por todas las tardes compartidas pasando consulta con los niños.

A toda mi familia, sobre todo a Josefina, sin cuya colaboración este trabajo no hubiese salido adelante.

Y por último, y por ello no menos importante, a Gustavo, por TODO.

INDICE

INTRODUCCION

1. Introducción	2
2. Aspectos históricos	5
3. Aspectos fotobiológicos	8
4. Metabolismo de la vitamina D	11
4.1 Regulación del metabolismo del 25-hidroxiciferol	15
4.2 Metabolismo extrarrenal de 25-hidroxiciferol a 1,25-dihidroxiciferol	17
4.3 Metabolismo alternativo del 25-hidroxiciferol y 1,25-dihidroxiciferol	18
5. Funciones biológicas del 1,25-dihidroxiciferol	22
5.1 Funciones clásicas del 1,25-dihidroxiciferol	22
5.2 Otras funciones biológicas del 1,25-dihidroxiciferol	25
6. Análisis de la vitamina D y sus metabolitos	29
6.1 Determinación de vitamina D ₂ y vitamina D ₃	30
6.2 Determinación de 24,25-dihidroxiciferol	30
6.3 Determinación de otros metabolitos	31
6.4 Determinación de 25-hidroxiciferol	31
6.5 Determinación de 1,25-dihidroxiciferol	32
7. Utilidad clínica de la determinación de 25-hidroxiciferol y 1,25-dihidroxiciferol	34

OBJETIVOS

Objetivos	38
-----------	----

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

1. Material biológico	41
1.1 Población estudiada	41
1.2 Recogida y almacenamiento de muestras	41
2. Instrumental y reactivos	42
2.1 Material instrumental	42
2.2 Reactivos	43

METODOS

1. Método de determinación de 25-hidroxiciferol	45
1.1 Fundamento del método	45
1.2 Componentes del análisis de 25-hidroxiciferol	45
1.3 Realización del análisis de 25-hidroxiciferol	46
2. Control de calidad de los reactivos utilizados para la determinación de 25-hidroxiciferol	49
2.1 Antígeno marcado	49
2.2 Antígeno frío	50
2.3 Proteína ligadora	51

3. Validación del método de determinación de 25-hidroxiciferol	52
3.1 Estudio de la imprecisión	52
3.2 Estudio de la inexactitud	53
3.3 Estudio de la especificidad	53
3.4 Estudio del límite de detección	54
3.5 Estudio del intervalo analítico	55
3.6 Intervalo de referencia	55
4. Método de determinación de 1,25-dihidroxiciferol	56
4.1 Fundamento del método	56
4.2 Componentes del análisis de 1,25-dihidroxiciferol	56
4.3 Realización del análisis de 1,25-dihidroxiciferol	57
5. Control de calidad de los reactivos utilizados en la determinación de 1,25-dihidroxiciferol	65
5.1 Antígeno marcado	65
5.2 Antígeno frío	66
5.3 Proteína ligadora	66
6. Validación del método de determinación de 1,25-dihidroxiciferol	67
6.1 Estudio de la imprecisión	67
6.2 Estudio de la inexactitud	67
6.3 Estudio de la especificidad	68
6.4 Estudio del límite de detección	69
6.5 Estudio del intervalo analítico	69
6.6 Intervalo de referencia	69
7. Evaluación matemática	70
8. Búsqueda bibliográfica	71

RESULTADOS

1. Curva estándar media del método de determinación de 25-hidroxiciferol	73
2. Ligazón inespecífica en el método de determinación de 25-hidroxiciferol	76
3. Control de calidad de los reactivos utilizados para la determinación de 25-hidroxiciferol	76
3.1 Antígeno marcado	76
3.2 Antígeno frío	79
3.3 Proteína ligadora	82
4. Validación del método de determinación de 25-hidroxiciferol	86
4.1 Estudio de la imprecisión	86
4.2 Estudio de la inexactitud	90
4.3 Estudio de la especificidad	91
4.4 Límite de detección	93
4.5 Intervalo analítico	93
4.6 Intervalo de referencia	93
5. Curva estándar media del método de determinación de 1,25-dihidroxiciferol	96
6. Ligazón inespecífica en el método de determinación de 1,25-dihidroxiciferol	100
7. Control de calidad de los reactivos utilizados para la determinación de 1,25-dihidroxiciferol	100
7.1 Antígeno marcado	100
7.2 Antígeno frío	103
7.3 Proteína ligadora	106

8. Validación del método de determinación de 1,25-dihidroxiciferol	110
8.1 Estudio de la imprecisión	110
8.2 Estudio de la inexactitud	115
8.3 Estudio de la especificidad	115
8.4 Límite de detección	117
8.5 Intervalo analítico	117
8.6 Intervalo de referencia	117

DISCUSION

Discusión	121
---------------------	-----

CONCLUSIONES

Conclusiones	147
------------------------	-----

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía	151
------------------------	-----

INTRODUCCION

1. - INTRODUCCION

El origen de la vitamina D data de hace 0,5 billones de años cuando se produjo un hábitat concreto en el fitoplacton oceánico, expuesto a determinadas condiciones de radiación solar (1). Con la evolución de los vertebrados terrestres, adquirió gran importancia en relación con el desarrollo y mantenimiento de la osificación del esqueleto.

Durante las últimas décadas, diferentes investigaciones pusieron de manifiesto que la vitamina D es una hormona y no una vitamina (2). Si la exposición a la luz solar es adecuada no se necesitan suplementos dietéticos. El principio activo de la vitamina D se sintetiza bajo control metabólico a través de hidroxilaciones sucesivas en el hígado y en el riñón, y es transportado a través de la sangre hasta los tejidos efectores (intestino delgado y hueso, fundamentalmente) para mantener la homeostasis del calcio. Los iones calcio y fosfato, la hormona paratiroidea y probablemente otras hormonas peptídicas y esteroideas, desempeñan un papel decisivo directo o indirecto en la regulación del metabolismo renal de la vitamina D (Figura 1).

Al hablar de vitamina D no podemos referirnos a un único compuesto, sino a una familia de ellos que presentan actividad vitamínica, siendo los más importantes la vitamina D₂ o ergocalciferol y la vitamina D₃ o colecalciferol. De modo general se usa el término de vitamina D, que se aplica a ambas formas, ya que se piensa que en el hombre su metabolismo y funciones son similares.

El análisis de los defectos hereditarios o adquiridos en los procesos metabólicos, ha permitido conocer mejor la fisiopatología de algunos trastornos del

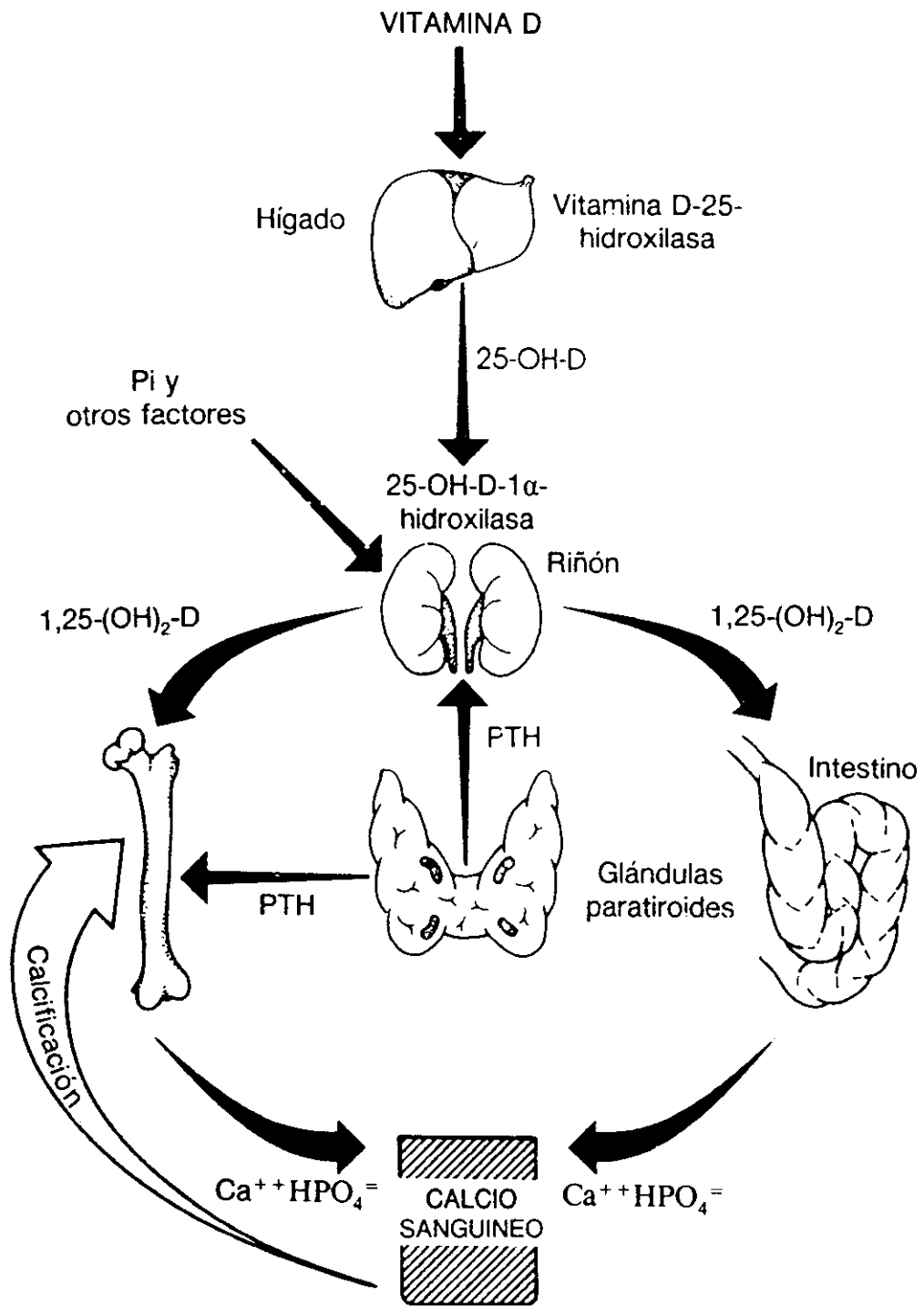


Fig. 1 .- Mecanismo de regulación de la vitamina D

metabolismo óseo, del calcio y del fósforo (3). Estos descubrimientos han impulsado ciertos avances como: la síntesis química de metabolitos y análogos activos de la vitamina D, el uso clínico de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en muchos estados de resistencia a la vitamina D, y el desarrollo de análisis para determinar la concentración sérica de los metabolitos de la vitamina D.

2 . – ASPECTOS HISTORICOS

Hay evidencia de que la mayoría de los animales terrestres y plantas son capaces de producir vitamina D durante su exposición a la luz solar (4). Desde el punto de vista humano, algunos historiadores relatan la existencia de raquitismo desde el siglo II a. de C., aunque la enfermedad no fue considerada como tal, hasta que las poblaciones se congregaron en el norte de Europa justamente antes de su industrialización. En la mitad del siglo XVII Whisler, Glisson y DeBoot de forma independiente, reconocieron que muchos de los niños que vivían en zonas poco soleadas de ciudades industrializadas, desarrollaban una enfermedad severa que afectaba a los huesos produciendo deformidades del esqueleto. La incidencia de esta patología aumentó de forma significativa durante la industrialización, sobre todo en el norte de Europa y América, hasta tal punto, que diferentes estudios realizados en autopsias en el siglo XIX en Leiden, sugerían que el 80-90% de los niños criados en ciudades multitudinarias presentaban la enfermedad (5). Ya en 1822 Sniadecki verificó la importancia de la exposición al sol para la prevención y curación del raquitismo (6), basándose en el hecho de que los niños que vivían en el interior de Varsovia presentaban una alta incidencia de enfermedad ósea, en comparación con los que vivían en zonas rurales a las afueras de la ciudad. Sin embargo, se dió poca importancia al ambiente como causa de enfermedad hasta 1890, cuando Palm publicó un estudio epidemiológico de todo el Imperio Británico y de Oriente, en el que revelaba que el raquitismo era excepcional en niños que vivían en ciudades pobres de China, Japón e India donde la alimentación era escasa, mientras que los niños de clase media de las ciudades industrializadas de las Islas Británicas presentaban una alta

incidencia de la enfermedad. En 1919 Huldschinsky comprobó que cuatro pacientes con raquitismo severo, curaban al ser sometidos a la exposición de una lámpara de cuarzo con vapor de mercurio, y pensó que la radiación responsable de la curación era la misma que la que provocaba la melanización de la piel.

En 1921, McCollum y cols. (7) reseñaron la importancia del fósforo de la dieta en los fenómenos de osificación en ratas en crecimiento, demostrando que cuando la dieta era pobre en fósforo y factor antirraquítico, las ratas desarrollaban raquitismo, cosa que no sucedía cuando el aporte de calcio y fósforo era adecuado, aunque el factor antirraquítico fuera deficiente. Se desconocía si el factor antirraquítico del aceite de hígado de bacalao era la vitamina A u otra sustancia diferente. McCollum y cols. oxidaron el aceite de hígado de bacalao y observaron que la actividad de la vitamina A, se perdía permaneciendo la actividad antirraquítica, que fue atribuida a otra sustancia liposoluble que denominaron vitamina D (7).

El hecho de que el factor antirraquítico pudiera generarse en la piel, tras una exposición a la luz solar o radiación ultravioleta e ingerirse en la dieta, obligó a pensar que podía tratarse de factores diferentes. Para esclarecer este punto Powers y cols. (8) realizaron un experimento en ratas raquíticas a las que trataron con aceite de hígado de bacalao o radiación ultravioleta, y obtuvieron el mismo resultado.

Steenbock y Black (9) y Hess y Weinstock (10) de forma independiente, demostraron que la irradiación de muchos alimentos con una lámpara de cuarzo con vapor de mercurio, proporcionaba propiedades antirraquíticas a los mismos.

Inicialmente se pensó que la sustancia que se producía por la acción de la luz ultravioleta era, el colesterol en los animales y el fitosterol en los vegetales. Posteriormente se comprobó que no se trataba del colesterol, porque éste perdía sus propiedades

antirraquíticas al ser purificado por procedimientos químicos, sino que era una sustancia relacionada con él.

El paso siguiente fue la identificación y aislamiento de la vitamina D. Windaws y cols. fueron los primeros en aislar una sustancia cristalina que denominaron vitamina D₁, identificada posteriormente como una mezcla de ergocalciferol y lumisterol. Años más tarde, se consiguió identificar 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 investigaciones posteriores Steenbock y cols. observaron que los pájaros curaban del raquitismo peor con ergosterol que con aceite de hígado de bacalao (11), basándose en este hecho, el grupo de investigación de Windawus en 1935 sintetizó químicamente el 7-dehidrocolesterol o provitamina D₃ (12) y demostró que su irradiación con luz ultravioleta daba origen a la vitamina D₃ o colecalciferol.

La única diferencia estructural entre la vitamina D₂ y la vitamina D₃ es la cadena lateral, que en la vitamina D₂ contiene un doble enlace entre C₂₂ y C₂₃ y un grupo metilo en C₂₄.

La vitamina D₂ es de 10 a 20 veces menos activa que la vitamina D₃ en pollos. Sin embargo, se ha asumido que en mamíferos, incluido el hombre, tienen el mismo potencial biológico, se metabolizan de forma similar y que las proteínas ligadoras de vitamina D se unen a la vitamina D₂ con una eficiencia de 1,5 a 2 veces menor que a la vitamina D₃.

3. – ASPECTOS FOTOBIOLOGICOS

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 (13); 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 que 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. Los cambios intensos de la temperatura en la superficie cutánea no modifican este proceso de conversión, ya que ocurre en las capas de crecimiento activo de la epidermis, en donde la temperatura permanece relativamente constante. Los dos compuestos, vitamina D y previtamina D, se encuentra en un equilibrio que a 37°C y expresado en concentraciones es de 89/11.

Aunque 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 (14). De los distintos metabolitos

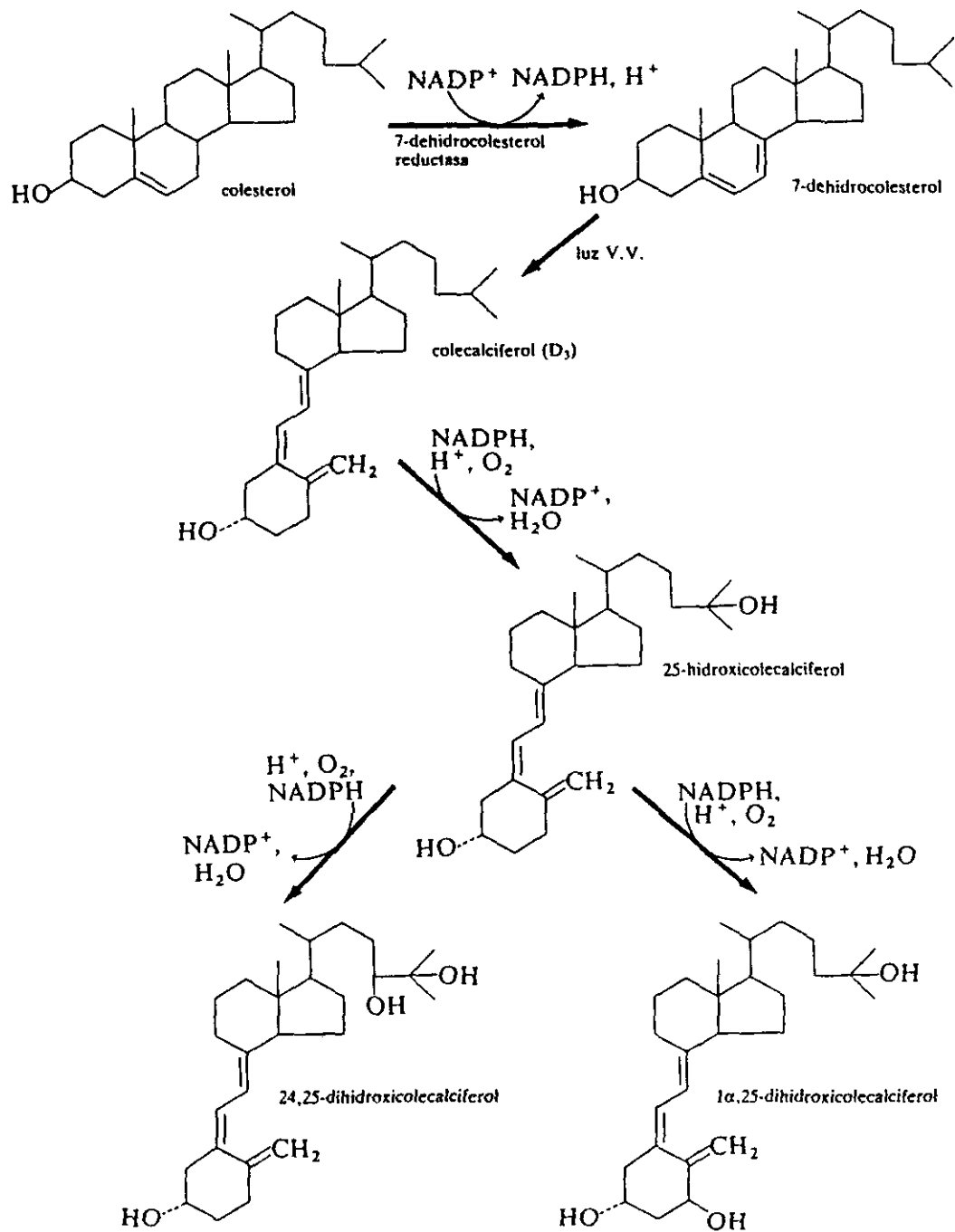


Fig. 2.- Estructura de la vitamina D y de sus metabolitos

formados en la piel, únicamente la vitamina D₃ tiene alta afinidad para las proteínas plasmáticas de transporte de vitamina D, por lo que pasa preferentemente a la circulación.

El envejecimiento disminuye la capacidad de síntesis de vitamina D₃ por la piel, produciéndose una reducción a la mitad a partir de los 70 años (15).

4 . - METABOLISMO DE LA VITAMINA D

La vitamina D que existe en el organismo tiene dos orígenes: la sintetizada en la piel (aporte endógeno) que es la vía principal de obtención de vitamina D para la mayoría de los individuos, y la obtenida a partir de la dieta (aporte exógeno) bien por ingerir alimentos enriquecidos con esta sustancia, o por tomar alimentos ricos en la misma, fundamentalmente hígado, yema de huevo y aceite de hígado de pescado. La vitamina D procedente del aporte exógeno se absorbe con el concurso de las sales biliares, utilizando el mecanismo de absorción de las grasas (Figura 3).

La edad repercute negativamente en la síntesis de vitamina D por la piel, pero no afecta a la absorción intestinal (16). En los síndromes de malabsorción intestinal, enfermedad de Crohn, Whipple y fibrosis quística, la absorción de vitamina D puede estar comprometida. Las enfermedades que afectan al intestino delgado a nivel más distal o al intestino grueso, generalmente no afectan a la absorción de vitaminas liposolubles (17).

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. No existe un órgano específico de almacenamiento de vitamina D, aunque si se ingiere en exceso, las mayores concentraciones se encuentran en el hígado, tejido adiposo y músculo.

La vitamina D sintetizada en la piel o ingerida en la dieta, debido a su carácter

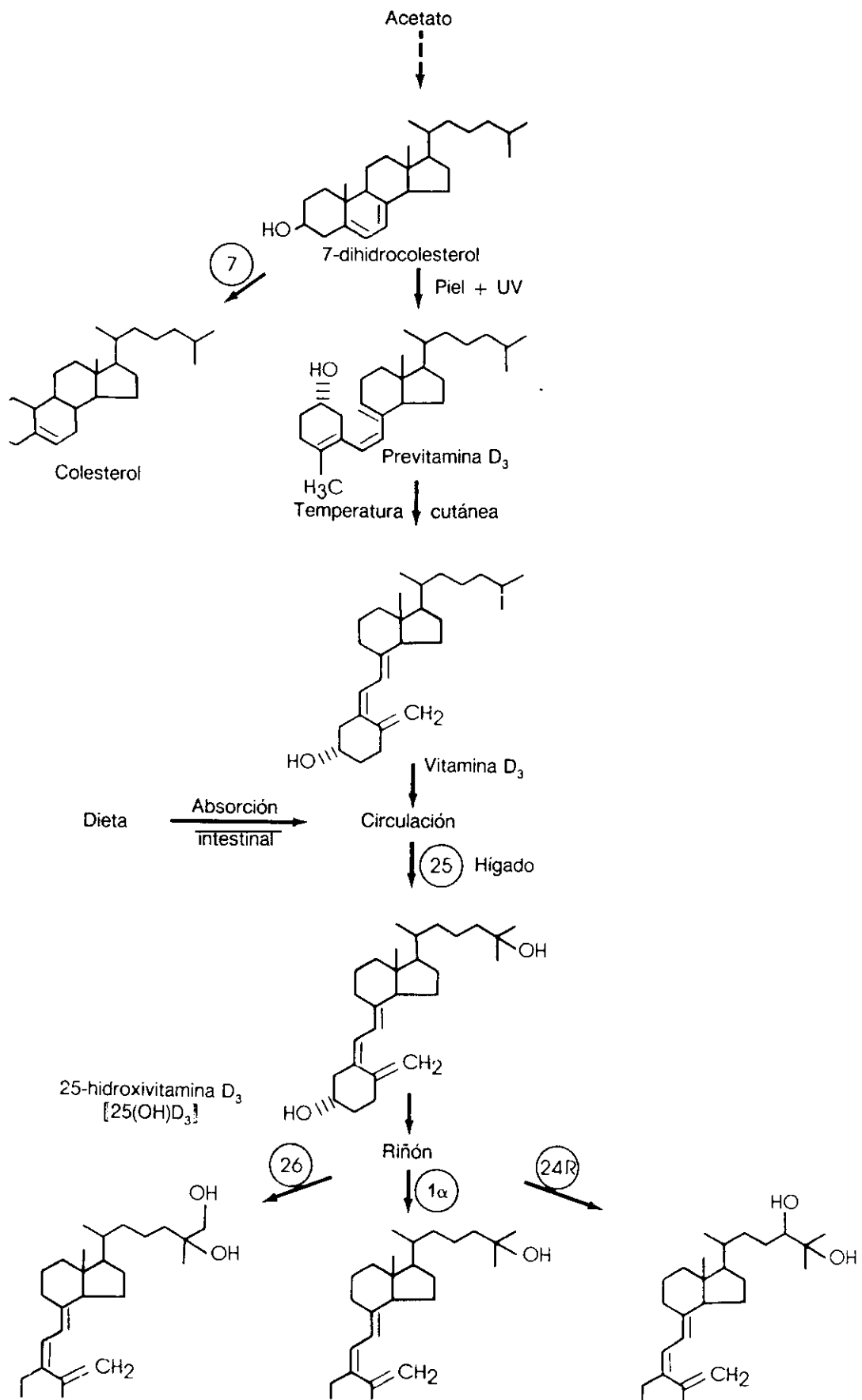


Fig. 3.- Metabolismo de la vitamina D

liposoluble, pasa a la circulación sanguínea unida a una proteína transportadora, la DBP (vitamin D binding protein), también llamada globulina grupo específico. La DBP es una globulina alfa de peso molecular de 56.000 D. constituida por una cadena polipeptídica que fija equimolecularmente a la vitamina D y a sus metabolitos hidroxilados. Su concentración en plasma es de 6000 nmol/L. La máxima afinidad de unión es para el 25-hidroxiciferol (25(OH)D), el 24,25(OH)₂D compite efectivamente con el 25(OH)D a concentraciones similares. La vitamina D y el 1,25-dihidroxiciferol (1,25(OH)₂D) son de 5 a 10 veces menos competitivos. Las afinidades de los distintos metabolitos por la DBP son proporcionales a sus vidas medias en el plasma; en consecuencia el 1,25(OH)₂D pasa fácilmente a los tejidos mientras que el 25(OH)D lo hace con mayor dificultad.

El complejo vitamina D-DBP es transportado al hígado donde la vitamina D se hidroxila en los hepatocitos mediante la 25-hidroxilasa-vitamina D localizada en mitocondrias y microsomas del parénquima celular hepático (18). El 25(OH)D es uno de los metabolitos circulantes principales de la vitamina D; su vida media es de aproximadamente 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 conversión de vitamina D hacia 25(OH)D puede verse comprometida en las enfermedades hepáticas colestásicas o parenquimatosas severas (19), como consecuencia de la reducción de las reservas de 25-hidroxilasa-vitamina D y de la malabsorción intestinal.

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 (20).

Cuando aumenta el metabolismo de 25(OH)D a 1,25(OH)₂D en enfermedades

como el raquitismo vitamina D dependiente tipo II, sarcoidosis, enfermedades granulomatosas, hiperparatiroidismo primario y calcinosis tumoral hiperfosfatémica, se observan concentraciones bajas de 25(OH)D aunque dentro de límites normales (21,22,23).

El 25(OH)D carece de efectos biológicos *in vivo* a concentraciones fisiológicas, pero actúa a concentraciones elevadas *in vitro* (24). 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 o C₂₄ (25), dependiendo del balance calcio-fósforo, para dar lugar al 1,25-dihidroxitamina D (1,25(OH)₂D) reconocido como el metabolito activo de la vitamina D, o al 24R,25-dihidroxitamina D (24,25(OH)₂D). Aunque el riñón es el órgano principal donde se encuentran ubicadas estas hidroxilasas, en la placenta (26,27) y en cultivos celulares de hueso, piel y monocitos también se han observado estos procesos (28,29). La hidroxilación en 1 α se realiza por medio de la enzima 25(OH)D-1 α -hidroxilasa (1 α -hidroxilasa), que es una monoxigenasa de función mixta que se localiza en la membrana interna de las mitocondrias de las células del túbulo proximal de la nefrona. La 1 α -hidroxilasa es una cadena de transporte electrónico formada por tres componentes proteicos: ferredoxina reductasa, ferredoxina y citocromo P₄₅₀. La ferredoxina reductasa es una flavoproteína que recibe electrones del fosfato de nicotinamida-adenín-dinucleótido (NADPH) que son transportados hasta la ferredoxina. La ferredoxina es un potente regulador que transporta los electrones hasta el citocromo P₄₅₀, componente catalítico que mediante el concurso del oxígeno molecular, producirá la hidroxilación del sustrato 25(OH)D en posición 1 α de la molécula. Esta reacción está regulada finamente por iones: calcio, fósforo y potasio, y por hormonas: hormona paratiroidea, AMPc, calcitonina, hormonas sexuales, hormona de crecimiento e insulina entre otras.

La actividad enzimática del tubo contorneado proximal se pierde tras la

tiroparatiroidectomía y aumenta con la administración de hormona paratiroidea y AMPc; la actividad de la 1α -hidroxilasa de la pars recta no se detecta en ausencia de calcitonina. Estudios realizados en microsecciones de segmentos de nefronas confirman la presencia de dos formas diferentes de 1α -hidroxilasa. Las enzimas del tubo contorneado proximal se activan por la hormona paratiroidea a través del AMPc, las de la pars recta son estimuladas 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 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (30).

4.1 REGULACION DEL METABOLISMO DEL $25(\text{OH})\text{D}$

No se conoce con precisión el mecanismo por el que la hormona paratiroidea influye en el metabolismo renal del $25(\text{OH})\text{D}$. 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 (31). Cuando a ratas deficientes de vitamina D se las somete a una tiroparatiroidectomía, disminuye su capacidad de síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, y la recuperan cuando se les administra hormona paratiroidea (32). Si a las mismas ratas se les aporta una dieta rica en calcio y pobre en fósforo, revierten los efectos de la tiroparatiroidectomía y son capaces de sintetizar $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. De estos datos se puede deducir que la regulación del fósforo sérico es el factor más importante para la actividad de la 1α -hidroxilasa. En el hombre, esta teoría parece confirmarse ya que 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 (33). Los suplementos de fósforo en la dieta producen

el efecto contrario.

Aunque se ha demostrado que la hipocalcemia induce la 1α -hidroxilasa renal, parece que el proceso es secundario al efecto de la hormona paratiroidea, que estimula la adenilciclasa 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 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (34).

La hormona paratiroidea es muy importante en la regulación "momento a momento" de la 1α -hidroxilasa renal (35), pero en este proceso enzimático influyen otros factores. 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 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (36). Los estrógenos, la prolactina 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* (37). Estas hormonas, por sí solas y en circunstancias normales, no parecen aumentar la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, por lo que se cree que han de existir otros factores desconocidos que juegan un papel a este nivel.

Los esteroides sexuales tienen un efecto indirecto en el metabolismo renal del $25(\text{OH})\text{D}$ en pollos. Sin embargo en el hombre su papel es confuso. La concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ no está alterada de forma significativa en mujeres jóvenes con anorexia nerviosa y déficit de estrógenos (38). Durante la fase de maduración sexual de los niños, el aumento de la testosterona no se acompaña de alteraciones de la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (39). Sin embargo durante la menopausia, la disminución de los estrógenos tiene un efecto significativo en la producción renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (40). En mujeres osteoporóticas los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ son ligeramente más bajos que en mujeres control de la misma edad

y los tratamientos con estrógenos, producen un ligero aumento en los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

La edad puede disminuir el efecto de la hormona paratiroidea en el metabolismo del $25(\text{OH})\text{D}$ a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Experimentalmente se ha observado que en individuos jóvenes, la infusión de fragmentos activos de hormona paratiroidea (1-34 PTH) duplica los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ a las 24 horas, y esto no ocurre en ancianos osteoporóticos (41).

El propio $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ también modifica el metabolismo renal del $25(\text{OH})\text{D}$, reduce la actividad de la $25(\text{OH})\text{D}$ - 1α -hidroxilasa y aumenta el metabolismo hacia $24,25$ -dihidroxitamina D (42). En general la 1α -hidroxilasa y la 24 -hidroxilasa responden a los mismos factores pero con efectos opuestos.

4.2 METABOLISMO EXTRARRENAL DE $25(\text{OH})\text{D}$ A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

Hennemann y cols. pensaron que la absorción intestinal elevada de calcio, podía ser la causante de la hipercalcemia e hipercalciuria observada en enfermos con sarcoidosis (43). El conocimiento de que la vitamina D debía de transformarse en $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ para realizar su función en el intestino, llevó a diferentes investigadores a especular que el aumento de la absorción intestinal de calcio, era consecuencia de una producción anormal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Posteriormente se ha observado que otras enfermedades granulomatosas como tuberculosis, silicosis y enfermedades fúngicas, presentan concentraciones inapropiadamente altas o normal-altas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Inicialmente se atribuyó el aumento de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ a un defecto de la regulación renal. El hallazgo de enfermos anéfricos con sarcoidosis, hipercalcemia y niveles elevados de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, apuntó la idea de que la transformación de $25(\text{OH})\text{D}$ a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ podía realizarse también fuera

del riñón (44), como se ha podido demostrar en homogenados de ganglios linfáticos, en cultivos de macrófagos alveolares pulmonares de pacientes con sarcoidosis, y en macrófagos activados por lipopolisacáridos de las paredes de bacterias gram negativas o por interferón gamma.

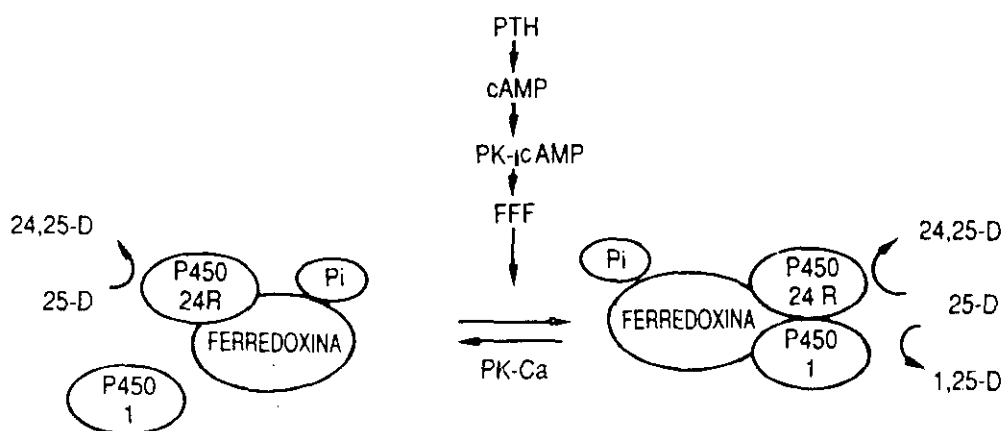
Ciertos tipos de linfomas tienen capacidad de metabolizar 25(OH)D a 1,25(OH)₂D, aunque se desconoce el mecanismo que activa la 1 α -hidroxilasa en estos enfermos. Cultivos de linfocitos de cordón umbilical infectados por virus HTLV-1, son capaces de inducir el metabolismo de 25(OH)D hacia un metabolito identificado como 1,25(OH)₂D por espectroscopia de masa, de lo que se desprende que estas células infectadas por virus poseen la maquinaria necesaria para sintetizar esta hormona (45).

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

La hidroxilación en 24R se lleva a cabo por la 25-hidroxi-vitamina D-24R-hidroxilasa. Esta es una enzima similar a la 1 α -hidroxilasa y se regula por un mecanismo inverso, estando su actividad íntimamente ligada a los niveles de 1,25(OH)₂D. En los últimos años se ha propuesto un modelo para la modulación de las actividades de las enzimas 1 α y 24R-hidroxilasa. La señal hormonal procedente de la hormona paratiroidea interactúa con la adenilato ciclasa originando la síntesis de AMPc, para activar una proteínofosfatasa denominada fosfoferredoxina fosfatasa (46). Se produce la desfosforilación de la ferredoxina, permitiendo así su unión con el citocromo P₄₅₀-1 α para dar origen a la síntesis de 1,25(OH)₂D. Por otra parte, una proteincinasa calcio-dependiente actuaría sobre la ferredoxina fosforilándola, permitiendo el acoplamiento de ésta con el citocromo P₄₅₀-24R dando origen a la síntesis de 24,25(OH)₂D, teniendo lugar el desacoplamiento de la

ferredoxina con el citocromo $P_{450-1\alpha}$ y por tanto, inhibiendo la síntesis de $1,25(OH)_2D$. En este modelo se contempla el que las enzimas 1α y 24R-hidroxilasa tienen una parte común para ambas, la ferredoxina reductasa y la ferredoxina, y sólo sería específico de cada enzima el citocromo P_{450} . El acoplamiento de la ferredoxina con ambos citocromos estaría modulado por los procesos de fosforilación/desfosforilación, dando como resultado la modulación de la síntesis de $1,25(OH)_2D$ y $24,25(OH)_2D$ (Figura 4).

Fig. 4.- Regulación de la síntesis de $1,25(OH)_2D$ y $24,25(OH)_2D$



La enzima 24R-hidroxilasa además de en riñón, también se localiza en otros órganos. En cultivos de células que poseen receptores nucleares para el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, como los condrocitos, queratinocitos, fibroblastos de la piel, células intestinales y melanomas, también se metaboliza $25(\text{OH})\text{D}$ hacia $24,25(\text{OH})_2\text{D}$. Aunque el $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ tiene una concentración plasmática 100 veces mayor que la del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, su mecanismo de acción está poco claro, lo más probable es que la hidroxilación en C_{24} constituya la primera etapa para la degradación tanto de $25(\text{OH})\text{D}$ como de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, aunque hay algunos autores que le atribuyen un papel complementario en el crecimiento óseo (47) y en el desarrollo embrionario (48).

En condiciones fisiológicas el $25(\text{OH})\text{D}$ se metaboliza en C_{26} para formar el $25\text{S},26$ -dihidroxitamina D_3 [$25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$] (25) cuya concentración en sangre es también un reflejo de la situación nutricional de $25(\text{OH})\text{D}$ en el hombre. No tiene una actividad biológica especial, pero remeda las acciones del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ cuando es hidroxilado en C_1 a nivel del riñón formando $1,25\text{S},26$ -trihidroxitamina D_3 . No se conoce demasiado sobre la regulación de este metabolito, pero el riñón parece que es el lugar fundamental de su metabolismo.

La hidroxilación del $25(\text{OH})\text{D}$ en C_{23} da lugar al $23\text{S},25$ -dihidroxitamina D_3 . Este metabolito es el precursor de un paso adicional que produce otro metabolito identificado como 25 -hidroxivitamina D_3 - $23,26$ -lactona. La lactona puede identificarse en el suero de animales y hombres que han recibido dosis farmacológicas de vitamina D. No hay evidencia de que tenga actividad relacionada con la $25(\text{OH})\text{D}$ a nivel intestinal ni óseo, pero las proteínas ligadoras de $25(\text{OH})\text{D}$ tienen una afinidad por él de 5 a 7 veces mayor que para el $25(\text{OH})\text{D}_3$ (18).

Además de las múltiples hidroxilaciones que pueden producirse en la cadena

lateral de la vitamina D, los hidroxilos también pueden oxidarse. El 24,25(OH)₂D₃ y el 23,25(OH)₂D₃ se oxidan formando 24-ceto-25(OH)D₃ y 23-ceto-25(OH)D₃, respectivamente.

Hasta la fecha, 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 (49) y la mayoría se consideran como productos de degradación. Mención especial merece la secuencia metabólica por la que se inactiva el 1,25(OH)₂D por la escisión oxidativa de la cadena lateral entre C₂₃ y C₂₄, apareciendo un producto biológicamente inerte e hidrosoluble, el ácido 1 α -hidroxivitamina D-23-carboxílico o ácido calcitroico (50).

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

5.1 FUNCIONES CLÁSICAS DEL 1,25(OH)₂D

Los estudios realizados en los últimos años, permiten concluir que el mecanismo de acción de la vitamina D corresponde al de un sistema hormonal, donde la vitamina D actúa como una prohormona y el 1,25(OH)₂D como la verdadera hormona sintetizada en el riñón, 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 la estimulación de la absorción intestinal de calcio. Entre la administración de la vitamina D y la respuesta intestinal transcurre un periodo de latencia de 24 a 48 horas (51). Este periodo puede reducirse a 20-24 horas si se administra 25(OH)D, e incluso a 8-12 horas si se administra directamente 1,25(OH)₂D, lo que confirma la vía metabólica indicada. Sin embargo, aunque se administre el metabolito dihidroxilado a dosis altas, se mantiene un periodo de latencia que resulta imposible de reducir. Este fenómeno es similar al que se observa con las hormonas esteroideas (52), y viene condicionado porque se requiere un tiempo para que tenga lugar la interacción entre la hormona y el receptor celular, la fijación selectiva del complejo hormona-receptor a la cromatina nuclear, y especialmente, para la síntesis del ARN mensajero específico y del material proteínico que constituirá el verdadero vehículo de la respuesta hormonal.

La administración de 1,25(OH)₂D₃ marcado radiactivamente permite comprobar su localización en el núcleo de las células del epitelio intestinal, al cabo de cuatro horas,

después de haberse fijado a una fracción proteínica y soluble del citoplasma, denominada receptor. Una vez el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se encuentra unido a la cromatina, se detecta una activación de la síntesis de ARN y una producción de proteína transportadora de calcio intracelular (CaBP). La cantidad formada de esta proteína es proporcional a la del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ localizada en la mucosa intestinal, y se correlaciona con la actividad de la 1α -hidroxilasa renal, y con el transporte intestinal de calcio mediado por la vitamina D. Este proceso se interfiere, experimentalmente, por la presencia de Actinomicina D, inhibidor de la síntesis de ARN dependiente de ADN, de acuerdo con un mecanismo de acción similar al de las hormonas esteroideas.

Existe acuerdo unánime en que las acciones celulares del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se inician por interacción de la hormona con un receptor o proteína ligadora específica, que se ha podido demostrar mediante anticuerpos monoclonales antirreceptor del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ de diferentes especies de mamíferos (53). Los receptores son proteínas intracelulares similares a las de las hormonas esteroideas. El descubrimiento del receptor para el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ data del año 1961, de los trabajos de Brumbaugh y Haussler (54) y Kream y cols. (55) que comprobaron la existencia de una proteína con capacidad de unión al $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, con una afinidad alta. El receptor presenta un lugar de unión a la hormona ($K_d = 10^{-10}$ - 10^{-11}) y un dominio de unión para el ADN. La importancia del receptor para la función del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se demuestra en los raquitismos vitamina D dependientes tipo II, donde hay una resistencia en los órganos diana a la acción de este metabolito. Se ha comprobado, que en ratas en periodo neonatal, falla la respuesta al $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ hasta los 16-18 días postparto, momento en el que el receptor hace su aparición en el enterocito (56). Esta aparición se acelera con los glucocorticoides y se impide con la adrenalectomía. El mismo comportamiento se observa con el transporte intestinal de calcio.

La unión de la hormona al receptor produce una fosforilación y aumenta la afinidad del receptor para su unión al núcleo y al ADN (52). El complejo hormona-receptor a nivel nuclear, regula la transcripción de los ARN mensajeros específicos que gobiernan la traslación de las proteínas.

Estudios experimentales que emplean $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ marcado radiológicamente, o con inmunoperoxidasas dirigidas frente a anticuerpos monoclonales antirreceptor, han demostrado la localización del receptor sobre todo a nivel del núcleo de las células diana.

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 (57).

La interacción del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ con la célula diana produce alteraciones a dos niveles, uno dependiente de la localización nuclear del complejo hormona-receptor y otro independiente de este fenómeno nuclear. Se han aislado dos poblaciones diferentes de receptores de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en pollos. El 80% de los receptores están en el núcleo y se unen ávidamente al complejo celulosa-ADN; la segunda población está en el citosol, tienen afección por el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pero no se une al complejo celulosa-ADN. De esta forma, aunque la población de receptores del citosol presenta alta afinidad por el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, aparentemente necesita un dominio de unión al ADN. Posiblemente la unión del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ al receptor citosólico controla los efectos no mediados por el núcleo, mientras que la unión de la hormona con los receptores nucleares controla 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 (58).

A nivel intestinal el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ estimula el transporte de calcio y fosfato desde la luz del intestino delgado hacia la circulación (35). El aumento de la resorción ósea

producido por el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ probablemente ocurre de forma sinérgica con la hormona paratiroidea. 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 inmaduras, que poseen receptores para las mismas, y se transforman en osteoclastos maduros, y/o interaccionan con los osteoclastos, que producirían citoquinas y aumentarían la actividad de las células maduras (59). La función del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sobre la regulación renal del calcio y fósforo no se conoce con precisión.

5.2 OTRAS FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

En los últimos años se han localizado receptores para el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en numerosos tejidos, algunos de los cuales aparentemente no tienen relación con el metabolismo del calcio (60,61). Este hecho ha supuesto la posibilidad de conocer otras funciones del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ que además de ser una hormona calciotropa, ejerce un papel en la regulación del sistema inmune y un aumento de la diferenciación celular, entre otras.

A.- EFECTOS DE DIFERENCIACION Y ANTIPROLIFERACION DEL $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

Diferentes tipos de líneas celulares tumorales con receptores para el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en cultivos, responden a esta hormona con una disminución de la tasa de proliferación y un aumento de la diferenciación. Si se exponen células promielocíticas humanas malignas (HL-60) al $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, se observa una maduración hacia macrófagos funcionantes en el plazo de una semana (62). Se desconoce el mecanismo por el que el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ induce la maduración, se sabe que disminuye la expresión del oncogén c-myc

coincidiendo con la disminución de la replicación. No obstante, este efecto no es prolongado, si se elimina el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ de los promielocitos HL-60 en fase de maduración, las células regresan a su estado de malignidad original, y no se suprime la expresión del oncogén c-myc. En la leucemia mieloblástica, para conseguir una supresión celular, se necesitan cantidades elevadas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ que producen hipercalcemias importantes. En la actualidad se investiga sobre análogos de la vitamina D con actividad preferente en la diferenciación de promielocitos sobre su actividad hipercalcemiante, que se consiguen añadiendo un carbono a la cadena lateral o al 26-metilo. El compuesto resultante es 10 veces más activo en la diferenciación de las células HL-60 que la hormona nativa, y no tiene prácticamente efectos en la movilización del calcio óseo.

Los osteoclastos son células activas de la médula ósea que se cree proceden de la línea celular de macrófagos-monocitos circulantes (63). El $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ induce la fusión de monocitos en células multinucleadas gigantes con capacidad de resorción ósea *in vitro* (64). Los osteoclastos de pollos maduros carecen de receptores para el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ y se puede especular que la acción del mismo a nivel óseo, es promover la maduración de las células monocitos-macrófagos hacia osteoclastos multinucleados.

B.- EFECTOS INMUNORREGULADORES DEL $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

La presencia de receptores para el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en linfocitos activados por mitógenos y monocitos de sangre periférica (65), sugiere que la interacción de los metabolitos de la vitamina D con estas células puede modular la respuesta inmune en el hombre. *In vitro*, se ha demostrado que el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ a concentraciones fisiológicas, inhibe la proliferación de células mononucleares periféricas activadas por inhibición de la producción de interleukina 2 (66). Sin embargo, no se ha podido demostrar este efecto inhibitorio, *in vivo*, en sangre

periférica humana. Posiblemente las concentraciones circulantes de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sean inadecuadas para modular la respuesta periférica inmune, pero la acumulación de metabolitos en determinados tejidos, puede ser inmunológicamente importante en el microambiente de los mismos. Diferentes autores apuntan la idea de que la producción local de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ por los macrófagos alveolares en los pacientes con sarcoidosis, puede ser un factor regulatorio importante en la proliferación de linfocitos y en la producción de linfocinas en el espacio alveolar de estos enfermos (67). Se necesita profundizar más en este campo para determinar si realmente el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ es importante en los fenómenos de inmunorregulación en el hombre.

C.- EFECTOS DEL $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ A NIVEL DE LA PIEL

La piel de los mamíferos, además de ser una vía de síntesis de vitamina D_3 , es un órgano diana para las formas activas de esta hormona. Se han identificado receptores para el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en piel de roedores y en cultivos de fibroblastos dérmicos y queratinocitos humanos (68). En cultivos de células humanas, el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe la proliferación de fibroblastos y queratinocitos, estimula la síntesis de 7-dehidrocolesterol, facilita la cornificación de los queratinocitos y aumenta la melanogénesis en células de melanomas.

Para algunos autores, la alopecia presente en los enfermos con raquitismo vitamina D dependiente tipo II, puede estar en relación con la ausencia de receptores bioefectivos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la piel de estos enfermos, ya que la administración de grandes cantidades de este metabolito, no estimula el crecimiento del cabello en estos casos (69).

El $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se ha utilizado como tratamiento en enfermos con psoriasis,

en base a su capacidad de inducir la diferenciación celular e inhibir la proliferación de las células epiteliales, observándose una mejoría de los síntomas en la mayoría de ellos.

6. – ANALISIS DE LA VITAMINA D Y SUS METABOLITOS

Debido a que los niveles de estos metabolitos en sangre son muy bajos, del orden de ng/mL (el 25(OH)D) y pg/mL (el 1,25(OH)₂D), sólo ha sido posible abordar su medida a partir de los estudios realizados por Yalow y Bergson, que dieron como fruto las técnicas de Radioinmunoanálisis (RIA) (70). Hasta ese momento sólo se podían hacer estudios de aproximación por métodos biológicos tales como: observar el crecimiento de la línea epifisaria (71), observar la estimulación de la absorción intestinal de calcio en ratas deficientes de vitamina D (72) o comprobar la estimulación del crecimiento de los animales.

La determinación de los metabolitos de la vitamina D por técnicas de competición proteica o RIA es compleja, debido a los problemas de reacciones cruzadas que presentan estos metabolitos a causa de la poca especificidad de las proteínas ligadoras y anticuerpos, por lo que es necesario el empleo de técnicas de purificación y separación de los mismos, antes de su cuantificación.

La introducción de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la purificación de las muestras, y la síntesis de radioligandos con actividad específica alta, han sido dos avances tecnológicos importantes para la cuantificación de metabolitos de la vitamina D. El 25(OH)D y el 1,25(OH)₂D son los metabolitos que tiene utilidad desde un punto de vista clínico, por esta razón vamos a prestar especial interés en los métodos para su valoración, haciendo una leve mención de las mediciones de vitamina D y otros metabolitos.

6.1 DETERMINACION DE VITAMINA D₂ Y VITAMINA D₃

La cuantificación de vitamina D₂ y vitamina D₃ es una tarea árdua que aporta poca información al clínico. Aunque la determinación de los niveles de vitamina D₃, puede proporcionar un índice de la cantidad de vitamina D sintetizada en la piel después de una exposición a las radiaciones ultravioleta B, no es una medida adecuada de la situación de la vitamina D en un individuo, ya que desaparece rápidamente del suero, y su concentración es muy variable, pudiendo ser baja incluso en verano si el individuo no ha estado expuesto recientemente a una cantidad adecuada de luz solar (73).

La vitamina D al ser menos polar que sus metabolitos hidroxilados, no puede ser purificada o aislada adecuadamente mediante una HPLC de fase normal. Precisa una extracción de los lípidos mediante una cromatografía en columna, purificación mediante HPLC en fase reversa y cuantificación mediante HPLC en fase directa (74).

6.2 DETERMINACION DEL 24,25(OH)₂D

Puede realizarse con HPLC de fase normal con columnas de gel de sílice, utilizando como eluyente Isopropanol-Hexano. El 24,25(OH)₂D migra junto con el 25(OH)D₃-23,26-lactona (75). Ambos metabolitos se pueden separar mediante una HPLC con columnas de afinidad, usando Cloruro de Metileno e Isopropanol. La cuantificación puede realizarse mediante HPLC o análisis de competición que emplean proteínas ligadoras. Queda por demostrar, si esta determinación tan laboriosa se compensa con la información que puede dar al clínico, aunque diferentes autores hablan del papel de este metabolito en el metabolismo óseo como factor en la diferenciación del procolágeno (76).

6.3 DETERMINACION DE OTROS METABOLITOS

En los últimos años se ha investigado sobre la cuantificación de otros metabolitos de la vitamina D, el 25,26(OH)₂D y el 25(OH)D₃-23,26-lactona mediante una HPLC que los purifica del extracto lipídico, como paso previo a su cuantificación por métodos competitivos que emplean proteínas ligadoras.

En el hombre, el papel fisiológico de estos metabolitos es poco conocido. De hecho, el 25(OH)D₃-23,26-lactona es el metabolito renal del 23,25(OH)₂D₃ que se detecta únicamente en el suero de pacientes con intoxicación por vitamina D (77).

Se desconoce el significado de la afinidad alta de la DBP por la lactona, en teoría concentraciones elevadas de este metabolito podrían desplazar el 25(OH)D y el 1,25(OH)₂D de la DBP, y facilitar su unión con los receptores celulares (78).

6.4 DETERMINACION DEL 25(OH)D₂ Y 25(OH)D₃

La determinación de 25(OH)D puede realizarse mediante HPLC, RIA y análisis competitivos que utilizan proteínas ligadoras. Antes de su cuantificación es necesario hacer una extracción de los lípidos del suero, para quitar componentes que producen interferencias.

El extracto lipídico contiene lípidos, vitamina D y sus metabolitos 1,25(OH)₂D, 25(OH)D, 24,25(OH)₂D, 25,26(OH)₂D, 25(OH)D₃-23,26-lactona. Todos ellos se unen a la DBP con cierta afinidad, igual que lo hacen otros lípidos no relacionados con la vitamina D.

La precisión de los métodos se puede mejorar haciendo una cromatografía del extracto lipídico con ácido silícico o LH-20 Sephadex (79), para aislar la fracción que contiene el 25(OH)D previamente a su cuantificación por HPLC o análisis competitivos.

La determinación de 25(OH)D₂ puede tener utilidad clínica en pacientes que toman preparados multivitamínicos que contienen vitamina D₂. La hidroxilasa que actúa sobre

el 25(OH)D en los microsomas hepáticos, no distingue entre las formas de vitamina D₂ y vitamina D₃ como sustrato (80) por esto, ante concentraciones bajas de vitamina D₃ en estos casos, se puede sospechar que la síntesis de vitamina D₃ endógena es deficiente, y que el paciente depende de la dieta o de los suplementos vitamínicos para mantener los niveles de vitamina D suficientes, que garanticen una situación nutricional adecuada. En el laboratorio se dispone de métodos de HPLC de fase normal, que separan 25(OH)D₂ y 25(OH)D₃, para analizarlos independientemente, a través de un detector ultravioleta sensible acoplado al cromatógrafo (81). El límite de detección para estos ensayos oscila entre 2 y 5 ng, por lo que para la cuantificación de los dos metabolitos por separado, se necesita un volumen de muestra grande (2-5 mL de suero), sobre todo ante una sospecha de déficit de vitamina D.

6.5 DETERMINACION DEL 1,25(OH)₂D

El primer análisis para valoración de la concentración de 1,25(OH)₂D se realizó en 1974 (82), precisamente 3 años después de la identificación estructural del 1,25(OH)₂D₃ como un metabolito activo de la vitamina D₃ (83). La clave para el desarrollo del mismo, fue el descubrimiento de una proteína (receptor) del epitelio intestinal de pollo, que presentaba afinidad alta y capacidad de unión baja, y que podía utilizarse como proteína ligadora específica en las técnicas de radioligandos. Los primeros ensayos necesitaban gran volumen de suero (20 mL) y 3 pasos de purificación cromatográfica previos al análisis. Recientemente se han mejorado los métodos, al disponer de trazadores con una actividad específica alta, y de cromatógrafos mejores para la purificación de las muestras, existiendo diferentes preparados comerciales para la valoración del 1,25(OH)₂D.

Los ensayos clásicos de análisis competitivos de proteínas ligadoras, utilizan como receptor la proteína aislada del intestino de pollos deficientes en vitamina D; esto

supone una desventaja porque discrimina contra la unión al $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ en favor del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. De esta forma, como ambos metabolitos son biológicamente equipotentes, no pueden medirse con eficiencia comparable y hay una infravaloración de los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. Este hecho puede tener alguna importancia cuando se determinan valores de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en pacientes con suplementos nutricionales de vitamina D_2 .

Estos problemas se han solucionado al disponer de receptores procedentes del timo de ternera, que ligan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ y $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con idéntica capacidad y afinidad. De esta forma, se pueden medir con mayor precisión los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ de los extractos lipídicos de pequeñas cantidades de suero (0.5 a 1 mL), después de una purificación a través de un cartucho de polímeros de silicio (84).

El radioinmunoanálisis también se ha utilizado como método para medir la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, aunque tiene el inconveniente de que los anticuerpos fabricados frente a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, presentan reacciones cruzadas con otros metabolitos de la vitamina D.

Ster y cols. (85) desarrollaron un bioanálisis muy sensible para la valoración del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, que mide la liberación de ^{45}Ca en cultivos, previamente marcados, de tibia y peroné de ratas.

7.- UTILIDAD CLINICA DE LA DETERMINACION DE 25(OH)D Y 1,25(OH)₂D

El 25(OH)D es el metabolito de elección para conocer el estado nutricional de vitamina D adquirida de forma endógena o exógena (86). Valores muy bajos o indetectables pueden indicar una falta de sustrato para la 25-hidroxilasa-vitamina D hepática, una alteración de la actividad de dicha enzima, una alteración de la síntesis de DBP o de su unión con el 25(OH)D, o un catabolismo acelerado de 25(OH)D. El déficit de sustrato puede estar en relación con una exposición insuficiente a la luz solar y/o una malabsorción intestinal de vitamina D (87).

Las enfermedades hepatocelulares pueden producir un déficit de 25(OH)D cuando esté comprometido el sustrato vitamina D₂ o vitamina D₃. Sin embargo, no es frecuente encontrar disminución de 25(OH)D con niveles de vitamina D normales, excepto cuando la alteración hepática es muy intensa y la actividad enzimática se ve comprometida (88).

La pérdida de DBP a través del riñón, en las proteinurias del síndrome nefrótico; el intestino, en las enteropatías pierdeproteínas; o la piel, en las quemaduras importantes, puede asociarse con disminución de los niveles de 25(OH)D.

La valoración del 25(OH)D también es importante para el seguimiento de los tratamientos con suplementos vitamínicos, así como para valorar la intoxicación por vitamina D por ingestión o administración parenteral. Los individuos normales, ante una excesiva exposición a las radiaciones ultravioleta, no desarrollan intoxicación por vitamina D₃ porque

sólo una pequeña cantidad de esta vitamina se transforma en la piel. Si la exposición persiste, la previtamina D₃ se transforma en fotoisómeros biológicamente inertes como taquisterol y lumisterol, y la vitamina D₃ se degrada a 5,6-trans-vitamina D₃ y suprasterol 1 y 2.

Ante un paciente con hipocalcemia hay que estudiar la situación de las hormonas que intervienen en el metabolismo del calcio: la vitamina D y la hormona paratiroidea. En el primer caso, lo que aporta más información es el 25(OH)D, porque al tener una vida media larga, es un índice excelente de la cantidad de vitamina D sintetizada en el hígado y de la cantidad de sustrato (25(OH)D) disponible para la síntesis del metabolito activo (1,25(OH)₂D). En pacientes hipocalcémicos, los niveles fróncamente disminuídos de 25(OH)D casi siempre indican síntesis cutánea y aporte dietético deficiente.

La hipocalcemia con niveles de 25(OH)D normales o elevados, indica déficit o disminución de la bioefectividad de la hormona paratiroidea, alteración adquirida del metabolismo del 25(OH)D a 1,25(OH)₂D, alteración hereditaria de la síntesis de 1,25(OH)₂D, o defecto de la acción del 1,25(OH)₂D sobre los órganos diana. Las dos últimas situaciones pueden diferenciarse por los niveles de 1,25(OH)₂D, que serán bajos o indetectables en el raquitismo vitamina D dependiente tipo I, y elevados en raquitismo vitamina D dependiente tipo II (30).

En los pacientes con disminución de la síntesis de hormona paratiroidea o alteraciones en los órganos diana para la misma (hipoparatiroidismo, déficit de magnesio o pseudohipoparatiroidismo), la concentración de 1,25(OH)₂D será baja; esto se debe a la falta de estimulación de la hormona paratiroidea a nivel de la 25(OH)D-1 α -hidroxilasa renal y al defecto inhibitorio de la hiperfosfatemia sobre la misma enzima. Debido al solapamiento de los valores de 1,25(OH)₂D entre enfermos y población normal, la cuantificación de este metabolito no es particularmente útil para el diagnóstico de hipoparatiroidismo.

La utilidad del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ para la evaluación de pacientes con hipercalcemia y/o hipercalciuria, en la mayoría de los casos queda restringida a aquellos que tienen suprimida la secreción de hormona paratiroidea. La elevación inapropiada de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, junto con la disminución de la hormona paratiroidea en pacientes con hipercalcemia y/o hipercalciuria, es sugestiva de intoxicación exógena de $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, dehidrotaquisterol o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; o de intoxicación endógena con $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en pacientes con sarcoidosis, enfermedades granulomatosas y linfomas, o hipercalciuria absortiva (89).

La determinación de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ puede ser útil para detectar hiperparatiroidismo primario en pacientes sospechosos de esta enfermedad, con datos de laboratorio poco claros.

Hay que tener en cuenta, que puede no haber un aumento claro del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en pacientes con hipercalcemia y/o hipercalciuria con enfermedad hepatocelular o *proteinuria nefrótica concomitante*, donde está disminuída la producción o hay pérdida de proteínas que se unen al $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Aunque la concentración total de hormona puede ser baja en estos enfermos, la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ libre será mayor de lo normal (90).

Respecto a la población infantil, en 1928 Hess y Lewis recomendaron la suplementación de la leche con vitamina D para prevenir el raquitismo en los niños (91), y desde entonces, numerosos autores han tratado de establecer la dosis recomendable de estos suplementos (92,93,94). La Academia Nacional de las Ciencias de la Alimentación y Nutrición de los Estados Unidos de América, en 1973 estableció la dosis de vitamina D necesaria para prevenir el raquitismo en 400 UI/día (95). Sin embargo, la práctica de suplementar rutinariamente a todos los niños con vitamina D durante los primeros meses de la vida, ha sido muy debatida en las últimas décadas (96,97,98,99,100), existiendo diversas opiniones en este sentido. Hay autores que basándose en factores de tipo geográfico, en el

hecho de que las dosis fisiológicas no revisten riesgos de efectos secundarios, y en que no han publicado casos de raquitismos en los niños que recibían suplementos de vitamina D, son partidarios de suplementar rutinariamente a toda la población infantil (101,102,103,104,105,106), mientras que otros autores opinan que la suplementación tal vez no sea precisa, y que la forma natural de obtener los aportes necesarios de vitamina D es a través de la radiación solar (107,108,109). De cualquier modo el estudio de la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ y $25(\text{OH})\text{D}$ va a ser de gran importancia, durante los primeros meses de la vida en los que se produce una fase de crecimiento rápido, dada la trascendencia de la vitamina D para un desarrollo y crecimiento correctos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Durante los últimos años se ha prestado especial interés al estado nutricional de la población infantil, y a sus posibles necesidades de suplementos vitamínicos, sobre todo durante las fases de crecimiento más rápido. Esto ha motivado en nuestro Hospital, la necesidad de disponer de parámetros bioquímicos relacionados con el crecimiento y/o metabolismo óseo; entre ellos los metabolitos de la vitamina D, 25-hidroxiciferol y 1,25-dihidroxiciferol.

La determinación de estos metabolitos no es sencilla, la mayoría de los autores se basan en métodos que requieren la utilización de la HPLC en algún momento del proceso, técnica no disponible en la mayoría de los laboratorios clínicos, que a su vez precisa de un volumen de muestra grande, lo que dificulta su aplicación a la población infantil.

Por este motivo, hemos elegido para la cuantificación de 25-hidroxiciferol y 1,25-dihidroxiciferol, métodos basados en el análisis competitivo de proteínas ligadoras que requieren un volumen de muestra relativamente pequeño y que no precisan de HPLC. Pretendemos poner a punto estos métodos para la cuantificación de ambos metabolitos, haciendo un control de los reactivos utilizados y una validación de las técnicas que garanticen unos resultados correctos.

Además, determinaremos los valores de referencia de 25-hidroxiciferol y 1,25-dihidroxiciferol, durante los primeros meses de la vida, teniendo en cuenta los factores que más influyen en el metabolismo de la vitamina D en una población sana: estacionalidad y alimentación.

MATERIAL Y METODOS

1.- MATERIAL BIOLÓGICO

1.1 POBLACION ESTUDIADA

Hemos realizado un seguimiento clínico y bioquímico de 52 niños (29 niños y 23 niñas) desde el nacimiento hasta los diez meses y medio de vida. Los niños fueron elegidos al azar en la maternidad del Hospital "12 de Octubre", hijos de madre sana, embarazo controlado sin complicaciones, parto a término y peso adecuado para la edad gestacional. La elección se realizó en dos momentos diferentes, seleccionándose 22 niños nacidos en el mes de Agosto de 1989 (Grupo A) y 30 niños nacidos en el mes de Diciembre del mismo año (Grupo B). Diecinueve niños fueron alimentados con lactancia natural y 33 con una fórmula adaptada que contenía 400 UI/L de vitamina D. Los niños recibieron lactancia exclusiva hasta los 4 meses, se introdujeron harinas de cereales al cuarto mes y alimentos sólidos al sexto mes.

Los niños fueron valorados 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.

1.2 RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras de sangre para la determinación de 25(OH)D y 1,25(OH)₂D se han recogido a las 3 semanas, 3 meses, 6 meses y 9 meses de vida, coincidiendo con algunas de las visitas pautadas por el pediatra, que valoraba el correcto crecimiento y desarrollo de los niños.

Las muestras de suero se han recogido en un tubo seco y se han conservado en un baño de hielo hasta su centrifugación (antes de una hora después de realizar la extracción), y a -60°C hasta el momento de su utilización.

2 . – INSTRUMENTAL Y REACTIVOS

2.1 MATERIAL INSTRUMENTAL

- Centrífuga IEC PR-600 con temperatura controlada (DAMON /IEC DIVISION).
- Agitador eléctrico Cenco cat. nº 34525-200 (Cenco Instrumenten B.U., Breda. The Netherlands).
- Colector de fracciones VAC ELUC SPS 24. Izasa.
- pHmetro Corning 140 (Essex England).
- Balanza de precisión Sartorius 2004 MP.
- Congelador -60°C Lie 80 (Koxka)
- Sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore).
- Contador β de centelleo LS 1801. Beckman.
- Dispositivo de evaporación BioMérieux nº 6 656 1, a una presión de 0,3 bar., que evapora con una corriente de aire enriquecida con nitrógeno.
- Baño de agua con temperatura regulable Grant Instrument Ltd. Barrington CB2 50 (Cambridge).
- Tubos de vidrio de 100 x 75 y 120 x 75 mm
- Pipetas de cristal de 1, 2, 5, 10 y 25 mL. (Bland Brand, West Germany).
- Matraces de 100, 200 y 500 mL. Simax CSN.

- Probetas de 100, 200 y 500 mL. Simax CSN.
- Vasos de precipitación de 25, 50, 100 y 250 mL (Schott Mainz, Duran, West Germany).
- Micropipetas de volumen fijo de 20, 50, 100, 300, 500 y 600 μL (SMI micro/pettor, USA).
- Micropipeta de volumen regulable de 200 a 1000 μL (Renner. Labsystems).
- Dispensadores de 1000 mL de volumen regulable de 1 a 10 mL. Dispenser 7,3 Sivelab Instrument AB.
- Viales de centelleo de polietileno de 5 mL. Ref. 401100. Lab Center.

2.2 REACTIVOS

- Acetonitrilo LiChrosolv. Grado HPLC. Merck.
- n-Hexano LiChrosolv. Grado HPLC. Merck.
- 2-Propanol LiChrosolv. Grado HPLC. Merck.
- Metanol LiChrosolv. Grado HPLC. Merck.
- Cloruro de Metileno LiChrosolv. Grado HPLC. Merck.
- Etanol Min. 99,5% LiChrosolv. Grado HPLC. Merck.
- Fosfato potásico dibásico (K_2HPO_4). Proanalysis. Merck.
- Hidróxido potásico. Proanalysis. Merck.
- Agua bidestilada. Ibys.
- Líquido de centelleo Pico Fluor™ 40. Packard.
- Microlumnas cromatográficas desechables $\text{C}_{18-\text{OH}}$ Sep-pak. (Waters Española). Millipore.
- Muestras de: $25(\text{OH})\text{D}_3$ (Ro 8-8892)
 - 24R,25(OH) $_2\text{D}_3$ (Ro 21-5816)
 - $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Ro 21-5535)
 - 25R,26(OH) $_2\text{D}_3$ (Ro 14-9492)

suministradas por Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland.

- Reactivos para la determinación de 25(OH)D suministrados por Nichols Institute Diagnostics. San Juan Capistrano, CA. 92674 U.S.A.
- Reactivos para la determinación de 1,25(OH)₂D suministrados por Nichols Institute Diagnostics. San Juan Capistrano, CA. 92675 U.S.A.

METODOS

1 . - METODO DE DETERMINACION DE 25(OH)D

1.1 FUNDAMENTO DEL METODO

Se basa en un análisis competitivo que utiliza una proteína ligadora, que no requiere extracciones ni cromatografías previas complejas.

En este método, los extractos alcohólicos procedentes de 50 μ l de suero, se incuban con la proteína ligadora y el 25(OH)D marcado con tritio. Después de 3 horas de incubación a 4°C se añade una suspensión de carbón-dextrano para separar el 25(OH)D unido a la proteína ligadora del que ha quedado libre. Tras 20 minutos de incubación se centrifuga, y el sobrenadante se transfiere a un vial que contiene líquido de centelleo. La radiactividad se mide en un contador de radiaciones β . Los resultados se expresan en ng/mL de suero y se interpolan en la curva estándar.

1.2 COMPONENTES DEL ANALISIS DE 25(OH)D

Para la determinación de 25(OH)D hemos utilizado los siguientes reactivos suministrados por Nichols Institute Diagnostics.

- Proteína ligadora procedente de suero humano. 2 viales liofilizados que se reconstituyen con 16 mL de agua bidestilada fría.
- Trazador 25-hydroxy[23,24(n)-³ H]D₃ con una actividad inferior a 1 μ Ci (<37KBq).
- Estándares de 25(OH)D. 5 viales liofilizados que se reconstituyen en 0,5 mL de agua

bidestilada fría, obteniéndose las siguientes concentraciones 4, 11, 22, 50 y 120 ng/mL de 25(OH)D.

- Controles. 2 viales que contienen 25(OH)D liofilizado de suero humano a dos concentraciones conocidas, se reconstituyen en 0,5 mL de agua bidestilada fría.
- Carbón-dextrano. 1 vial de 10 mL.
- Tampón NSB. 1 vial liofilizado que se reconstituye en 5 mL de agua bidestilada fría.

1.3 REALIZACION DEL ANALISIS DE 25(OH)D

Todos los reactivos se almacenan en congelador a -15°C, excepto la suspensión de carbón-dextrano que se mantiene a 4°C, hasta el momento de su utilización, teniendo siempre en cuenta no sobrepasar la fecha de caducidad de los mismos.

El ensayo se realiza a 4°C por lo que todos los reactivos, materiales y sueros de los enfermos, han de permanecer en hielo durante el mismo. Se reconstituyen los reactivos liofilizados con agua bidestilada fría según las indicaciones del fabricante (excepto el reactivo que contiene la proteína ligadora, que se reconstituye inmediatamente antes de su utilización) para proceder como sigue:

A) Fase de extracción

Pipetear 50 µl de estándares, controles y muestras de pacientes en un tubo de cristal correctamente identificado, y añadir a cada uno de ellos 600 µl de un reactivo de alcohol frío compuesto por Etanol/Metanol/2-Propanol (90/5/5) [Reactivo de alcohol]. Agitar en vórtex aproximadamente 5 segundos y dejar en hielo durante 20 minutos, centrifugándose posteriormente a 1300 - 1500 x g 15 minutos a 2 - 8°C. El sobrenadante se procesa según el protocolo siguiente:

B) Ensayo propiamente dicho (Tabla. I)

Rotular los tubos de vidrio de 100 x 75 mm en número suficiente para incluir: total, ligazón inespecífica (NBS), ligazón máxima (B_0), 5 estándares, 2 controles y las muestras a analizar, todos por duplicado.

Añadir 50 μ l del reactivo de alcohol a los tubos rotulados del 1 al 6 (Total, NBS y B_0).

De cada uno de los tubos que contiene el extracto de alcohol de los estándares, controles y muestras problema, transferir cuidadosamente 50 μ l a su tubo correspondiente.

Añadir 20 μ l del trazador [25 (OH)D H^3] a todos los tubos. Agitar y cubrir con papel de aluminio para evitar su exposición a la luz.

Reconstituir el reactivo que contiene la proteína ligadora.

Añadir 600 μ l del tampón NSB a los tubos 1 y 2 (Totales) y 500 μ l a los tubos 3 y 4 (NBS).

Añadir 500 μ l de la proteína ligadora al resto de los tubos. Cubrir con papel de aluminio e incubar durante 3 horas a 2 - 8°C.

Durante la última media hora de incubación, preparar el reactivo de carbón-dextrano agitándolo de forma continua y manteniendo el envase que lo contiene en hielo picado, para conseguir una correcta homogenización antes de transferir 100 μ l a todos los tubos, excepto a los correspondientes a los totales. Agitar vigorosamente e incubar 20 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar a 1300 - 1500 x g durante 20 minutos a 2 - 8°C.

Pipetear 4,5 mL de líquido de centelleo a los viales debidamente identificados a los que se añaden 555 μ l del sobrenadante de cada uno de los tubos, evitando mover el precipitado.

Determinar la radiactividad de cada tubo en el contador β , durante 2 minutos cada uno de ellos.

Los resultados se expresan en función de B/T, siendo B el contaje del sobrenadante de cada tubo en desintegraciones por minuto (dpm), y T la media del contaje obtenido en los tubos de actividad total. Se dibuja una curva estándar representando en ordenadas B/T y en abscisas la concentración de 25(OH)D en ng/mL. Los contajes de los controles y sueros problema se interpolan en esta curva para conocer la concentración de los mismos.

Tabla I. Metodica del análisis de 25(OH)D

Nº DE TUBO	ESTANDAR CONTROL S.PROBL.	25(OH)D MARCADO	PROTEINA LIGADORA	INCUBAC.	CARBON DEXTRANO	INCUBAC.	CENTRIF.	CONTAJE
1 y 2 TOTAL	50 μ l	20 μ l	600 μ l NSB	3 horas 4°C	---	20 min. T ^a . amb.	1500xg 15 min 4°C	2 min.
3 y 4 NBS			500 μ l NSB		100 μ l			
5 y 6 B ₀			500 μ l P.Lig.		Agitar			
7 al 16 Estand.			Agitar					
17 al 20 Control								
21... S.Probl.								

2. – CONTROL DE CALIDAD DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACION DE 25(OH)D

2.1 ANTIGENO MARCADO

Se estudia si el 25(OH)D se ha degradado durante el proceso de marcaje o si el tiempo de almacenamiento provoca una alteración significativa en el mismo, porque en ambos casos se produciría una disminución de su capacidad para ligarse al anticuerpo.

El 25(OH)D marcado se somete a una cromatografía de polaridad en minicolumna, en un tiempo próximo a la fecha de marcaje y a la de caducidad. Las columnas utilizadas son cartuchos Sep-pak (Waters Española) rellenos de una fase estacionaria hidrofóbica o no polar (C_{18-OH}); para la fase móvil se emplean disolventes polares que eluyen la muestra. La selección del relleno y los disolventes utilizados son los adecuados para permitir una elución correcta del 25(OH)D (molécula polar), y retener en el cartucho las fracciones no deseables de la muestra.

La técnica empleada ha sido la siguiente:

1. Acondicionamiento de la columna previo a la aplicación de la muestra, mediante lavados sucesivos utilizando:

5 mL de n-Hexano

5 mL de 2-Propanol

5 mL de Metanol

5 mL de agua bidestilada

2. Aplicación de 500 μ l de 25(OH)D marcado, del que se recoge el eluído. Posteriormente se van aplicando solventes de polaridad creciente en el siguiente orden:

5 mL de agua bidestilada

5 mL de Metanol/H₂O al 70%

10 mL de cloruro de Metileno/n-Hexano al 10%

5 mL de 2-Propanol/n-Hexano al 1%

5 mL de 2-Propanol/n-Hexano al 5%

Los eluídos correspondientes a cada apartado se recogen por separado, y se someten al conteo de su radiactividad durante 5 minutos, representándose sus dpm frente al número del tubo para obtener el perfil de actividad.

2.2 ANTIGENO FRIO (ESTANDARES)

El control de calidad del antígeno frío lo hemos realizado mediante la cromatografía de una solución de estándar de 25(OH)D suministrada por la casa comercial. Hemos practicado dos tipos de ensayos:

a) Cromatografía de 100 μ l de una mezcla de estándares que se efectúa en las mismas condiciones técnicas que las expresadas en el apartado anterior. Tras eluir los distintos solventes que eliminan todas las sustancias diferentes al 25(OH)D, el eluído correspondiente a los 5 mL de cloruro de Metileno en n-Hexano al 10%, se recoge en alícuotas de 500 μ l/tubo mediante un colector de fracciones. Se concentran hasta tener un volumen aproximado de 200 μ l/tubo con el que se realiza el análisis competitivo de proteínas ligadoras para, determinar la concentración de 25(OH)D en cada tubo.

b) Se realiza el mismo proceso anterior, con una mezcla de estándares en la que se ha hecho una extracción previa con el reactivo de alcohol. Se pipetea 400 μ l de estándar y

4800 μ l de reactivo de alcohol, se centrifuga y el sobrenadante resultante se aplica en la columna. Después de eliminar las sustancias no deseadas, se recoge el eluido de 5 mL de cloruro de Metileno en n-Hexano al 10% fraccionado en alícuotas de 500 μ l/tubo, que se evaporan bajo corriente de nitrógeno líquido y se reconstituyen con 200 μ l del reactivo de alcohol, realizándose posteriormente el análisis de proteínas ligadoras.

2.3 PROTEINA LIGADORA

Se trata de estudiar la cinética de la unión antígeno - anticuerpo en base a su constante de asociación

$$K_a = [\text{Ag-Ac}] / [\text{Ag}][\text{Ac}]$$

Donde [Ag-Ac] es la concentración del complejo antígeno-anticuerpo, [Ag] es la concentración de antígeno y [Ac] la concentración de anticuerpo o proteína ligadora.

Esta constante representa la actividad potencial del ensayo; se determina mediante el cálculo de la pendiente de la asíntota a la curva obtenida al representar gráficamente la relación

$$B/F = f(B_{\text{total}})$$

Esta relación puede ser de dos tipos:

a) Lineal. Indica que el anticuerpo es homogéneo, es decir, que existe un solo tipo de anticuerpo con lugares de unión iguales e independientes.

b) No lineal. Indica que el anticuerpo es heterogéneo, es decir, que existen puntos de distinta afinidad por el antígeno o que aparecen fenómenos de cooperatividad.

3. - VALIDACION DEL METODO DE DETERMINACION DE 25(OH)D

Hemos estudiado diversos parámetros que definen a los métodos de análisis competitivos de proteínas ligadoras, de acuerdo con las pautas establecidas por la Federación Internacional de Química Clínica (110,111) y el European Committee for Clinical Laboratory Standards (112).

3.1 ESTUDIO DE LA IMPRECISION

Este parámetro mide la variación observada entre determinaciones repetidas de una misma muestra. También se conoce como "reproductibilidad", y puede definirse como el grado en que un conjunto de determinaciones de una misma muestra, coincide con la media de este conjunto.

Los resultados se expresan como un coeficiente de variación ($CV = \text{Desviación estándar}/\text{media} \times 100$).

Hemos estudiado la imprecisión intra-análisis mediante el análisis de cuatro sueros con concentraciones diferentes de 25(OH)D (Sueros A, B, C y D), medidos por duplicado en un mismo ensayo, de 10 a 14 veces cada uno de ellos.

La imprecisión inter-análisis se ha valorado con la determinación sucesiva de dos sueros con diferente concentración de 25(OH)D (Sueros A y B), a lo largo de 15 análisis.

3.2 ESTUDIO DE LA INEXACTITUD

Este parámetro mide la concordancia entre el valor obtenido en un ensayo y el valor verdadero de una sustancia en una muestra. Se calcula en función de la desviación porcentual respecto al valor diana, tomando como valor diana, la media aritmética de los resultados obtenidos.

La inexactitud la hemos evaluado mediante pruebas de recuperación, para lo cual se ha determinado la concentración de un suero con un nivel conocido de 25(OH)D, al que hemos añadido cantidades conocidas de 25(OH)D a partir de una solución estándar.

3.3 ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD

La especificidad se define como el grado en el que un ensayo responde a sustancias diferentes a aquellas para la que está diseñado. Con este parámetro se pretende ver la capacidad de un método analítico, para detectar únicamente la sustancia que se quiere medir, y se evalúa mediante:

a) **Test de diluciones.** Antes del proceso de extracción con alcohol, hemos mezclado un suero humano con una concentración determinada de 25(OH)D, con una solución de suero fisiológico según las siguientes razones: 4/5, 3/5, 2/5 y 1/5, determinando posteriormente la concentración de 25(OH)D en cada una de las diluciones.

También hemos realizado el test de diluciones sobre un suero humano, al que habíamos sometido a un proceso de extracción con alcohol, antes de realizar las diluciones a razón de 4/5, 3/5, 2/5 y 1/5 con una solución estándar que contiene 0 ng/mL de 25(OH)D, determinando igualmente la concentración de 25(OH)D en cada una de ellas.

b) Test de reacciones cruzadas. Se define como la cantidad de sustancia requerida para desplazar el 50% del trazador, bajo condiciones estándar del ensayo.

Las reacciones cruzadas de análogos del 25(OH)D, con la proteína ligadora utilizada para la determinación de esta sustancia, se estudian viendo como afecta el exceso de estos metabolitos en la cuantificación de la misma, para lo cual hemos añadido cantidades conocidas de 24,25(OH)₂D, 25,26(OH)₂D y 1,25(OH)₂D, a una muestra de suero con un valor conocido de 25(OH)D, y hemos observado si hay incremento de dicho valor.

3.4 ESTUDIO DEL LIMITE DE DETECCION

El límite de detección ha sido definido por la I.F.C.C. (International Federation of Clinical Chemistry) y por la I.U.P.A.C. (International Union of Pure and Applied Chemistry) con ligeras diferencias pero con el mismo sentido. La I.F.C.C. lo define como el menor resultado individual que puede distinguirse de un blanco adecuado, con una probabilidad preestablecida (95%). La I.U.P.A.C. lo define como la concentración que se deduce de la medida más pequeña que se puede detectar, con una certeza razonable, por un procedimiento analítico determinado. De las definiciones anteriores puede deducirse que el límite de detección es directamente proporcional a la imprecisión del método analítico a concentración cero.

El límite de detección lo hemos calculado, hallando la curva media de los estándares de calibración del método, obtenida de 15 análisis, y en ella el valor medio ± 2 desviaciones estándar del punto correspondiente a 0 ng/mL de 25(OH)D, ya que toda la zona comprendida en ese rango de concentración será indistinguible de 0 ng/mL.

3.5 INTERVALO ANALITICO

Es el rango de la curva estándar o intervalo de concentración, para el que se puede aplicar el método sin modificaciones. Los valores deberán estar de acuerdo con los datos esperados, de tal manera que éstos se lean en la zona de más sensibilidad de la curva.

3.6 INTERVALO DE REFERENCIA

Consiste en el rango de valores de un parámetro obtenidos en una población supuestamente sana.

Hemos obtenido los valores de referencia en relación con la edad (3 semanas, 3 meses, 6 meses y 9 meses de vida) y la estacionalidad (verano e invierno), y en función de la media $\pm 2DS$, después de depurar aquellos resultados que superaban la media $\pm 4DS$.

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

4.1 FUNDAMENTO DEL METODO

Se trata de un análisis competitivo de proteínas ligadoras proporcionado por Nichols Institute Diagnostics, que consta de dos fases:

Primera fase. Proceso de extracción del metabolito 1,25(OH)₂D a través de una cromatografía en columna con un cartucho C_{18-OH}.

Segunda fase. Los extractos resultantes de la fase anterior se incuban con la proteína ligadora de 1,25(OH)₂D durante 1 hora, antes de añadir el 1,25(OH)₂D marcado con tritio. Transcurrido el periodo de incubación, se añade una solución de carbón-dextrano para separar el 1,25(OH)₂D unido a la proteína ligadora, del 1,25(OH)₂D libre. Tras 30 minutos de incubación a 4 °C, se centrifuga y el sobrenadante se transfiere a un vial que contiene líquido de centelleo. La radiactividad se mide en un contador de radiaciones β y los resultados se interpolan en la curva estándar. Los valores se expresan en pg/mL de suero, después de realizar una corrección que tiene en cuenta la recuperación obtenida del paso por la columna de cromatografía C_{18-OH}.

4.2 COMPONENTES DEL ANALISIS DE 1,25(OH)₂D

La determinación de 1,25(OH)₂D la hemos realizado con los siguientes reactivos suministrados por Nichols Institute Diagnostics:

- Receptor de 1,25(OH)₂D procedente de timo de ternera. Dos viales que contienen 21 mL

de solución de receptor después de su reconstitución.

- Trazador $1,25(\text{OH})_2$ (^3H -26,27)D. Un vial que contiene 3,4 mL en un buffer de isopropanol con una actividad $< 1 \mu\text{Ci} = < 37 \text{ kBq}$ de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ tritiado.
- Trazador de recuperación $1,25(\text{OH})_2$ (^3H -26,27)D. Un vial que contiene 1,6 mL de trazador con una actividad $< 1 \mu\text{Ci}$.
- Suspensión de carbón-dextrano (15 mL).
- Estándar con 0 pg/mL de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Un vial con 6 mL en un buffer de isopropanol.
- Estándares de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Cinco viales de 0,5 mL de un buffer de isopropanol con 25, 50, 100, 200 y 400 pg/mL de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.
- Controles. Dos viales que contienen $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ liofilizado procedente de suero humano, a dos concentraciones conocidas.
- Buffer NSB. Un vial liofilizado que se reconstituye con 6 mL.
- Diluyente del receptor de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (45 mL).
- Dithiothreitol. Dos viales con 16 mg.
- 24 minicolumnas cromatográficas Sep-pak $\text{C}_{18}\text{-OH}$.

4.3 REALIZACION DEL ANALISIS DE $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

El análisis consta de varias fases y se realiza a 4 °C, por lo que todos los reactivos y sueros de pacientes, deben de permanecer en un baño de hielo durante el mismo.

A) Procedimiento de extracción (Tabla II)

- Pipetear 1 mL de cada control y muestras de pacientes en un tubo de vidrio de 120 x 75 mm.
- Añadir 50 μl del trazador de recuperación a cada tubo, así como a dos viales a los que

añadiremos 4,5 mL de líquido de centelleo. Las dpm de estos viales se utilizarán para calcular las recuperaciones. Agitar los tubos que contienen los controles y muestras con el trazador, 2 veces en los siguientes 10 minutos.

- Añadir 1 mL de Acetonitrilo a cada tubo y agitar vigorosamente durante 30 segundos.
- Centrifugar a 1300 - 1500 x g a 2-8°C durante 15 minutos.
- Decantar el sobrenadante en un tubo de vidrio de 120 x 75 mm que contenga 1 mL de fosfato potásico 0,4M a pH = 10,5 y agitar. Centrifugar a 1300 - 1500 x g durante 10 minutos a 2-8°C.
- Guardar el sobrenadante en baño de agua helada hasta el momento de ser decantado en la columna C_{18-OH} preconditionada.

B) Precondicionamiento de las columnas C_{18-OH}

Se lleva a cabo en un colector de fracciones. El sistema de vacío debe permanecer cerrado mientras se están aplicando las soluciones y tan pronto como éstas hayan atravesado las columnas, para evitar que se sequen con el paso del aire. El vacío óptimo se consigue aproximadamente con 15 inches o 400 mm Hg.

El precondicionamiento de las columnas, previo a la aplicación de las muestras, se hace con las siguientes soluciones:

5 mL de n-Hexano

5 mL de 2-Propanol

5 mL de Metanol

5 mL de agua ultrapura

Tras su elución, la columna está preparada para aplicar el sobrenadante resultante del proceso de extracción de las muestras. A continuación, se lavan las columnas con las siguientes soluciones, despreciándose los eluidos.

5 mL de agua ultrapura

5 mL de Metanol en agua al 70%

5 mL de Cloruro de Metileno en n-Hexano al 10%

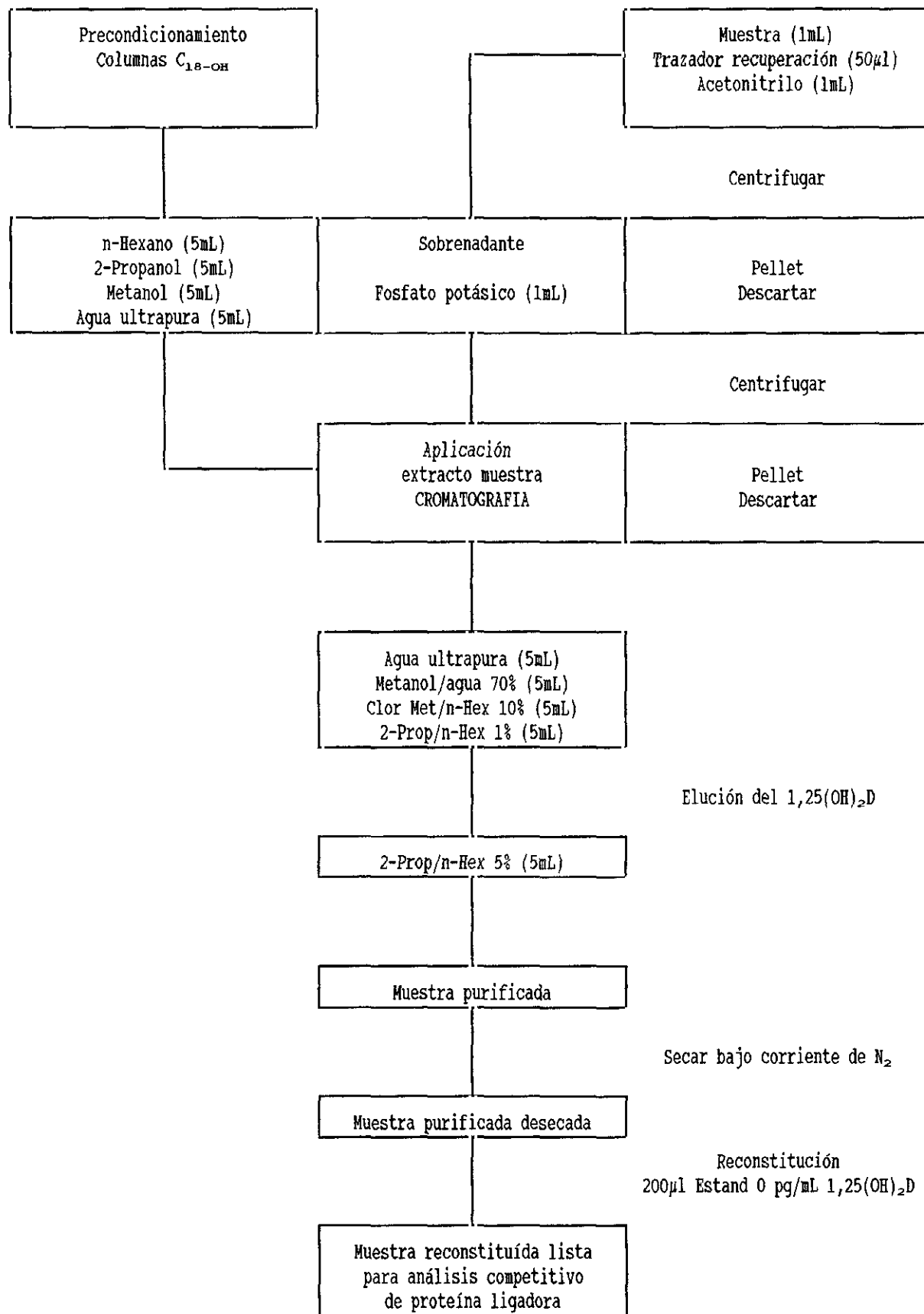
5 mL de 2-Propanol en n-Hexano al 1%

Por último se aplican 5 mL de 2-Propanol en n-Hexano al 5% recogándose el eluido resultante.

Las columnas pueden utilizarse hasta un máximo de tres veces, para lo que se regeneran con 5 mL de 2-Propanol y se preconditionan como se ha mencionado anteriormente. Este proceso debe realizarse justamente antes de su reutilización.

Si el ensayo no puede completarse en un día, los extractos procedentes de las muestras se evaporan en el dispositivo pertinente, bajo corriente de aire enriquecido con nitrógeno a 5 psi, durante 30 a 45 minutos. El tubo que contiene el residuo procedente de la evaporación se cubre con papel de aluminio, manteniéndose a -20°C durante un tiempo inferior a una semana. Inmediatamente antes de su utilización se reconstituye con $200\ \mu\text{l}$ de estándar de $0\ \text{pg/mL}$ de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ helado, se agita y se mete en hielo. A los 5 minutos se vuelve a agitar, asegurándonos que el líquido baña toda la pared del tubo, hasta el nivel donde llegaba el eluido antes de ser secado bajo corriente de aire enriquecido con nitrógeno, se esperan otros 5 minutos metido en hielo, para que la reconstitución sea completa, y ya puede comenzarse el ensayo que se ha de realizar durante los siguientes 30 minutos.

Tabla II.- Procedimiento de extracción del 1,25(OH)₂D



C) Preparación de los reactivos para el análisis de 1,25(OH)₂D

Hay que conservar todos los reactivos desde el momento de su recepción hasta su utilización, a -20°C o temperaturas inferiores, excepto la suspensión de carbón-dextrano, el diluyente del receptor y el dithiothreitol que se conservan a 4°C, y las columnas C_{18-OH} que han de permanecer a temperatura ambiente.

Para la reconstitución de los reactivos liofilizados se utiliza agua ultrapura helada, entendiéndose como tal, al agua bidestilada que se somete a un proceso de purificación mediante un sistema Millipore que contiene una unidad de ósmosis inversa, una unidad de carbón vegetal, dos unidades de intercambio iónico y una unidad de filtración, para eliminar partículas mayores de 0,22 μm, con lo que conseguimos un agua con una resistencia específica alta, de aproximadamente 10 megaΩ/cm.

Se reconstituye el reactivo control y el buffer NBS con 1,5 y 6 mL de agua ultrapura helada, respectivamente, y se guardan en un baño de hielo junto con el resto de reactivos y muestras.

El reactivo que contiene la proteína ligadora se reconstituye inmediatamente antes de su utilización, con 21 mL del reactivo diluyente y un vial de dithiothreitol.

D) Ensayo propiamente dicho (Tabla III)

Rotular un número suficiente de tubos de cristal de 100 x 75 mm para incluir por duplicado: ligazón inespecífica (NSB), máxima unión (B₀), 5 estándares, controles y muestras de pacientes, y colocarlos en un baño de hielo.

Pipetear 50 μl del estándar de 0 pg/mL de 1,25(OH)₂D en los tubos correspondientes a NSB y B₀ y 50 μl de cada uno del resto de los estándares en sus tubos correspondientes.

Tabla III. Protocolo del método de determinación de 1,25(OH)₂D

Rotular tubos	NBS	B ₀	Estándar	Control	S.Problema
Pipetear (μl)					
Estándar 0 pg/mL	50	50	-	-	-
Estándares	-	-	50	-	-
Control	-	-	-	50	-
S. Problemas	-	-	-	-	50
Pipetear (μl)					
Buffer NSB	500	-	-	-	-
Proteína ligadora	-	500	500	500	500
Incubar	1 hora a temperatura ambiente				
Pipetear (μl)					
Trazador	50	50	50	50	50
Incubar	1 hora a temperatura ambiente				
Pipetear (μl)					
Carbón-dextrano	100	100	100	100	100
Incubar	30 minutos a 4°C				
Centrifugar	1300 - 1500 x g 20 minutos 2 - 8°C				
Contaje radiactividad	2 minutos/tubo				

De cada uno de los tubos que contienen el extracto reconstituído de los controles y muestras de pacientes, transferir 50 μ l en sus tubos. La misma cantidad se pipetea a un vial que contiene 4,5 mL de líquido de centelleo para calcular las recuperaciones de cada uno de los extractos.

Añadir 500 μ l del buffer NSB a los tubos de la ligazón inespecífica. Agitar.

Reconstituir el reactivo de la proteína ligadora y pipetear 500 μ l en todos los tubos, excepto en los de la ligazón inespecífica. Agitar.

Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

Poner los tubos en hielo durante 5 minutos antes de añadir 50 μ l del trazador a cada uno de ellos. Agitar, cubrir con papel de aluminio e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

En dos viales de centelleo pipetear 50 μ l del trazador, 600 μ l del buffer NSB y 4,5 mL de líquido de centelleo, que servirán para conocer la radiactividad total.

Durante la última media hora de incubación, preparar el carbón-dextrano tal y como hemos descrito para la técnica del 25(OH)D.

Colocar los tubos en hielo durante 5 minutos y posteriormente añadir 100 μ l de carbón-dextrano. Agitar e incubar en hielo durante 30 minutos.

Centrifugar a 1300 - 1500 x g 20 minutos a 2 - 8°C.

Pipetear cuidadosamente 605 μ l de cada tubo, evitando mover el precipitado, a un vial con 4,5 mL de líquido de centelleo y agitar vigorosamente.

Medir la radiactividad de cada tubo en un contador β durante 2 minutos.

Los resultados se expresan como B/T, siendo B el contaje del sobrenadante de cada tubo en desintegraciones por minuto (dpm), y T la media del contaje obtenido en los tubos de actividad total. Se dibuja una curva representando en ordenadas B/T y en abscisas la

concentración de 1,25(OH)₂D en pg/mL. Los contajes de controles y muestras se interpolan en esta curva, para conocer la concentración de 1,25(OH)₂D de los mismos.

Debido a que eficiencia de la extracción varía en las diferentes muestras, es necesario realizar esta corrección hallando el porcentaje de recuperación en cada una de ellas, como sigue:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{dpm de la recuperación de la muestra}}{\text{dpm recuperación total} / 4} \times 100$$

El resultado final viene determinado por:

$$\text{pg/mL de } 1,25(\text{OH})_2\text{D} = \frac{\text{Concentración en la gráfica}}{\% \text{ Recuperación}}$$

5.- CONTROL DE CALIDAD DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACION DE 1,25(OH)₂D

5.1 ANTIGENO MARCADO

Hemos valorado la posible alteración del 1,25(OH)₂D producida durante el proceso de marcaje o almacenamiento, haciendo una cromatografía en columna C_{18-OH} con el trazador 1,25(OH)₂(³H-26,27)D, en una fecha próxima al momento del marcaje y de caducidad del mismo, siguiendo el mismo proceso que para la valoración del 25(OH)D marcado. Después del acondicionamiento de la columna, aplicamos 500 μl del trazador, recogiendo el eluido. Posteriormente realizamos una cromatografía con:

5 mL de agua ultrapura

5 mL de metanol en agua ultrapura al 70%

5 mL de cloruro de Metileno en n-Hexano al 10%

5 mL de 2-Propanol en n-Hexano al 1%

recogiéndose los eluidos por separado, en un colector de fracciones.

En último lugar hemos aplicado 10 mL de 2-Propanol en n-Hexano al 5%, recogiendo el eluido en alícuotas de 500 μl/tubo.

De cada uno de los tubos con su eluido correspondiente, hemos pipeteado 500 μl a un vial que contiene 4,5 mL de líquido de centelleo para obtener el perfil de radiactividad, enfrentando las dpm frente al número de tubo.

5.2 ANTIGENO FRIO

La valoración del antígeno frío la hemos realizado mediante una cromatografía en columna C_{18-OH} del estándar de $1,25(OH)_2D$ de mayor concentración, siguiendo los mismos pasos que para la valoración del antígeno caliente.

Una vez obtenidos los eluidos, los hemos evaporado bajo corriente de aire enriquecida con nitrógeno, para después reconstituirlos con $200 \mu l$ del estándar de 0 pg/mL de $1,25(OH)_2D$, y proceder al análisis competitivo de proteínas ligadoras para determinar la concentración de $1,25(OH)_2D$ de cada tubo.

5.3 PROTEINA LIGADORA

Para determinar si la proteína ligadora utilizada en el análisis competitivo para la cuantificación de $1,25(OH)_2D$ es homogénea o heterogénea, hemos realizado la representación gráfica de B/F frente a $B \text{ Total}$, mediante una curva de Scatchard correspondiente a la media de 20 curvas, pertenecientes a 20 análisis efectuados en días diferentes.

6. – VALIDACION DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE 1,25(OH)₂D

6.1 ESTUDIO DE LA IMPRECISION

La imprecisión intra-análisis la hemos determinado a partir del coeficiente de variación obtenido de tres muestras con diferentes concentraciones de 1,25(OH)₂D, procesadas 14 veces consecutivas en el mismo análisis (Sueros A, B y C).

La imprecisión inter-análisis se determinó a partir del coeficiente de variación de los resultados de dos sueros con diferente concentración de 1,25(OH)₂D (Sueros A y B), procesados dos veces por análisis durante 10 análisis consecutivos. El resultado fue la media de los valores obtenidos en cada uno de los días.

6.2 ESTUDIO DE LA INEXACTITUD

La inexactitud la hemos calculado comparando los valores teóricos de 1,25(OH)₂D con los valores obtenidos con nuestro ensayo, expresando el tanto por ciento de diferencia entre ellos, según la siguiente fórmula:

$$\text{Inexactitud} = \frac{\text{Valor teórico} - \text{Valor obtenido}}{\text{Valor teórico}} \times 100$$

Para ello hemos partido de un suero con un valor determinado de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, al que hemos añadido cantidades conocidas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ a partir de una solución estándar, y hemos determinado la concentración de este metabolito.

6.3 ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD

La especificidad del método empleado para la determinación de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ la hemos estudiado mediante:

A) Test de diluciones

Antes del proceso de extracción, hemos diluído un suero humano con una concentración de terminada de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, con una solución de suero fisiológico para obtener unas diluciones de $1/5$, $2/5$, $3/5$ y $4/5$, determinándose posteriormente la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ de cada una de ellas.

También hemos realizado este test con un suero al que hemos sometido al proceso de extracción con Acetonitrilo y Fosfato potásico, y al que posteriormente hemos diluído con un estándar que contiene 0 pg/mL de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ para conseguir diluciones de $1/5$, $2/5$, $3/5$ y $4/5$, en las que hemos valorado la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

B) Test de reacciones cruzadas

Hemos estudiado las posibles reacciones cruzadas de metabolitos de la vitamina D con la proteína ligadora, añadiendo diferentes concentraciones de $25,26(\text{OH})_2\text{D}$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ y $25(\text{OH})\text{D}$ a un suero con una concentración conocida de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, y observando la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ resultante en cada uno de los casos.

6.4 ESTUDIO DEL LIMITE DE DETECCION

El límite de detección del método, lo hemos hallado en función de la curva media de los estándares de calibración obtenida durante 20 ensayos. El valor medio ± 2 desviaciones estándar del punto correspondiente a una concentración de 0 pg/mL de 1,25(OH)₂D en esta curva, lo hemos considerado como el límite de detección para el método, teniendo en cuenta que la zona comprendida en este rango de concentración, es indistinguible de 0 pg/mL de 1,25(OH)₂D.

6.5 ESTUDIO DEL INTERVALO ANALITICO

El intervalo analítico corresponde al intervalo de concentración de 1,25(OH)₂D en la curva estándar, para el que podemos utilizar este método sin ningún tipo de modificación del mismo.

6.6 INTERVALO DE REFERENCIA

El intervalo de referencia lo hemos calculado analizando los niveles de 1,25(OH)₂D, en la misma población y en las mismas condiciones que para el caso del 25(OH)D.

7. – EVALUACION MATEMATICA DE LOS RESULTADOS

Todas las curvas estándares, controles y muestras problema fueron analizadas por duplicado y en las mismas condiciones.

Para definir la muestra, hemos utilizado 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 en el programa estadístico R-SIGMA Base de Datos Bioestadística. Horus Hardware S.A., en un ordenador personal Tandon 386/25.

8. – BUSQUEDA BIBLIOGRAFICA

Los datos recogidos de la bibliografía los hemos obtenido mediante búsqueda manual en el Index Medicus, búsquedas periódicas en el ordenador mediante el sistema del disco óptico del Medline, y bibliografía aportada por los laboratorios comerciales: Productos Roche, S.A., Nichols Institute Diagnostics e Izasa S.A.

RESULTADOS

1. CURVA ESTANDAR MEDIA DEL METODO DE DETERMINACION DE 25(OH)D

En la Tabla IV se muestran los valores de B/T % (Tanto por ciento de radiactividad respecto al total) para cada concentración de estándar de 25(OH)D, correspondientes a 10 ensayos. Con estos resultados representamos una curva estándar media en la Figura 5, así como una curva elegida al azar (Figura 6).

Tabla IV.- Curva estándar media de 25(OH)D

CURVA ESTANDAR MEDIA DE 25(OH)D						
Concentración (ng/mL)	0	4	11	22	50	120
B/T %	34,96	31,51	27,57	22,35	21,50	13,72
	34,70	32,95	30,23	24,77	19,27	15,37
	34,94	30,56	27,71	20,31	13,21	11,93
	35,97	28,78	26,49	20,41	14,64	11,64
	36,34	31,99	27,42	22,29	16,32	11,27
	36,54	32,88	30,57	25,73	17,40	13,26
	33,29	30,76	27,85	22,69	15,43	11,28
	34,09	31,99	28,98	23,47	15,81	12,64
	34,87	29,12	25,62	20,14	14,56	10,20
	34,86	29,20	25,48	20,08	14,32	10,29
Media	35,05	30,95	27,79	22,02	16,24	12,16
2 Desv. Típica	0,99	1,51	1,73	1,70	2,50	1,61
CV %	2,82	4,78	6,22	7,72	15,39	13,24

CURVA ESTANDAR MEDIA 25(OH)D

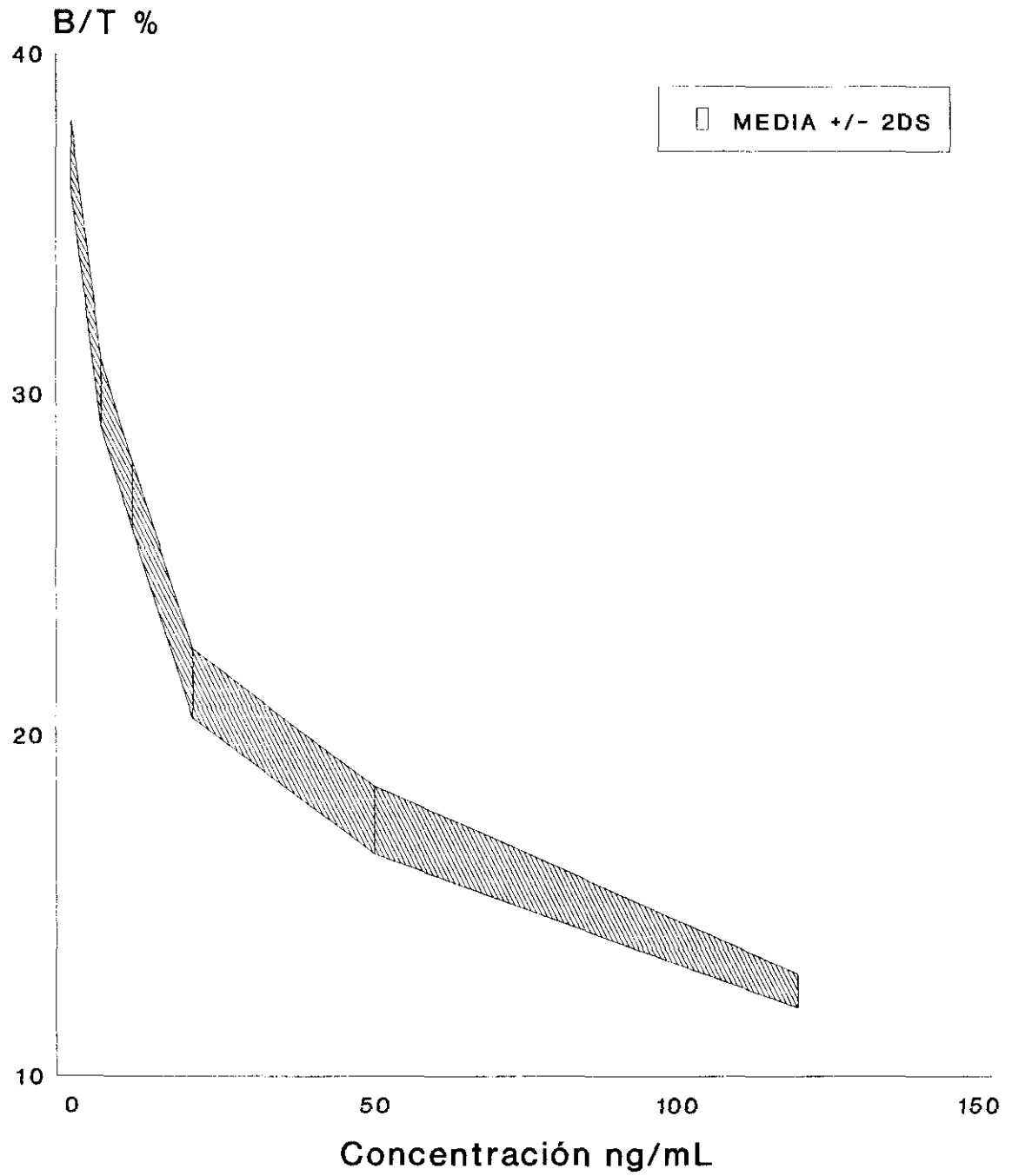


Fig. 5.- Curva estándar media de 25(OH)D

CURVA ESTANDAR ELEGIDA AL AZAR 25(OH)D

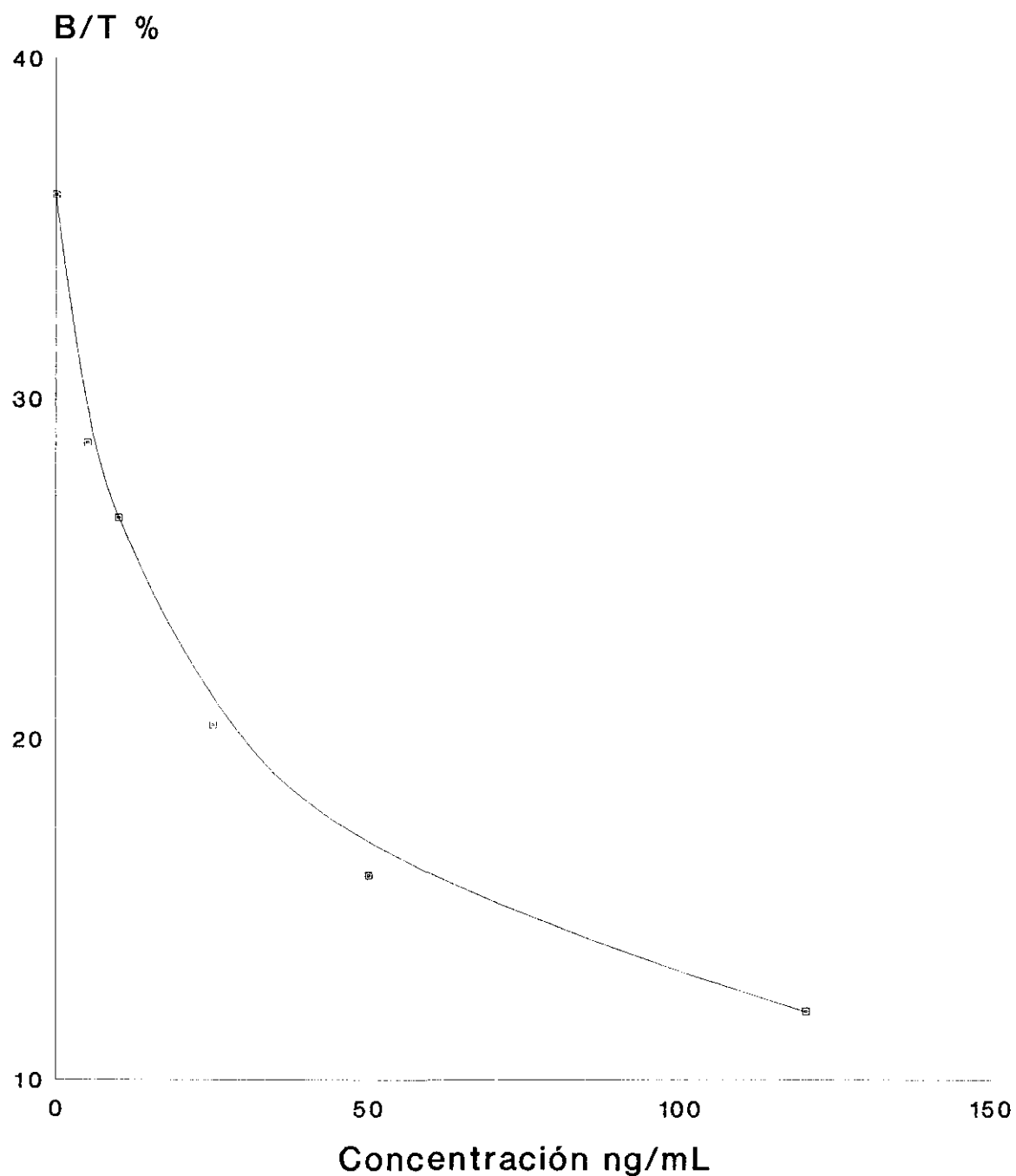


Fig. 6.- Curva estándar elegida al azar de 25(OH)D

2.- LIGAZON INESPECIFICA EN EL METODO DE DETERMINACION DE 25(OH)D

Los valores medios de la ligazón inespecífica en los ensayos realizados han sido de $0,033 \pm 0,008$, y se ha valorado sustituyendo la proteína ligadora de 25(OH)D por un buffer carente de este metabolito, añadido a diez muestras problema.

3.- CONTROL DE CALIDAD DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACION DE 25(OH)D

3.1 Antígeno marcado

El 25(OH)D marcado con tritio se cromatografía en columna C_{18-OH} en un periodo de tiempo próximo a la fecha de marcaje (Ensayo A) y a la fecha de caducidad (Ensayo B). Se recogen 25 tubos de eluido cuyos contajes de radiactividad se muestran en la Tabla V y se representan en la Figura 7.

Tabla V.- Control del 25(OH)D marcado

Tubo / Eluido	ENSAYO A Fecha 26/2/91		ENSAYO B Fecha 27/6/91	
	Dpm	(%)	Dpm	(%)
1 25(OH)D marcado	226	(0,3%)	419	(0,7%)
2 Agua ultrapura	6368	(8,56%)	6945	(12,4%)
3 Metanol/Agua (70%)	770	(1,03%)	588	(1,04%)
4 Clor.Met/n-Hex (10%)	30605	(41%)	10814	(19,3%)
5 "	74584	(100%)	56070	(100%)
6 "	1270	(1,7%)	22094	(39,4%)
7 "	257	(0,34%)	4003	(7,13%)
8 "	188	(0,25%)	463	(0,8%)
9 "	133	(0,17%)	223	(0,4%)
10 "	103	(0,13%)	169	(0,3%)
11 "	184	(0,24%)	132	(0,23%)
12 "	80	(0,1%)	109	(0,19%)
13 "	80	(0,1%)	117	(0,2%)
14 "	62	(0,08%)	75	(0,13%)
15 "	53	(0,07%)	325	(0,6%)
16 "	58	(0,07%)	73	(0,13%)
17 "	55	(0,07%)	882	(1,57%)
18 "	50	(0,06%)	1263	(2,2%)
19 "	51	(0,06%)	263	(0,47%)
20 "	52	(0,06%)	112	(0,2%)
21 "	50	(0,06%)	60	(0,1%)
22 "	51	(0,06%)	40	(0,07%)
23 "	51	(0,06%)	51	(0,09%)
24 Isopr/n-Hexano (1%)	65	(0,08%)	60	(0,1%)
25 Isopr/n-Hexano (5%)	92	(0,12%)	85	(0,15%)

CONTROL 25(OH)D MARCADO

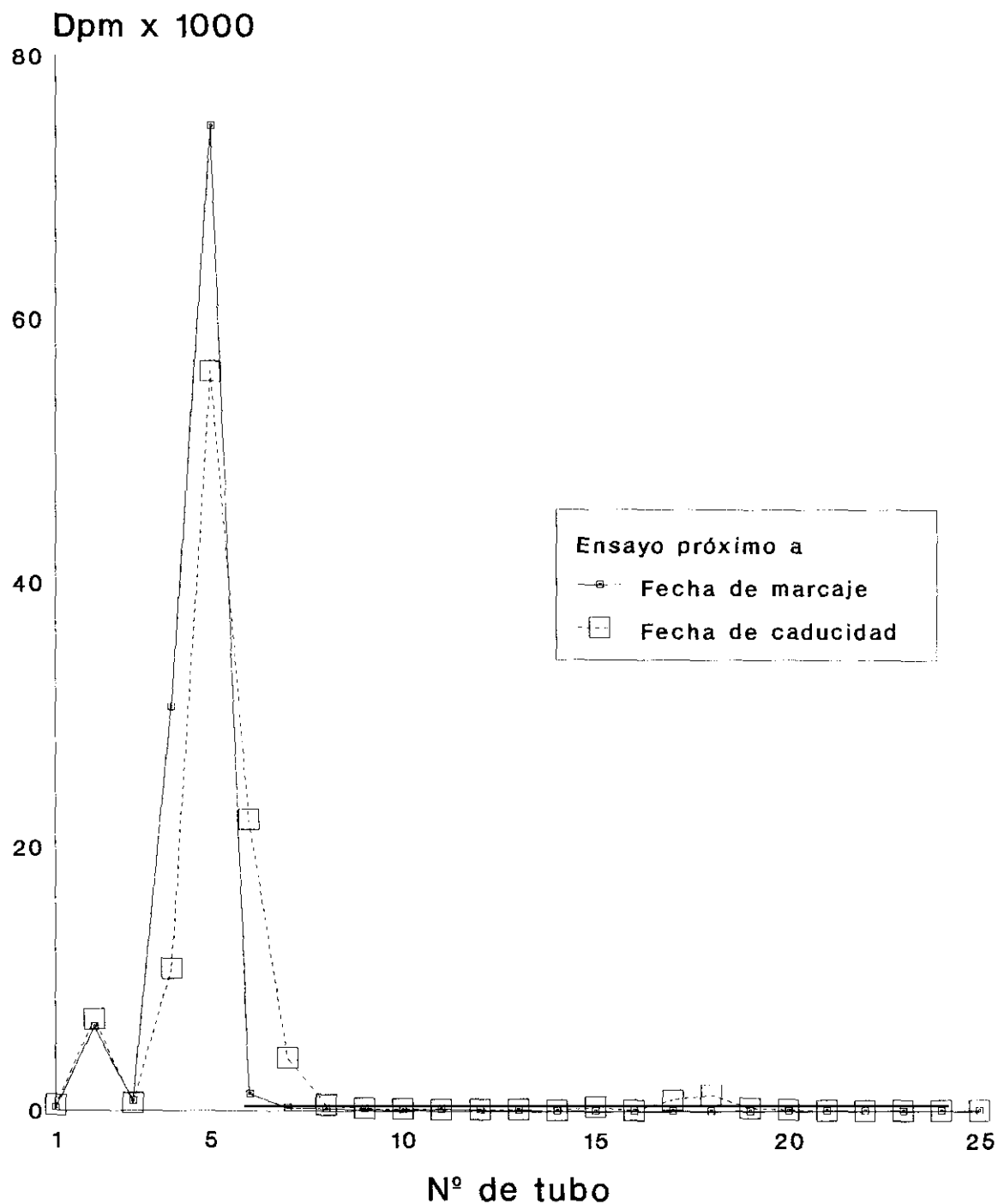


Fig. 7.- Control del 25(OH)D marcado

3.2 Antígeno frío

En la Tabla VI hemos recogido los resultados del análisis de unión competitiva con proteínas ligadoras de 25(OH)D de los 10 tubos de eluido, tras la cromatografía de una mezcla de 25(OH)D, al que hemos sometido previamente a un proceso de extracción (Ensayo A = con Acetonitrilo, Ensayo B = con el reactivo de alcohol: etanol, metanol, isopropanol).

Tabla VI. Control de calidad de los estándares de 25(OH)D

Nº Tubo	ENSAYO A (ng/mL)	ENSAYO B (ng/mL)
1	6,4	24,5
2	53,5	156
3	89,5	36,8
4	28,5	4,2
5	7,3	0
6	5,4	0
7	0	0
8	0	6
9	0	11
10	0	9

La Figura 8 muestra la concentración de 25(OH)D en cada uno de los tubos del eluido; donde podemos apreciar que con ambos procesos de extracción, aparece un pico de máxima concentración de 25(OH)D entre el segundo y tercer tubo, siendo a partir del quinto, prácticamente indetectable.

CONTROL 25(OH)D NO MARCADO

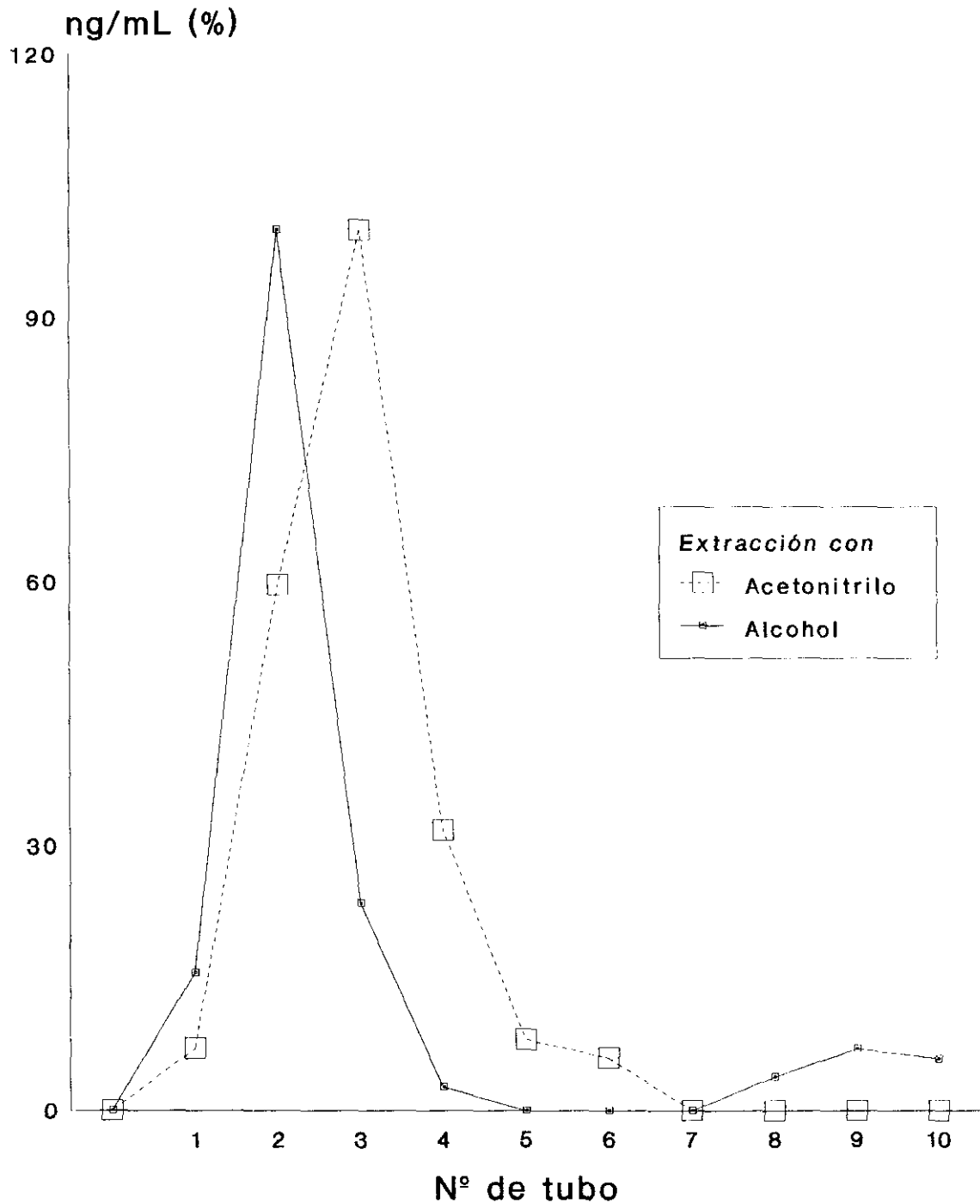


Fig. 8.- Control de calidad de los estándares de 25(OH)D

3.3 Proteína ligadora

Hemos realizado la representación gráfica de Scatchard para la curva estándar media ($n = 10$) y para una curva estándar elegida al azar, según los datos de las Tablas VII y VIII. Posteriormente hemos calculado los valores de las constantes de afinidad a partir de las curvas de las Figuras 9 y 10.

Tabla VII. Valores de la curva de Scatchard media de 25(OH)D

Ag (ng/mL)	B / T (tanto por uno)	B (Ag ó B/T)	F / T (1-B/T)	B / F (B/T:F/T)
0	0,3505	0	0,6495	0,5396
4	0,3095	1,238	0,6905	0,4482
11	0,2779	3,056	0,7221	0,3848
22	0,2202	4,844	0,7798	0,2823
50	0,1624	8,120	0,8376	0,1938
120	0,1216	14,592	0,8784	0,1384

$K_a = 3,28 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$
$K_b = 1,05 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$

Tabla VIII. Valores de la curva de Scatchard elegida al azar de 25(OH)D

Ag (ng/mL)	B / T (tanto por uno)	B (Ag ó B/T)	F / T (1-B/T)	B / F (B/T:F/T)
0	0,3435	0	0,6565	0,5396
4	0,3105	1,243	0,6845	0,4482
11	0,2811	3,043	0,7196	0,3848
22	0,2198	4,819	0,7811	0,2823
50	0,1665	8,112	0,8296	0,1938
120	0,1222	14,765	0,8467	0,1354

$K_a = 3,37 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ $K_b = 1,09 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$
--

CONTROL PROTEINA LIGADORA 25(OH)D CURVA SCATCHARD MEDIA

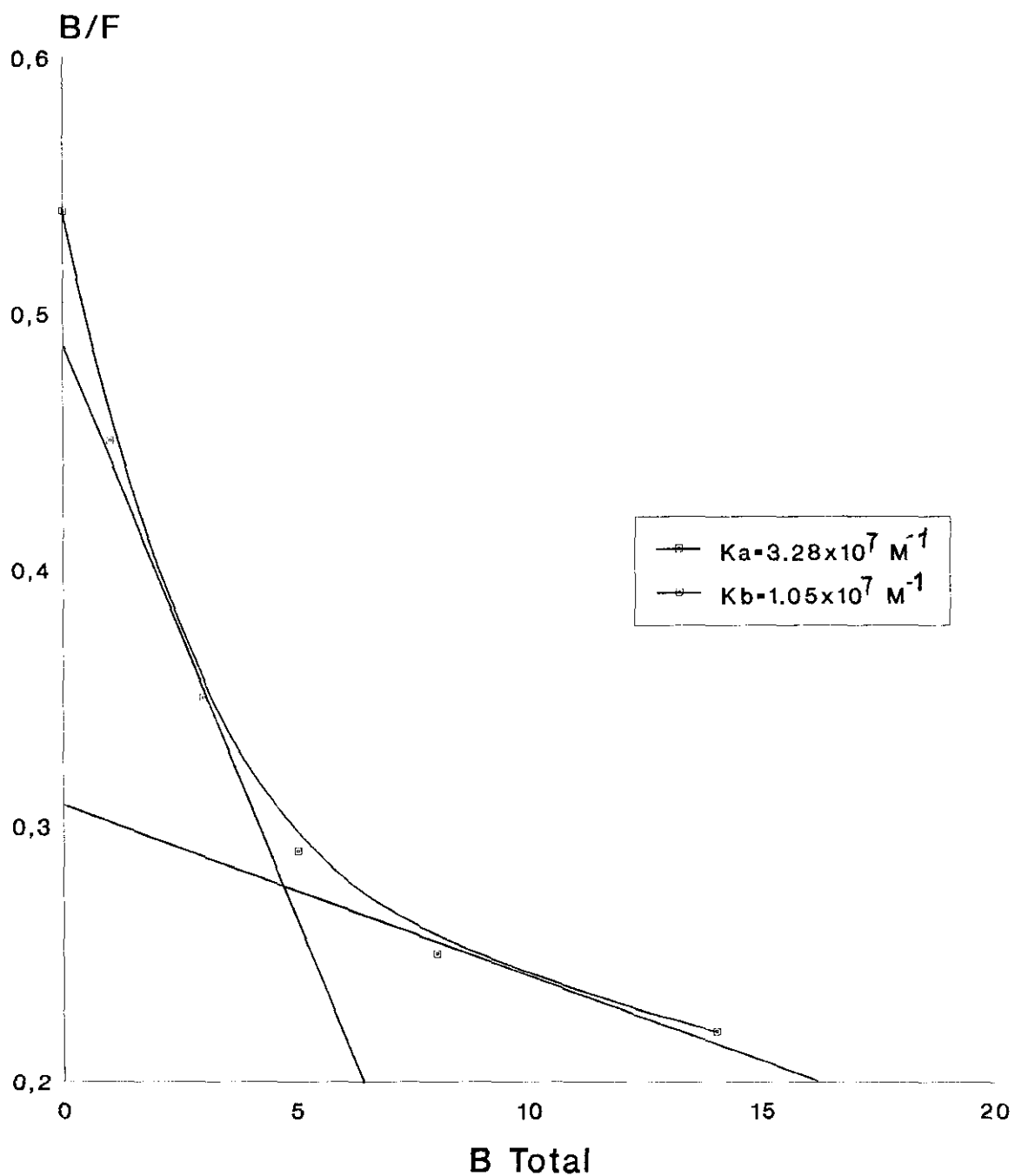


Fig. 9.- Curva de Scatchard media de 25(OH)D

CONTROL PROTEINA LIGADORA 25(OH)D CURVA ELEGIDA AL AZAR

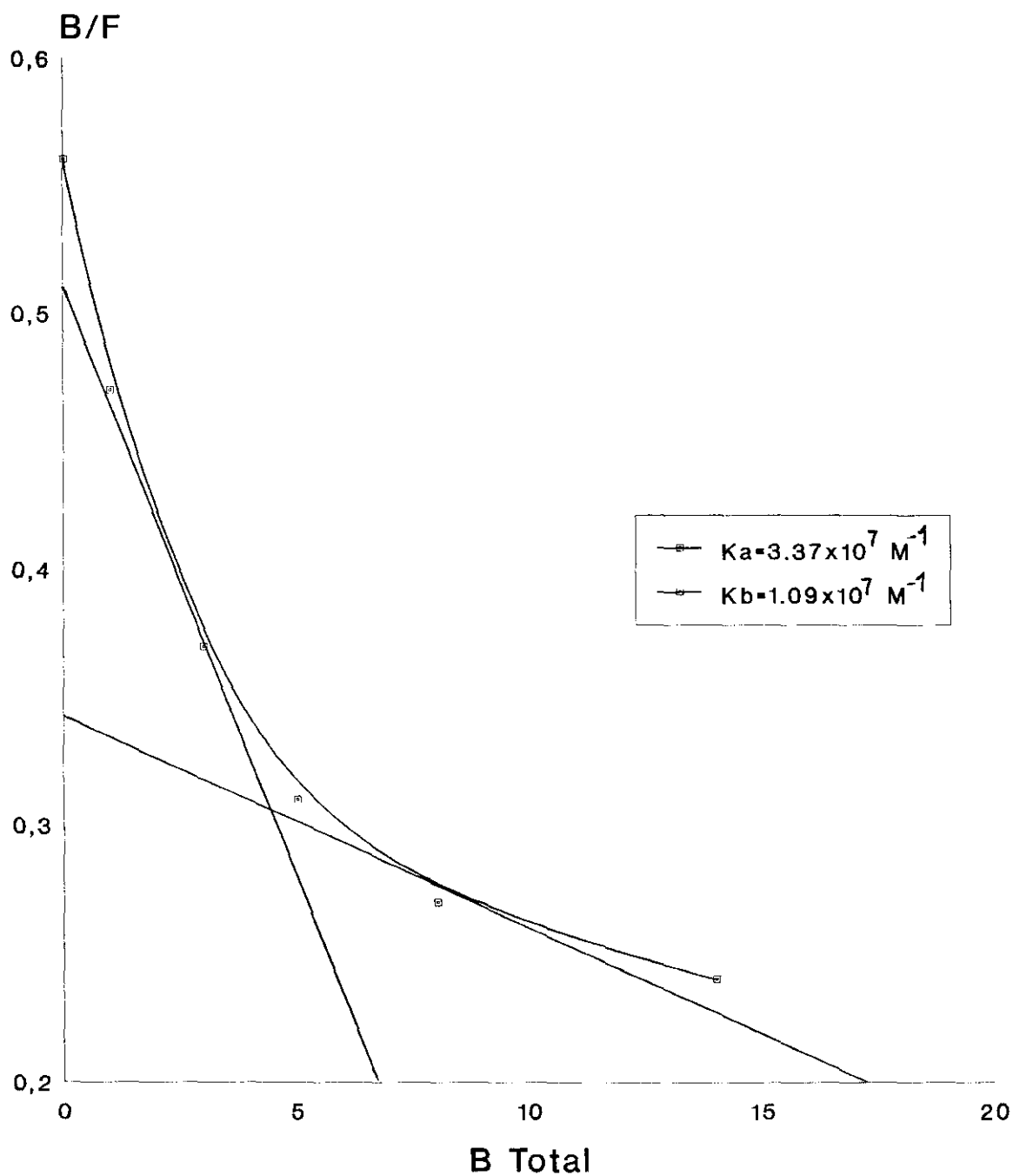


Fig. 10.- Curva de Scatchard elegida al azar de 25(OH)D

4. VALIDACION DEL METODO DE DETERMINACION DE 25(OH)D

4.1 Estudio de la imprecisión

Los resultados de la imprecisión intra-análisis del método de determinación de 25(OH)D aparecen en la Tabla IX y se representa en la Figura 11.

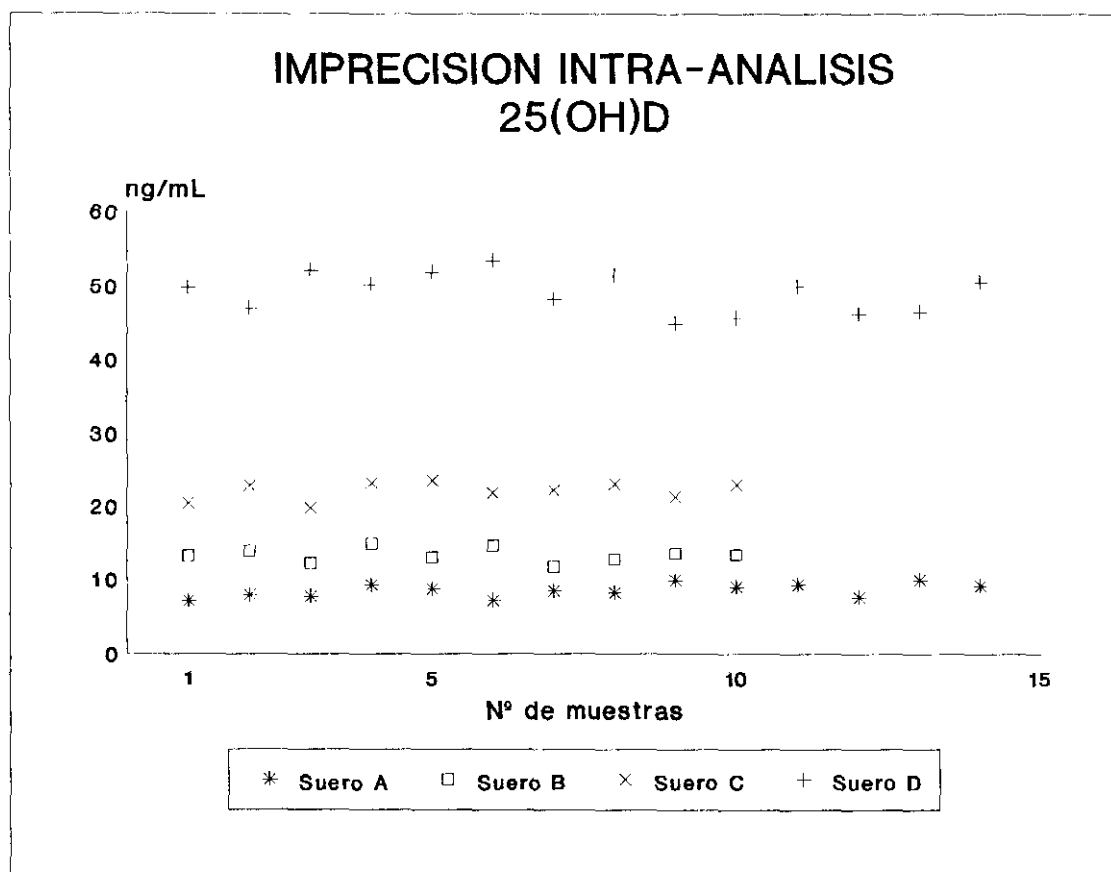


Fig. 11.- Variación intra-análisis del método de determinación de 25(OH)D

Tabla IX. Variación intra-análisis del método de determinación de 25(OH)D

SUERO A (ng/mL)	SUERO B (ng/mL)	SUERO C (ng/mL)	SUERO D (ng/mL)
9,2	13,7	25,4	48,2
7,1	13,2	20,4	50,9
7,8	13,9	22,8	50,2
9,7	12,2	19,8	52,1
10,3	14,9	23,2	56
9,8	13,1	23,5	55,8
7,2	14,6	19,9	53,45
8,5	11,8	22,2	50,5
8,2	12,8	24,1	47
9,9	10,5	23	43,8
9			45,6
9,4			49,9
7,7			46,1
10			46,4
n = 14	10	10	14
Media = 8,3	13,1	22,4	49,7
2 Desv. Est. = 1,09	1,32	1,86	3,75
CV % = 12,35	10,13	8,32	7,55
CV INTRA-ANALISIS MEDIO = 7,93 %			

La variación inter-análisis ha oscilado entre 11,98% y 10,18%, para dos sueros con diferentes concentraciones de 25(OH)D y analizados por duplicado durante 15 días diferentes.

La media de la imprecisión inter-análisis ha sido de 11,08% (Tabla X y Figura 12).

Tabla X. Imprecisión inter-análisis del método de determinación de 25(OH)D

SUERO A (ng/mL)		SUERO B (ng/mL)
33,5		58,6
28,7		70,2
29,6		71,1
27,5		58,3
31		72,1
28,1		64,5
32,4		70,5
30,1		57,5
26,4		77
29,8		56,2
23		60,8
27,5		56,9
23		66,3
23,8		65,5
24		66
15	n	15
27,7	Media	64,8
3,31	2 Desviac. Estándar	6,6
11,98	CV %	10,18
CV INTER-ANALISIS MEDIO = 11,08 %		

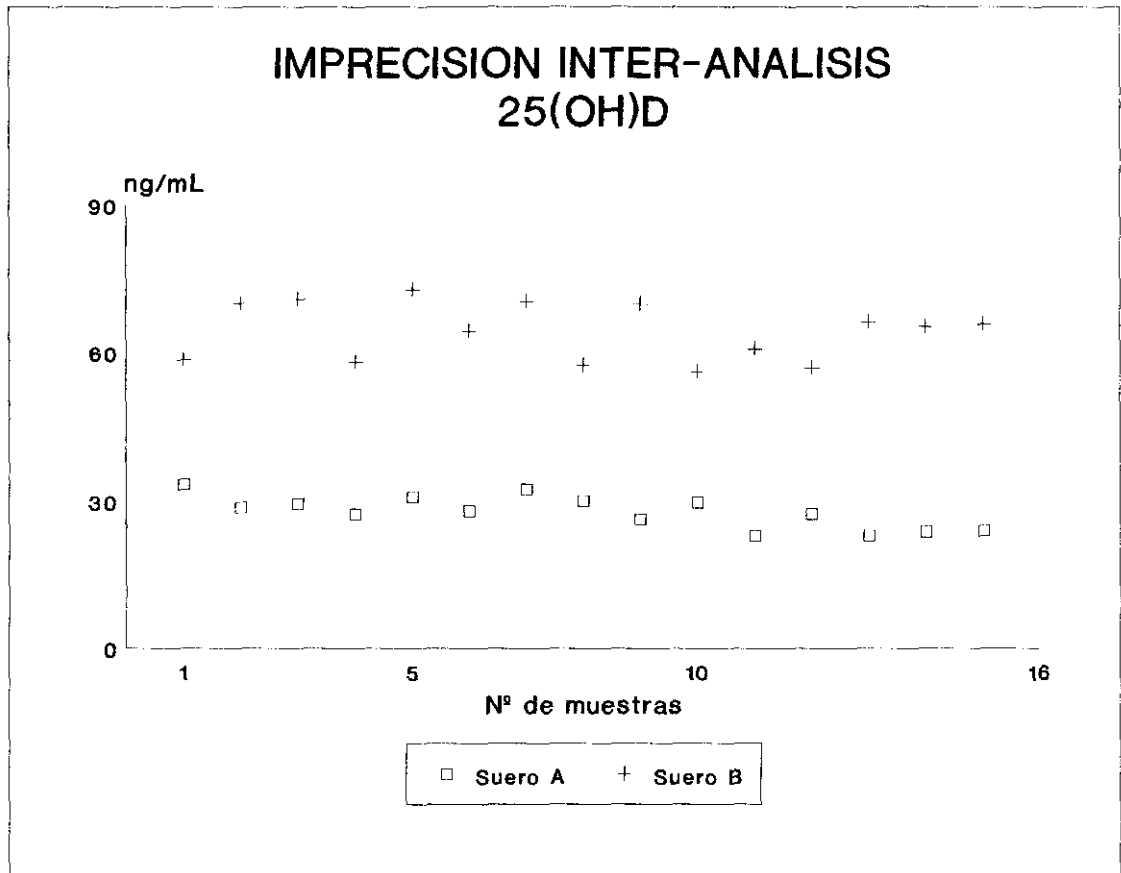


Fig. 12.- Imprecisión inter-análisis del método de determinación de 25(OH)D

4.2 Estudio de la inexactitud

A un suero humano con una concentración determinada de 25(OH)D le hemos añadido diferentes cantidades de un estándar con una concentración conocida de 25(OH)D, analizando la concentración de este metabolito antes y después de la adición, y calculando el porcentaje de recuperación que osciló entre 84,81% y 104,3 % con un valor medio de 94,9 % (Tabla XI).

Tabla XI. Análisis de la inexactitud del método de determinación de 25(OH)D

VALOR ESPERADO (ng/mL)	VALOR OBTENIDO (ng/mL)	RECUPERACION (%)
47,2	47,8	101,3
65,4	68,3	104,3
83,6	74,6	89,3
101,3	86,3	84,8
RECUPERACION MEDIA = 94,9 %		

4.3 Estudio de la especificidad

Los test de diluciones seriadas que hemos llevado a cabo, con una solución de suero fisiológico (antes del proceso de extracción con el reactivo de alcohol) y con una solución estándar que contiene 0 ng/mL de 25(OH)D (después del proceso de extracción con el reactivo de alcohol), presenta una especificidad adecuada como se muestra en la Figura 13.

Del estudio de las posibles interferencias en la determinación de 25(OH)D, producidas al añadir cantidades crecientes de diferentes metabolitos de la vitamina D: 24,25(OH)₂D, 25,26(OH)₂D y 1,25(OH)₂D hemos obtenido los resultados que se reflejan en la Figura 14.

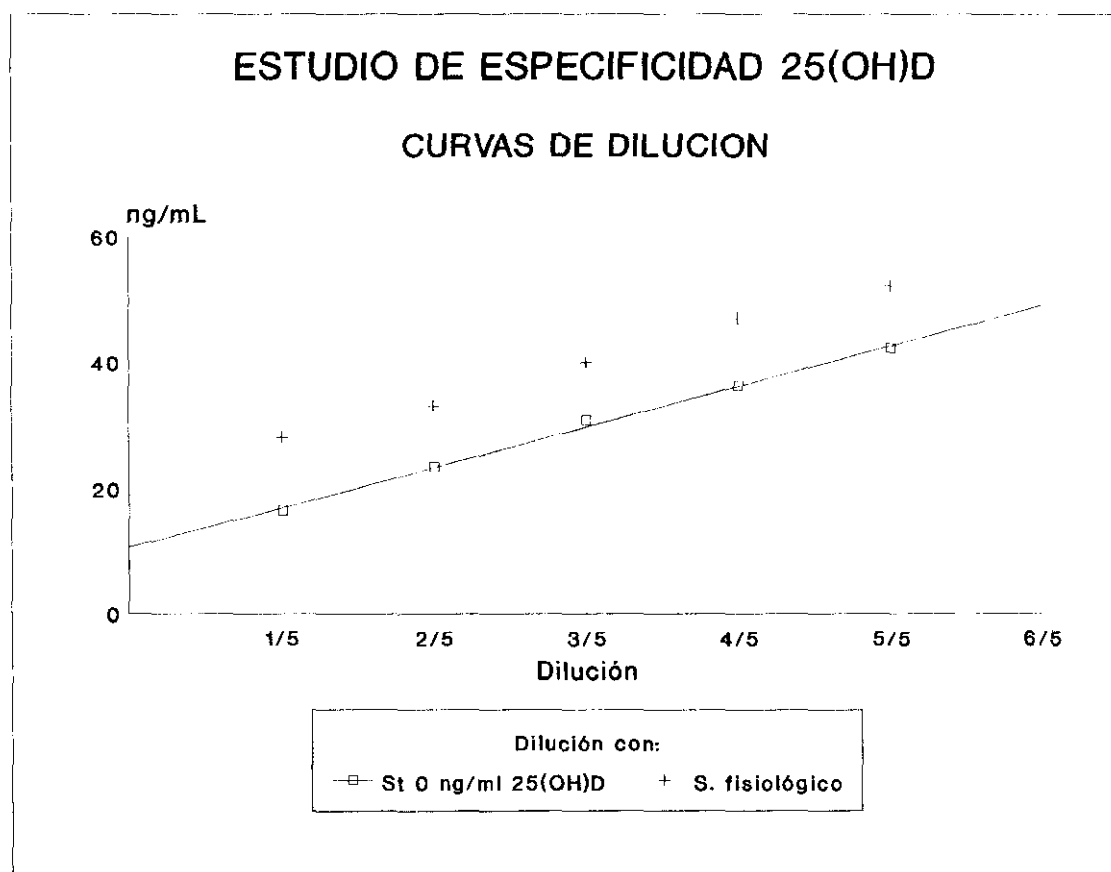


Fig. 13.- Test de diluciones del método de 25(OH)D

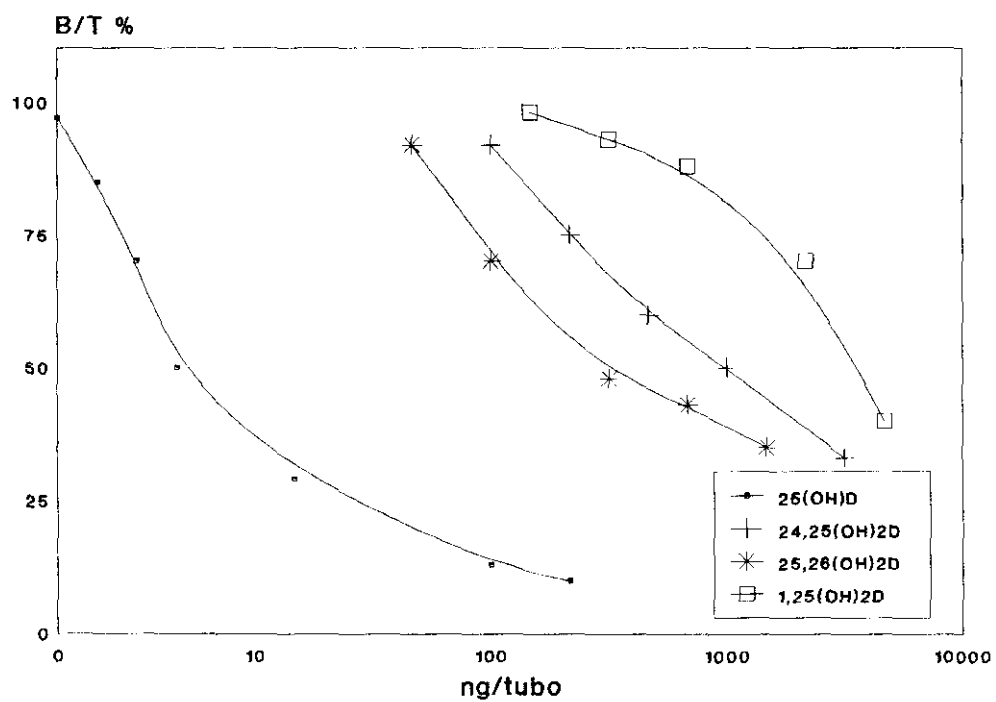


Fig. 14.- Reacciones cruzadas del método de 25(OH)D

4.4 Límite de detección

El límite de detección para el método que hemos empleado en la cuantificación de 25(OH)D, lo estimamos próximo a 3,5 ng/mL, con un grado de certeza del 95%.

4.5 Intervalo analítico

El intervalo de concentración para el que podemos aplicar el método, sin realizar ninguna modificación, oscila entre 3,5 y 120 ng/mL de 25(OH)D.

4.6 Intervalo de referencia

Los niveles séricos de 25(OH)D, a las 3 semanas, fueron significativamente menores en los niños nacidos durante el invierno (Grupo B), que en los nacidos durante el verano (Grupo A) ($p < 0,01$). Sin embargo a los 6 y 9 meses la concentración sérica de 25(OH)D fue significativamente mayor en los niños del Grupo B ($p < 0,01$), no observándose diferencias a los 3 meses (Tabla XII).

Tabla XII.- Valores de referencia de 25(OH)D en los niños nacidos en verano (Grupo A) y en los niños nacidos en invierno (Grupo B) (ng/mL)

	GRUPO A n=22	GRUPO B n=30	ANOVA
3 semanas	31,8 ± 11,5	16,8 ± 7,5	p<0,01
3 meses	32,9 ± 10,2	30,1 ± 9,5	NS
6 meses	32,3 ± 10,4	51,5 ± 16,6	p<0,01
9 meses	33,4 ± 11,2	51,9 ± 13,4	p<0,01

Mientras en el grupo de niños nacidos en verano la concentración de 25(OH)D se ha mantenido estable de las 3 semanas a los 9 meses de vida, en el grupo de niños nacidos en invierno encontramos un incremento significativo de dicha concentración, de las 3 semanas a los 3 meses ($p < 0,001$), y de los 3 meses a los 6 meses de vida ($p < 0,001$) (Figura 15).

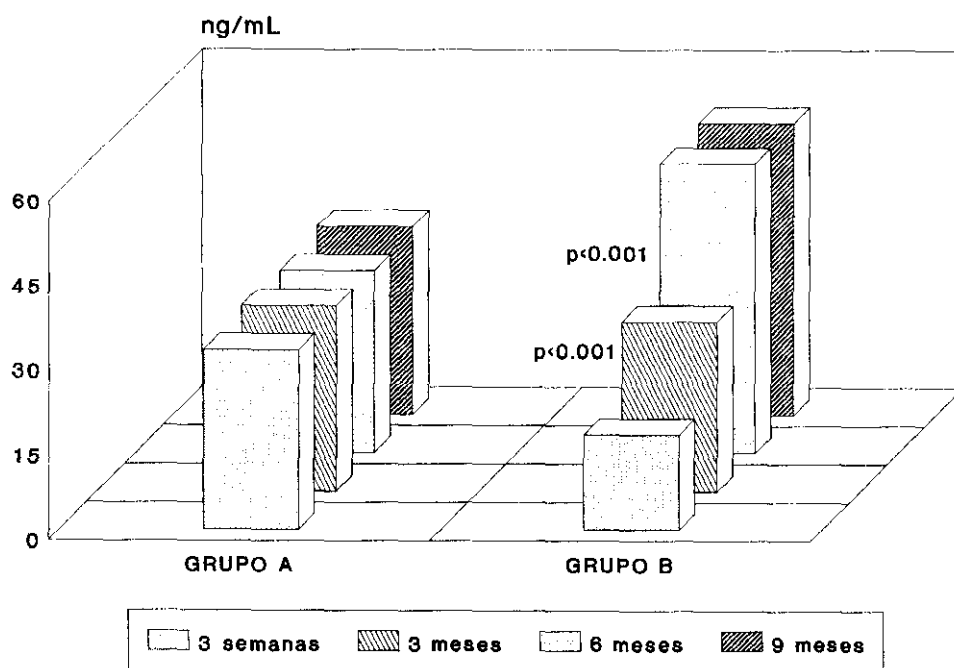


Fig. 15.- Evolución de la concentración sérica de 25(OH)D en los niños nacidos en verano (Grupo A), y en los niños nacidos en invierno (Grupo B)

A las 3 semanas y 3 meses de vida, los niños con lactancia artificial tuvieron una concentración sérica de 25(OH)D superior a la de los niños con lactancia materna ($p < 0,01$), pero no hubo diferencias significativas a los 6 y 9 meses (Tabla XIII).

Respecto al sexo, no encontramos diferencias significativas en la concentración de 25(OH)D (Tabla XIV).

Tabla XIII.- Valores de referencia de 25(OH)D en los niños alimentados con lactancia natural y en los niños alimentados con lactancia artificial (ng/mL)

	LACT. NATURAL n=19	LACT. ARTIFICIAL n=33	ANOVA
3 semanas	17,3 ± 8,6	26,5 ± 12,4	$p < 0,01$
3 meses	24,9 ± 8,9	35,0 ± 10,0	$p < 0,01$
6 meses	40,3 ± 16,7	45,2 ± 17,3	NS
9 meses	47,7 ± 14,3	42,0 ± 15,9	NS

Tabla XIV.- Valores de referencia de 25(OH)D en función del sexo (ng/mL)

	NIÑOS n=29	NIÑAS n=23	ANOVA
3 semanas	21,9 ± 10,0	22,6 ± 13,3	NS
3 meses	32,3 ± 9,6	33,6 ± 11,9	NS
6 meses	45,8 ± 17,7	44,1 ± 16,7	NS
9 meses	43,5 ± 13,8	42,1 ± 16,1	NS

5.- CURVA ESTANDAR MEDIA DEL METODO DE DETERMINACION DE 1,25(OH)₂D

La curva estándar media del método de determinación de 1,25(OH)₂D se ha obtenido representando las concentraciones conocidas de la solución estándar de 1,25(OH)₂D en abscisas, frente al porcentaje de radiactividad para cada valor del estándar respecto al total (B/T %), en ordenadas.

En la Tabla XV mostramos los valores que hemos obtenido en 20 ensayos, y en las Figuras 16 y 17 representamos la curva estándar media y una curva estándar elegida al azar.

Tabla XV. Curva estándar media de 1,25(OH)₂D

CURVA ESTANDAR MEDIA DE 1,25(OH) ₂ D						
Concentración (pg/mL)	0	25	50	100	200	400
B/T %	27,78	23,76	21,12	17,37	11,36	5,44
	26,89	25,18	20,58	17,80	9,66	6,12
	27,61	26,08	24,04	19,50	13,44	7,23
	28,17	24,34	23,32	19,03	14,01	7,51
	30,47	26,14	23,70	20,36	13,75	8,80
	28,34	24,40	24,34	18,80	13,78	7,76
	27,60	24,63	22,73	17,79	12,28	6,58
	27,02	24,93	21,60	18,82	11,89	5,65
	29,75	27,37	24,44	19,25	14,33	7,72
	30,57	27,15	25,05	19,91	15,13	9,02
	29,61	25,70	24,19	16,85	9,64	3,49
	27,68	26,20	24,15	16,30	10,15	3,62
	26,00	24,35	22,96	17,62	12,88	6,57
	26,87	26,03	21,28	19,09	11,86	5,61
	28,67	26,05	22,05	16,87	12,09	5,79
	27,55	26,46	23,62	18,34	13,29	6,65
	30,47	26,95	24,66	17,77	9,14	4,35
	27,36	26,14	25,14	17,05	9,54	4,36
	28,20	26,04	24,66	19,45	12,55	5,36
	29,09	27,67	25,47	19,66	12,90	7,02
Media	28,18	25,89	23,45	18,39	12,18	6,23
2 Desv.Típica	1,38	1,19	1,42	1,13	1,72	1,52
CV %	5,08	4,74	6,19	6,29	1,45	2,50

CURVA ESTANDAR MEDIA 1,25 (OH)₂ D

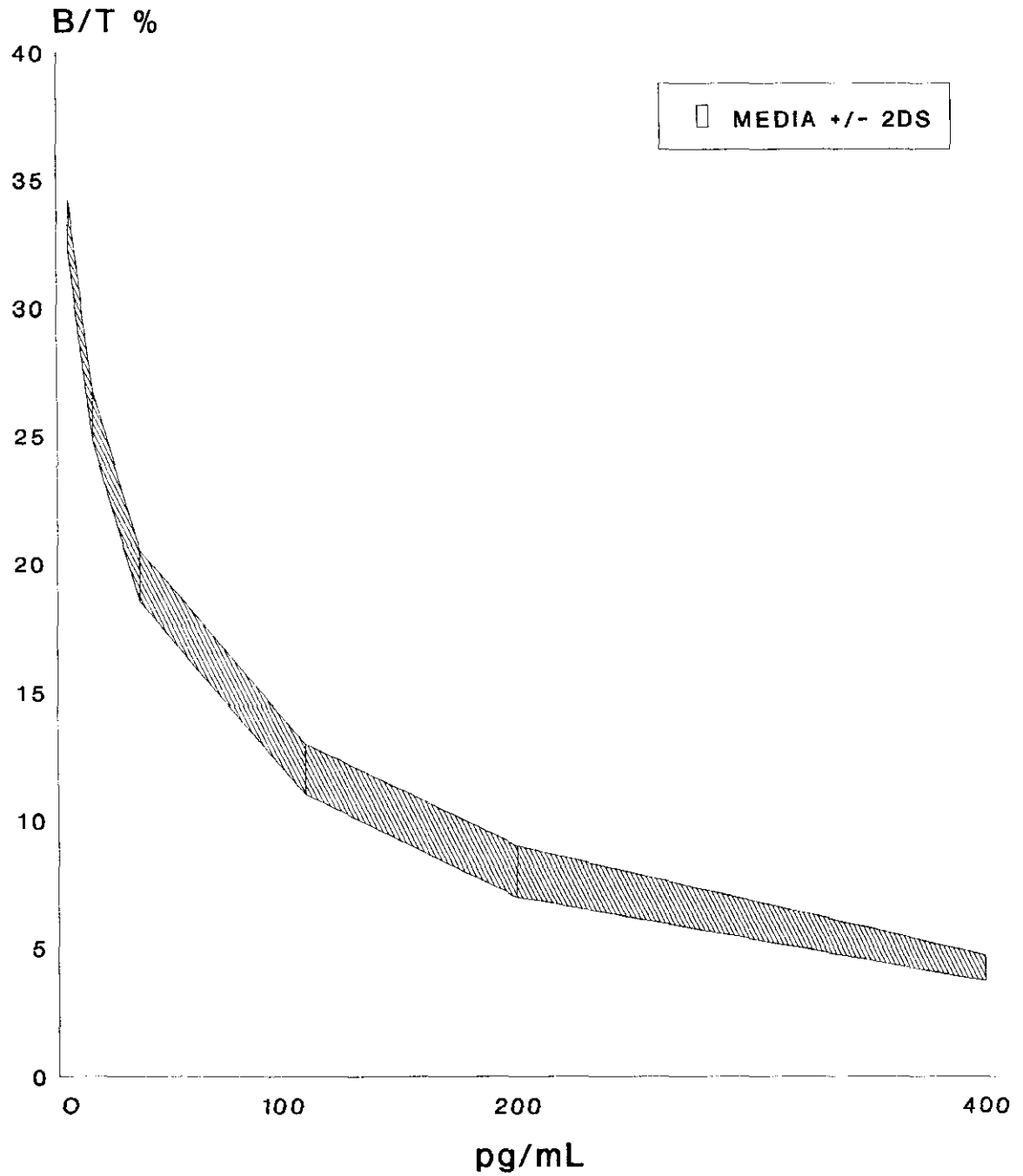


Fig. 16.- Curva estándar media de 1,25(OH)₂D

CURVA ESTANDAR ELEGIDA AL AZAR 1,25 (OH)₂ D

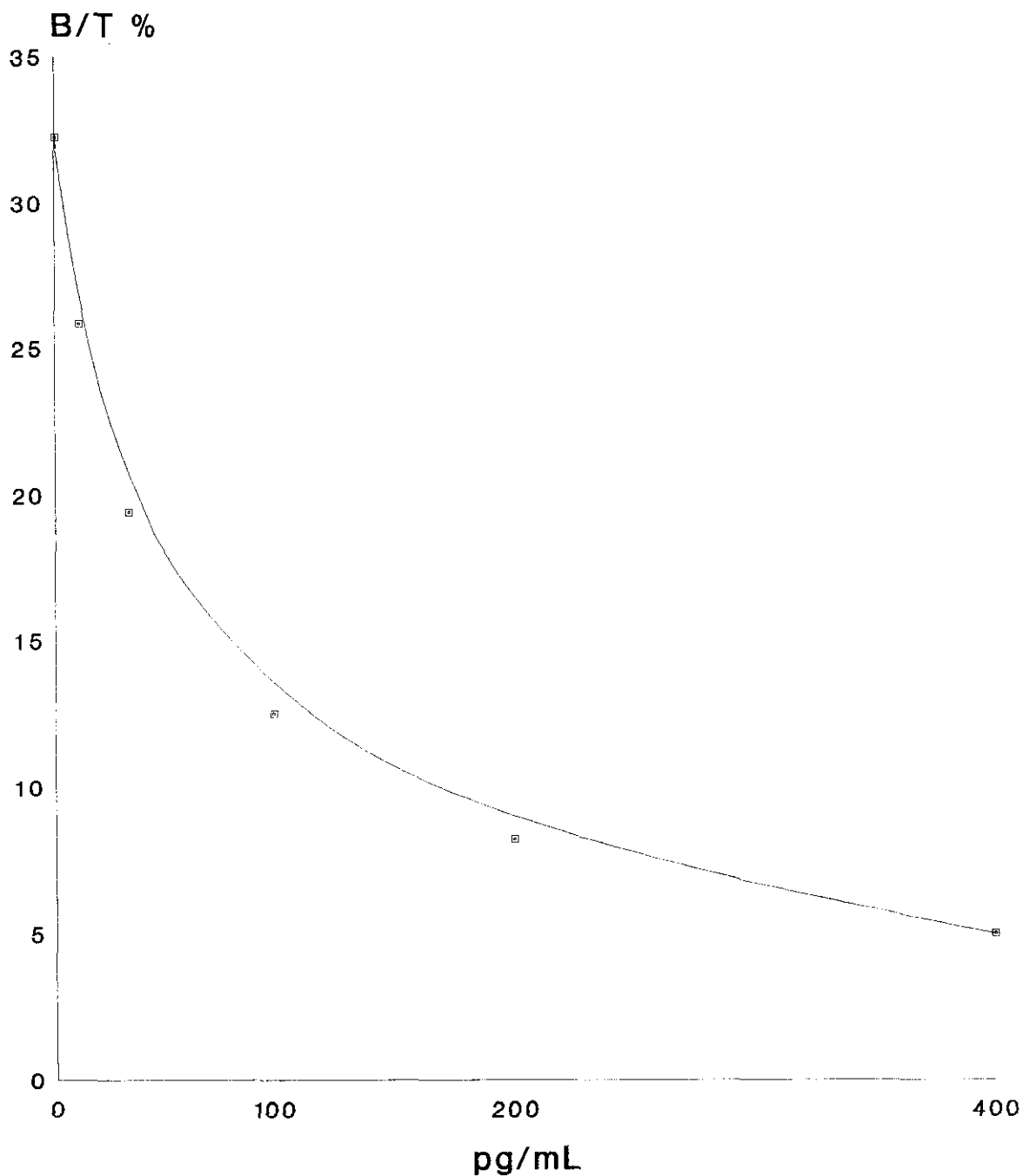


Fig. 17.- Curva estándar elegida al azar de 1,25(OH)₂D

6.- LIGAZON INESPECIFICA DEL METODO DE DETERMINACION DE 1,25(OH)₂D

La media obtenida de los valores de la unión inespecífica de 20 ensayos realizados, ha sido de $0,031 \pm 0,010$ %.

7.- CONTROL DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACION DE 1,25(OH)₂D

7.1 Antígeno marcado

Hemos cromatografiado en columna C_{18-OH} el 1,25(OH)₂D tritiado según las indicaciones expresadas en el capítulo de Material y Métodos, en una fecha próxima al marcaje del 1,25(OH)₂D (Ensayo A) y a la caducidad del mismo (Ensayo B).

La radiactividad en dpm, recogida en cada uno de los 25 tubos del eluido, se muestra en la Tabla XVI que se corresponde con la Figura 18.

Tabla XVI.- Control del 1,25(OH)₂D marcado

Tubo / Eluido	ENSAYO A Fecha 28/2/91		ENSAYO B Fecha 29/7/91	
	Dpm	(%)	Dpm	(%)
1 1,25(OH) ₂ D marcado	44,5	(0,47)	42	(0,46)
2 Agua ultrapura	68	(0,72)	74	(0,81)
3 Metanol/Agua (70%)	215,5	(2,3)	183	(2)
4 Clor.Met/n-Hex (10%)	960	(10,12)	638	(6,9)
5 Isopr./Hexano (1%)	689,5	(7,26)	520	(0,57)
6 Isopr./Hexano (5%)	9481	(100)	7653	(83,9)
7 "	7833,8	(82,63)	9115	(100)
8 "	1290	(13,61)	1063	(11,66)
9 "	712,5	(7,51)	426	(4,56)
10 "	348	(3,67)	263	(2,88)
11 "	204,5	(2,15)	196	(2,15)
12 "	388	(4,09)	199	(2,18)
13 "	423	(4,46)	203	(2,22)
14 "	164	(1,73)	76	(0,83)
15 "	63	(0,66)	62	(0,68)
16 "	84	(0,88)	83	(0,91)
17 "	56	(0,59)	61	(0,66)
18 "	62	(0,66)	58	(0,63)
19 "	69	(0,72)	43	(0,47)
20 "	53	(0,55)	62	(0,68)
21 "	73	(0,77)	68	(0,74)
22 "	52	(0,54)	61	(0,66)
23 "	50	(0,53)	52	(0,57)
24 "	50	(0,53)	50	(0,54)
25 "	50	(0,53)	50	(0,54)

CONTROL 1,25 (OH)₂ D MARCADO

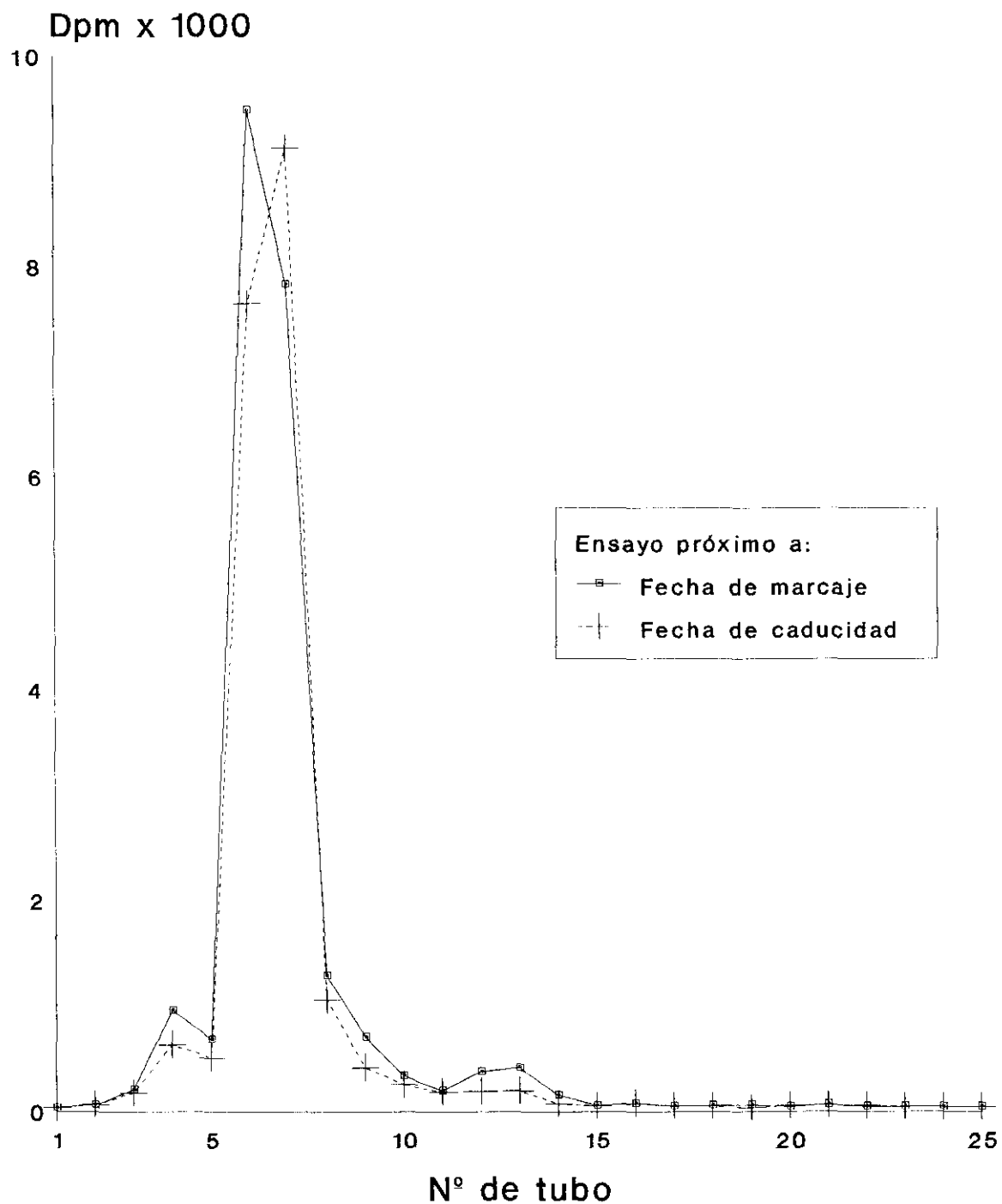


Fig. 18.- Control del 1,25(OH)₂D marcado

7.2 Antígeno frío

Los resultados del control de calidad del estándar de 1,25(OH)₂D, los hemos recogido en la Tabla XVII, donde aparecen los pg/mL obtenidos con el análisis de unión competitiva de los 10 tubos del eluido, recogido tras la cromatografía de dicho estándar, realizado en dos ocasiones (Ensayo A y Ensayo B).

Tabla XVII. Control de calidad del estándar de 1,25(OH)₂D

Nº Tubo	ENSAYO A (pg/mL)	ENSAYO B (pg/mL)
1	37	35,3
2	117,7	123,2
3	36,4	20,8
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0

En la Figura 19 hemos representado la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ de cada tubo, donde podemos observar, en los dos análisis realizados en días diferentes, que el pico máximo de este metabolito no marcado eluye en los tres tubos primeros, siendo en el resto indetectable.

CONTROL 1,25 (OH)₂ D NO MARCADO

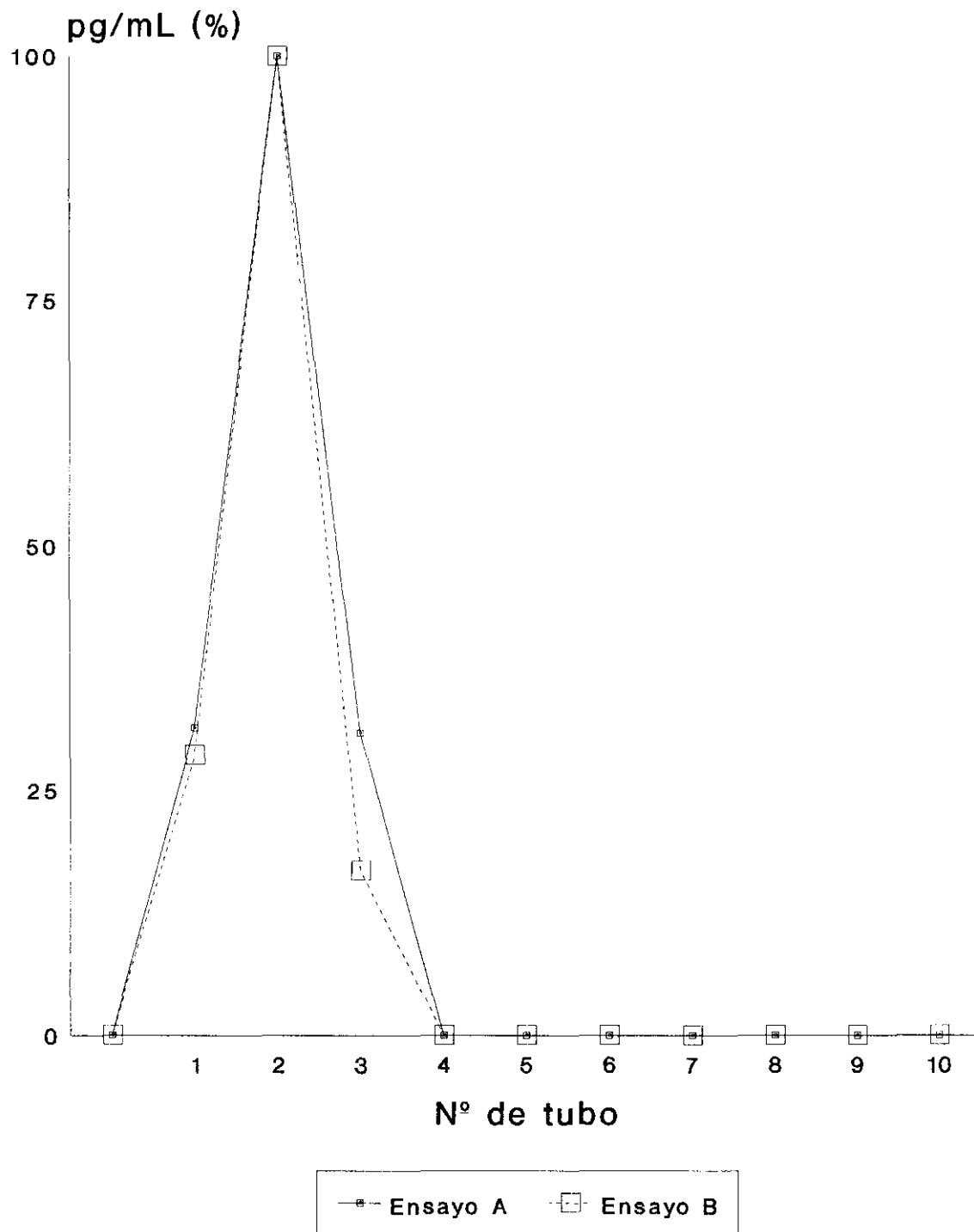


Fig. 19.- Control de calidad de los estándares de 1,25(OH)₂D

7.3 Proteína ligadora

Para la valoración de la proteína de los receptores de timo de ternera utilizada para la determinación de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, hemos realizado una representación gráfica de Scatchard, resultante de la curva estándar media de 20 ensayos, así como, la correspondiente a un ensayo elegido al azar, con los datos que presentamos en la Tablas XVIII y XIX.

Tabla XVIII.- Valores de la curva de Scatchard media de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

Ag (pg/mL)	B / T (tanto por uno)	B (Ag ó B/T)	F / T (1-B/T)	B / F (B/T:F/T)
0	0,3136	0	0,6864	0,4568
25	0,2889	7,2225	0,7111	0,4063
50	0,2618	13,0933	0,7382	0,3546
100	0,2140	21,4055	0,7860	0,2722
200	0,1542	30,8433	0,8458	0,1823
400	0,0948	37,9200	0,9052	0,1047
$K_1 = 4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$				

Tabla XIX.- Valores de la curva de Scatchard elegida al azar de 1,25(OH)₂D

Ag (pg/mL)	B / T (tanto por uno)	B (Ag ó B/T)	F / T (1-B/T)	B / F (B/T:F/T)
0	0,2935	0	0,7065	0,4154
25	0,2660	6,6500	0,7340	0,3624
50	0,2319	11,5950	0,7681	0,3019
100	0,1999	19,9900	0,8001	0,2498
200	0,1317	26,3400	0,8683	0,1517
400	0,0863	34,5200	0,9137	0,0944

$K_1 = 3,89 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$

Las funciones lineales representadas en la Figura 20 y 21, nos permite estimar el valor de la constante de afinidad, que es del mismo orden, en ambos casos.

CONTROL PROTEINA LIGADORA 1,25 (OH)₂ D CURVA SCATCHARD MEDIA

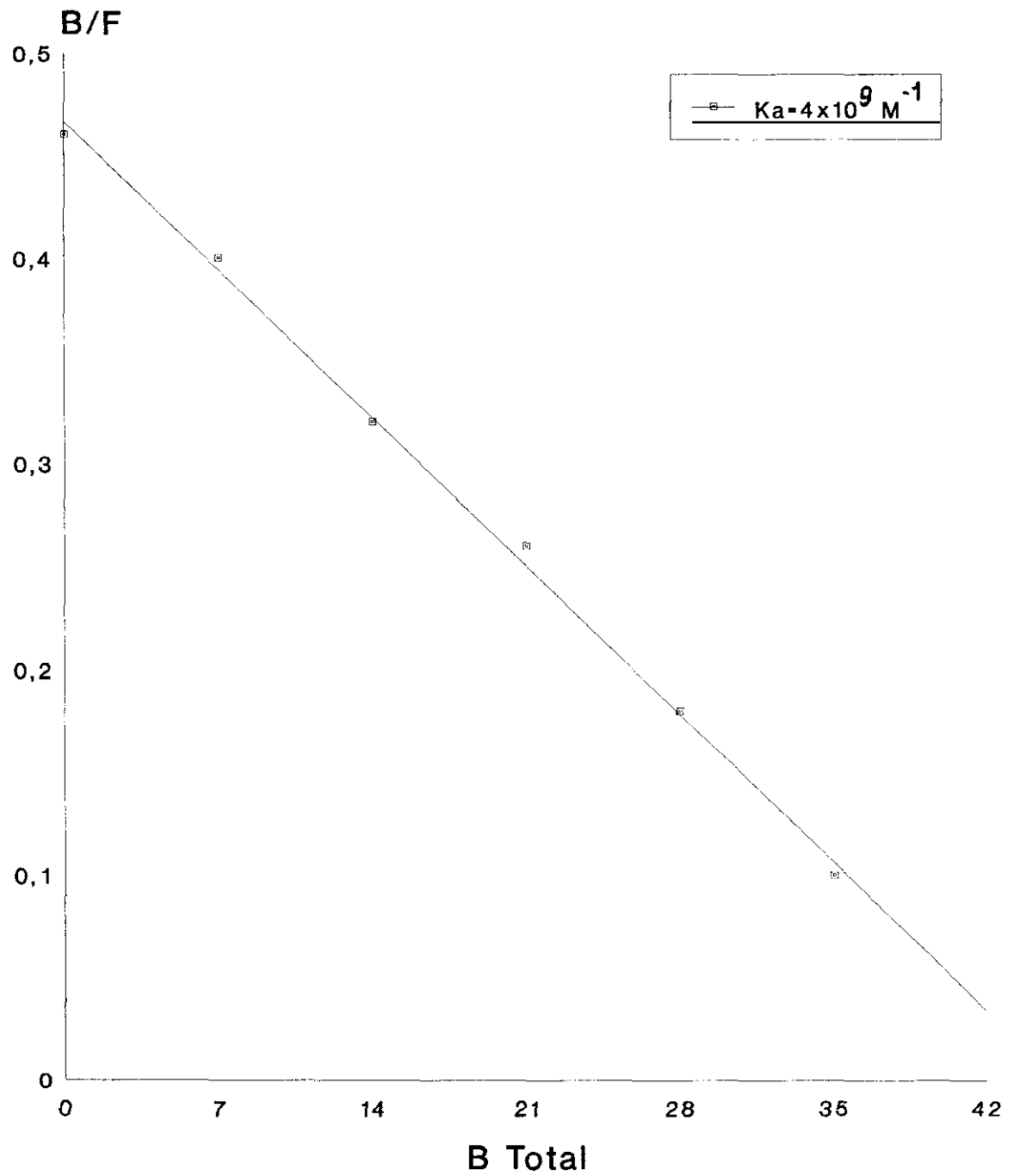


Fig. 20.- Curva de Scatchard media de 1,25(OH)₂D

CONTROL PROTEINA LIGADORA 1,25 (OH)₂ D CURVA SCATCHARD AL AZAR

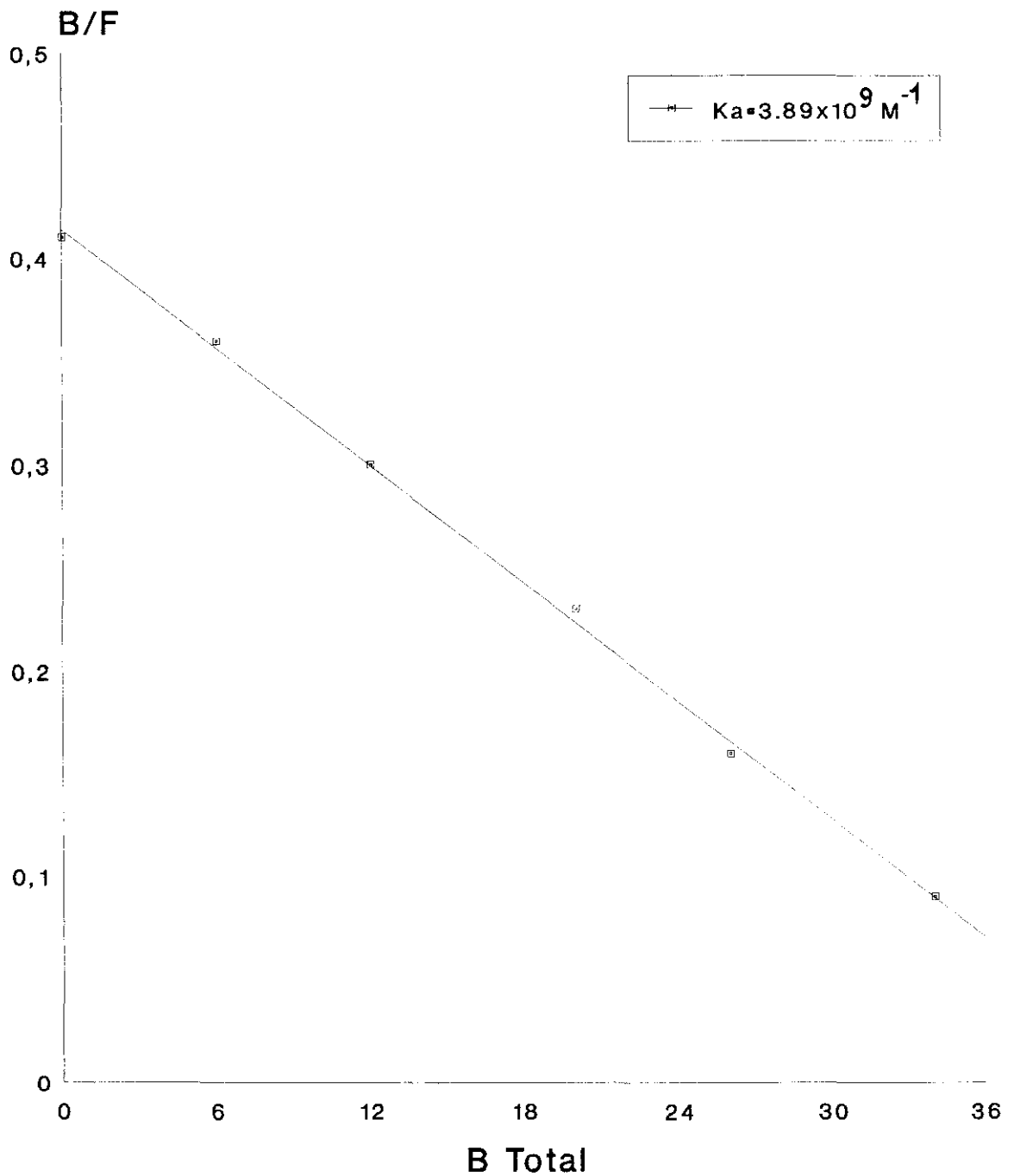


Fig. 21.- Curva de Scatchard elegida al azar de 1,25(OH)₂D

8. – VALIDACION DEL METODO DE DETERMINACION DE 1,25(OH)₂D

8.1 Estudio de la imprecisión

La imprecisión intra-análisis la hemos determinado a partir del coeficiente de variación (%) obtenido en tres muestras con diferentes concentraciones de 1,25(OH)₂D, procesadas catorce veces consecutivas cada una de ella, dentro del mismo análisis (Tabla XX y Figura 22).

Tabla XX.- Variación intra-análisis del método de determinación de 1,25(OH)₂D

SUERO A (pg/mL)	SUERO B (pg/mL)	SUERO C (pg/mL)
23,01	37,53	69,80
21,64	43,10	74,23
21,65	34,46	68,90
20,77	35,23	73,64
21,31	40,08	68,16
20,05	36,25	73,14
21,97	40,13	73,80
25,75	37,32	72,60
24,08	35,55	69,90
21,67	31,51	70,83
21,15	37,59	70,85
23,64	37,98	68,00
20,96	39,92	67,80
23,01	39,35	70,40
n = 14	14	14
Media = 22,19	36,92	70,86
2 Desv. Est. = 1,53	2,56	2,26
CV % = 6,91	6,93	3,20
CV INTRA-ANALISIS MEDIO = 5,68 %		

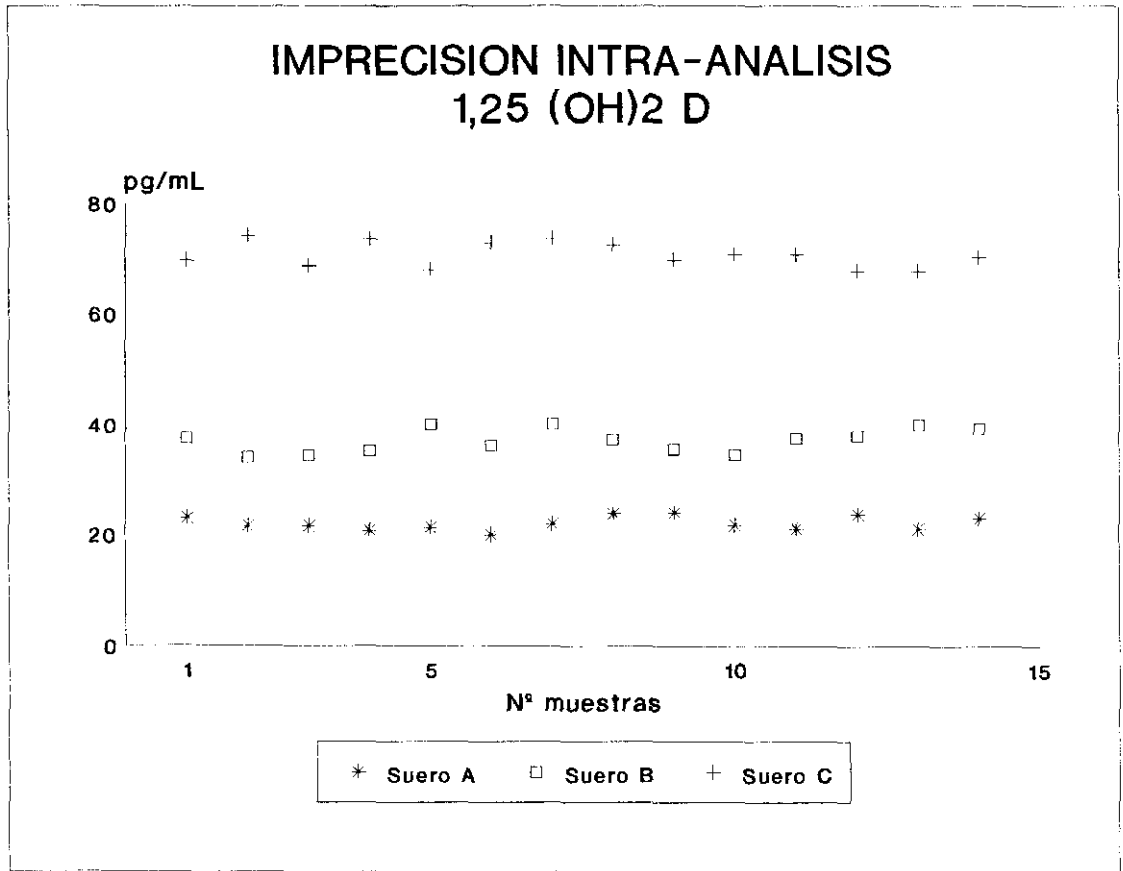


Fig. 22.- Variación intra-análisis del método de determinación de 1,25(OH)₂D

La imprecisión inter-análisis la hemos determinado a partir del coeficiente de variación (%) de los resultados de dos muestras de diferente concentración de 1,25(OH)₂D, procesadas dos veces cada día, en diez análisis diferentes. Los resultados obtenidos han oscilado entre 10,19% y 11,25%, con una imprecisión inter-análisis media de 10,72% (Tabla XXI y Figura 23).

Tabla XXI.- Imprecisión inter-análisis del método de determinación de 1,25(OH)₂D

SUERO A (pg/mL)		SUERO B (pg/mL)	
20,40		36,90	
25,35		38,70	
26,20		40,10	
19,80		39,83	
23,50		34,34	
19,00		30,90	
26,20		34,15	
24,10		32,60	
23,75		39,40	
22,85		33,49	
10	n	10	
23,11	Media	35,74	
2,60	2 Desviac. Estándar	3,64	
11,25	CV %	10,19	
CV INTER-ANALISIS MEDIO = 10,72 %			

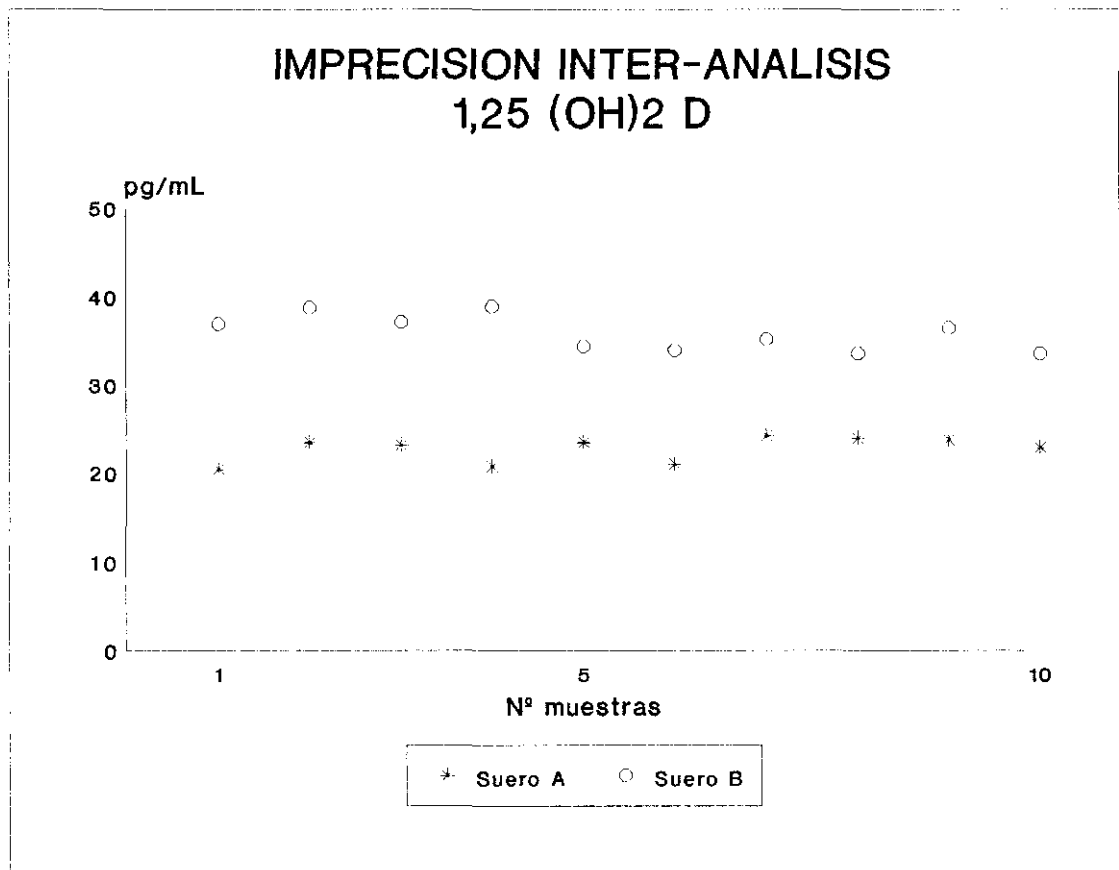


Fig. 23.- Imprecisión inter-análisis del método de determinación de 1,25(OH)₂D

8.2 Estudio de la inexactitud

Para estudiar la inexactitud del análisis de competición proteica de 1,25(OH)₂D, hemos añadido antes de realizar el ensayo, diferentes cantidades de este metabolito a un suero con concentración conocida de 1,25(OH)₂D, encontrándose recuperaciones comprendidas entre 96,7% y 102,3% (Tabla XXII).

Tabla XXII.- Análisis de la inexactitud del método de determinación de 1,25(OH)₂D

VALOR ESPERADO (pg/mL)	VALOR OBTENIDO (pg/mL)	RECUPERACION (%)
98,6	97,7	99,08
136,2	131,8	96,70
173,8	178,7	102,3
211,4	214,3	101,3
RECUPERACION MEDIA = 99,97%		

8.3 Estudio de la especificidad

Para estudiar la especificidad, hemos realizado un test de diluciones seriadas, añadiendo suero fisiológico a una muestra de suero humano (antes de efectuar el proceso de extracción) o una solución estándar que contenía 0 pg/mL de 1,25(OH)₂D (después de realizar la extracción), obteniendo los resultados que se muestran en la Figura 24.

También hemos estudiado las interferencias producidas en la determinación de 1,25(OH)₂D, cuando añadíamos cantidades crecientes de otros metabolitos de la vitamina D, químicamente relacionados con él, como: 25(OH)D, 24,25(OH)₂D y 25,26(OH)₂D (Figura 25).

ESTUDIO DE ESPECIFICIDAD 1,25 (OH)₂ D CURVAS DE DILUCION

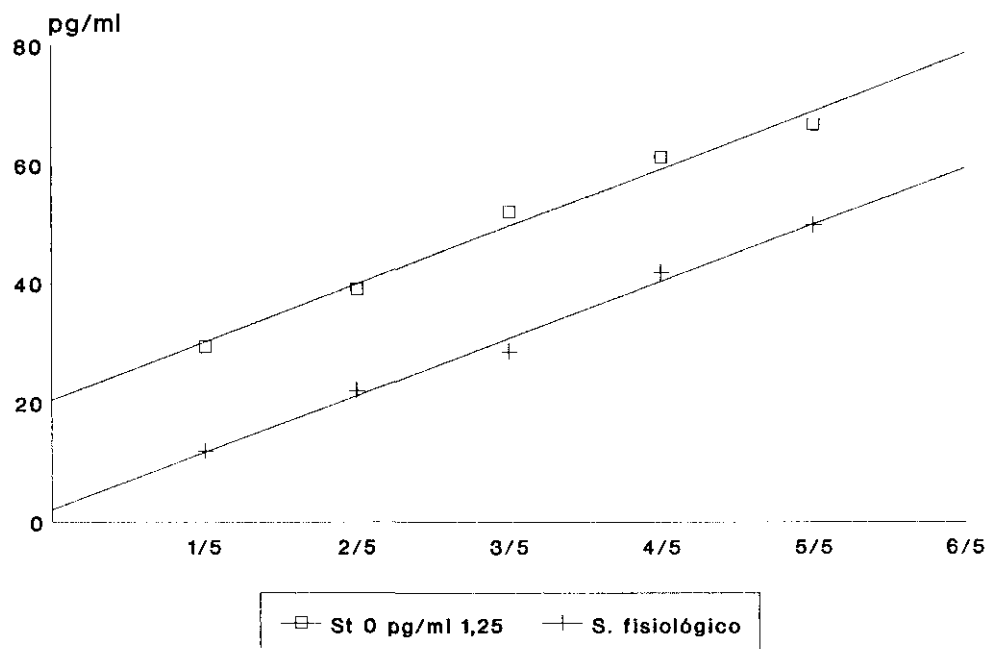


Fig. 24.- Test de diluciones del método de determinación de 1,25(OH)₂D

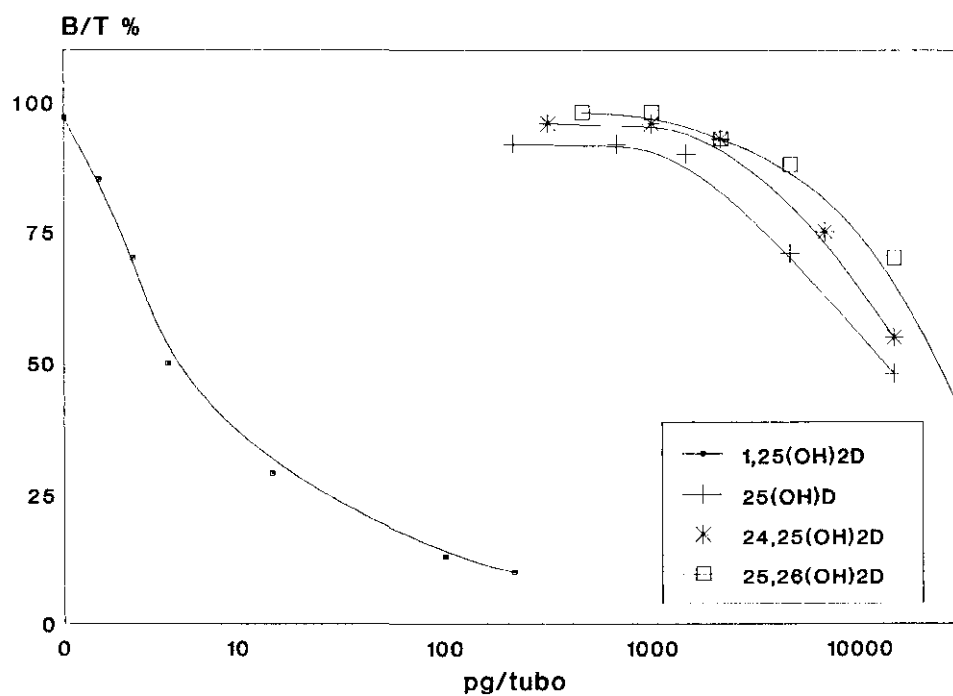


Fig. 25.- Test de reacciones cruzadas del método de determinación de 1,25(OH)₂D

8.4 Límite de detección

El valor medio \pm dos desviaciones estándar, que hemos obtenido en el punto correspondiente a 0 pg/mL de 1,25(OH)₂D, en la curva estándar media resultante de 20 análisis, ha sido aproximadamente de 4,5 pg/mL de 1,25(OH)₂D.

8.5 Intervalo analítico

El intervalo analítico de concentración para el que podemos aplicar el método sin modificaciones, oscila entre 4,5 pg/mL y 400 pg/mL de 1,25(OH)₂D.

8.6 Intervalo de referencia

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 A) y los niños nacidos en invierno (Grupo B). A los 6 y 9 meses de vida, los niños del Grupo B presentaron niveles séricos de 1,25(OH)₂D superiores a los del Grupo A ($p < 0,01$) (Tabla XXIII).

Tabla XXIII.- Valores de referencia de 1,25(OH)₂D en los niños nacidos en verano (Grupo A) y en los niños nacidos en invierno (Grupo B) (pg/mL)

	GRUPO A n=22	GRUPO B n=30	ANOVA
3 semanas	44,4 \pm 17,6	43,1 \pm 14,8	NS
3 meses	57,2 \pm 13,5	61,7 \pm 12,1	NS
6 meses	57,4 \pm 16,4	71,8 \pm 17,1	$p < 0,01$
9 meses	54,9 \pm 10,4	81,3 \pm 15,9	$p < 0,001$

Hemos encontrado un incremento significativo de la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ de las 3 semanas a los 3 meses de vida ($p < 0,01$). De los 3 meses a los 9 meses, los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se mantienen estables en el grupo de niños nacidos en verano, pero en los niños nacidos en invierno se produce un incremento significativo de dichos niveles de los 3 a los 6 meses ($p < 0,01$) y de los 6 a los 9 meses de vida ($p < 0,05$) (Figura 26).

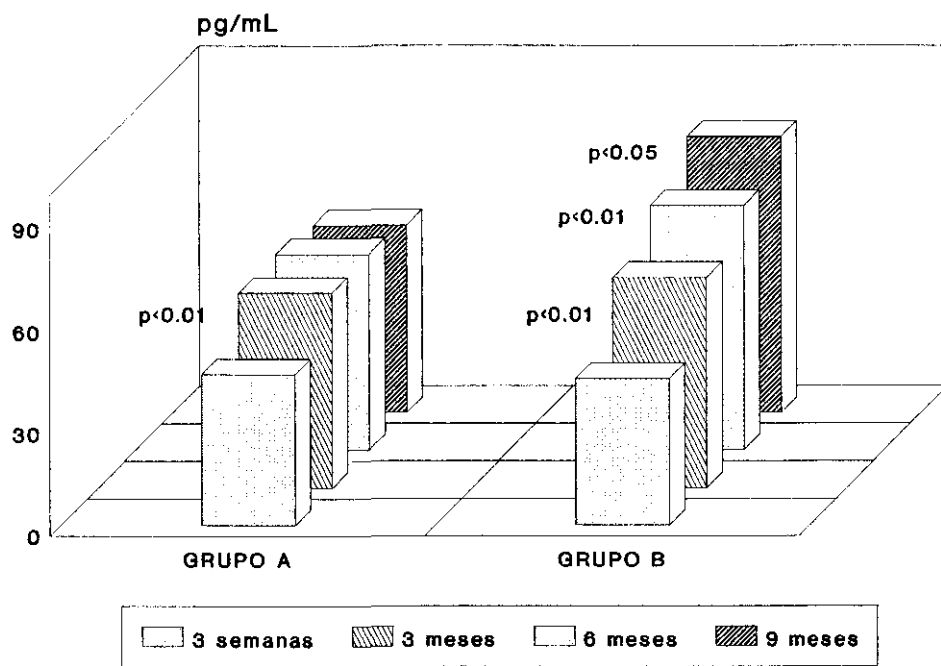


Fig. 26.- Evolución de los niveles séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en los niños nacidos en verano (Grupo A), y en los niños nacidos en invierno (Grupo B)

No hemos observado diferencias significativas en la concentración de 1,25(OH)₂D, ni en relación con la alimentación (Tabla XXIV) ni con el sexo (Tabla XXV).

Tabla XXIV. Valores de referencia de 1,25(OH)₂D en los niños alimentados con lactancia natural y en los niños alimentados con lactancia artificial (pg/mL)

	LACT. NATURAL n=19	LACT. ARTIFICIAL n=33	ANOVA
3 semanas	42,1 ± 16,4	44,6 ± 15,7	NS
3 meses	56,0 ± 14,7	61,9 ± 16,0	NS
6 meses	64,8 ± 17,8	66,3 ± 18,6	NS
9 meses	75,2 ± 17,3	67,3 ± 19,6	NS

Tabla XXV.- Valores de referencia de 1,25(OH)₂D en función del sexo (pg/mL)

	NIÑOS n=29	NIÑAS n=23	ANOVA
3 semanas	45,5 ± 16,5	39,8 ± 14,3	NS
3 meses	61,8 ± 14,6	59,0 ± 13,9	NS
6 meses	68,4 ± 19,0	64,8 ± 15,3	NS
9 meses	70,0 ± 18,7	69,8 ± 18,5	NS

DISCUSSION

DISCUSION

El conocimiento del metabolismo y del mecanismo de acción de la vitamina D tiene gran importancia, no sólo desde el punto de vista nutricional y fisiológico, sino también por su aplicación al estudio de la fisiopatología de las alteraciones del metabolismo óseo y mineral (113).

En el laboratorio no se dispone de métodos sencillos para la cuantificación de la vitamina D y de sus metabolitos; su concentración baja en sangre y su solubilidad escasa, son las dificultades mayores para un análisis preciso.

Las primeras determinaciones de vitamina D se realizaban fundamentalmente mediante bioensayos. Con el "Test de la línea" se valoraba la actividad de la vitamina D y de sus metabolitos en las ratas (114). Otros métodos "in vivo" se basaban en la valoración de los efectos de la vitamina D sobre el transporte intestinal de calcio o su movilización desde el hueso (115,116). También se utilizaba la cuantificación del calcio en la ceniza de los huesos, como marcador de la actividad de la vitamina D. Todos estos bioensayos se empleaban para determinar el potencial biológico de nuevos preparados de vitamina D sintética, y el contenido de vitamina D procedente de diferentes alimentos suplementados con esta sustancia. Sin embargo, no eran útiles para cuantificar los niveles de esta hormona en el suero humano. Además, tras el conocimiento de que la vitamina D tiene que hidroxilarse antes de ser biológicamente activa, las alteraciones del calcio, fósforo y metabolismo óseo han de estudiarse en base a los niveles de sus metabolitos fundamentales, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ y

25(OH)D.

Las primeras determinaciones de 25(OH)D se realizaban mediante ensayos de fijación competitiva (117,118) que continúan siendo los métodos más utilizados. Están basados en el hecho de que los metabolitos de la vitamina D van transportados en sangre unidos a una proteína específica, la proteína ligadora de vitamina D (DBP) (119) cuya concentración sérica (alrededor de 6×10^{-6} M) excede a la concentración sérica de 25(OH)D (alrededor de 4×10^{-9} M) por lo que se encuentra saturada entre 1 y 3 % (120) y por tanto, circula en su mayoría en forma de apoDBP. Cada molécula de proteína tiene un sitio de unión específico para la vitamina D (119), con una afinidad alta para el colecalciferol, 25(OH)D, 1,25(OH)₂D y 24,25(OH)₂D (121), siendo la afinidad para el 25(OH)D y 24,25(OH)₂D ($K_a = 6.4 \times 10^{-8}$ M) mayor que para el colecalciferol ($K_a = 4.3 \times 10^{-7}$ M) y el 1,25(OH)₂D ($K_a = 3.4 \times 10^{-7}$ M).

El método de unión competitiva se basa en la unión reversible no covalente de una molécula pequeña o ligando, con una proteína de unión específica, que posee afinidad por la molécula con la que reacciona.

El rasgo molecular de las proteínas de unión que hace que puedan utilizarse en análisis cuantitativos, es su capacidad de fijar compuestos con un grado alto de especificidad y afinidad. En la reacción entre las proteínas de unión y el ligando, existe una constante de asociación K_a que se define en función de las concentraciones molares M^{-1} o L/mol. Cuanto mayor es K_a mayor es la afinidad de la proteína por el ligando.

La descripción de esta reacción puede expresarse mediante la representación gráfica de Scatchard, que ha sido la utilizada para valorar la proteína ligadora de 25(OH)D en nuestro análisis.

En el ensayo de unión competitiva se van añadiendo cantidades crecientes de

un ligando no marcado, a mezclas de reacción que contienen cantidades conocidas de ligando marcado y de proteína de unión específica. El ligando no marcado compite con el marcado por los sitios de unión con la proteína ligadora. La concentración de los sitios de unión es un factor limitante con respecto al ligando total que se encuentra en exceso en la solución. Representando el porcentaje de ligando combinado marcado, en función de la concentración de ligando no marcado se obtiene una curva "dosis-respuesta" o curva estándar.

Como ligando no marcado hemos empleado 25(OH)D sintético, estable a bajas temperaturas, y como ligando marcado, al igual que otros autores (122,123), hemos utilizado [26,27-metil-³H] 25(OH)D₃. El tritio es considerado como un buen marcador al tener una actividad específica alta y producir una gran cantidad de energía; emite partículas β que se pueden medir en contadores de centelleo líquido mediante la liberación de fotones en el medio, utilizando el disolvente adecuado.

La proteína ligadora de vitamina D de muchas especies animales presenta propiedades fijadoras similares a la del hombre, lo que amplía las posibles fuentes de obtención del reactivo de fijación. Haddad y Chyu (124), emplearon inicialmente el citosol de riñón de ratas raquíticas que ha sido posteriormente utilizado por diferentes autores (125,126). También se ha empleado el suero de ratas alimentadas, al menos durante cuatro semanas, con dieta semisintética deficiente en vitamina D (127,128), y el plasma de pacientes con osteomalacia (129,130). Posteriormente se comprobó que no era necesario obtener la proteína ligadora de humanos o animales carentes de vitamina D, ya que los metabolitos de la vitamina D endógena ocupan sólo un número reducido de sitios de unión, por lo que se han obtenido proteínas ligadoras de riñón de rata sana (131,132) y de suero de humanos no deficientes de vitamina D (133).

La proteína ligadora de 25(OH)D fija también 1,25(OH)₂D (134),

24,25(OH)₂D y colecalciferol; tiene por tanto baja especificidad, que también se ve comprometida por la interferencia de lípidos no específicos del suero. Por ello la valoración de la concentración de 25(OH)D en extractos crudos de suero mediante ensayo de fijación competitiva, proporciona valores más elevados que los observados cuando se realiza una extracción o cromatografía previa al ensayo (127). En este sentido, se han desarrollado diferentes procesos de extracción y purificación previos a la cuantificación. Para la extracción se han empleado como solventes: diclorometano (135), cloruro de metileno-metanol (136,137,138), dietileter, acetonitrilo (139), metanol (140) y metilcianida (141) entre otros. Para la purificación se ha utilizado cromatografía de capa fina (129), cromatografía a través de LH-20 seguida de una purificación por HPLC (136,142) o por cromatografía con C₁₈ (128). Nosotros, al igual que otros autores hemos utilizado un método de extracción de 25(OH)D del plasma con etanol, que no necesita una purificación cromatográfica posterior, previa a la cuantificación con análisis de proteínas ligadoras (128,130).

Además de los ensayos de fijación competitiva para la cuantificación de 25(OH)D en suero, se han empleado con buenos resultados métodos basados en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En estos métodos la exactitud depende de la eficiencia de la separación del 25(OH)D de los lípidos contaminantes y del resto de metabolitos de la vitamina D. Debido a que la sensibilidad limitada de los detectores convencionales ultravioleta está a nivel de pocos nanogramos, estos métodos precisan en general, volúmenes mayores de muestra, de 2 a 4 mL de suero (136,139,141), que los necesarios para los ensayos de unión competitiva (127,130,131). Nosotros hemos utilizado un volumen de muestra de 50 µl, similar a otros autores (128). Este hecho puede ser interesante a la hora de elegir un método para valorar los niveles de 25(OH)D en la población infantil, donde es más problemática la consecución de la muestra, sobre todo si ésta supone importantes

volúmenes para este tipo de población.

En los procedimientos de HPLC, el suero se equilibra con el trazador ^3H -25(OH)D, para determinar la recuperación del esteroide durante la extracción y la cromatografía. El 25(OH)D se fracciona previamente por cromatografía en columna o por HPLC (136,141). La separación y determinación final se realiza mediante HPLC en columnas con micropartículas de sílice (109,123) o sílice y C_{18} (139). La detección se lleva a cabo por espectroscopia ultravioleta, utilizando un filtro de 254 nm. La concentración se calcula relacionando el área del pico de la muestra desconocida, con una curva de calibración generada por HPLC de cantidades conocidas de 25(OH)D.

El radioinmunoanálisis también se ha utilizado como método de cuantificación de 25(OH)D, una vez que ha sido separado del resto de metabolitos de la vitamina D, por diferentes métodos de extracción (143,144).

Los ensayos por HPLC, si bien son precisos y exactos, son laboriosos y costosos y están limitados en gran parte a los laboratorios de investigación, ya que pueden ofrecer ciertas ventajas sobre los ensayos de fijación competitiva. Es posible, mediante columnas apropiadas, separar la forma natural 25(OH)D₃, de la sintética 25(OH)D₂, y así medir la vitamina exógena frente a la endógena (128).

La falta de disponibilidad de estándares de metabolitos de la vitamina D₂, la movilidad cromatográfica diferente entre análogos de la vitamina D₂ y la vitamina D₃ y la distinta afinidad de las proteínas de unión y de los receptores por los metabolitos D₂ y D₃ (135), ha supuesto una infraestimación de los metabolitos de la vitamina D₂. Sin embargo, teniendo en cuenta que los metabolitos derivados del colecalciferol representan el 90-95 % del total de vitamina D, este hecho no tiene implicaciones clínicas, salvo en aquellas condiciones especiales donde haya un aporte extremadamente alto de vitamina D₂ (142).

El 25(OH)D es el metabolito de la vitamina D más abundante y de vida media prolongada, no tiene una acción fisiológica importante por sí mismo, pero es el precursor del metabolito biológicamente activo. La determinación de su concentración sérica tiene muchas implicaciones clínicas potenciales, especialmente en la detección de posible intoxicación o déficit de vitamina D, ya que es el mejor índice de la reserva de esta hormona producida de forma endógena o a partir del aporte dietético.

Actualmente no existen procedimientos de referencia para la determinación de 25(OH)D y 1,25(OH)₂D. Con frecuencia, la elección del método particular depende de las posibilidades técnicas y de la información que se pretenda obtener. En el caso del 25(OH)D, para una valoración rápida del estado de la vitamina D, la mayoría de los autores se inclinan por los ensayos de fijación competitiva, que en algunos casos son precedidos por una cromatografía, ya que en general, existe una buena correlación entre los métodos que cuantifican 25(OH)D mediante HPLC, y los que lo hacen mediante proteínas ligadoras.

Durante los últimos años se han puesto en práctica métodos de cuantificación de 25(OH)D de los extractos etanólicos del suero. Basándonos en estos hechos, hemos validado en nuestro laboratorio una técnica de cuantificación de este metabolito con el fin de determinar sus valores de referencia durante las primeras etapas de la vida, en función de la estacionalidad, la alimentación y las características ambientales de nuestro medio. Para ello hemos utilizado un volumen de muestra pequeño, de 50 μ l de suero, sobre el que hemos realizado un procedimiento de extracción con 600 μ l de un reactivo alcohólico (Etanol-Metanol-Isopropanol 95:5:5) para separar proteínas y sustancias que producen interferencias en la cuantificación de 25(OH)D. Con este método también detectamos metabolitos de la vitamina D dihidroxilados, como 24,25(OH)₂D, 25,26(OH)₂D y 1,25(OH)₂D. Sin embargo, la concentración fisiológica de estos metabolitos es insignificante en comparación con la del

25(OH)D, por lo que la seguridad clínica, tanto en el seguimiento de deficiencias como de intoxicación por vitamina D, no se ve comprometida por la valoración de estos metabolitos dihidroxilados con este método directo.

La representación de la curva estándar que hemos utilizado para la determinación de 25(OH)D, es la que enfrenta las diferentes concentraciones de los calibradores (eje de abcisas), con su porcentaje de unión respecto a la unión máxima (eje de ordenadas), que presenta una ligazón inespecífica de $0,033 \pm 0,008$ %, por lo que la unión de la proteína ligadora de 25(OH)D a sustancias inespecíficas, puede considerarse despreciable.

Por otro lado, el control de calidad de los reactivos utilizados en este método, demuestra su idoneidad para la cuantificación de 25(OH)D. La cromatografía en C_{18-OH} del 25(OH)D tritiado, pone de manifiesto que no existen formas degradadas del mismo, ya que la radiactividad se recoge en forma de un pico neto, no observándose una degradación durante el almacenamiento desde su recepción en nuestro laboratorio, hasta una fecha próxima a su caducidad, como se comprueba en la Figura 7, lo que nos garantiza su validez durante todo este periodo.

Así mismo, el 25(OH)D utilizado como estándar, tras su cromatografía muestra un pico de concentración máxima entre el segundo y tercer tubo del eluído, tanto cuando el análisis de ligazón competitiva se realiza con el estándar que se ha sometido previamente a una extracción con Acetonitrilo y Fosfato potásico, como cuando se emplea para la extracción la mezcla del reactivo de alcohol (Etanol-Metanol-2-Propanol).

El estudio de la proteína ligadora de 25(OH)D utilizada en el ensayo, proporciona un gráfico de Scatchard en forma de curva (Figuras 9 y 10), lo que nos indica que se trata de una proteína ligadora heterogénea, que presenta más de un sitio de unión

antigénico con el 25(OH)D. La población de proteína ligadora con una alta afinidad para este metabolito tiene una $K_a = 3.28 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ y la población de baja afinidad tiene una $K^b = 1.05 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Estas poblaciones diferentes de proteínas ligadoras varían en su afinidad por fijar el ligando y de reconocer los distintos sitios de su superficie, de ahí la heterogeneidad de la misma.

Al igual que lo observado por otros autores (130), el estudio de las reacciones cruzadas de la proteína ligadora de 25(OH)D con otros metabolitos de la vitamina D, demuestra una especificidad adecuada, sobre todo teniendo en cuenta que los metabolitos dihidroxilados se encuentran en sangre, en condiciones normales, a unas concentraciones mucho más bajas que el 25(OH)D, por lo que aunque con este método estemos cuantificando algo de 24,25(OH)₂D o 25,26(OH)₂D como si fuera 25(OH)D, esto no tiene implicaciones diagnósticas puesto que el incremento será mínimo.

En el estudio de imprecisión hemos obtenido unos coeficientes de variación comparables a otras metodologías (129,130), y consideramos que una imprecisión total inferior al 10 % (CV intra-análisis = 7.93 % y CV inter-análisis = 11.08 %) es aceptable para un inmunoensayo.

El límite de detección de 25(OH)D para métodos de proteínas ligadoras publicado por diferentes autores, oscila entre 4 ng/mL en el análisis de Haddad y Chyu (124), a 0.5 ng/mL en el de Belsey y cols (127). Un límite de detección bajo permite un estudio mejor de las situaciones de déficit de vitamina D, y evita la necesidad de grandes volúmenes de muestra. El límite de detección de 25(OH)D que hemos conseguido con nuestro método ha sido de 3.5 ng/mL con un volumen de suero de 50 μ l. La sensibilidad podría mejorarse aumentando el volumen de la muestra, pero esto no parece ser necesario de forma rutinaria, ya que la concentración de 25(OH)D suele ser bastante superior a 3.5 ng/mL.

La inexactitud que hemos observado en el método de cuantificación de 25(OH)D, al añadir una concentración conocida de este metabolito a un suero humano, ha oscilado entre 84.8 % y 104.3 %, con un valor medio de 94.9 %, por lo que puede ser considerado como un método tan exacto como el descrito por otros autores (123,129,130,131,133).

El intervalo analítico de este método ha oscilado entre 3.5 ng/mL y 130 ng/mL de 25(OH)D, entre cuyo rango puede utilizarse con seguridad para el diagnóstico y seguimiento de deficiencias e intoxicaciones de vitamina D.

Los distintos estudios practicados, ponen de manifiesto que se trata de un método correcto para la cuantificación de 25(OH)D, que no requiere instrumental de laboratorio complejo, y que al necesitar poco volumen de muestra es idóneo para su aplicación en la población infantil, aventajando en este sentido a los métodos que precisan de técnicas de HPLC.

Descubrimientos importantes durante los últimos años han establecido que el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ es la hormona sintetizada en el riñón, que juega un papel crucial en la mineralización y en el metabolismo óseo. La concentración de este metabolito, varía en situaciones fisiológicas cuando los requerimientos de calcio están aumentados, y en alteraciones del metabolismo mineral y esquelético (35,145,146). Además, el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ también se utiliza como agente terapéutico. Por todo esto, la valoración de su concentración ha adquirido gran importancia para el diagnóstico y manejo de pacientes con una amplia variedad de enfermedades. La concentración sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ es muy baja, del orden de picogramos/mL (10^{-10} M), mientras que otros metabolitos relacionados químicamente con él, como el $25(\text{OH})\text{D}$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ y la propia vitamina D circulan en cantidades de nanogramos/mL (10^{-7} - 10^{-8} M), lo que supone un problema técnico a la hora de valorar su concentración (147).

Para la cuantificación de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se han desarrollado diferentes métodos; aunque los más utilizados son los análisis de competición proteica, la HPLC y el RIA también se han utilizado como métodos alternativos (148,149,150), existiendo una buena correlación entre ellos.

En el primer RIA para determinación de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, se emplearon anticuerpos preparados en ovejas o conejos frente a un conjugado de $1,25(\text{OH})_2$ -vitamina D_3 -25-hemisuccinato-AB. Estos anticuerpos tenían un título y afinidad altos para el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, pero también presentaban una reacción cruzada significativa con otros metabolitos de la vitamina D, principalmente con el $25(\text{OH})\text{D}$. Inmunizaciones posteriores con éste y otros antígenos han proporcionado anticuerpos más selectivos, que permiten el desarrollo de RIA más específicos (151). La vitamina D se extrae inicialmente con solventes orgánicos a partir de 1 a 2 mL de suero, se prefracciona con cartuchos Sep-pak (sílice o C_{18}) y finalmente se

purifica por HPLC en columnas de micropartículas de sílice. El RIA se lleva a cabo incubando las muestras a analizar, los estándares de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ y el trazador ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$ marcado con tritio), con el anticuerpo durante 14 a 16 horas a 4°C . Las fracciones de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ fijada y libre, se separan por tratamiento con carbón recubierto de dextrano.

Una ventaja del método de RIA con respecto a los métodos con radiorreceptores, es que utiliza un reactivo de fijación estable, un anticuerpo. Sin embargo, el grado de especificidad de los anticuerpos, no es tan bueno como el de los receptores proteicos naturales utilizados en los ensayos con radiorreceptor. En consecuencia, se necesita una purificación por HPLC de la vitamina D para asegurar la correcta especificidad del RIA. La falta de derivados adecuados para la generación de anticuerpos específicos hace, que por el momento, el RIA no sea una técnica de elección para la cuantificación de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, aunque en los últimos años se ha avanzado mucho en este campo.

En general, los métodos más utilizados para la valoración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ son los que utilizan proteínas ligadoras de vitamina D procedentes de diferentes tejidos animales. Se ha utilizado el receptor procedente de intestino de pollos raquíuticos, que se obtiene mediante un proceso laborioso (152). Tras mantener a los pollos con una dieta deficiente en $25(\text{OH})\text{D}$ hasta su sacrificio por decapitación a las 9-12 semanas, se reseca el duodeno y se lava con un tampón de fosfato potásico 0.05 M y cloruro potásico 0.057 M a $\text{pH } 7.4$, manteniendo el tejido a 4°C durante todo el proceso. Se elimina la serosa, y la mucosa se homogeniza con el tampón centrifugándose a 2000 xg durante 10 minutos, descartando el sobrenadante. Se resuspende el pellet dos veces consecutivas con tampón, y se centrifuga. El pellet resultante se resuspende en tampón y se vuelve a homogenizar a 0°C en un baño de hielo. Se centrifuga a 226600 xg durante 45 minutos, se elimina la capa de lípidos y se recoge el citosol, que se congela en un baño de hielo seco y acetona. Se liofiliza y se

almacena bajo corriente de Nitrógeno a -20° C hasta el momento de su utilización. Esta técnica ha sufrido diferentes modificaciones hasta conseguir un método más idóneo y menos laborioso (135,142,153), aunque tiene el inconveniente de que la proteína receptora del intestino de pollo, es relativamente inestable y debe de prepararse con frecuencia.

En 1982, Reinhardt y col. (154) demostraron que el timo de ternera presentaba receptores para el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ similares a los receptores para esta hormona, presentes en otros tejidos y animales. Para su obtención se utiliza el timo de terneras con edad comprendida entre 5 y 20 semanas que se lava con suero salino helado y se corta en cubos de unos 2 cm^3 . Se congelan en Nitrógeno líquido y se almacenan a -56° C hasta el momento de su utilización. En estas condiciones el receptor para el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ conserva su actividad durante un año. Los timos congelados o frescos se procesan a 4° C, homogenizándose en un tampón que contiene tris-ClH 50 mM, ClK 500 mM, ditiotreitól 5 mM, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM y EDTA 1.5 mM a pH 7.5 durante 20 segundos. El homogenado se centrifuga a 300000 xg durante 1 hora, recogándose el citosol, que se fracciona por la adición lenta de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 35% de saturación. El citosol se homogeniza de forma suave 30-60 minutos y se centrifuga a 20000 xg 20 minutos. Tras decantar el sobrenadante, el pellet se almacena a -20° C. Antes de su utilización se redisuelve en el tampón anteriormente citado (133).

El ensayo de fijación competitiva implica la preincubación de los estándares de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ no marcado y de las muestras a analizar con el receptor (durante 1 hora a 25° C), seguida de la adición del trazador y de una nueva incubación de 1 hora. La separación del $^3\text{H}-1,25(\text{OH})_2\text{D}$ fijado del libre, se realiza por tratamiento con carbón recubierto con dextrano y centrifugación. Se determina la cantidad de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ unido en base a la radiactividad del sobrenadante, que está inversamente relacionada con la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ presente en la muestra.

Aunque la afinidad del receptor para el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ es de 500 a 1000 veces superior que para el $25(\text{OH})\text{D}$ (154), la concentración circulante de este último es mayor que la del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. En consecuencia, en gran parte de los trabajos publicados se emplean diferentes procedimientos para conseguir la extracción y purificación del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ antes de realizar el análisis de fijación competitiva. Para la fase de extracción se han utilizado Acetonitrilo (155), Benceno (144), Metanol/Agua (123), Dietil-éter (153) y Diclorometano (135) entre otros. Tras la extracción se realiza una purificación para separar el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ del resto de los metabolitos de la vitamina D, que pueden interferir en su cuantificación. Para esto se han utilizado diferentes procesos y solventes, la mayoría basados en la HPLC (156,157,158). Estos pasos cromatográficos para aislar el metabolito, tienen una serie de inconvenientes ya que alargan el tiempo empleado para su realización, precisan de una tecnología instrumental no disponible en la mayoría de los laboratorios clínicos y requieren volúmenes de suero de 3 a 20 mL (135,136,142).

Para obviar estos problemas, Reinhardt y cols. en 1986 (159) desarrollaron un método para la valoración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en suero, que no necesita de HPLC. Basándonos en estos hechos, hemos puesto a punto en nuestro laboratorio una metodología similar, dirigida fundamentalmente a la población infantil, en la que hemos establecido los valores de referencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ con este método y en nuestra situación, durante los primeros meses de la vida, por sus posibles implicaciones diagnósticas y nutricionales. Para ello hemos utilizado el receptor de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ obtenido de timo de ternera, una extracción en fase sólida del metabolito de las muestras de suero, y hemos añadido una extracción en fase sólida reversa seguida de una purificación en fase normal en un cartucho $\text{C}_{18-\text{OH}}$, que ya ha sido utilizada por otros autores (155).

Esta técnica permite la extracción y purificación en un cartucho único, consigue

extraer el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ eficazmente y separarlo de otras sustancias lipofílicas que interfieren con la cuantificación mediante análisis de radioreceptor, especialmente en muestras procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica (136).

Las proteínas y los lípidos insolubles precipitan con el Acetonitrilo y el K_2HPO_4 facilita la eliminación de otros lípidos. Durante la fase normal se separa completamente el $25(\text{OH})\text{D}$ del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, requisito imprescindible en cualquier método de separación previo a la cuantificación de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, ya que el $25(\text{OH})\text{D}$ circula a concentraciones más elevadas y presenta reacción cruzada con el receptor del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ obtenido de timo de ternera (159). Con el sistema de purificación que hemos empleado no se separa completamente el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ del $25,26(\text{OH})_2\text{D}$; sin embargo, este hecho no supone ningún inconveniente ya que el $25,26(\text{OH})_2\text{D}$ compite pobremente con el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ por los sitios de unión de las proteínas del receptor del timo de ternera, como se demuestra al añadir $20 \mu\text{g/L}$ de $25,26(\text{OH})_2\text{D}$, que representan dosis farmacológicas, que no interfieren en el análisis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (155).

La ventaja más importante de este método ha sido la eliminación de la HPLC como fase final de purificación previa al análisis. Hay trabajos en la literatura en los que el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ no se purifica mediante HPLC antes de su cuantificación. El primero de ellos que se desarrolló en 1974 por Brumbaugh y cols. (160) supuso un gran avance, pero necesitaba volúmenes grandes de muestra y un consumo de tiempo importante para la purificación, por lo que pronto dió lugar a la metodología basada en la HPLC. Manolagas y cols. en 1983 (147) desarrollaron un método basado en la internalización selectiva y la unión posterior del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ a su receptor específico en cultivos celulares. Sin embargo, esta técnica precisa de personal con experiencia en cultivos celulares y un soporte tecnológico superior al de las técnicas de HPLC, lo que encarece los costos.

Las características específicas del receptor obtenido de timo de ternera facilita la eliminación de la purificación de las muestras mediante HPLC. Una de estas características es la aparente insensibilidad del receptor a las interferencias de los lípidos, en contraste con el receptor del intestino de pollo (161). Además, el receptor para el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ del timo de ternera, carece de las críticas comunes hacia los ensayos basados en receptores, tales como la labilidad del mismo y la necesidad de tener que preparar constantemente nuevos lotes. El proceso de extracción de la glándula es barato y el receptor es estable durante más de un año en congelación. Otra mejora de la metodología ha sido la utilización de técnicas de incubación no en equilibrio, que mejoran la sensibilidad del ensayo y disminuyen el volumen necesario de muestra (138).

En nuestro método de cuantificación de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ hemos empleado una curva "dosis-respuesta" similar a la del $25(\text{OH})\text{D}$, resultante de enfrentar en abscisas la concentración de los diferentes calibradores, con el porcentaje de desintegraciones por minuto respecto a la unión máxima en ordenadas. Las sustancias inespecíficas que reaccionan con la proteína ligadora de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ han proporcionado una ligazón inespecífica prácticamente despreciable, del orden de $0,031 \pm 0,01\%$.

El control de los reactivos que hemos empleado ha resultado satisfactorio. El estudio del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ marcado con tritio, revela la inexistencia de formas degradadas, ya que en la cromatografía del mismo hemos observado un único pico de radiactividad, tanto cuando el estudio se realiza en el momento de recibir los reactivos en el laboratorio, como cuando se hace en una fecha próxima a la caducidad de los mismos. Si bien las desintegraciones por minuto son algo inferiores en el segundo caso, la agrupación de la radiactividad en torno a un único pico nos indica que el antígeno caliente no ha sufrido degradación durante el tiempo de almacenamiento, pudiendo utilizarse con garantías al menos

hasta la fecha de caducidad que recomienda la casa comercial.

Algo similar ocurre con el antígeno frío, que presenta un elución máxima agrupada en los tres primeros tubos, siendo el resto indetectable.

En el gráfico de Scatchard que valora la reacción de las proteínas ligadoras procedentes del timo de ternera y el ligando, se pone de manifiesto que se trata de proteínas homogéneas, con un único sitio de unión antigénico y una constante de afinidad del mismo orden en la curva de Scatchard media (resultante de 20 ensayos) y en una curva de Scatchard elegida al azar ($K_a = 4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ y $K_a = 4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, respectivamente). La elevada afinidad de la proteína ligadora por el $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, aumenta la pendiente de la curva "dosis-respuesta" y determina la sensibilidad o límite de detección. La sensibilidad es función de la pendiente de esta curva y del error experimental (inexactitud e imprecisión).

Dentro de los ensayos que hemos realizado para la validación de este método, hemos observado que la repetitividad intraserie, obtenida para los tres niveles de concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ que se refleja en la Tabla XX, resulta muy aceptable, ya que el coeficiente de variación máximo obtenido es de 6,9%, para una concentración media de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ de 36,9 pg/mL, y de 3,2% para una concentración media de 70,8 pg/mL, comparable a lo publicado por otros autores (153). El coeficiente de variación inter-análisis ha resultado de 10,72%, similar a datos encontrados en la bibliografía, que oscilan entre 10 y 26% (136,155).

La adición de cantidades crecientes y conocidas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ a una determinada muestra, ha proporcionado un porcentaje de recuperación media, calculado con el valor observado dividido entre el valor teórico y multiplicado por cien, de 99,9%, lo que representa una excelente exactitud, similar a la obtenida con otros métodos (123,139).

El método ha resultado altamente específico para la determinación de

1,25(OH)₂D; tanto el metabolito 1,25(OH)₂D₂ como el 1,25(OH)₂D₃ presentan una afinidad similar por el receptor por lo que se valoran de forma conjunta en las muestras de suero, esto contrasta con otros análisis empleados que infravaloran las concentraciones de 1,25(OH)₂D₂ en un 16-80% (162).

La especificidad de una proteína de unión por su ligando se mide por su capacidad para fijar sólo el ligando y no otras sustancias. Las moléculas de reactividad cruzada son las que tienen una estructura tan semejante a la del ligando que pueden ser fijadas por la proteína. Las diferencias en cuanto a unión con la proteína del ligando y las sustancias de reacción cruzada, es por tanto función de las diferencias de afinidad.

La sustitución de los calibradores de 1,25(OH)₂D por concentraciones elevadas y progresivamente crecientes de los posibles metabolitos de la vitamina D interferentes en el análisis, nos ha servido para estudiar las reacciones cruzadas que hemos obtenido al dividir la concentración de 1,25(OH)₂D que produce el 50% de la unión máxima, por la concentración de 25(OH)D, 24,25(OH)₂D y 25,26(OH)₂D que produce la misma respuesta y hallando el porcentaje. Las reacciones cruzadas con estos metabolitos de la vitamina D han sido leves, alrededor de 0,1% para el 25(OH)D, 0,03% para el 24,25(OH)₂D y 0,009% para el 25,26(OH)₂D. Estimando la recuperaciones de estos metabolitos en la fracción de 1,25(OH)₂D, las reacciones cruzadas y el volumen final de plasma utilizado por tubo, consideramos que el 25(OH)D, 24,25(OH)₂D y 25,26(OH)₂D a concentraciones normales, no interfieren en la cuantificación de 1,25(OH)₂D, como demuestran numerosos estudios que correlacionan los resultados obtenidos con métodos que realizan la purificación de las muestras mediante HPLC y la cuantificación por HPLC o proteínas ligadoras, con métodos similares a los nuestros donde no se realiza HPLC en ningún momento del análisis (156,163). Sin embargo es posible, que concentraciones altas de 24,25(OH)₂D o 25,26(OH)₂D que

pueden aparecer en situaciones de intoxicación por vitamina D, pudieran conducir a una sobrestimación de la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, aunque hay que tener en cuenta que la intoxicación por vitamina D es una situación rara, y puede detectarse fácilmente midiendo la concentración de $25(\text{OH})\text{D}$. Para estos casos la purificación final de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ debería realizarse mediante HPLC.

Otros metabolitos 1-hidroxilados de la vitamina D presentan una afinidad por el receptor de timo de ternera similar al $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (164), pero no interfieren en el análisis del mismo ya que se encuentran en concentraciones muy bajas en el suero y además, se separan de la fracción del $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ durante el procedimiento de purificación en $\text{C}_{18}\text{-OH}$.

El límite de detección de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, considerado como la mínima concentración de esta sustancia capaz de diferenciarse de cero, y calculado con un 95% de certeza a partir del estándar con una concentración de 0 pg/mL de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, viene definido por la concentración resultante al interpolar sobre la curva estándar, el valor de la media obtenida para éste menos dos desviaciones estándar, y ha resultado de 4,5 pg/mL para un volumen de 1 mL de suero, que es similar al descrito por otros autores que emplean incluso un volumen de muestra mayor.

En el rango comprendido entre 4,5 y 400 pg/mL, podemos utilizar el método sin realizar ninguna modificación.

Al igual que en el caso del $25(\text{OH})\text{D}$, la cuantificación de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ por proteínas ligadoras ha resultado idóneo, ya que tanto la calidad de los reactivos como la validación del método han sido correctos, y el hecho de no precisar de la HPLC para la purificación y/o cuantificación del mismo, le hace disponible a un mayor número de laboratorios clínicos.

El mejor criterio para valorar el aporte de vitamina D al organismo, es el nivel

plasmático de 25(OH)D, resultante de la acción ejercida en el parénquima hepático por la 25-hidroxilasa sobre la vitamina D₃, que constituye la fuente principal de vitamina D para nuestro organismo, siendo de menor transcendencia el aporte de vitamina D₂. La mayor parte del suministro de vitamina D₃ tiene una procedencia endógena, pues deriva del 7-dehidrocolesterol sintetizado a nivel cutáneo y transformado *in situ* en vitamina D₃, gracias a la acción de la luz ultravioleta. Otra fracción menos importante, en condiciones normales, corresponde a la vitamina D₃ ingerida con los alimentos, que también proporcionan pequeñas cantidades de vitamina D₂, cuyo metabolismo y función corren paralelos a los de la vitamina D₃.

No obstante existen ciertas dificultades para establecer los valores normales de 25(OH)D debido a la gran dispersión de su concentración (165,166,167,168). Esta variabilidad podría estar en relación con los diferentes hábitos de exposición al sol y de alimentación. También hay circunstancias capaces de influir en la tasa de transformación de la vitamina D en 25(OH)D, como por ejemplo el déficit de sustrato, que pueden explicar que las concentraciones séricas de este metabolito presenten, en condiciones normales, unos márgenes muy amplios. En nuestra serie, el rango de los niveles plasmáticos de 25(OH)D ha oscilado entre 19 y 72 ng/ml.

Al igual que otros autores (169), no hemos encontrado diferencia en la concentración de 25(OH)D en relación con el sexo, que sugiera una influencia de las hormonas gonadales, en el primer paso de la transformación de la vitamina D.

Los valores plasmáticos de 25(OH)D van a depender de la síntesis endógena y del aporte exógeno de vitamina D. En condiciones normales el factor más importante es la síntesis a nivel de la piel de vitamina D, influida a su vez por el grado de exposición a la luz solar.

En efecto, en la población estudiada durante los primeros meses de la vida, hemos observado la influencia indudable de los cambios estacionales en la concentración de 25(OH)D, como consecuencia del diferente grado de exposición solar. Este hecho ha sido bien constatado por otros autores (140,170,171,172), aunque ha sido poco referido en la población infantil en nuestro medio. Los niveles séricos de 25(OH)D a las 3 semanas, 6 meses y 9 meses han sido significativamente superiores en los meses de verano que en los meses de invierno ($p < 0,01$) (Tabla XII).

Además de la estacionalidad existen otros factores, como edad, raza y situación geográfica, que van a influir en la síntesis cutánea de vitamina D, y por tanto en la concentración de 25(OH)D (173,174,175).

La fotoproducción de previtamina D₃ en la piel depende de la presencia de provitamina D₃, cuya concentración media en edades tempranas, en un área de 6,25 cm², es aproximadamente de 5 μg en la epidermis y de 1 a 3 μg en la dermis (15). Existe una relación inversa entre esta concentración y la edad, de tal forma que un adulto joven es capaz de sintetizar de 2 a 3 veces más cantidad de previtamina D₃ que un anciano con la misma cantidad de radiación solar (15). Posiblemente este hecho esté relacionado con el aumento de las necesidades de vitamina D durante las etapas de crecimiento rápido, fundamentalmente en la primera infancia y en la adolescencia.

En 1967, Loomis y cols. (176) popularizaron la teoría de la relación entre la pigmentación de la piel y la regulación de la síntesis de la vitamina D₃, sugiriendo que los habitantes de zonas cercanas al ecuador, que están sometidos diariamente a radiaciones solares intensas, no sufrían intoxicación por vitamina D porque paralelamente iban aumentando la pigmentación de su piel. La melanina producida por la epidermis compite con el 7-dehidrocolesterol por los fotones ultravioleta β, limitando la síntesis cutánea de previtamina

D₃. La previtamina D₃ es sensible a la radiación ultravioleta y a la energía térmica, de tal forma que una vez formada en la epidermis y la dermis, puede isomerizarse térmicamente a vitamina D₃ o, si la exposición a la luz ultravioleta es muy duradera, isomerizarse a compuestos biológicamente inertes, por lo que exposiciones muy prolongadas a la luz solar no aumentan de forma proporcional la concentración de previtamina D₃.

Diferentes trabajos demuestran que los individuos de raza negra y los naturales de Asia del Sur (India y Pakistán), no tienen disminuída la capacidad de producir vitamina D por la piel (177,178), pero requieren una dosis de radiación ultravioleta mayor, sobre todo los individuos de raza negra, para conseguir unos niveles circulantes de vitamina D similar a los individuos de raza caucásica y los naturales de Asia del Este (China y Japón) (25).

Otros factores que modifican la síntesis de vitamina D₃ son la latitud, la localización geográfica y el momento del día. La latitud modifica profundamente la síntesis cutánea de vitamina D₃; a medida que aumenta el ángulo cénit del sol, la capa de ozono absorbe un número mayor de fotones de alta energía, responsables de las síntesis de previtamina D₃. En Boston (42° N) y en Edmonton (52° N) la absorción de estos fotones es tan intensa, que entre los meses de Noviembre a Febrero y de Octubre a Marzo, respectivamente, la síntesis de vitamina D es muy limitada (179). En España, debido a su localización geográfica, es lógico pensar que la síntesis de vitamina D sea adecuada a lo largo del año, lo que se confirma con los datos de nuestra serie, ya que la concentración media de 25(OH)D, tanto en el grupo de niños nacidos en invierno como en el de los nacidos verano, se encuentra dentro de los límites considerados normales por otros autores (96,99,180,181,182).

Al igual que en otros trabajos (183), otra diferencia estacional que hemos observado en la población estudiada, ha sido la evolución diferente de la concentración de

25(OH)D de los niños nacidos en verano (Grupo A), respecto a los nacidos en invierno (Grupo B). Mientras que en el Grupo A los niveles plasmáticos se han mantenido estables de las 3 semanas a los nueve meses de edad, en el Grupo B hemos observado un incremento significativo de las 3 semanas a los 3 meses ($p < 0,001$), y de los 3 meses a los 6 meses ($p < 0,001$) de dicha concentración (Figura 15). Posiblemente este incremento observado en el grupo de niños nacidos en invierno, podría estar en relación con una mayor actividad de la 25-hidroxilasa hepática. Se ha demostrado experimentalmente que el déficit de vitamina D aumenta la afinidad de la 25-hidroxilasa por el colecalciferol, y al aumentar la cantidad de éste, la afinidad de la enzima disminuye. Como el colecalciferol derivado de la piel no puede exceder la cantidad limitada de 7-dehidrocolesterol accesible a la luz solar, y los aportes de vitamina D por la dieta son mínimos, la síntesis endógena raramente va a condicionar una sobreproducción de 25(OH)D.

Los cambios de actividad de la hidroxilasa hepática son más llamativos a bajas concentraciones de sustrato, por lo que se piensa que este hecho podría ser más que un mecanismo de protección contra el exceso de formación de 25(OH)D, una vía para aumentar la producción de este metabolito cuando los suplementos de colecalciferol son bajos. Por tanto, cuando la concentración de vitamina D es elevada, la afinidad enzimática está disminuída, mientras que en situaciones de concentraciones bajas de vitamina D, la 25-hidroxilasa puede utilizar el sustrato disponible más eficazmente. Este hecho podría explicar que los niños que nacieron en verano, y que tenían unas reservas de vitamina D altas, mantuviesen una concentración sérica de 25(OH)D estable a lo largo del tiempo, a diferencia de lo que ocurría con los niños nacidos en invierno. En estos, al tener una reserva de vitamina D inferior, por haber transcurrido la última etapa de su vida intrauterina durante meses con menor soleamiento, la velocidad de hidroxilación hepática aumenta rápidamente

al aportar sustrato al hígado, y la concentración de 25(OH)D se eleva progresivamente hasta conseguir niveles eficaces de sustrato para modular la respuesta de la 25-hidroxilasa hepática.

Las diferencias observadas a las 3 semanas y los 3 meses en la concentración de 25(OH)D, entre los niños alimentados con lactancia materna y los niños alimentados con lactancia artificial ($p < 0,01$), son concordantes con los resultados obtenidos por otros autores (96,97,98,99). Los niveles plasmáticos de 25(OH)D no sólo son reflejo de la diferente exposición a la luz solar, ya que dichos niveles también pueden modificarse por el aporte exógeno de vitamina D (184). La leche materna contiene de 15 a 80 UI/L de vitamina D (185,186), mientras que los niños alimentados artificialmente recibieron una fórmula adaptada que contenía 400 UI/L de vitamina D. Este hecho explicaría la diferencia observada entre los niños con lactancia materna y lactancia artificial a las 3 semanas y 3 meses de vida (Tabla XIII), ya que durante este periodo de tiempo, la leche ha sido el único alimento de su dieta.

Al igual que otros autores (187), hemos encontrado un rango de concentración de 1,25(OH)₂D amplio en el primer año de vida, pero en general, los niveles séricos de 1,25(OH)₂D en los niños son superiores a los del adulto (182,187). Hay pocos estudios en la literatura sobre la concentración sérica de 1,25(OH)₂D en niños menores de un año, y los que hay, corresponden a zonas geográficas diferentes y distintas estaciones del año (109,180,187) y han sido realizados con diferentes metodologías, y probablemente esto explique las diferencias encontradas en los niveles de 1,25(OH)₂D en diferentes trabajos consultados.

Parece demostrado que esta hormona aumenta a las 24 horas de vida y permanece elevada al menos hasta los 18 meses (169). La concentración alta de 1,25(OH)₂D durante la infancia se correlaciona con la velocidad de crecimiento rápido que tiene lugar

durante esta etapa de la vida, y presumiblemente es necesaria para aumentar la absorción intestinal de los minerales requeridos para esta fase de crecimiento.

Es un hecho establecido que la capacidad de absorción de calcio por el intestino delgado varíe en función de las necesidades fisiológicas. Por otro lado, experimentos animales (188) ponen de manifiesto que la absorción intestinal de calcio dependiente de la vitamina D, únicamente tiene lugar en circunstancias de deficiencia de calcio o de vitamina D o cuando las necesidades del mismo están aumentadas, como ocurre en las fases de crecimiento, durante el embarazo o la lactancia. Existe un control homeostático por el que la disminución de la disponibilidad de calcio estimula la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, para aumentar la absorción intestinal y subsiguientemente suprimir la actividad de la 1α -hidroxilasa renal.

Aunque en adultos se ha demostrado una influencia significativa de las hormonas sexuales en el metabolismo de la vitamina D, observándose niveles más altos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en mujeres jóvenes durante la ovulación (189), en la población infantil los resultados no son tan concluyentes. Algunos autores han encontrado diferente concentración de estrógenos y testosterona entre niños y niñas menores de 18 meses de edad (190), pero no han demostrado influencia de estas hormonas en el metabolismo de la vitamina D (191). Nosotros tampoco hemos encontrado diferencias significativas en la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ entre niños y niñas en ningún momento del estudio (Tabla XXV).

No hemos observado diferencias en la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ entre los niños nacidos en verano (Grupo A) y los niños nacidos en invierno (Grupo B) a las 3 semanas y 3 meses de vida. Sin embargo a los 6 y 9 meses, los niños del Grupo B tenían unos niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ superiores a los niños del Grupo A ($p < 0,01$), pero a nuestro entender esta diferencia no estaría indicando una influencia estacional, sino una adaptación distinta de los niños nacidos en invierno respecto a los nacidos en verano.

Como puede observarse en la Figura 26, existe un incremento significativo de la concentración sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ de las 3 semanas a los 3 meses de vida en ambos grupos, que podría estar en relación con la maduración fisiológica de la 1α -hidroxilasa renal y probablemente con el aumento de las necesidades de calcio para una fase de crecimiento tan rápido como la que tiene lugar en estas primeras etapas de la vida. A partir de los 3 meses los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se estabilizan en los niños nacidos en verano (Grupo A), mientras que en los niños que nacieron en invierno (Grupo B) se incrementan significativamente de los 3 a los 6 meses ($p < 0,01$) y de los 6 a los 9 meses de vida ($p < 0,05$). Este hecho podría explicarse por que los niños nacidos en invierno tienen una reserva menor de vitamina D al nacimiento, que estaría reflejada por la menor concentración de $25(\text{OH})\text{D}$ a las 3 semanas de vida en este grupo de niños (192). Se ha observado que en situaciones de deplección de reservas de vitamina D hay una estimulación mantenida de la 1α -hidroxilasa renal, por un aumento de hormona paratiroidea que trataría de mantener unos niveles plasmáticos estables de calcio y fósforo en dichas circunstancias (193).

Al igual que otros autores (109), hemos observado que los niveles séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en los niños con lactancia materna han sido similares a los de los niños con lactancia artificial, lo que confirma que esta hormona se regula homeostáticamente y su concentración no depende del aporte exógeno de vitamina D.

CONCLUSIONES

Al desarrollar los métodos de cuantificación de 25(OH)D y 1,25(OH)₂D mediante técnicas de proteínas ligadoras, y valorar la concentración de ambos metabolitos en la población infantil sana estudiada, hemos obtenido las siguientes conclusiones:

1. El control de calidad de los reactivos utilizados en las técnicas de determinación de 25(OH)D y 1,25(OH)₂D, es adecuado para garantizar la fiabilidad de los resultados, por los siguientes hechos:

a) La proteína ligadora de 25(OH)D es heterogénea, posee afinidad diferente por los distintos sitios antigénicos, y una buena constante de asociación que se mantiene en rango similar en la totalidad de los ensayos realizados.

b) La proteína ligadora de 1,25(OH)₂D es homogénea, con un único sitio de unión antigénico, y una constante de asociación similar en todos los análisis.

c) No hemos observado degradación en los antígenos calientes ni en los fríos durante el proceso de almacenamiento.

2. La validación de los métodos de cuantificación de 25(OH)D y 1,25(OH)₂D muestra especificidad, exactitud y precisión correctas, y un límite de detección suficiente para valorar adecuadamente situaciones carenciales.

3. El método de valoración de 1,25(OH)₂D permite la extracción y purificación del mismo sin necesidad de recurrir a la HPLC.

4. El volumen de muestra necesario para la determinación de ambos metabolitos con nuestros métodos es, en comparación con otros métodos, relativamente pequeño, por lo que lo hace ideal para su aplicación en la población infantil.

5. Los valores de 25(OH)D y 1,25(OH)₂D que hemos encontrado, y que proponemos como valores de referencia de nuestros métodos, son similares a los publicados en otros trabajos y realizados con otras metodologías. Y queremos destacar que, al igual que en dichos trabajos, hemos encontrado una amplia dispersión de valores, que se justificaría por la influencia de los diferentes factores que gravitan sobre el metabolismo de la vitamina D.

6. Los niveles séricos de 25(OH)D parecen sufrir una influencia estacional, de modo que son superiores durante los meses de verano. Así, a las 3 semanas de vida, los niños nacidos en verano presentan una concentración sérica de 25(OH)D mayor que la de los niños nacidos en invierno; sin embargo, a los 6 y 9 meses de vida, los valores son más altos en los que nacieron durante el invierno, y que a dichas edades se encuentran en verano.

7. En cuanto a la evolución en el tiempo de la concentración de 25(OH)D en el grupo de niños nacidos en verano, hemos observado que se ha mantenido estable de las 3 semanas a los 9 meses de vida. En los niños nacidos en invierno, apreciamos un incremento significativo de dicha concentración desde las 3 semanas a los 6 meses de vida.

8. Los niños con lactancia artificial presentan una concentración de 25(OH)D superior a la de los niños con lactancia materna, a las 3 semanas y 3 meses de edad.

9. Los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ no parecen sufrir una clara influencia estacional. No obstante, la evolución de los mismos es distinta entre el grupo de niños nacidos en verano y los nacidos en invierno. En el primero, la concentración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se estabiliza a partir de los 3 meses, mientras que en el segundo, se incrementa hasta los 9 meses de vida, probablemente en relación con la situación endocrino-metabólica de estos niños.

10. En relación con el tipo de alimentación no hemos observado diferencias en la concentración sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

11. No hemos encontrado diferencias en los niveles séricos de $25(\text{OH})\text{D}$ ni de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, en relación con el sexo.

12. Como resumen de lo anteriormente expuesto queremos resaltar, que la valoración de los niveles de los metabolitos de la vitamina D debe de realizarse teniendo en cuenta, muy cuidadosamente, los factores que influyen sobre los mismos, en especial, la estación y la alimentación.

BIBLIOGRAFIA

1. Holick MF, Holick SA, Guillard RL. Photosynthesis of previtamin D in phytoplankton. In Loft B, Holmes WN: Current Trends in Comparative Endocrinology. Hong Kong, Hong Kong University Press 1985;2:1263-1266.
2. Kodicek E. The story of vitamin D from vitamin hormone. Lancet 1974;I:325-329.
3. Haussler MR, McCain TA. Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action (second of two parts). N Engl J Med 1977;297:1041-1050.
4. Horst RL, Reinhardt TA, Russell JR, Napoli JL. The isolation and identification of vitamin D₂ and vitamin D₃ from *Medicago sativa*. Arch Biochem Biophys 1984;231:67-71.
5. Park EA. The etiology of rickets. Physiol Rev 1923;3:106-159.
6. Hess AF, Unger LJ. Cure of infantile rickets by sunlight. JAMA 1921;77:39-43.
7. 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.
8. 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.

9. Steenbock H, Black A. The induction of growth-promotin and calcifying properties in aration by exposure to ultraviolet light. *J Biol Chem* 1924;61:408-422.
10. Hess AF, Weinstock M. Antirachitic properties imparted to inert fluids and green vegetables by ultraviolet irradiation. *J Biol Chem* 1924;62:301-313.
11. Steenbock H, Kletzien SWF, Halpin JG. The reaction of the chicken to irradiated ergosterol and irradiated yeast as contrasted with the natural vitamin D in fish liver oils. *J Biol Chem* 1932;97:249-264.
12. Windaus A, Lettre H, Schenck F. 7-dehydrocholesterol. *Ann* 1935;520:98-106.
13. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB. Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and the physiologic consequences. *Science* 1980;210:203-205.
14. Holick MF, MacLaughlin JA, Doppelt SH. Factors that influence the cutaneous photosynthesis of previtamin D₃. *Science* 1981;211:590-593.
15. McLaughlin JA, Holick MF. Aging decreaes the capacity of human skin to produce vitamin D₃. *J Clin Invest* 1985;76:1536-1538.
16. Holick MF. Vitamin D requeriments for the elderly. *Clin Nutr* 1986;5:121-129.

17. 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.
18. DeLuca HF. Vitamin D metabolism and function. In Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York 1979.
19. Long RG, Skinner RK, Meinhard E. Serum 25-hydroxyvitamin D values in liver disease and hepatic osteomalacia. *Gut* 1976;17:824-827.
20. Pietrek J, Kokot F. Serum 25-hydroxyvitamin D in patients with chronic renal disease. *Eur J Clin Invest* 1977;7:283-287.
21. Bell NH. Vitamin D-endocrine system. *J Clin Invest* 1985;76:1-6.
22. Gkonos PJ, London R, Hendler ED. Hypercalcemia and elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in a patient with end-stage renal disease and active tuberculosis. *N Engl J Med* 1984;311:1683-1685.
23. Lyles KW, Hasley DL, Friedman NE, Lobaugh B. Correlations of serum concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D, phosphorus and parathyroid hormone in tumoral calcinosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:88-92.

24. Onisko BL, Schnoes HK, DeLuca HF, Glover RS. Metabolism and biological activity of 25-fluorocholecalciferol, 24-dehydrocholecalciferol and 25-dehydrocholecalciferol in the rat. *Biochem J* 1979;181:1-9.
25. Holick MF, Adams JS. Vitamin D metabolism and biological function. In *Metabolic bone disease and clinically related disorders*. Avioli & Krane 2nd ed. Ed. WB Saunders Company. 1990;p:155-195.
26. 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.
27. Gray TK, Lester GE, Lorenc RS. Evidence for extrarenal 1-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃ in pregnancy. *Science* 1979;204:1311-1313.
28. Howard GA, Turner RT, Sherrad DJ, Baylink DJ. Human bone cells in culture metabolize 25-hydroxyvitamin D₃ to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Biol Chem* 1981;256:7738-7740.
29. Bikle DD, Nemanic MK, Whitney JO, Elias PW. Neonatal human foreskin keratinocytes produce 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochemistry* 1986;25:1545-1548.
30. Chesney RW, Zelikovic I. The metabolism of vitamin D and the renal handling of calcium and phosphate. In *Metabolic bone disease in children*. Ed Castells and Finberg 1990;p:43-70.

31. Bell NH. Vitamin D-endocrine system. *J Clin Invest* 1985;76:1-6.
32. Garabedian M, Holick MF, DeLuca HF, Boyle IT. Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69:1973-1976.
33. 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
34. 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.
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. Reddy GS, Norman AW, Willis DM, Goltzman D, Guyda M, Salomon S, Philips DR, Bishop JE, Mayer E. Regulation of vitamin D metabolism in normal human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:363-370.
37. Adams ND, Garthwhite TL, Gray RW. The interrelationship among prolactin, 1,25-dihydroxyvitamin D and parathyroid hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1979 ;49 :628-630.

38. Rigotti NA, Nussbaum SR, Herzog DB, Neer RM. Osteoporosis in women with anorexia nervosa. *N Engl J Med* 1984;311:1601-1606.
39. Krabbe S, Hummer L, Christiansen C. Serum levels of vitamin D metabolites and testosterone in male puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:503-507.
40. Riggs BL, Gallagher JC, DeLuca HF. A syndrome of osteoporosis increased serum immunoreactive parathyroid hormone, and inappropriately low serum 1,25-dihydroxyvitamin D. *Mayo Clin Proc* 1978;53:701-706.
41. Slovik Dm, Adams JS, Neer RM. Deficient production of 1,25-dihydroxyvitamin D in elderly osteoporotic patients. *N Engl J Med* 1981;305:372-374.
42. Fox J, Kollenkirchen U, Walters MR. Deficiency of vitamin D metabolites directly stimulates renal 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase activity in rats. *Metabolism* 1991;40:438-441.
43. Henneman PH, Dempsey EF, Carroll EL, Albright F. The cause of hypercalciuria in sarcoid and its treatment with cortisone and sodium phytate. *J Clin Invest* 1956;35:1229-1242.
44. Barbour GL, Coburn JW, Slatopolsky E, Norman AW, Horst RL. Hypercalcemia in an anephric patient with sarcoidosis: Evidence for extrarenal generation of 1,25-dihydroxyvitamin D. *N Eng J Med* 1981;305:440-443.

45. Fetchick DA, Bertolini DR, Saring ES. Production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by human T cell lymphotropic virus-I-transformed lymphocytes. *J Clin Invest* 1986;78:592-596.
46. Traba ML. Estados patológicos relacionados con la vitamina D. *Rev Esp Enf Meb Oseo* 1993;2:30-37.
47. Bordier P, Rasmussen H, Marie P, Miravet L, Gueris J, Ryckwaert A. Vitamin D metabolites and bone mineralization in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;46:284-294.
48. Henry HL, Norman AW. Vitamin D: Two dihydroxylated metabolites are required for normal chicken egg hatchability. *Science* 1978;201:835-837.
49. 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.
50. 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.
51. Christakos S, Norman AW. Vitamin D dependent calcium binding protein synthesis by chick kidney and duodenal polysomes. *Arch Biochem Biophys* 1980;203:809-815.
52. Orti E, Bodwell JE, Munck A. Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocrine Reviews* 1992;13:105-128.

53. 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.
54. Braumbaugh PF, Haussler MR. Nuclear and cytoplasmic binding componends for vitamin D metabolites. Life Sci 1975;16:353-362.
55. 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.
56. Halloran BP, DeLuca HF. Appearance of the intestinal cytosolic recptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ during neonatal development in the rat. J Biol Chem 1981;256:7338-7342.
57. Wasserman RH, Taylor AN. Vitamin D₃-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. Science 1966;152:791-793.
58. Pike JW. Intracellular receptors mediated the biological action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Nutr Rev 1985;43:161-168.
59. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. Endocrine Reviews 1992;13:66-80.

60. 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.
61. Berger U, Wilson P, McClelland RA, Colston K, Haussler MR, Pike JW, Coombes RC. Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:607-613.
62. Tanaka H, Abe E, Miyaura C. 1,25-dihydroxyvitamin D and a human myeloid leukemia cell line (HL-60): The presence of cytosol receptor and induction differentiation. *Biochem J* 1982;204:713-719.
63. Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone* 1992;13:S3-S6.
64. Bar-Shavit Z, Tietelbaum SL, Reitsma P. Induction of monocytic differentiation and bone resorption by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:5907-5910.
65. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in human leukocytes. *Science* 1983;221:1181-1182.
66. Tsoukas CD, Provvedini DM, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D₃, a novel immunoregulatory hormone. *Science* 1984;224:1438-1440.

67. Adams JS, Gacad MA, Singer FR, Sharma OP. Production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by pulmonary alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. NY Acad Sci 1986;465:587-594.
68. Clemens TL, Adams JS, Horiuchi N, Gilcrest BA, Cho H, Tsuchiya Y, Matsuo N, Suda T, Holick MF. Interaction of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ with keratinocytes and fibroblasts from skin of normal subjects and a subject with Vitamin D-dependent rickets, type II: A model for study of the mode of action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. J Clin Endocrinol Metab 1983;56:824-830.
69. Holick MF. Vitamin D resistance and alopecia, a causal or causal relationship?. Arch Dermatol 1985;121:601-603.
70. Berson SA, Yalow RS. Introduction and general consideration in principles of competitive protein binding assays. Odell WD, Daughaday WH. Ed. JB Lippincott Co. Philadelphia, Chapter 1, 1971.
71. McCollum FG, Simmonds N, Shipley PG, Park EA. Studies on experimental rickets. XVI. A delicate biological test for calcium-depositing substances. J Biol Chem 1922;54:41-50.
72. Schacter D, Dowdle EB, Schenker H. Active transport of calcium by small intestine of the rat. Am J Physiol 1960;198:263-271.

73. Adams JS, Clemens TL, Parrish JA, Holick MF. Vitamin-D synthesis and metabolism after ultraviolet radiation of normal and vitamin-D-deficient subjects. *N Engl J Med* 1982;306:722-725.
74. Clemens TL, Adams JS, Nolan JM, Holick MF. Measurement of circulating vitamin D in man. *Clin Chim Acta* 1982;121:301-308.
75. Hones G. Chromatographic separation of 24(R),25-dihydroxyvitamin D₃, and 25-hydroxyvitamin D₃-26,23-lactone using a cyano-bonded phase packing. *J Chromatogr* 1983; 276:69-74.
76. Hodsman AB, Wong EGC, Sherrard DJ. Preliminary trials with 24,25-dihydroxyvitamin D₃ in dialysis osteomalacia. *Am J Med* 1983;74:407-414.
77. Napoli JL, Pramanik BC, Partridge JJ. 23S,25-dihydroxyvitamin D₃ as a circulating metabolite of vitamin D₃: its role in 25-hydroxyvitamin D₃-26,23-lactone biosynthesis. *J Biol Chem* 1982;257:9634-9639.
78. Horst RL, Reinhart DT, Napoli JL. 23-Keto-25-hydroxyvitamin D₃ and 23-keto-1,25-dihydroxyvitamin D₃: two new metabolites with high affinity for the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;107:1319-1322.
79. Bouillon R, Van Kerkhove P, DeMoor P. Measurement of 25-hydroxyvitamin D₃ in serum. *Clin Chem* 1976;22:364-368.

80. Jones G, Schnoes HK, DeLuca HF. An in vitro study of vitamin D₂ hydroxylases in the chick. *J Biol Chem* 1976;251:24-28.
81. Jones G. Assay of vitamin D₂ and D₃ and 25-hydroxyvitamins D₂ and D₃ in human plasma by high performance liquid chromatography. *Clin Chem* 1978;24:287-298.
82. Brumbaugh PF, Haussler DH, Bursac KM, Haussler MR. Filter assay for 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Utilization on the hormones target tissue chromatin receptor. *Biochemistry* 1974;13:4071-4097.
83. Lawson BEM, Fraser DR, Kodicek E. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism. *Nature (London)* 1971;230:228-230.
84. Hollis BW. Assay of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D₃ involving a novel single cartridge extraction and purification procedure. *Clin Chem* 1986;32:2060-2063.
85. Stern PH, Hamstra AJ, DeLuca HF, Bell NH. A bioassay capable of measuring 1 picogram of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;46:891-896.
86. Avioli LV, Haddad JG. The vitamin D family revisited. Editorial. *N Engl J Med* 1984;311:47-49.
87. Bouillon R. Clinical use of vitamin D metabolite assays (calcidiol and calcitriol). *Lab Med* 1990;14:342-347.

88. Bouillon R, Auwerx J, Dekeyser L, Fevery J, Lissens W. Serum vitamin D metabolites and their binding protein in patients with liver cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:86-89.
89. Broadus AE, Insogna KL, Lang R, Ellison AF, Dreyer BE. Evidence for disordered control of 1,25-dihydroxyvitamin D production in absorptive hypercalciuria. *N Engl J Med* 1984;311:73-80.
90. Bikle DD, Siiteri PK, Ryzen E. Serum protein binding of 1,25-dihydroxyvitamin D: a reevaluation by direct measurement of free metabolite levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:969-975.
91. Hess AF, Lewis JM. Clinical experience with irradiated ergosterol. *JAMA* 1928;91:783-796.
92. Ross SG. Vitamin D intoxication in infancy. *J Pediatr* 1952; 41:815-822.
93. Committee on hypercalcemia, British Paediatric Association. Hypercalcemia in infants and vitamin D. *Br Med J* 1956;2:149-155.
94. Fomon SJ, Younoszai MK, Thomas LN. Influence of vitamin D on linear growth of normal full-term infants. *J Nutr* 1966; 88:345-350.
95. Food and Nutrition Board, National Academy of Sciences National Research Council, 1973.

96. Birkbeck JA, Scott HF. 25-Hydroxycholecalciferol serum levels in breast-fed infants. *Arch Dis Child* 1980;55:691-695.
97. Roberts CC, Chan GM, Folland D, Rayburn C, Jackson R. Adequate bone mineralization in breast-fed infants. *J Pediatrics* 1981;90:192-196.
98. 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.
99. 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.
100. Rothberg AD, Pettifor JM, Desmond FC, Sonnendecker EWW, Ross FP. Maternal-infant vitamin D relationships during breast-feeding. *J Pediatr* 1982;101:500-503.
101. Chesney RW. Requirements and upper limits of vitamin D intake in the term neonate, infant and older child. *J Pediatr* 1980;116:159-166.
102. Haddad JG. Vitamin D. Solar rays, the milky way, or both?. *N Eng J Med* 1992;326:1213-1215.

103. Bhowmick SK, Jonhson KR, Rettig KR. Call for clarification of vitamin D recomendations. In reply. *Am J Dis Child* 1992;146:14.
104. 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.
105. 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.
106. 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.
107. Fraser DR. La economía fisiológica de la vitaina D. *Lancet (Ed Esp)* 1983;3:199-203.
108. 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.
109. Greer FR, Marshall S. Bone mineral content, serum vitamin D metabolite concentrations, and ultraviolet B light exposure in infants fed human milk with and without vitamin D₂ supplements. *J Pediatr* 1989;114:204-212.
110. Whitehead TP. Principios de control de calidad (Lab/76.1). *Quim Clin* 1984;3:53-78.

111. Stamm D. Directrices par aun programa básico para el control de calidad interno de análisis cuantitativos en química clínica (LAB/81.3). *Quim Clin* 1988;7:33-62.
112. Guidilenes for the evaluation of analysers in clinical chemistry. *ECCLS* 1986;3:1-32.
113. Scriver CR, Reade TM, DeLuca HF, Hamstra AJ. Serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal subjects and in aptientes whit hereditary rickets or bone disease. *N Engl J Med* 1978;299:976-979.
114. McCollum FG, Simmonds N, Shipley PG, Park EA. Studies on experimental rickets XVI. A delicated biological test for calcium-depositing substances. *J Biol Chem* 1992;54:41-50.
115. Schacter D, Roseng SM. Active transport of Ca^{45} by the small intestine and its dependences on vitamin D. *Am J Physiol* 1959;196:357-365.
116. Schacter D, Dowdle EB, Schenker H. Active transport of calcium by small intestine on the rat. *Am J Physiol* 1960;198:263-271.
117. Belsey R, DeLuca HF, Potts JT. Competitive protein-binding assay for vitmain D and 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;33:554-557.
118. Haddad JG, Chyu KJ. Competitive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;33:992-995.

119. Imawari M, Goodman ES. Immunological and immunoassay studies of the binding protein for vitamin D and its metabolites in human serum. *J Clin Invest* 1977;59:432-442.
120. Bouillon R, Baelen HV, Moor PP. The measurement of the vitamin D-binding protein in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1977;45:225-231.
121. Haddad JG, Hillman L, Roganasathit S. Human serum binding capacity and affinity for 25-hydroxyergocalciferol and 25-hydroxycholecalciferol. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;43:86-91.
122. Traba ML, Piedra C, Babe M, Marin A. Estudio comparativo de la determinación de 25-hidroxivitamina D₃ mediante un ensayo de competición protéica tras diferentes técnicas de purificación con Sephadex LH-20, Sep-pak C-18 y cromatografía líquida de alta eficacia. *Rev Clin Esp* 1983;171:195-199.
123. Kao PC, Hesser DW. Simultaneous determination of 25-hydroxy- and 1,25-dihydroxyvitamin D from a single sample by dual-cartridge extraction. *Clin Chem* 1984;30:56-61.
124. Haddad JG, Chyu KS. Competitive protein binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol *J Clin Endocrinol Metab* 1971;33:992-995.
125. Roberts CC, Chan GM, Folland D, Rayburn C, Jackson R. Adequate bone mineralization in breast-fed infants. *J Pediatr* 1981;99:192-196.

126. Greer FR, Searcy JE, Levin RS, Steichen JJ, Asch 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.
127. Belsey RE, DeLuca HF, Potts, JT. A rapid assay for 25-hydroxyvitamin D₃ without preparative chromatography. *J Clin Endocrinol Metab* 1974;38:1046-1051.
128. Bouillon R, Herck EV, Jans I, Tan BK, Baelen HV, de Moor P. Two direct (nonchromatography) assay for 25-hydroxyvitamin D. *Clin Chem* 1984;30:1731-1736.
129. Bayard F, Bee P, Louvet JP. Measurement of plasma 25-hydroxycholecalciferol in man. *Europ J Clin Invest* 1972;2:195-198.
130. Morris JF, Peacock M. Assay of plasma 25-hydroxyvitamin D. *Clin Chim Acta* 1976;72:383-391.
131. Fairney A, Turner C, Hanson S, Zambon N. A simple micromethod for 25-hydroxyvitamin D estimation. *Ann Clin Biochem* 1979;16:106-110.
132. Bishop JE, Norman AW, Coburn JW, Roberts PA, Henry JN. Studies on the metabolism of calciferol 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.

133. Traba ML, Quesada M, Marin A, Piedra C, Babe M, Navarro F. Determinación del 25-hidroxicolecalciferol en suero. *Rev Esp Fisiol* 1984;40:69-76.
134. Bouillon R, Vanassche A, Van Baelen H, Heyns W, de Moor P. Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Significance of the free 1,25-dihydroxyvitamin D₃ concentration. *J Clin Invest* 1981;67:589-596.
135. 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.
136. 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.
137. Adams JS, Clemens TL, Holick MF. Silica Sep-pak preparative chromatography for vitamin D and its metabolites. *J Chromatography* 1981;226:198-201.
138. Hollis BW, Roos BA, Lambert PW. Vitamin D in plasma: quantitation by a nonequilibrium ligand binding assay. *Steroids* 1981;27:609-619.
139. Mawer EB, Hann JT. Rapid automated high-performance liquid chromatographic assay for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ using trans-calcidiol as an ultraviolet-absorbing internal standard. *J Chromatography* 1987;415:305-316.

140. McLaughlin M, Fairney A, Lester E, Raggatt PR, Brown DJ, Wills MR. Seasonal variations in serum 25-hydroxycholecalciferol in healthy people. *Lancet* 1974;1:536-538.
141. Turnbull H, Trafford DJH, Makin HLJ. A rapid and simple method for the measurement of plasma 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ using Sep-pak C₁₈ cartridges and a single high-performance liquid chromatographic step. *Clin Chim Acta* 1982;120:65-76.
142. 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.
143. Bouillon R. Radiochemical assays for vitamin D metabolites: technical possibilities and clinical applications. *J Steroid Biochem* 1983;19:921-927.
144. Leenheer AP, Bauwens MR. Radioimmunoassay for 1,25-dihydroxyvitamin D in serum or plasma. *Clin Chem* 1985;31:142-146.
145. Mawer EB. Clinical implications of measurements of circulating vitamin D metabolites. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;9:63-84.
146. Pike JW, Toverud S, Boass A, McCain T, Haussler Mr. Circulating 1,25(OH)₂D during physiological states of calcium stress. In biochemical, chemical, and clinical aspects related to calcium metabolism. Ed Walter de Gruyter. 1977; p:187-214.

147. Manolagas SC, Culler FL, Howard JE, Brickman AS, Deftos LJ. The cytoceptor assay for 1,25-dihydroxyvitamin D and its applications to clinical studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:751-760.
148. Clemens TL, Hendy GN, Papapoulos SE. Measurement of 1,25-dihydroxycholecalciferol in man by radioimmunoassay. *Clin Endocrinol* 1979;11:225-234.
149. Bouillon R, De Moor P, Baggiolini EG, Uskokovic MR. A Radioimmunoassay for 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Clin Chem* 1980;26:562-567.
150. Gray TK, McAdoo T, Pool D. A modified radioimmunoassay for 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Clin Chem* 1981;27:458-463.
151. Fraber LJ, Adami S, Clements TL. Radioimmunoassay of 1,25-dihydroxyvitamin D₂: studies on the metabolism of vitamin D₂ in human. *Clin Endocrinol* 1983;18:151-165.
152. Brumbaugh PF, Haussler DH, Bursac KM. Filter assay for 1,25-dihydroxyvitamin D₃: utilization of the hormone's target tissue chromatin receptor. *Biochemistry* 1974;13:4091-4097.
153. 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.

154. Reinhardt TA, Horst RL, Littledike ET, Beitz DC. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in bovine thymus gland. *Biochem Biophys Res Communications* 1982;106:1012-1018.
155. Hollis B. Assay of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D involving a novel single-cartridge extraction and purification procedure. *Clin Chem* 1986;32:2060-2063.
156. Jongen MJM, Van Ginkel FC, Van der Vijgh WJF, Kuiper S, Netelenbos JC, Lips P. And international comparison of vitamin D metabolite measurements. *Clin Chem* 1984;30:399-403.
157. Manolagas SC, Reitz R, Horst RL. Multicenter comparison of 1,25-dihydroxycholecalciferol measurements in human serum. *Lancet* 1983;I:191-192.
158. Jongen MJM, Van der Vijgh WJF, Willems HJJ, Netelenbos JC. Analysis for 1,25-dihydroxyvitamin D in human plasma after a liquid chromatographic purification procedure, with a modified competitive protein binding assay. *Clin Chem* 1981;27:444-450.
159. Reinhardt TA, Hollis BW. 1,25-dihydroxyvitamin D microassay employing radioreceptor techniques. *Methods Enzymol* 1986;123:176-185.
160. Horst RI, Littledike ET, Riley JL, Napoli JL. Quantitation of vitamin D and its metabolites and their concentrations in five species of animals. *Ann Biochem* 1981;116:189-193.

161. Dokoh S, Pike JW, Chandler JS, Mancini JM, Haussler MR. An improved radioreceptor assay for 1,25-dihydroxyvitamin D in human plasma. *Ann Biochem* 1981;116:211-217.
162. Jones G, Byrnes B, Palna F, Segev D, Mazur Y. Displacement potency of vitamin D₂ analogs in competitive protein binding assays for 25-hydroxyvitamin D₃, 24,25-dihydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;50:773-778.
163. Jongen MJM, Van der Vijgh WJF, Van Beresteyn ECH. Interlaboratory variation of vitamin D metabolite measurements. *J Clin Chem Clin Biochem* 1982;20:753-756.
164. Manolagas SC, Deftos LJ. Comparison of 1,25-, 25-, and 24,25-hydroxylated vitamin D₃ binding in fetal rat calvariae and osteogenic sarcoma cells. *Calcif Tissue Int* 1981;33:655-661.
165. Mayer E, Schmidt-Gayk H. Interlaboratory comparison of 25-hydroxyvitamin D determination. *Clin Chem* 1984;30:1199-1204.
166. Lambert PW, Syverson BJ, Arnaud CD, Spelsberg TC. Isolation and quantitation of endogenous vitamin D and its physiologically important metabolites in man plasma by high-performance liquid chromatography. *J Steroid Biochem* 1979;8:929-937.

167. Horst HL, Shepard RM, Jorgensen NA, DeLuca HF. Assays for vitamin D and its metabolites. In vitamin D, basic research and its clinical application. Ed. Walter de Gruyter. 1979 p:213-220.

168. Mayer E, Schmidt-Gayk H, Gartner R, Knuppen R. Simultaneous assay of 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ by high-performance liquid chromatography. Acta Endocrinol Suppl 1981;240,96 A 44.

169. Lichtenstein P, Specker L, 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, age, race, season, and diet on vitamin D status. Pediatrics 1986;77:883-890.

170. 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.

171. 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.

172. Tjellessen L, Christiansen C. Vitamin D metabolites in normal subjects during one year. A longitudinal study. Scand J Clin Lab invest 1983;43:85-88.

173. Sanchez ML, Borque M, Del Olmo J, Rubio P. Observaciones preliminares sobre los niveles plasmáticos de 25(OH)D en la población normal y su variación con la edad. Rev Clin Esp 1983;169:169-172.

174. Rushton C. Vitamin D hydroxylation in young and old age. Age Ageing 1978;7:91-94.

175. Lund B, Sorensen OH. Measurement of 25-hydroxyvitamin D₃ in serum and its relation to sunshine, age and vitamin D intake in danish population. Scand J Clin Lab Invest 1979;39:23-30.

176. Loomis F. Skin-pigment regulation of vitamin D biosynthesis in man. Science 1967;157:501-506.

177. Dunningan MG, Childs WC, Smith CM, McIntosh WB, Ford JA. The relative roles of ultra-violet deprivation and diet in the aetiology of Asian rickets. Scott Med J 1975;20:217-218.

178. 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;36:23-36.

179. Adams JS, Clemens TL, Parrish JA, Holick MF. Vitamin-D synthesis and metabolism after ultra-violet radiation of normal and vitamin-D-deficient subjects. N Engl J Med 1982;306:722-725.

180. 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.
181. Ala-Houhala M, Koskinen T, Parviainen MT, Visakorpi J. 25-hydroxyvitamin D and vitamin D in human milk: effects of supplementations and season. *Am J Clin Nutr* 1988;48:1057-1060.
182. Hillman LS, Chow W, Salmons SS, Weaver E, 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.
183. Sherman SS, Hollis BW, Tobin JD. Vitamin D status and related parameters in a healthy population: the effects of age, sex, and season. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;71:405-413.
184. Holick MF, Krane SM, Potts JT. Calcium, phosphorus, and bone metabolism: calcium regulating hormones. In Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG. *Harrison's principles of internal medicine*. 11th ed. New York, McGraw-Hill 1986 p:1857-1870.
185. Greer FR, Reeve LE, Chesney RW, DeLuca HF. Water-soluble vitamin D in human milk. *Pediatrics* 1982;69:238-240.
186. Reeve LE, Chesney RW, DeLuca HF. Vitamin D in human milk: identification of biologically active forms. *Am J Clin Nutr* 1982;36:122-126.

187. 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.
188. Younoszai MK, Schedl HP. Influence of vitamin D on *in vivo* intestinal calcium transport in normal rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972;140:496-501.
189. Gray TK, McAddo T, Williams ME. Circulating levels of 1,25(OH)₂D vary during the menstrual cycle. In vitamin D: chemical, biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism. Norman AW, Schaefer K, Herrath DW. New York, W de Gruyter. 1982; p: 653-656.
190. Winter JS, Hughes IA, Reyes FI. Pituitary gonadal relations in infancy: patterns of serum gonadal steroid concentrations in man from birth to 2 years of age. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;42:679-686.
191. Chesney RW, Rosen JF, Hamstra AJ. Serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal children and in vitamin D disorders. *Am J Dis Child* 1980;134:135-139.
192. Lorenzo Sanz G. Metabolismo óseo en el lactante. Su relación con la alimentación, aportes de vitamina D, e influencia estacional. Tesis Doctoral (pendiente de lectura). Universidad Complutense de Madrid. 1993.
193. Fraser DR. Regulation of the metabolism of vitamin D. *Phys Review* 1980;60:551-613.