

TESIS DOCTORAL

REGULACIÓN DEL FÓSFORO EN EL RECIÉN NACIDO
PREMATURO Y SU PAPEL EN LA ENFERMEDAD
METABÓLICA ÓSEA DE LA PREMATURIDAD

PhD THESIS

REGULATION OF PHOSPHORUS IN PRETERM
INFANTS AND THE ROLE IN METABOLIC BONE
DISEASE OF PREMATURITY

AUTORA

SANDRA LLORENTE PELAYO

DIRECTOR

DOMINGO GONZÁLEZ-LAMUÑO LEGUINA

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Escuela de **Doctorado** de la Universidad de Cantabria

Santander 2023



ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
DOCTORADO EN MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL

**REGULACIÓN DEL FÓSFORO EN EL RECIÉN NACIDO
PREMATURO Y SU PAPEL EN LA ENFERMEDAD METABÓLICA
ÓSEA DE LA PREMATURIDAD**

PhD THESIS

**REGULATION OF PHOSPHORUS IN PRETERM INFANTS AND
THE ROLE IN METABOLIC BONE DISEASE OF PREMATURITY**

Tesis Doctoral presentada por Sandra Llorente Pelayo
Director: Prof. Domingo González-Lamuño Leguina

Agradecimientos

Son muchas las personas a las que me gustaría agradecer en este momento tan especial que supone el final de la tesis doctoral, empezando por mi profesora de biología en secundaria, María Félix, que me inculcó el interés por la medicina y la investigación; y terminando por todos aquellos compañeros de profesión que me han ido enseñando el arte de la medicina y han hecho que vaya creciendo como persona y como profesional, hasta llegar al día de hoy.

De entre todas estas personas que sería imposible enumerar, mi mayor reconocimiento y gratitud es para el Doctor González-Lamuño, por toda su dedicación, su ayuda y su ejemplo. Me quedo corta si digo que ha sido el mejor tutor y director que he podido tener. Ha sido mucho más que eso, cómo a veces le digo, es “mi padre en la investigación”, y nunca dejaré de aprender a su lado. Su ayuda ha sido inestimable, desde el primer momento en que me presenté en su consulta para pedirle consejo, su visión ha sido clave para plantear el estudio, para desarrollarlo y para interpretar y reinterpretar los resultados, siempre con ilusión, pasión, inteligencia y rigurosidad.

El otro pilar de este trabajo es mi compañero y amigo el Doctor Pablo Docio, con quién he realizado todo el trabajo de campo, con quién he crecido y a quién he visto crecer en estos años. Hemos compartido horas de cursos, de ecografías, de análisis de datos, y también de confidencias. Hemos ido de la mano en la aventura de la tesis doctoral y sin él, esto no hubiese sido posible, gracias Pablo.

También quiero hacer una mención especial al departamento de bioquímica con los doctores M. Teresa García Unzueta y Bernardo Lavín a la cabeza, que han sido una parte básica en este estudio, quiero agradecer su interés y profesionalidad, entendiendo las dificultades que suponen las muestras en grandes prematuros y haciendo lo imposible por optimizar esos pocos mililitros de los que muchas veces disponíamos.

Así mismo, agradecer a la Doctora M^a Ángeles Ballesteros, “Geles” para los que tienen la suerte de conocerla, por toda su ayuda, asesoramiento y rigurosidad en el análisis de los datos y, por encima de todo, por su disposición, carácter y motivación que son un ejemplo para mi y seguro que para todos los que se cruzan en su camino.

A todo el equipo de Neonatología, por su excelente trabajo en la atención al recién nacido prematuro y sin el cuál este estudio no tendría sentido.

Además, y de forma no menos importante, quiero agradecer públicamente a mis padres por haberme educado en el respeto, el esfuerzo y la capacidad de superación, por creer en mi, por haberme dado las alas que me permiten volar y por ser siempre mi fuente de apoyo incondicional.

Por supuesto, también a mi compañero de vida, Juan, por su paciencia infinita, por haberme acompañado a lo largo de este proyecto, teniendo que renunciar en ocasiones a nuestro tiempo de pareja, siendo mi apoyo y consuelo en los momentos de flaqueza o cansancio, siempre a mi lado, siendo un equipo.

Y finalmente a todos los “pequeños grandes prematuros” y a sus familias, por haber hecho posible este trabajo y por mostrarnos el maravilloso poder de la vida.

“Nada en la vida es para ser temido, es solo para ser comprendido.
Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”

Marie Curie

Fuentes de financiación

El presente trabajo ha utilizado fondos del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL) procedentes de un estudio previo financiado por Kyowa-Kirin (MD0075).

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 23 |
| ABSTRACT..... | 27 |
| 1-INTRODUCCIÓN..... | 31 |
| 1.1. Metabolismo del fósforo..... | 33 |
| 1.2. Mineralización ósea fetal y postnatal..... | 37 |
| 1.3. Desórdenes minerales en el prematuro..... | 39 |
| 1.3.1. Factores de riesgo..... | 40 |
| 1.4. Métodos diagnósticos de enfermedad metabólica ósea | 43 |
| 1.4.1. Marcadores bioquímicos..... | 43 |
| 1.4.2. Marcadores radiológicos..... | 44 |
| 1.4.3. Criterios diagnósticos..... | 46 |
| 1.5. Justificación del estudio..... | 48 |
| 1.5.1. Vacíos de investigación..... | 48 |
| 2-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 51 |
| 2.1. Hipótesis..... | 53 |
| 2.2. Objetivos..... | 54 |
| 3-MATERIAL Y MÉTODOS..... | 55 |
| 3.1. Diseño..... | 57 |
| 3.2. Población de estudio..... | 58 |
| 3.2.1. Contexto..... | 58 |
| 3.2.2. Muestra..... | 58 |
| 3.2.3. Procedimiento..... | 59 |
| 3.3. Variables..... | 60 |
| 3.3.1. Variables clínicas..... | 60 |

| | |
|---|-----|
| 3.3.2. Variables bioquímicas..... | 61 |
| 3.3.3. Variables radiológicas..... | 62 |
| 3.4. Análisis de datos..... | 63 |
| 3.4.1. Análisis de valores nutricionales..... | 63 |
| 3.4.2. Análisis estadístico..... | 64 |
| 3.5. Consideraciones éticas..... | 65 |
| 4-RESULTADOS..... | 67 |
| 4.1. Características generales de la población..... | 69 |
| 4.2. Parámetros nutricionales..... | 71 |
| 4.3. Resultados del análisis bioquímico..... | 73 |
| 4.3.1. Resultados de bioquímica sanguínea..... | 73 |
| 4.3.2. Resultados de bioquímica urinaria..... | 74 |
| 4.3.3. Metabolismo del fosforo..... | 76 |
| 4.4. Estudio ecográfico..... | 80 |
| 4.4.1. Núcleo de osificación femoral distal..... | 82 |
| 4.4.2. Núcleo de osificación tibial proximal..... | 82 |
| 4.5. Factores clínicos asociados con EMO..... | 83 |
| 4.5.1. Factores nutricionales..... | 87 |
| 4.6. Variables bioquímicas y EMO..... | 91 |
| 4.7. Estudio ecográfico y EMO..... | 98 |
| 5-DISCUSIÓN..... | 105 |
| 5.1. Metabolismo del fósforo en el prematuro | 107 |
| 5.2. Prevalencia y factores de riesgo de EMO..... | 112 |
| 5.3. Marcadores bioquímicos de EMO..... | 115 |
| 5.3.1. Fósforo..... | 116 |

| | |
|--|-----|
| 5.3.2. Calcio..... | 117 |
| 5.3.3. Fosfatasa alcalina y fosfatasa alcalina ósea..... | 117 |
| 5.3.4. Otros marcadores..... | 119 |
| 5.3.5. FGF23..... | 119 |
| 5.4. Marcadores radiológicos de EMO..... | 121 |
| 5.5. Prevención y tratamiento de la EMO..... | 124 |
| 5.6. Limitaciones y fortalezas del estudio | 126 |
| 5.6.1. Limitaciones..... | 126 |
| 5.6.2. Fortalezas..... | 127 |
| 6-CONCLUSIONES..... | 129 |
| 7-BIBLIOGRAFÍA..... | 135 |
| 8-ANEXOS..... | 149 |
| 8.1. Cuaderno de recogida de datos..... | 151 |
| 8.2. Hoja de información al paciente..... | 154 |
| 8.3. Consentimiento informado..... | 158 |
| 8.4. Difusión de resultados y publicaciones..... | 159 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----------|
| Tabla 1. Comparación de las estrategias utilizadas para el screening, diagnóstico y monitorización de la enfermedad metabólica ósea a nivel internacional y nacional. | Pag. 47 |
| Tabla 2. Composición de los diferentes productos de nutrición enteral. | Pag. 63 |
| Tabla 3. Características generales de la población. | Pag. 70 |
| Tabla 4. Ingestas nutricionales por paciente en el momento de la determinación bioquímica. | Pag. 72 |
| Tabla 5. Resultados del análisis bioquímico en suero/plasma a las 3-4 semanas de vida. | Pag. 73 |
| Tabla 6. Resultados del análisis bioquímico en orina a las 3-4 semanas de vida. | Pag. 74 |
| Tabla 7. Correlaciones entre las principales variables implicadas en el metabolismo fosfocálcico. | Pag. 77 |
| Tabla 8. Medidas de los núcleos de osificación y grosor del cartílago de crecimiento en las epífisis femoral distal (EFD) y tibial proximal (ETP). | Pag. 82 |
| Tabla 9. Factores clínicos asociados con enfermedad metabólica ósea de la prematuridad. | Pag. 86 |
| Tabla 10. Factores nutricionales asociados con enfermedad metabólica ósea de la prematuridad. | Pag. 90 |
| Tabla 11. Factores bioquímicos relacionados con EMO. | Pag. 91 |
| Tabla 12. Análisis univariante de los factores bioquímicos relacionados con EMO. | Pag. 93 |
| Tabla 13. Análisis multivariante de los factores relacionados con EMO. | Pag. 93 |
| Tabla 14. Factores clínicos asociados con aparición retardada de los núcleos de osificación y con EMO. | Pag. 100 |
| Tabla 15. Variables bioquímicas del metabolismo óseo y su asociación con la aparición retardada de los núcleos de osificación. | Pag. 102 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|---------|
| Figura 1. Esquema de la regulación del fósforo. | Pag. 36 |
| Figura 2. Resumen esquemático del proceso de mineralización fetal y de la transición postnatal. | Pag. 38 |
| Figura 3. Factores de riesgo de enfermedad metabólica ósea de la prematuridad, clasificados en base a su mecanismo etiopatogénico. | Pag. 42 |
| Figura 4. Procedimiento de reclutamiento y recogida de datos. | Pag. 59 |
| Figura 5. Gráficos mostrando la ausencia de correlación entre la edad gestacional y el cociente uCisC/uCr (A) y uGGT/uCr (B) | Pag. 75 |
| Figura 6. Gráficos mostrando la correlación entre la GGT sérica y el cociente uGGT/uCr (A) y la CisC sérica y el cociente uCisC/uCr (B). | Pag. 75 |
| Figura 7. A- Correlación entre PTH y calcio. B- Correlación entre 25-OH-VitD y calcio. C-Correlación entre FGF23 y calcio. | Pag. 77 |
| Figura 8. A- Correlación entre PTH y fosforo. B- Correlación entre 25-OH-VitD y fosforo. C-Correlación entre FGF23 y fosforo. | Pag. 78 |
| Figura 9. A- Correlación entre PTH y uCa/uCr. B- Correlación entre 25-OH-VitD y uCa/uCr. C-Correlación entre FGF23 y uCa/uCr. | Pag. 78 |
| Figura 10. A- Correlación entre PTH y uP/uCr. B- Correlación entre 25-OH-VitD y uP/uCr. C-Correlación entre FGF23 y uP/uCr. | Pag. 79 |
| Figura 11. A- Correlación entre PTH y RTP (reabsorción tubular de fosfato). B- Correlación entre 25-OH-VitD y RTP. C- Correlación entre FGF23 y RTP. | Pag. 79 |
| Figura 12. Imagen ecográfica de la epífisis femoral distal (EFD) y la epífisis tibial proximal (ETP). | Pag. 81 |
| Figura 13. Diagrama de caja mostrando la distribución de la edad gestacional (A), el peso al nacimiento (B), la talla al nacimiento (C) y el perímetro craneal (D) en los pacientes sanos y los que desarrollan EMO. | Pag. 83 |
| Figura 14. Gráfico de sectores mostrando la distribución de displasia broncopulmonar (A), neumonía (B), ductus arterioso persistente (C), hipotiroidismo (D), anemia (E), convulsiones (F) en los pacientes sanos y en los que desarrollan enfermedad metabólica ósea (EMO). | Pag. 84 |
| Figura 15. Diagrama de caja mostrando la distribución del primer día de inicio de la movilización con método madre | Pag. 85 |

| | |
|---|----------|
| canguro (MMC), en los pacientes sanos y en los que desarrollan enfermedad metabólica ósea (EMO). | |
| Figura 16. Diagrama de caja mostrando la ganancia de peso semanal en el primer mes (A) y en el segundo mes (B); en los pacientes sanos y los que desarrollan enfermedad metabólica ósea (EMO). | Pag. 88 |
| Figura 17. Gráfico de líneas mostrando las medianas de peso al nacimiento, peso en el primer mes y peso en el segundo mes; en los pacientes sanos y los que desarrollan enfermedad metabólica ósea (EMO). | Pag. 88 |
| Figura 18. Diagrama de caja mostrando los días de nutrición parenteral en el primer mes (A), los días de nutrición parenteral en el segundo mes (B), los días con nutrición parenteral exclusiva (C), los días totales con alimentación por sonda enteral (D); en los pacientes sanos y los que desarrollan enfermedad metabólica ósea (EMO). | Pag. 89 |
| Figura 19. A- Diagrama de caja mostrando la distribución de FGF23 según la presencia de EMO. B- Diagrama de caja mostrando la distribución de fósforo según la presencia de EMO. C- Diagrama de caja mostrando la distribución de FA según la presencia de EMO. C- Diagrama de caja mostrando la distribución de FAO según la presencia de EMO. | Pag. 92 |
| Figura 20. A- Análisis de la curva ROC de FGF23 para predecir la EMO. B- Análisis de la curva ROC de fósforo para predecir la EMO. C- Análisis de la curva ROC de FA para predecir la EMO. D- Análisis de la curva ROC de FAO para predecir la EMO. | Pag. 95 |
| Figura 21. A-Diagrama de sectores del uso de la combinación de Fósforo <4 mg/dl y/o FA> 750IU/L a las 3-4 semanas para predecir EMO. B- Diagrama de sectores del uso de FGF23<15,45 ng/L a las 3-4 semanas para predecir EMO. | Pag. 97 |
| Figura 22. Diagrama de caja mostrando la distribución de la aparición del núcleo de osificación femoral distal (EFD) según la presencia de EMO. | Pag. 98 |
| Figura 23. Gráficos mostrando la correlación entre la edad postmenstrual de aparición del núcleo de osificación femoral distal (núcleo EFD) y los niveles de FGF23 (A), fósforo (B), fosfatasa alcalina (C) y fosfatasa alcalina ósea (D). | Pag. 103 |

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

25-OH-Vit D: 25 hidroxicolecalciferol (o calcidiol).

1-25-2OH-vit D: 1,25 dihidroxicolecalciferol (o calcitriol)

AAP: Academia Americana de Pediatría.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ALT: Alanina aminotransferasa.

ARN: Ácido ribonucleico.

ASPEN: Sociedad Estadounidense de Nutrición Parenteral y Enteral.

AST: Aspartato aminotransferasa.

AUC: Área bajo la curva.

BD: Bilirrubina directa.

BT: Bilirrubina total.

ATP: Trifosfato de adenosina.

BUA: Atenuación del sonido.

Ca: Calcio.

tCa: Calcio total.

CisC: Cistatina C.

Cl: Cloro.

Cr: Creatinina.

DEXA: Densitometría ósea.

E: Especificidad.

EDF: Epífisis femoral distal.

ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

EMO: Enfermedad metabólica ósea de la prematuridad.

ESPGHAN: Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición
Pediátrica.

ETP: Epífisis tibial proximal.

FA: Fosfatasa alcalina.

FA-O: Fosfatasa alcalina ósea.

FGF23: Factor de crecimiento de fibroblastos 23.

FP: Fórmula de prematuros.

GGT: Gamma-glutamil transferasa.

HUMV: Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

IC: Intervalo de confianza.

ICH: Conferencia Internacional de Armonización.

IDIVAL: Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla.

K: Potasio.

LMF: Leche materna fortificada.

LXH: Raquitismo hipofosfatémico ligado a X.

MCT: Triglicéridos de cadena media.

Mg: Magnesio.

MMC: Método madre canguro.

Na: Sodio.

NE: Nutrición enteral.

NP: Nutrición parenteral.

OR: Odds ratio.

P: Fósforo.

PTH: Paratohormona.

QUS: Ultrasonido cuantitativo.

RIQ: Rango intercuartílico.

ROC: Curva característica operativa del receptor.

RTP: Reabsorción tubular de fosfato.

S: Sensibilidad.

SOS: Velocidad del sonido.

uCa: Calcio en orina.

uCisC: Cistatina C urinaria.

uCr: Creatinina en orina.

uGGT: gamma-glutamyl transfera en orina.

uP: Fosforo en orina.

RESUMEN

En la regulación del fósforo participan factores hormonales que actúan a nivel intestinal, renal y óseo, como la paratohormona, la vitamina D y el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23), que se ha propuesto como el principal regulador de la concentración sanguínea de fósforo, pero cuyo papel en el metabolismo mineral neonatal y del prematuro no está establecido, al igual que la influencia de la inmadurez del túbulo renal. En el presente trabajo se analiza, en una muestra de 25 grandes prematuros, la regulación de la homeostasis del fósforo a través del estudio de los reguladores hormonales, de función tubular renal y de las variables bioquímicas de remodelado óseo, y su relación con la enfermedad metabólica ósea de la prematuridad, la cual, a pesar de los avances en los cuidados neonatales, continua siendo una importante causa de morbilidad en los prematuros extremos.

ABSTRACT

Hormonal factors such as parathormone, vitamin D and fibroblast growth factor 23 (FGF23), acting at the intestinal, renal and bone levels, participate in the regulation of phosphorus metabolism. FGF23 has been proposed as the main regulator of blood phosphate, but its role in neonatal and premature mineral metabolism is not well established, same as the influence of renal tubular maturity. In the present study, performed in a sample of 25 very preterm infants, phosphorus regulation is analyzed through the study of hormonal regulators, renal tubular function and biochemical variables of bone homeostasis, and their relationship with metabolic bone disease of prematurity, which, despite latest advances in neonatal care, continues to be an important cause of morbidity in extremely preterm newborns.

1- INTRODUCCIÓN

1.1. Metabolismo del fósforo

El fósforo es un elemento esencial en numerosas funciones del organismo. Participa en la formación de las cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN), es decir, en la estructura genética del organismo. Además, desempeña un papel fundamental en el almacenamiento de energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP), que es la principal fuente de energía utilizada por las células.

El fósforo también forma parte de la estructura de las membranas celulares, donde desempeña un papel importante en la señalización celular y la activación de enzimas. Estas enzimas utilizan la transferencia de grupos fosfato para llevar a cabo diversas funciones metabólicas.

Otro aspecto crucial en el que el fósforo juega un papel destacado es en la mineralización ósea y el desarrollo esquelético. El fósforo es uno de los componentes principales del tejido óseo, junto con el calcio. Ayuda en la formación y fortaleza de los huesos y dientes, siendo esencial para el crecimiento y mantenimiento adecuado del esqueleto.

En resumen, el fósforo desempeña múltiples funciones en el organismo, desde la participación en la estructura genética y el almacenamiento de energía, hasta la formación de membranas celulares, la señalización celular y la mineralización ósea. Su presencia y equilibrio adecuado son esenciales para el correcto funcionamiento y desarrollo del organismo.

El fósforo supone aproximadamente el 0,6% del peso corporal al nacimiento, y en torno al 1% en el individuo adulto¹. La mayor parte, el 85%, se encuentra formando parte del esqueleto óseo y los dientes, mientras que el 15% restante se encuentra en los fluidos corporales y tejidos blandos². En plasma, el fósforo se encuentra predominantemente en forma de fosfato orgánico (fosfolípidos y ésteres de fosfato), y una pequeña parte en forma de fosfato inorgánico, que es la forma medible en la práctica clínica habitual^{3,4}.

El fósforo de la dieta se absorbe en el intestino delgado, principalmente en duodeno y yeyuno, a través de un transportador dependiente de sodio (cotransportador NaPi-IIb); se filtra a nivel renal y se reabsorbe en el túbulo proximal, a través de la misma familia de transportadores NaPi-I, NaPi-II (las isoformas IIa y IIc) y NaPi-III^{5,6}. En condiciones fisiológicas, la cantidad de fósforo absorbido a nivel intestinal, y excretado a nivel renal, se regula para conseguir un balance neutro de fósforo en el adulto (o un balance positivo en la infancia, para asegurar el crecimiento)⁷.

Los niveles séricos de fósforo se regulan en base a la cantidad de fósforo ingerida en la dieta (a mayor ingesta, mayor absorción)¹ y también a partir de factores hormonales que actúan a nivel intestinal, renal y óseo, como la paratohormona (PTH), la vitamina D y especialmente el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23), Figura 1.

La PTH producida en las glándulas paratiroides, tiene un efecto fundamentalmente “calciostático”, pero también ejerce su efecto en la regulación de fósforo⁸, actuando fundamentalmente a nivel renal, donde disminuye el número de transportadores y por tanto disminuye la reabsorción y aumenta la excreción renal de fósforo (efecto fosfatúrico). Por otra parte, la PTH también influye en la absorción intestinal de calcio y fósforo, ya que incrementa la actividad de la 1- α -hidroxilasa renal, que convierte la 25-hidroxivitamina D3 en 1,25-dihidroxivitamina D3, y también incrementa la movilización de calcio y fósforo desde el hueso, al estimular la osteoclastogénesis⁹. No obstante de forma global su efecto es fosfatopénico, en base a su acción renal.

El calcitriol (1,25-dihidroxivitamina D3 o vitamina D activa) actúa fundamentalmente a nivel intestinal, aumentando la absorción intestinal de calcio y fósforo. Así mismo aumenta la reabsorción renal y la movilización desde el hueso al compartimento extracelular¹⁰.

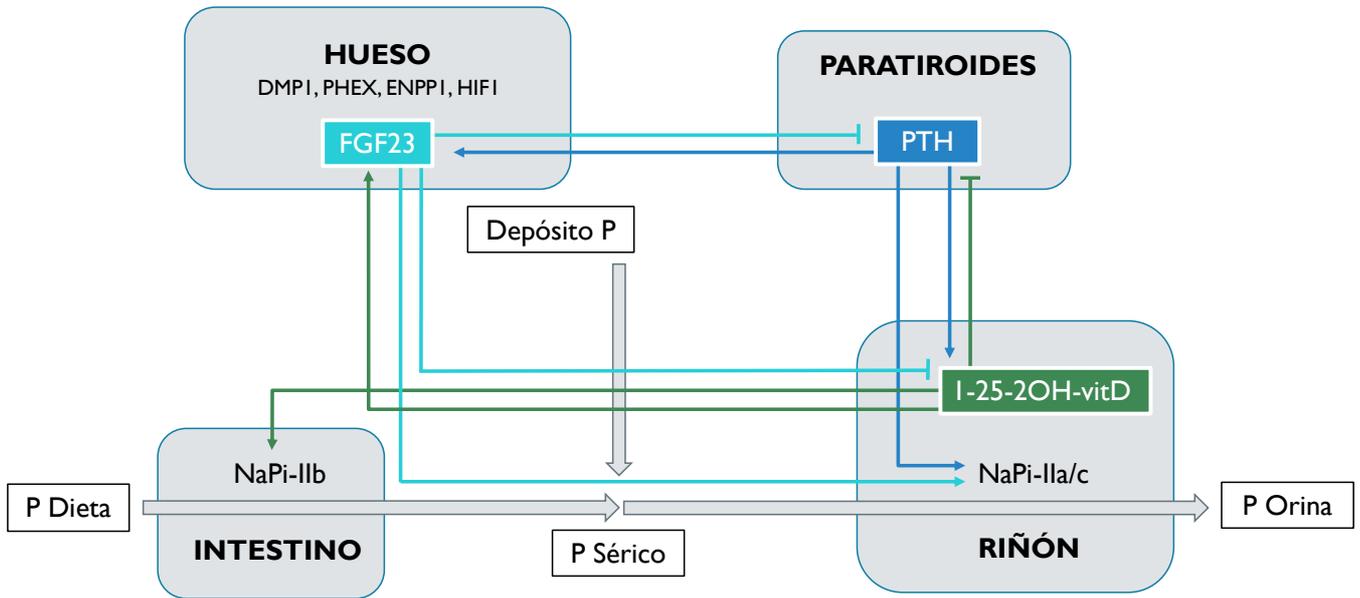
FGF23 es una proteína de 251 aminoácidos (32 KDa)^{11,12} que ejerce acciones locales como otros factores de crecimiento, pero también lleva a cabo acciones sistémicas u hormonales a través de su interacción con receptores FGF (FGFR),

en presencia de la proteína Klotho, que actúa como correceptor. Desde su descubrimiento, es considerado el principal regulador a largo plazo del metabolismo del fósforo.

FGF23 se expresa en múltiples tejidos incluyendo el corazón, hígado, timo y cerebro, pero su principal expresión es en el hueso, en osteocitos y osteoblastos^{11,13,14}. FGF23, a través de su unión a FGFR-Klotho, actúa a nivel renal, promoviendo la internalización de los co-transportadores de sodio y fósforo, disminuyendo la reabsorción tubular, y disminuyendo la expresión de la 1-hidroxilasa renal, que convierte la 25-hidroxivitamina D3 en 1,25-dihidroxivitamina D3, produciendo por ambos mecanismos hipofosfatemia. Por otro lado, la acción de FGF-23 sobre la glándula paratiroidea tiene un efecto inhibitorio sobre la PTH^{8,15}.

A su vez, FGF23 se ve regulado por factores circulantes y locales. A nivel local, FGF23 se ve influido por la presencia de proteínas producidas por las células óseas (DMP1, PHEX, ENPP1, HIF1...)^{16,17,18}. A nivel circulante, la 1,25 dihidroxivitamina D3 estimula la expresión de FGF23 en osteocitos por medio del elemento de respuesta a vitamina D, el cual se une al promotor del FGF23¹⁹. Respecto a la paratohormona, aún existe controversia sobre si hay un efecto directo de la PTH en la regulación de la síntesis de FGF23^{8,20}. En cuanto al fosfato en si mismo, sabemos que la carga oral de fosfato aumenta los niveles circulantes de FGF23 y estos cambios están inversamente relacionados con la reabsorción tubular de fosfato y los niveles de calcitriol²¹; sin embargo, en cultivos de osteoblastos el fosfato no parece estimular al ARNm o activar al promotor del gen de FGF23²², así pues los factores que median los efectos del fosfato en la regulación de FGF23 aún no están bien definidos¹⁶. En cualquier caso, la proteólisis de FGF23 resulta fundamental en su regulación biológica, puesto que los fragmentos N y C terminales de FGF23 no muestran bioactividad y no producen efecto fosfatúrico²³.

Figura 1. Esquema de la regulación del fósforo.



Fuente: Adaptado de Christov M, Jüppner H. Phosphate homeostasis disorders. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2018 oct

P: fósforo, FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23, PTH: Hormona paratiroidea, 1-25-2OH-vit D: 1,25 dihidroxicolecalciferol o calcitriol, NaPi: transportador de fósforo dependiente de sodio.

1.2. Mineralización ósea fetal y neonatal

La mineralización ósea comienza en la fase embrionaria, pero la mayor parte del proceso ocurre en el tercer trimestre de la gestación, cuando se deposita el 80% del contenido mineral óseo. En el feto, a través de la placenta llegan al torrente sanguíneo cantidades suprafisiológicas de calcio y fósforo que condicionan una situación de “hipercalcemia fetal”, que se asocia con bajos niveles de PTH, calcitriol y de hormonas esteroideas en el feto, así como aumento en los niveles de calcitonina y PTHrP (PTH related protein), lo que favorece el depósito de mineral óseo en la matriz orgánica²⁴. Los niveles de FGF23 en el feto son inferiores a los valores normales del adulto (1/3 aproximadamente), aunque la porción C-terminal del FGF23 es el doble de los valores normales, y Klotho, el correceptor de FGF-23, circula en niveles 6 veces superiores a los normales, dificultando la interpretación del papel de FGF23 en periodo fetal²⁵.

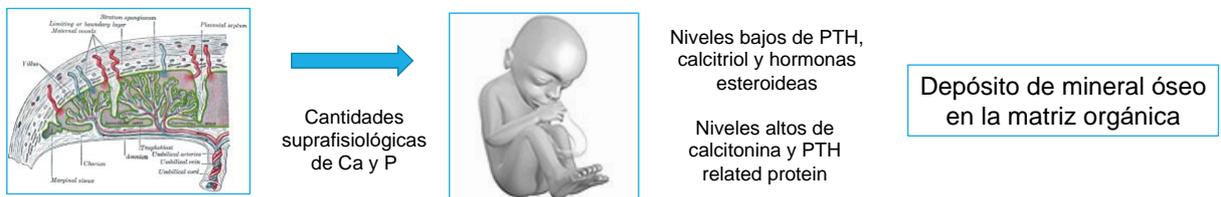
Tras el parto, se produce un cese en el paso placentario de minerales; además, el inicio de la respiración condiciona un aumento del pH, ocasionando una caída en los niveles de calcio en las primeras 12-24 horas tras el parto. Simultáneamente al descenso en la calcemia, el fósforo aumenta en las primeras 24-48 horas. Se trata de un intervalo transitorio de hipoparatiroidismo hasta que las glándulas suprarrenales del neonato comienzan a producir PTH, normalizando la calcemia. FGF23 multiplica por 4 los valores entre el nacimiento y los primeros 4-5 días de vida, mientras que la porción C-terminal de FGF23 mantiene los niveles altos propios del periodo fetal²⁵, si bien no se conoce su efecto. Figura 2.

Se ha observado que la ausencia de FGF23 relaciona con casos neonatales de hiperfosfatemia y formación de masas calcificadas. Sin embargo, también existen casos asintomáticos en los que no se presentan síntomas evidentes. Por otro lado, en trastornos como el raquitismo hipofosfatémico ligado a X (XLH), que se caracteriza por un exceso de FGF23, se ha observado una reducción de los niveles de fósforo en suero desde la segunda semana de vida en algunos casos²⁵. Sin embargo, otros neonatos con exceso de FGF23, los niveles de

reabsorción de fosforo se mantienen normales y no se presentan signos de raquitismo hasta los 3-6 meses de vida, lo que sugiere que la acción de FGF23 sobre el riñón puede estar relacionada con la maduración del sistema.

Figura 2 . Resumen esquemático del proceso de mineralización fetal (A) y de la transición postnatal (B).

A) Embarazo



FGF23

- Los niveles de FGF23 en el feto son inferiores a los valores normales del adulto (1/3 aproximadamente)
- La porción C-terminal del FGF23 es el doble de los valores normales
- Klotho, el correceptor de FGF23, circula en niveles 6 veces superiores a los normales

B) Postparto



FGF23

- FGF23 aumenta x4 los valores entre el nacimiento y los primeros 4-5 días de vida
- La porción C-terminal del FGF23 mantiene los niveles altos propios del periodo fetal

Fuente: Elaboración propia

1.3. Desórdenes minerales en el prematuro

En recién nacidos prematuros, es frecuente encontrar desórdenes en la mineralización, lo que se conoce como enfermedad metabólica ósea de la prematuridad (EMO), también llamada osteopenia o raquitismo del prematuro^{26,27}.

La EMO es una entidad en la que existe un déficit en el contenido mineral del hueso inducido por una alteración en su homeostasis, y que se acompaña asimismo de desequilibrios bioquímicos y radiológicos. Se puede definir como una reducción en la matriz orgánica y/o en el contenido mineral (osteomalacia/osteopenia), acompañada o no de signos radiológicos^{26,28}. Dado que la transferencia placentaria de calcio y fósforo y la formación del esqueleto fetal es máxima en el tercer trimestre de la gestación, los recién nacidos pretérmino presentan un alto riesgo de EMO, especialmente si existen comorbilidades que involucran el funcionamiento placentario. Esta entidad se observa con frecuencia en recién nacidos prematuros menores de 32 semanas de gestación²⁹, ocurriendo entre el 16 y el 60% de recién nacidos de muy bajo peso al nacer (<1500 g) y extremadamente bajo peso al nacer (<1000 g)^{30,31,32}.

En la EMO la desmineralización se desarrolla progresivamente en las primeras semanas de vida sin embargo los signos clínicos de raquitismo suelen ser tardíos, en torno a las 6-16 semanas^{31,33}. Los primeros indicadores son las alteraciones bioquímicas, con elevación de la fosfatasa alcalina sérica (FA), seguido de signos radiológicos como osteopenia y fracturas patológicas (especialmente de costillas y huesos largos). La EMO conlleva enlentecimiento de la velocidad de crecimiento y fracturas patológicas con repercusiones clínicas como dolor con la manipulación y deformidad. Además, en el caso de las fracturas costales, puede ocasionar distrés respiratorio y alteraciones en la función pulmonar por alteración en la complianza, prolongando la necesidad de soporte respiratorio. La incidencia real de las fracturas no se conoce pero se estima en torno al 17-34%, y en muchas ocasiones se detectan de forma incidental, en radiografías realizadas por otros motivos^{34,35,36}. Si no se trata,

finalmente se pueden observar signos de raquitismo florido (cabeza grande, craneotabes, abombamiento frontal, fontanela ancha, engrosamiento costocondral, etc.), poco frecuente hoy en día^{27,31,33,34}. Las consecuencias a largo plazo son difíciles de evaluar debido a las dificultades para definir el diagnóstico y por la presencia de factores de confusión, pero existe alguna evidencia de asociación entre EMO y un crecimiento infantil deficiente^{33,37,38}.

1.3.1. FACTORES DE RIESGO

La enfermedad metabólica ósea del prematuro tiene un origen multifactorial, viéndose afectada por factores tanto prenatales como postnatales. Figura 3.

De forma prenatal, las patologías que afectan a la transferencia placentaria de nutrientes, como la corioamnionitis, la preeclampsia y el crecimiento intrauterino restringido, se han asociado con EMO^{32,39}. La incidencia de EMO es inversamente proporcional a la edad gestacional y el peso al nacimiento²⁸, y el peso al nacimiento se ha demostrado como un importante factor de riesgo independiente de EMO^{40,41,42}, probablemente por su asociación con insuficiencia placentaria. Otros factores antenatales como la deficiencia materna de estrógenos³³ o la deficiencia materna de vitamina D, también han sido propuestos. No obstante, la relación de este último no ha podido ser demostrada. La suplementación materna con vitamina D ha probado mejorar los depósitos neonatales de calcio y vitamina D y disminuir la severidad de la hipocalcemia transitoria⁴³, sin embargo, hay estudios observacionales en madres con deficiencia severa de vitamina D en los que no se han demostrado alteraciones en las concentraciones neonatales de calcio ni fosforo^{25,44}.

Entre los factores postnatales, la ingesta insuficiente de calcio y fósforo, bien sea por bajos aportes en la dieta o por alteraciones en la absorción o biodisponibilidad, es un factor clave en el desarrollo de EMO^{27,44,45,46,47,48}. Desde hace décadas se conoce que los recién prematuros alimentados exclusivamente con leche materna presentan niveles de fosforo inferiores a los que reciben

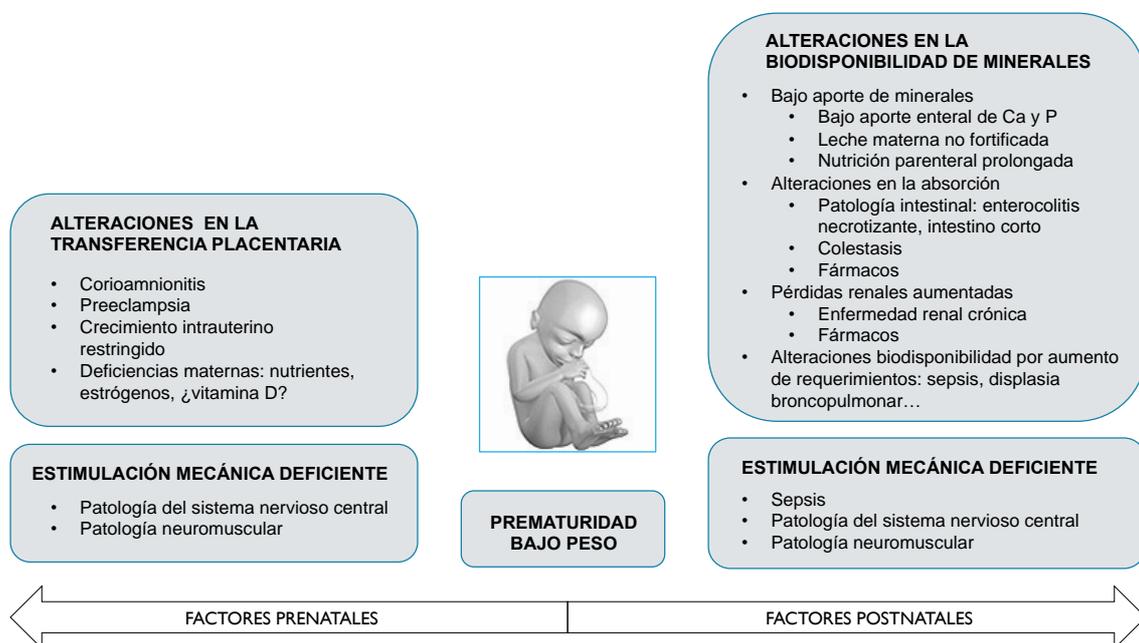
fórmulas especiales o suplementos minerales⁴⁹. Asimismo, los prematuros alimentados con leche materna no fortificada presentan raquitismo en el 40% de los casos frente al 16% de los alimentados con fórmulas especiales⁵⁰. En los últimos años, desde que la fortificación en calcio y fósforo de la leche materna y el uso de fórmulas específicamente diseñadas para prematuros es universal, otros factores de riesgo nutricionales adquieren relevancia, como el retraso en el inicio de la nutrición, las alteraciones digestivas o la nutrición parenteral prolongada^{33,40,44,51}. En los prematuros con mala tolerancia y nutrición parenteral, puede resultar difícil alcanzar los requerimientos fisiológicos de calcio y fósforo para una adecuada mineralización ósea^{40,47}, entre otras cosas por los problemas de precipitación calcio-fosfato que resultan limitantes en la elaboración de nutriciones parenterales.

Además de los aspectos nutricionales, determinadas condiciones clínicas como la displasia broncopulmonar, las patologías neurológicas severas, la sepsis, la colestasis, la enterocolitis necrotizante y la enfermedad renal crónica se han relacionado con EMO^{33,36,44}. Mientras que la enfermedad hepática, intestinal y renal interfieren con la absorción y la pérdida de minerales, otras patologías, como la sepsis o la displasia broncopulmonar, juegan su papel aumentando los requerimientos energéticos y comprometiendo el aporte mineral óseo³³. En la misma línea, el uso de algunos tratamientos también puede alterar el metabolismo mineral óseo. Por ejemplo, el tratamiento prolongado con diuréticos de asa o glucocorticoides favorece la pérdida de minerales^{40,52} y se ha asociado con EMO. De forma similar, el uso de antiácidos interfiere con la absorción de estos nutrientes³³. Además, la EMO también se ha relacionado con el uso de metilxantinas, antibióticos y antiepilépticos, entre otros^{27,33,36,44}.

Finalmente, la EMO también se ha relacionado factores físicos como periodos prolongados de inmovilización, especialmente relevantes en los pacientes con sepsis, enfermedades neuromusculares o enfermedades del sistema nervioso central^{33,53}. Según el modelo “mecanostático” de Miller⁵⁴, la mineralización intrauterina es altamente dependiente de las fuerzas aplicadas al hueso con los movimientos fetales, especialmente en el tercer trimestre. Según este modelo, la actividad física reducida conlleva un aumento de la resorción ósea debido a la

reducción en la estimulación mecánica³³ y, en este sentido, varios estudios y revisiones en los últimos años han mostrado la influencia de la actividad física reglada diaria, junto al adecuado aporte de nutrientes, como factor protector de EMO^{52,53,56}.

Figura 3. Factores de riesgo de enfermedad metabólica ósea de la prematuridad, clasificados en base a su mecanismo etiopatogénico.



Fuente: elaboración propia

1.4. Métodos diagnósticos de enfermedad metabólica ósea

Dado que los signos clínicos de EMO aparecen de forma insidiosa y tardía, resulta importante identificar el riesgo de EMO de una forma precoz y adecuada, para poder iniciar intervenciones terapéuticas que modifiquen la historia natural²⁷. Para ello se utilizan marcadores bioquímicos y marcadores radiológicos o de imagen.

1.4.1. MARCADORES BIOQUÍMICOS

En la práctica clínica, en todos los pacientes prematuros de riesgo, se utilizan marcadores bioquímicos que se determinan en torno a las 3-4 semanas de vida, siendo los dos que mejor se han correlacionado con la enfermedad la hipofosfatemia y la hiperfosfatasa.

El fósforo se utiliza como el marcador más precoz de alteración del metabolismo mineral, ya que se puede manifestar desde los 7-14 días después del nacimiento⁴⁴. Estudios previos muestran como niveles de fósforo por debajo de 3,6 mg/dl en recién nacidos alimentados con lactancia materna y por debajo de 5,6 mg/dl en pretérminos de media de 30 semanas de gestación, se asocian con la presencia de raquitismo^{57,58}.

Respecto a la fosfatasa alcalina, aumenta de forma fisiológica durante las primeras 3 semanas de vida con un pico a las 6-12 semanas⁵⁹. Se expresa en múltiples tejidos (hígado, hueso, riñón, intestino, cerebro, etc.), si bien, en general más del 80% proviene de las formas ósea (FA-O) y hepática, siendo un buen marcador del turnover óseo⁴⁴. Los niveles de FA por encima de 500 U/L se han relacionado con alteración del metabolismo óseo y por encima de 700 U/L con demineralización^{59,60}. La FA se utiliza de forma universal como marcador de EMO, sin embargo, plantea dos problemas fundamentales: que no existe acuerdo entre los puntos de corte a utilizar y que puede elevarse en otras patologías frecuentes en el prematuro como en la colestasis.

Cuando se estudia la combinación de ambos marcadores, niveles de FA >900 U/L junto con fósforo <5,6 mg/dl en prematuros, presentan una sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de EMO del 70 y 100% respectivamente⁵⁸. Junto a ellos, los niveles de PTH >100 pg/ml también pueden sugerir EMO^{32,61}, mientras que el resto de marcadores del metabolismo fosfo-cálcico, como el calcio o la vitamina D, no se han demostrado como herramientas útiles⁴⁴.

En orina, el cálculo de la reabsorción tubular de fosfato (RTP) también ha demostrado utilidad ya que, en respuesta a la hipofosfatemia, la reabsorción tubular de fósforo aumenta, de forma que una RTP aumentada >95% puede ser marcador de aportes insuficientes de fósforo^{32,62}.

1.4.2. MARCADORES RADIOLÓGICOS

Además de los marcadores bioquímicos, también se utilizan herramientas de imagen para el diagnóstico de EMO.

La radiografía simple puede revelar diversos grados de EMO (osteopenia, signos de raquitismo y fracturas)⁶³, pero tiene el inconveniente de no detectar signos de demineralización hasta etapas tardías. Para poder ser detectada en la radiografía, la mineralización ósea debe reducirse entre un 20-40%, lo cual hace que este método de imagen no sea útil para el diagnóstico precoz^{44,64}.

La densitometría ósea (DEXA) es el gold estándar para evaluar la densidad mineral ósea^{65,66}. La densitometría ósea expresa el contenido mineral del hueso como gramos de hidroxapatita por centímetro cuadrado y normalmente se mide en la columna vertebral, la frente o el calcáneo en los pacientes prematuros⁶⁷. La densidad mineral ósea >0,068 g/cm² en prematuros de menos de 31 semanas y menos de 1500g se asocia con una baja probabilidad de desarrollar EMO⁶⁸, sin embargo, la baja disponibilidad de la técnica y el hecho de que utilice radiaciones ionizantes, hace poco relevante su papel en la práctica clínica habitual.

El ultrasonido cuantitativo (QUS) mide tanto el contenido mineral óseo como la matriz orgánica. Utiliza dos parámetros, la velocidad del sonido (SOS) y la atenuación del sonido (BUA) y generalmente se realiza a nivel tibial en prematuros. Tiene como ventaja importante respecto a la DEXA que el aparato es portátil, que tiene un bajo coste y que no utiliza radiación ionizante. Su uso en prematuros de menos de 33 semanas ha permitido observar cómo el entre la primera semana de vida y las 40 semanas de edad corregida se produce un descenso del contenido mineral óseo, y este dato se correlaciona inversamente con los valores de FA⁶⁹. En especial los pacientes con FA mayor de 900 IU/L presentaban Z scores en tibia más bajos que los pacientes con FA menor de 900 IU/L⁶⁹. Otros estudios también han correlacionado los resultados de QUS con los niveles de fósforo⁷⁰ y también de calcio y vitamina D⁷¹. Aunque el QUS parece tener utilidad en la monitorización de la EMO, su uso en la práctica clínica no está extendido y, a día de hoy, no forma parte de los algoritmos de manejo habituales en las unidades neonatales.

La evaluación mediante ultrasonidos del desarrollo esquelético a través de la presencia y medición de los núcleos de osificación epifisarios femoral distal (EFD) y tibial proximal (ETP) de la rodilla es una técnica ampliamente utilizada en la datación de la edad gestacional en los fetos. El núcleo de osificación EFD es detectable en el 71-72% de fetos a las 32-33 semanas de edad gestacional, en el 94% a las 34-35 semanas y en el 100% a las 37 semanas, mientras que el núcleo ETP se detecta a partir de la semana 36 en el 33-50%, aumentando hasta el 80% a las 37 semanas, al 97% a las 39 semanas y al 100% a las 40 semanas^{72,73}. Cuando se ha evaluado su presencia una cohorte de 178 recién nacidos de entre 24 y 41 semanas de edad gestacional, el núcleo EFD estaba presente en el 29% a las 33 semanas de edad corregida, en el 79% a las 35 semanas y en el 86% a las 37 semanas, mientras que el ETP lo hacía en el 31% a las 36 semanas, en el 61% a las 37 semanas y en el 87% a las 40 semanas de edad corregida⁷⁴, retrasados con respecto a los datos en fetos.

La evaluación de los núcleos de osificación es una herramienta excelente para evaluar la maduración esquelética, inocua, técnicamente sencilla y fácil de realizar por pediatras generales, sin embargo no se ha evaluado su utilidad en la enfermedad metabólica ósea de la prematuridad.

1.4.3. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

Aunque existen recomendaciones internacionales sobre los factores de riesgo y las estrategias nutricionales para prevenir la enfermedad metabólica ósea^{39,75,76}, no hay un consenso internacional en cuanto a la detección, el diagnóstico, el tratamiento o el seguimiento de esta entidad. Esto ha dado lugar a una amplia variabilidad en el manejo de esta patología entre países y centros de atención médica. Estudios realizados en Reino Unido y Estados Unidos por Harrison et al.⁴⁸ y Kelly et al.⁷⁷, respectivamente, han demostrado esta variabilidad en el manejo de la EMO a través de encuestas realizadas a profesionales de la salud. Estos estudios muestran como la mayoría de los profesionales se basan en los valores de fósforo y de fosfatasa alcalina, junto con la radiografía simple para la prevención y el diagnóstico de la EMO. Sin embargo, hay una gran variabilidad en la utilización de estos métodos y en los puntos de corte establecidos para tomar decisiones clínicas (Tabla 1-A). Aunque no se ha realizado una encuesta nacional en nuestro país, en la revisión de los protocolos publicados por los centros hospitalarios, también se encontraron diferencias significativas en el enfoque y manejo de la EMO (Tabla 1-B).

A pesar de las diferencias entre países e instituciones, existe un acuerdo en que el cribado de pacientes de riesgo debe iniciarse de forma precoz, a las 3-4 semanas de vida, para poder implementar intervenciones terapéuticas tempranas que puedan modificar la evolución de la enfermedad³³.

Tabla 1. Comparación de las estrategias utilizadas para el screening, diagnóstico y monitorización de la enfermedad metabólica ósea a nivel internacional (A) y nacional (B).

A- REVISIÓN DE ENCUESTAS A NIVEL INTERNACIONAL

| | | |
|--|---------------------------------|---|
| Harrison et al.⁴⁸ 53 Unidades Neonatales en Reino Unido | <i>Variables screening</i> | Alta consideración: P y FA Moderada consideración: Ca |
| | <i>Criterios diagnósticos</i> | P bajo y FA elevada En menor medida: Ca bajo > cambios en radiografía simple > PTH alta > 25-OH-Vit D baja |
| | <i>Variables monitorización</i> | FA (97% utilización) y P (94% utilización) |
| Kelly et al.⁷⁷ 246 Unidades Neonatales en EEUU | <i>Variables screening</i> | FA (99,4% utilización) > P (92,7% utilización) > Ca (88,1% utilización) > Radiografía simple (18,1% utilización) |
| | <i>Criterios diagnósticos</i> | FA elevada se usa universalmente como criterio diagnóstico con puntos de corte variables entre 300-1000 IU/L (>500 IU/L punto de corte más utilizado) Como marcador etiológico: P Bajo > Ca bajo > Vitamina D baja |
| | <i>Variables monitorización</i> | P (73,9% utilización) > FA (73,9% utilización) > Ca (70,8% utilización) > Radiografía simple (40,5% utilización) |

B- REVISIÓN DE PROTOCOLOS A NIVEL NACIONAL

| | | |
|---|---------------------------------|---|
| H. Clinic y H. San Joan de Deu⁷⁸ Barcelona | <i>Variables screening</i> | Ca, P y FA Orina: uCa, uP, uCa/uCr, uP/uCr, RTP |
| | <i>Criterios diagnósticos</i> | Riesgo EMO: FA < 500 IU/L con P < 5 mg/dL o RTP, uP/uCr o uCa/uCr alterado EMO: FA > 500 IU/L con P < 5 mg/dL y/o RTP, uP/uCr y uCa/uCr alterado |
| | <i>Variables monitorización</i> | Ca, P y FA (+25-OH-Vit D) Orina: uCa, uP, uCa/uCr, uP/uCr, RTP |
| H Vall d'Hebron⁷⁹ Barcelona | <i>Variables screening</i> | Ca, P y FA |
| | <i>Criterios diagnósticos</i> | FA > 800-1000 IU/L |
| | <i>Variables monitorización</i> | Ca, P, FA y 25-OH-Vit D |
| H. La Paz⁸⁰ Madrid | <i>Variables screening</i> | P y FA |
| | <i>Criterios diagnósticos</i> | Si FA > 600 IU/L y/o P < 4,5 mg/dL → solicitud de Radiografía simple (considerada confirmatoria) |
| | <i>Variables monitorización</i> | Ca, P, FA y 25-OH-Vit D |

P: fósforo, FA: fosfatasa alcalina, Ca: calcio, 25-OH-Vit D: 25 hidroxicoalciferol (o calcidiol), uCr: Creatinina en orina, uCa: calcio en orina, uP: fósforo en orina, RTP: reabsorción tubular de fosfato.

1.5. Justificación del estudio

En las últimas décadas, con la mejora en los cuidados neonatales y la introducción de medidas específicas como la fortificación de la leche materna y el uso de fórmulas para prematuros (enriquecidas en calcio y fósforo), la incidencia de EMO ha disminuido, desde aproximadamente el 50% en 1987 a 15% en el año 2009^{33,39,81,82}; sin embargo, sigue siendo un importante problema de salud en esta población.

Aunque en los últimos años se ha llegado a acuerdos en cuanto a las estrategias nutricionales de prevención^{39,75,76}, no existen guías de consenso universales sobre la detección precoz, el tratamiento ni el seguimiento de esta patología, dando lugar a diferentes abordajes según cada centro y generando confusión en los profesionales a la hora de solicitar e interpretar los hallazgos bioquímicos y de imagen.

El hecho de que no exista un marcador precoz, sensible y específico de EMO, dificulta el reconocimiento temprano de esta entidad y, por tanto, su manejo.

Son necesarios, en este sentido, estudios bien diseñados que evalúen nuevos marcadores de enfermedad metabólica ósea que permitan mejorar el reconocimiento y manejo de esta entidad.

1.5.1. VACÍOS DE INVESTIGACIÓN

Conocemos bien la regulación del calcio en el periodo neonatal pero no conocemos bien la regulación del fósforo, especialmente en el prematuro. Conocemos el papel de FGF23 en niños y adultos, pero no está bien estudiado en el recién nacido prematuro y se desconoce si su acción renal puede ser madurativa. ¿Cuáles son los valores de FGF23 en prematuros y cómo se

relacionan con el resto de variables del metabolismo del fósforo? ¿Es posible estimar la madurez renal mediante el uso de cocientes urinarios y variables de función tubular?

Sabemos que el fósforo y la fosfatasa alcalina son los principales marcadores precoces para la evaluación de la enfermedad metabólica ósea, sin embargo, ni estos, ni ningún otro de los marcadores del metabolismo óseo de forma independiente puede considerarse específico de EMO. ¿El estudio de la isoforma ósea de la fosfatasa alcalina mejora el rendimiento de la fosfatasa alcalina para el diagnóstico de enfermedad metabólica ósea? ¿Es FGF23 un buen marcador de enfermedad metabólica ósea?

Está bien estudiada la evaluación de los núcleos de osificación como marcador del desarrollo esquelético para su uso en la datación de la edad gestacional pero no se ha evaluado su utilidad en la enfermedad metabólica ósea de la prematuridad. ¿Está retardada la aparición de los núcleos de osificación en los pacientes con enfermedad metabólica ósea? ¿Se correlaciona la aparición de estos núcleos con el resultado de las variables bioquímicas del metabolismo óseo?

2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La hipótesis de este estudio destaca la necesidad de identificar nuevos marcadores bioquímicos de EMO y evaluar el uso de los núcleos de osificación como indicadores del desarrollo esquelético y la enfermedad metabólica ósea de la prematuridad.

La hipótesis planteada sugiere que factores hormonales, como la paratohormona, la vitamina D y el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23), junto con los aportes externos de fósforo en la dieta y las pérdidas renales, desempeñan un papel importante en la homeostasis del fósforo en prematuros y podrían estar relacionados con la EMO en esta población. Además, se plantea que la evaluación de los núcleos de osificación mediante ultrasonidos podría ser útil para monitorizar la salud ósea en los prematuros.

La pregunta de investigación planteada sería la siguiente: *"¿Cuál es el papel de los factores hormonales, como la paratohormona, la vitamina D y el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23), en la homeostasis del fósforo y su relación con la enfermedad metabólica ósea en prematuros?"*

2.2. Objetivos del estudio

En base a esta hipótesis, el objetivo principal del estudio es evaluar el papel de los factores hormonales y FGF23 en el metabolismo del fósforo en el prematuro y su utilidad en el diagnóstico de enfermedad metabólica ósea de la prematuridad.

Como objetivos secundarios nos planteamos:

- Conocer la prevalencia actual de la enfermedad metabólica ósea en nuestra población de prematuros.
- Identificar los factores de riesgo asociados con enfermedad metabólica ósea en nuestra población, incluyendo el análisis exhaustivo de los parámetros nutricionales.
- Analizar los valores de fósforo y sus reguladores hormonales PTH, 25-OH-D, 1,25-OH-D y FGF23 en el prematuro, evaluando su relación con la enfermedad metabólica ósea de la prematuridad.
- Evaluar las pérdidas urinarias de calcio y fósforo a través de los cocientes calcio/creatinina, fósforo/creatinina y RTP (reabsorción tubular de fosfatos) y su papel en la regulación del fósforo del prematuro y en la enfermedad metabólica ósea.
- Valorar la utilidad de estimar la madurez tubular renal a través del estudio de los cocientes urinarios GGT/creatinina y cistatina C/creatinina en prematuros.
- Comparar el rendimiento diagnóstico a las 3-4 semanas de los marcadores bioquímicos de enfermedad metabólica ósea, incluyendo los parámetros del metabolismo del fósforo y las principales variables de remodelado óseo (fosfatasa alcalina y fosfatasa alcalina ósea).
- Estudiar la presencia y medida de los núcleos de osificación de la rodilla en prematuros y su relación con la enfermedad metabólica ósea y con los parámetros bioquímicos de remodelado óseo.

3- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño

Para cumplir con los objetivos se ha diseñado un estudio observacional-no intervencionista, prospectivo, unicéntrico.

3.2. Población de estudio

3.2.1. CONTEXTO

La comunidad autónoma de Cantabria dispone de 3 centros de atención al parto; dos hospitales públicos (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y Hospital Comarcal de Laredo) y un hospital privado (Clínica Mompía). Los nacimientos en la comunidad autónoma son 3211 al cierre del año 2022, según la base de datos de tarjeta sanitaria del Servicio Cántabro de Salud.

El Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) es el centro de referencia de la comunidad, acogiendo el 85% de los nacimientos y siendo el único que dispone de Unidad de Neonatología de nivel IIIB, con atención a recién nacidos menores de 32 semanas de edad gestacional y peso al nacimiento menor de 1500 gramos.

3.2.2. MUESTRA

La población de estudio han sido los recién nacidos prematuros que cumplieron los criterios de inclusión, nacidos en Cantabria en el periodo comprendido entre el 1 de Abril de 2020 y el 31 de Marzo de 2021.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Prematuros de ambos sexos nacidos antes de la semana 32 de edad gestacional y/o con un peso al nacimiento inferior a 1500 gramos.
- Aceptación voluntaria a participar en el estudio y firma de consentimiento informado por parte de los progenitores (anexo).

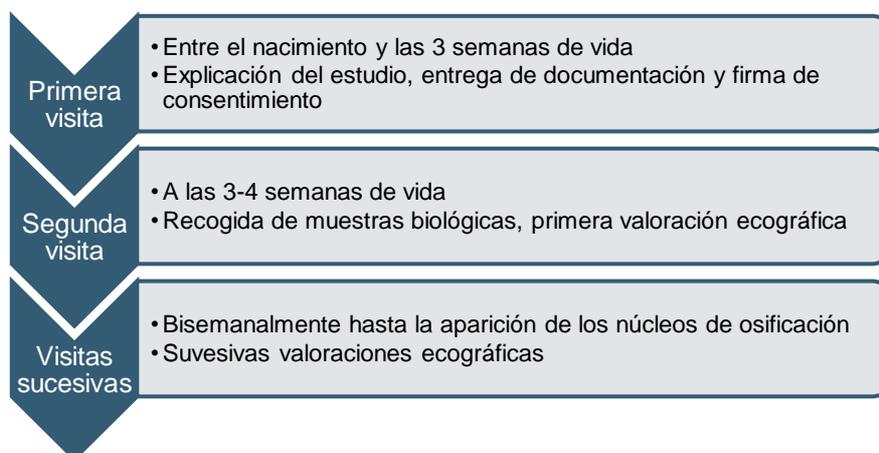
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Ausencia de firma de consentimiento informado.
- Fallecimiento anterior a las 4 semanas de vida.

3.2.3. PROCEDIMIENTO (figura 4)

Tras el nacimiento, durante el ingreso en la Unidad de Neonatología, se realizaba la primera visita en la que se explicaba a los progenitores el objetivo y las características del estudio, se entregaban las hojas de información (anexo) y se solicitaba el consentimiento para participar en el mismo. En la segunda visita, a las 3-4 semanas de vida, se recogían las muestras biológicas y se realizaba la primera valoración ecográfica, que se repetía en visitas sucesivas periódicamente hasta que se constataba la aparición de los núcleos de osificación estudiados. Todos los datos se registraban en el cuaderno de recogida de datos.

Figura 4. Procedimiento de reclutamiento y recogida de datos.



3.3. Variables

3.3.1. VARIABLES CLÍNICAS

Las variables clínicas se recogieron desde el nacimiento hasta el alta de la Unidad Neonatal e incluyen:

- Sexo.
- Gemelaridad.
- Edad gestacional.
- Biometría al nacimiento: peso, talla y perímetro craneal con sus respectivos percentiles (Intergrowth 21).
- Evolución ponderoestatural semanal y mensual (peso, talla y perímetro craneal).
- Día de inicio de la movilización en canguro (Kangaroo mother care)
- Diagnóstico de enfermedad metabólica ósea de la prematuridad: a criterio del neonatólogo en función de la presencia de marcadores bioquímicos (fósforo $<4\text{mg/dl}$ y/o fosfatasa alcalina $>750\text{ IU/L}$) o radiológicos (osteopenia o fracturas).
- Otros diagnósticos/comorbilidades.
- Registro nutricional: cantidad, tipo y duración de la nutrición recibida (nutrición parenteral vs enteral) y tipo de leche (materna fortificada vs fórmulas específicas).
- Nutrientes recibidos en el momento de la extracción bioquímica: calorías, proteínas, calcio, fosforo y vitamina D.
- Medicaciones recibidas en el momento de la extracción bioquímica: fármacos y dosis.

3.3.2. VARIABLES BIOQUÍMICAS

En cada paciente se recogieron 1,5 ml de suero y plasma y 1,5 ml de orina que se procesaron inmediatamente tras la extracción, y fueron congelados a -80 grados hasta su análisis. La analítica en sangre se realizó coincidiendo con la extracción habitual del perfil nutricional a las 3-4 semanas de vida y la orina se recogió de forma concomitante, mediante bolsa colectora.

- Variables en sangre: glucosa, urea, creatinina (Cr), cistatina C (CisC), sodio (Na), potasio (K), cloro (Cl), calcio total (tCa), fósforo (P), magnesio (Mg), fosfatasa alcalina (FA), fosfatasa alcalina ósea (FAO), gamma-glutamyl transferasa (GGT), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina total (BT), bilirrubina directa (BD), prealbúmina, hormona paratiroidea (PTH), 25 hidroxicolecalciferol (25-OH-Vit D o calcidiol), 1,25 dihidroxicolecalciferol (1-25-2OH-vit D o calcitriol) y factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23).
- Variables en orina de micción aislada: calcio urinario (uCa), fósforo urinario (uP), gamma-glutamyl transferasa urinaria (uGGT) y cistatina C urinaria (uCisc) así como sus ratios por creatinina (uCr).
- La reabsorción tubular de fosfato (TRP) se calculó en base a la formula:

$$\%TRP = \left(1 - \frac{uP \times Cr}{uCr \times P}\right) \times 100$$

Las muestras se procesaron y analizaron en el Laboratorio de Bioquímica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, en Santander, utilizando las plataformas Atellica CH&IM (*Siemens Healthcare Diagnostics, Malvern, PA, USA*) y BNII-Nephelometer System (*Siemens Healthcare Diagnostics, USA*). Los niveles de 25-hidroxicolecalciferol se analizaron mediante ensayo de quimioluminiscencia competitivo automatizado (*Liaison XL, DiaSorin Inc, Stillwater, MN, EE. UU.*); mientras que los de 1,25 dihidroxicolecalciferol, fosfatasa alcalina ósea y FGF23 se analizaron mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando los siguientes kits comerciales: 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA (*DiaSource Immunoassays, Belgium*), MicroVue Bone Alkaline Phosphatase EIA (*Quidel-Palex Medical, Barcelona, Spain*), y Human FGF23 (Intact) ELISA de Immunotopics (*Immunotopics*

International, San Clemente, CA 92673). Este kit ELISA de FGF23 tiene las siguientes características: 3,5% de reproducibilidad intraensayo y 6,3% interensayo, no tiene reactividad cruzada con N-terminal (25-179) o C-terminal (180-251 fragmentos) y el límite de la cuantificación es de 5 ng/L.

3.3.3. VARIABLES RADIOLÓGICAS

- Medición ecográfica de los núcleos de osificación femoral distal y tibial proximal de la rodilla.

La evaluación ecográfica se realizó condiciendo con la segunda vista a las 3-4 semanas y se repitió periódicamente cada 2-4 semanas hasta la aparición de los núcleos de osificación femoral distal y tibial proximal.

Se realizó con el ecógrafo *Philips Affiniti 50* utilizando un transductor lineal de banda ancha. Cada evaluación se realizó por separado por dos pediatras entrenados en la evaluación de los núcleos de osificación en recién nacidos (Pablo Docio Pérez y Sandra Llorente Pelayo).

Se definió la presencia de un núcleo de osificación epifisaria por la presencia de una estructura hiperecoica mensurable con una superficie irregular o lisa dentro del cartílago epifisario. Cuando estaba presente, se registraba la edad postmenstrual a la que se visualizaba y se obtenían las medidas del diámetro longitudinal, diámetro transversal y grosor del cartílago, tomándose 3 mediciones repetidas y utilizando el valor medio.

Por consenso se evaluó la rodilla izquierda con el paciente en decúbito supino y la extremidad extendida.

3.4. Análisis de datos

3.4.1. ANÁLISIS DE VALORES NUTRICIONALES

Para estimar las ingestas de nutrientes se analizó la cantidad y composición de la alimentación de cada paciente, además de los aportes extraordinarios en forma de sueros o medicaciones.

- Nutrición parenteral: se consultó la composición de la nutrición parenteral prescrita, a partir de los registros informáticos del Servicio de Farmacia del Hospital Valdecilla.
- Nutrición enteral: Se calcularon los mililitros de leche diarios recibidos según los registros de enfermería y se estimaron los nutrientes en base a los siguientes parámetros (tabla 2):
 - Lactancia materna (donada o propia): composición estándar de la leche madura
 - Fortificante de lactancia materna: composición de *Pre NAN FM85®*
 - Fórmula de prematuros: composición de *NAN Alprem®* 14,4%
 - Formula específica grandes prematuros: composición de *NAN Alprem Clinic 1®*
 - MCTs: Composición Aceite *MCT nutricia®*

Tabla 2. Composición de los diferentes productos de nutrición enteral.

| | <i>Leche materna (c/100 ml)</i> | <i>Pre NAN FM85® (c/ 1g)</i> | <i>NAN ALPREM® (c/100 ml)</i> | <i>NAN ALPREM CLINIC 1® (c/100 ml)</i> | <i>Aceite MCT Nutricia® (c/ 1ml)</i> |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--|--|
| Calorías (Kcal) | 65 | 4,3 | 73 | 80 | 8,5 |
| Proteínas (g) | 1,1 | 0,4 | 2 | 2,9 | - |
| Calcio (mg) | 34 | 19 | 80 | 116 | - |
| Fosforo (mg) | 14 | 11 | 48 | 77 | - |

Se calcularon los líquidos, kilocalorías, proteínas y micronutrientes específicos (calcio y fosforo) y se expresaron por kg de peso y día, según la nomenclatura habitual.

3.4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos incorporó un análisis descriptivo inicial. Para las variables cuantitativas, se presentaron medidas de tendencia central y dispersión, mientras que para las variables categóricas se utilizaron números absolutos y porcentajes. El resultado principal estudiado fue la presencia de enfermedad metabólica ósea de la prematuridad.

Se utilizaron pruebas estadísticas específicas para contrastar las variables continuas. Se emplearon las pruebas T de Student y U de Mann-Whitney, así como la prueba de la mediana, dependiendo de la distribución de cada variable. Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para identificar las variables con distribución normal. Para comparar variables categóricas se utilizó el test de Chi Cuadrado y la prueba exacta de Fisher. Se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson para explorar la relación entre los marcadores bioquímicos séricos.

Además se realizaron análisis de regresión logística simple y regresión logística multivariante, y cada variable independiente se analizó junto con la variable dependiente EMO. El análisis de regresión logística multivariante se realizó incorporando al modelo las variables que resultaron significativas en el modelo univariante, junto con las que se consideraron de interés, a partir de estudios previos en la literatura y a criterio del investigador. Se presenta el odds ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95 % (IC del 95 %) para las variables incluidas en el modelo final de selección por pasos hacia delante con un nivel de significación de 0,10. Todas las pruebas fueron bilaterales y un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo

Se utilizó la curva característica operativa del receptor (ROC) para evaluar los potenciales biomarcadores responsables de predecir la enfermedad ósea metabólica de la prematuridad. El punto de corte para cada biomarcador se calculó a partir del gráfico de sensibilidad vs 1- especificidad. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Para el análisis estadístico se utilizó el software Statistics versión 19 (IBM SPSS).

3.5. Consideraciones éticas

El estudio llevó a cabo cumpliendo los requisitos éticos establecidos en las declaraciones de Helsinki (Versión de Fortaleza 2013), las Guías de Buena Práctica Epidemiológicas de la ICH (Conferencia Internacional de Armonización) y la normativa existente en España, específicamente la Circular 4/2000 de la DGFP (Farmacovigilancia). Se trata de un estudio observacional sin intervención farmacológica. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria, con el número de proyecto CSI20/09.

La recopilación de la información clínica y el manejo de las muestras de los pacientes se llevó a cabo empleando un proceso de codificación o disociación reversible en números de 2 cifras, asegurando así la protección de la identidad de los pacientes. Esto se llevó a cabo de acuerdo al Reglamento (UE) 2016/679 y la Ley orgánica 3/2018, del 5 de Diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales.

4- RESULTADOS

4.1. Características generales de la población

En el periodo de estudio nacieron en la Unidad Neonatal un total de 29 pacientes candidatos, de los cuales 4 fueron excluidos por fallecimiento antes de las 4 semanas de vida, quedando una muestra final de 25 grandes prematuros.

Del los pacientes incluidos, 15 (60%) eran mujeres y 6 de ellos (24%) eran pares de gemelos. La mediana de la edad gestacional al nacimiento fue de 30 semanas con un rango que osciló entre 24 y 34 semanas. La mediana de peso al nacimiento fue de 1180 gramos, con un rango que varió entre 645 y 2030 gramos. Cinco pacientes (20%) fueron etiquetados como bajo peso para la edad gestacional (percentil de peso al nacimiento inferior a p10).

De los 25 pacientes, cinco (20%) fueron diagnosticados con enfermedad metabólica ósea de la prematuridad, en uno de los casos (4%) cursando con fracturas patológicas a nivel costal. Otros diagnósticos frecuentes incluyeron apneas de la prematuridad (80%), enfermedad de membrana hialina (68%), hipoglucemia precoz (56%), ictericia de la prematuridad (52%), anemia de la prematuridad (40%), ductus arterioso persistente (36%), displasia broncopulmonar (36%), hipotiroidismo (24%), hemorragia intraventricular (20%) y sepsis (20%).

En el momento del análisis bioquímico, 17 pacientes (68%) estaban recibiendo tratamiento farmacológico, fundamentalmente cafeína (60%), antibióticos/antifúngicos (20%) y levotiroxina (16%).

En la tabla 3 se recogen las principales características de la población estudiada.

Tabla 3. Características generales de la población.

| | |
|--|-------------------------|
| Edad gestacional (semanas) | 30 (RIQ 26,6-31,2) |
| Sexo | |
| - Varones | 10 (40%) |
| - Mujeres | 15 (60%) |
| Gemelaridad | 6 (24%) |
| Antropometría al nacimiento | |
| - Peso (gramos) | 1180 (RIQ 900-1445) |
| - Percentil peso | 54,12 (RIQ 21,63-70,98) |
| - Talla (centímetros) | 38 (RIQ 35,5-40,5) |
| - Percentil talla | 30,92 (RIQ 17,24-63,09) |
| - Perímetro cefálico (centímetros) | 27 (RIQ 24-28,75) |
| - Percentil perímetro cefálico | 37,5 (RIQ 11,72-69) |
| Primera movilización en canguro (días) | 5 (RIQ 2,5-13,5) |
| Diagnósticos | |
| - EMO | 5 (20%) |
| - Apnea de la prematuridad | 20 (80%) |
| - Enfermedad membrana hialina | 17 (68%) |
| - Displasia broncopulmonar | 8 (32%) |
| - Neumotórax | 1 (4%) |
| - Ductus arterioso persistente | 9 (36%) |
| - Comunicación interauricular | 1 (4%) |
| - Canal auriculoventricular | 1 (4%) |
| - Hipoglucemia precoz | 14 (56%) |
| - Hipotiroidismo | 6 (24%) |
| - Anemia | 10 (40%) |
| - Trombocitopenia | 2 (8%) |
| - Reacción leucoeritoblástica | 2 (8%) |
| - Ictericia de la prematuridad | 13 (52%) |
| - Colestasis neonatal | 2 (8%) |
| - Hemorragia intraventricular | 5 (20%) |
| - Convulsiones | 2 (8%) |
| - Enterocolitis necrotizante | 2 (8%) |
| - Sepsis | 5 (20%) |
| - Neumonía | 4 (16%) |
| - Meningitis | 1 (4%) |
| - Peritonitis | 1 (4%) |
| - Infecciones víricas | 5 (20%) |
| - Cirugía | |
| Resección intestinal | 1 (4%) |
| Cierre de ductus | 1 (4%) |
| Tratamientos farmacológicos | |
| - Cafeína | 15 (60%) |
| - Levotiroxina | 4 (16%) |
| - Hierro | 3 (12%) |
| - Furosemida | 1 (4%) |
| - Hidroclorotiazida | 2 (8%) |
| - Espironolactona | 2 (8%) |
| - Fenobarbital | 2 (8%) |
| - Levetiracetam | 2 (8%) |
| - Opiáceos | 3 (12%) |
| - Cisatracurio | 1 (4%) |
| - Dopamina | 1 (4%) |
| - Dexametasona | 1 (4%) |
| - Ibuprofeno | 1 (4%) |
| - Fluconazol | 3 (12%) |
| - Meropenem | 2 (8%) |
| - Cefotaxima | 2 (8%) |
| - Vancomicina | 2 (8%) |
| - Gentamicina | 1 (8%) |
| - Clindamicina | 1 (8%) |
| - Ampicilina | 1 (8%) |

4.2. Parámetros nutricionales

La pérdida máxima de peso en la muestra de pacientes fue de mediana del 9,9% (RIC 4,8-14,5). La mediana de ganancia de peso durante el primer mes fue de 510 gramos (RIC 275-680), con una mediana de ganancia de 29,28 g/día (RIC 16,78-36,06) durante la semana previa al análisis bioquímico.

Todos los pacientes recibieron nutrición parenteral al nacimiento (100%), con una mediana de duración de 9 días (RIQ 5,5-12,5); aunque 6 pacientes (24%) recibieron nutrición parenteral durante más de 2 semanas. La nutrición enteral se inició en el primer día de vida en 20 de los 25 pacientes (80%); sin embargo durante el primer mes, 4 pacientes (16%) permanecieron en ayuno absoluto durante más de 3 días (entre 4 y 12 días). La nutrición enteral administrada a través de sonda enteral se mantuvo durante una mediana de 42 días (RIC 21-74,5), hasta completar la alimentación completa vía oral.

En el momento del análisis bioquímico, un paciente (4%) estaba recibiendo nutrición mixta enteral y parenteral, mientras que los otros 24 pacientes (96%) recibían nutrición enteral exclusiva. De los pacientes con nutrición enteral, 6 pacientes (24%) recibían fórmula para prematuros, 18 pacientes (72%) leche materna fortificada y 1 paciente (4%) ambos tipos de alimentación. La fortificación de lactancia materna se inició en una mediana de 9 días (RIC 6-13).

El aporte calórico a las 3-4 semanas de vida tuvo una mediana de 130,8 kcal/kg/día (RIC 124,1-142,2) con un aporte de proteínas de 3,7 g/kg/día (RIQ 3,5-4,5). Los aportes de calcio fueron de mediana 146 mg/kg/día (RIC 134,3-183,3) y los de fósforo de 83,6 mg/kg/día (RIC 72,4-100,4). La suplementación vitamínica fue universal con una mediana de vitamina D de 600 UI/día y un rango de 400 a 870 UI/día.

Los parámetros nutricionales detallados se pueden consultar en la tabla 4.

Tabla 4. Ingestas nutricionales por paciente en el momento de la determinación bioquímica

| | Tipo de nutrición | Líquidos (ml/kg/d) | Calorías (kcal/kg/d) | Proteínas (g/kg/d) | Calcio (mg/kg/d) | Fosforo (mg/kg/d) | Vitamina D (IU/d) |
|-------------|-------------------|--------------------|----------------------|--------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Paciente 1 | NE (LMF) | 160 | 131 | 3,89 | 155,7 | 81,07 | 600 |
| Paciente 2 | NE (LMF) | 150 | 122,5 | 3,65 | 146 | 76 | 870 |
| Paciente 3 | NE (FP) | 138 | 100,7 | 2,77 | 110,8 | 66,46 | 400 |
| Paciente 4 | NE (FP) | 167 | 121,9 | 3,3 | 133,3 | 80 | 600 |
| Paciente 5 | NE (LMF+MCT) | 144 | 140,4 | 4,79 | 201 | 108,2 | 800 |
| Paciente 6 | NE (LMF+MCT) | 169 | 139,7 | 3,63 | 141,9 | 72,4 | 800 |
| Paciente 7 | NE (LMF+MCT) | 147 | 146 | 4,28 | 176,5 | 93,8 | 800 |
| Paciente 8 | NE (LMF) | 160 | 144 | 4,96 | 206,4 | 110,4 | 800 |
| Paciente 9 | NE (LMF+MCT) | 149 | 140,1 | 3,92 | 159,1 | 83,6 | 600 |
| Paciente 10 | NE (LMF+MCT) | 160 | 137,7 | 3,36 | 130,4 | 66,4 | 600 |
| Paciente 11 | NE (LMF) | 145 | 130,6 | 4,51 | 187,6 | 100,36 | 600 |
| Paciente 12 | NE (LM) | 168 | 130,3 | 3,54 | 137,3 | 69,9 | 800 |
| Paciente 13 | NE (LM) + PN | 150 | 108 | 3,65 | 28 | 87 | 400 |
| Paciente 14 | NE (LMF+MCT) | 167 | 160,5 | 4,75 | 195,1 | 103,42 | 600 |
| Paciente 15 | NE (AC) | 155 | 125,6 | 4,49 | 179,8 | 119,35 | 600 |
| Paciente 16 | NE (LMF) | 170 | 130,5 | 3,47 | 133,8 | 67,8 | 600 |
| Paciente 17 | NE (LMF) | 164 | 128,8 | 3,59 | 140,3 | 71,89 | 600 |
| Paciente 18 | NE (FP) | 174 | 127 | 3,48 | 139,3 | 83,6 | 600 |
| Paciente 19 | NE (FP) | 168 | 122,6 | 3,36 | 134,4 | 80,64 | 600 |
| Paciente 20 | NE (LMF) | 174 | 147,9 | 4,7 | 191,3 | 100,87 | 600 |
| Paciente 21 | NE (LMF+FP) | 160 | 120,4 | 3,28 | 129,2 | 71,6 | 600 |
| Paciente 22 | NE (LMF+MCT) | 171 | 149,6 | 4,17 | 166,9 | 86,86 | 600 |
| Paciente 23 | NE (LMF+MCT) | 167 | 153,3 | 4,5 | 183,3 | 96,7 | 600 |
| Paciente 24 | NE (LMF+MCT) | 145 | 139,9 | 4,51 | 187,6 | 100,36 | 600 |
| Paciente 25 | NE (LMF) | 165 | 130,8 | 3,69 | 145,4 | 74,82 | 600 |

NE: Nutrición enteral, NP: Nutrición Parenteral, LMF: Leche materna fortificada, FP: Fórmula de prematuros, AC: NAN Alprem Clinic 1®, MCT: Suplementación con triglicéridos de cadena media.

4.3. Resultados del análisis bioquímico

4.3.1. RESULTADOS DE BIOQUÍMICA SANGUINEA

Se obtuvieron muestras de suero y plasma en los 25 pacientes del estudio, sin embargo algunos valores no pudieron obtenerse en todos los pacientes debido a dificultades de procesamiento o a la escasez de muestra. En 20 pacientes, se obtuvieron los valores de FGF23, con una mediana de 45.9 ng/L (RIQ 13,03-76,78) con un rango de 5 a 101,2 ng/L. Los resultados del análisis bioquímico se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados del análisis bioquímico en suero/plasma a las 3-4 semanas de vida

| | N | Mediana (RIQ) |
|------------------------|----|--------------------|
| Glucosa (mg/dL) | 25 | 73 (62,5-81,5) |
| Urea (mg/dL) | 25 | 21 (15-29) |
| Cr (mg/dL) | 25 | 0,34 (0,28-0,38) |
| CisC (mg/L) | 25 | 1,43 (1,31-1,57) |
| Na (mEq/L) | 25 | 137 (132,5-139,5) |
| K (mEq/L) | 21 | 5 (5-5) |
| Cl (mEq/L) | 13 | 104 (99-105) |
| tCa (mg/dL) | 25 | 9,6 (9,45-10) |
| P (mg/dL) | 25 | 6,9 (6,2-7,3) |
| Mg (mg/dL) | 25 | 1,9 (1,5-2) |
| FA (IU/L) | 25 | 333 (286,5-485) |
| FAO (IU/L) | 24 | 139 (106-186) |
| GGT (IU/L) | 25 | 100 (61,5-132,5) |
| AST (IU/L) | 24 | 30,5 (24,25-40,25) |
| ALT (IU/L) | 25 | 10 (7,5-15,5) |
| BT (mg/dL) | 25 | 3,4 (1,9-4,25) |
| BD (mg/dL) | 25 | 0,8 (0,55-1,1) |
| Prealbúmina (mg/dL) | 25 | 8 (5,8-10,55) |
| PTH (pg/mL) | 24 | 58 (35,25-75,25) |
| 25-OH-Vit D (ng/mL) | 25 | 27 (20,5-33) |
| 1-25-2OH-vit D (pg/mL) | 23 | 102 (81-141) |
| FGF23 (pg/mL) | 20 | 45,9 (13,03-76,78) |

Cr: creatinina, CisC: cistatina C, Na: sodio, K: potasio, Cl: cloro, calcio total tCa, P: fósforo, Mg: magnesio, FA: fosfatasa alcalina, FAO: fosfatasa alcalina ósea, GGT: gamma-glutamil transferasa, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanina aminotransferasa, BT: bilirrubina total, BD: bilirrubina directa, PTH: hormona paratiroidea, 25-OH-Vit D: 25 hidroxicolecalciferol (o calcidiol), 1-25-2OH-vit D: 1,25 dihidroxicolecalciferol (o calcitriol), FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23.

4.3.2. RESULTADOS BIOQUÍMICA URINARIA

Se obtuvieron muestras de orina, de forma concomitante al estudio analítico, en los 25 pacientes del estudio. Los resultados se recogen en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados del análisis bioquímico en orina a las 3-4 semanas de vida

| | N | Mediana (RIQ) |
|------------------|----|-----------------------|
| uCr (mg/dL) | 25 | 11 (8-15,5) |
| uCa (mg/dL) | 25 | 6,2 (3,45-8,95) |
| uCa/uCr (mg/mg) | 25 | 0,6 (0,31-0,8) |
| uP(mg/dL) | 25 | 18 (6,8-31,5) |
| uP/uCr (mg/mg) | 25 | 1,78 (0,52-2,6) |
| TRP (%) | 25 | 92 (86,78-97,69) |
| uCisC (mg/L) | 21 | 0,06 (0,04-0,57) |
| uCisC/uCr (mg/g) | 21 | 0,6 (0,3-2,53) |
| uGGT (IU/L) | 25 | 23 (17,5-53,5) |
| uGGT/uCr (IU/g) | 25 | 176,92 (132,5-366,67) |

uCr: Creatinina en orina, uCa: calcio en orina, uP: fosforo en orina, TRP: reabsorción tubular de fosfato, uCisC: cistatina C en orina, uGGT: gamma-glutamyl transferasa en orina.

El análisis de la función tubular renal se realizó a través del estudio de las moléculas cistatina C y GGT en orina y los ratios uCisC/uCr y uGGT/uCr. No se encontró correlación de estas dos variables con la edad gestacional ni la edad corregida, tampoco con el peso ni la talla al nacimiento y tampoco se obtuvo correlación entre ambas variables urinarias ni sus cocientes (figura 5).

Si que se observó de forma muy débil una correlación positiva entre la GGT sérica y urinaria (coeficiente de correlación 0,551, p0,004) y de forma cercana a la significación estadística en el caso de la CisC sérica y la urinaria (coeficiente de correlación 0,594, p 0,005). La mayor parte de los valores en el caso de ambos cocientes se encontraron agrupados. Si que destaca que los valores más elevados de CisC plasmática (2,2 mg/L) y CisC urinaria (11,10 mg/L) y del cociente uCisC/uCr (158,57 mg/g) procedieron de una paciente de 28 semanas de EG (32 postmenstruales) con fallo renal agudo en tratamiento con furosemida y dopamina en el momento del análisis, señalada en rojo en la figura 6.

Figura 5. Gráficos mostrando la ausencia de correlación entre la edad gestacional y el cociente uCisC/uCr (A) y uGGT/uCr (B)

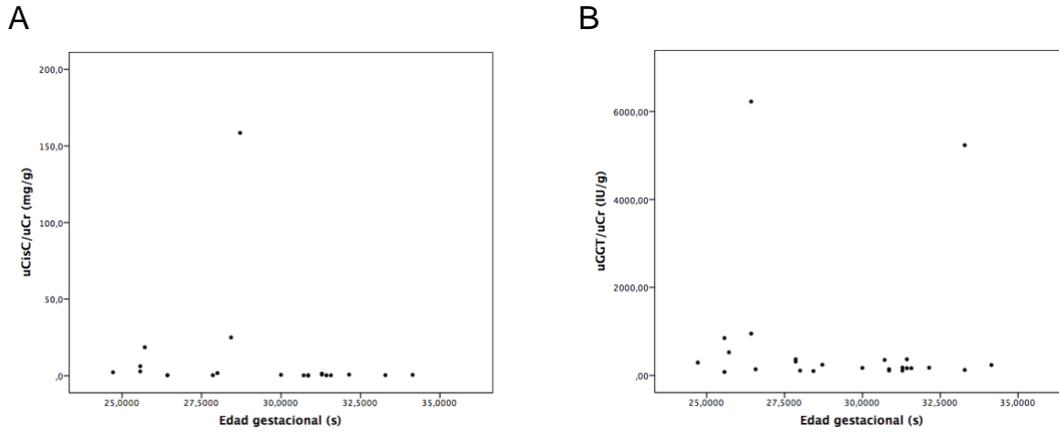
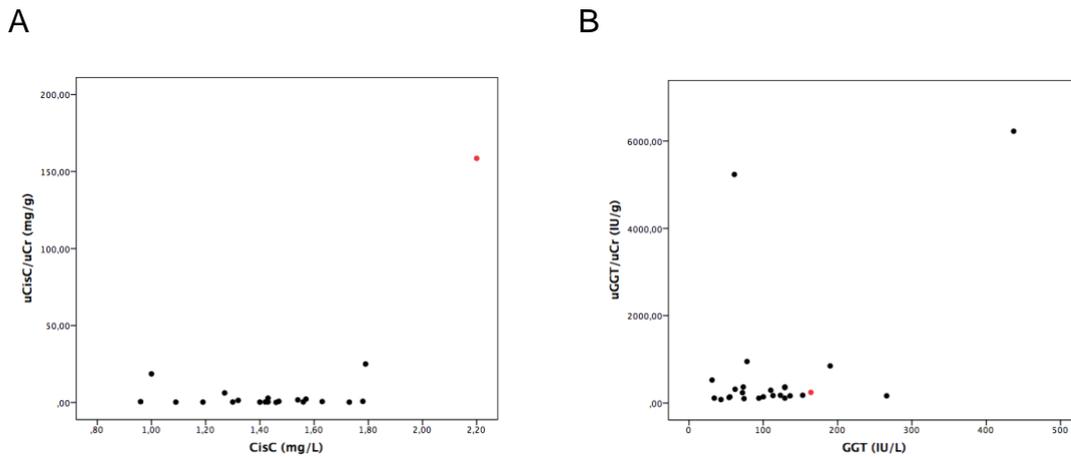


Figura 6. Gráficos mostrando la correlación entre la GGT sérica y el cociente uGGT/uCr (A) y la CisC sérica y el cociente uCisC/uCr (B).



El punto rojo señala a una paciente de 28 semanas de EG (32 postmenstruales) con fallo renal agudo en tratamiento con furosemida y dopamina.

4.3.3. METABOLISMO DEL FOSFORO

Se establecieron correlaciones entre las variables calcio y fósforo, la hormona paratiroidea (PTH), la 25-OH vitamina D, la forma activa de la vitamina D (1-25-2OH Vitamina D) y el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23), así como con los cocientes urinarios uCa/uCr, uP/uCr y la reabsorción tubular de fosfato (TRP). También se analizaron las ingestas diarias de calcio y fósforo y los marcadores de función renal.

Se encontró una fuerte correlación positiva entre los niveles plasmáticos de fosforo y FGF23 (coeficiente de correlación de 0,824, $p < 0,001$). No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de fosforo y PTH, aunque el fosforo mostro una asociación leve con un cociente uCa/uCr elevado (coeficiente de correlación -0,44, $p = 0,028$); y el cociente uCa/uCr elevado se relacionó con niveles bajos de PTH (coeficiente de correlación -0,657, $p < 0,001$). También se encontró una correlación débil negativa entre los niveles de fosforo y vitamina D (coeficiente de correlación -0,546, $p = 0,005$). Por otro lado, no se encontró ninguna relación entre los niveles de calcio o fósforo y las ingestas diarias de estos nutrientes. Tampoco se observó correlación con los marcadores serológicos ni urinarios de función renal (Creatinina, Cistatina C, ni los cocientes urinarios uCisC/uCr ni uGGT/uCr).

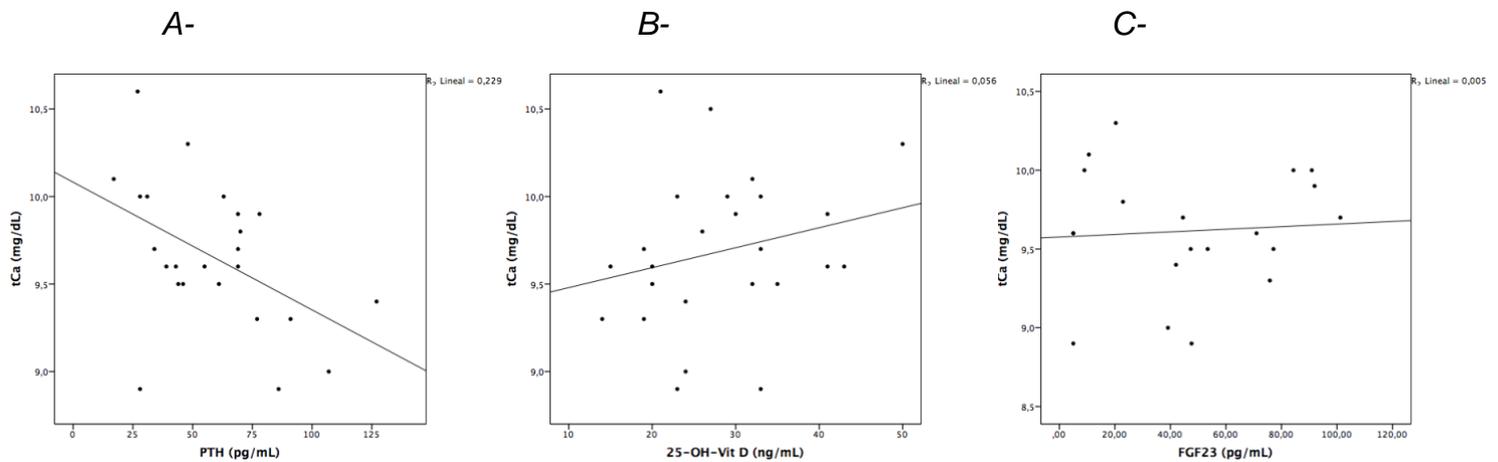
En la tabla 7 se presentan las correlaciones estadísticamente significativas entre las distintas variables. En las figuras 7 y 8 se muestra de forma gráfica la correlación del calcio y fósforo con sus principales hormonas reguladoras, FGF23, paratohormona y vitamina D, mientras que las figuras 9, 10 y 11 muestran los cocientes urinarios y su correlación con principales las hormonas.

Tabla 7. Correlaciones entre las principales variables implicadas en el metabolismo fosfocálcico.

| | | Coefficiente correlación | p |
|---------------|---------------|--------------------------|--------|
| Calcio | - PTH | -0,478 | 0,018 |
| | - uP/uCr | -0,576 | 0,003 |
| | - RTP | 0,637 | 0,001 |
| Fosforo | - FGF23 | 0,824 | <0,001 |
| | - 25-OH-Vit D | -0,546 | 0,005 |
| | - uCa/uCr | -0,44 | 0,028 |
| PTH | - uCa/uCr | -0,657 | <0,001 |
| | - uP/uCr | 0,478 | 0,018 |
| | - RTP | 0,637 | 0,001 |
| 25-OH-Vit D | - uCa/uCr | 0,487 | 0,014 |
| 1-25 OH-Vit D | - uCa/uCr | 0,455 | 0,029 |

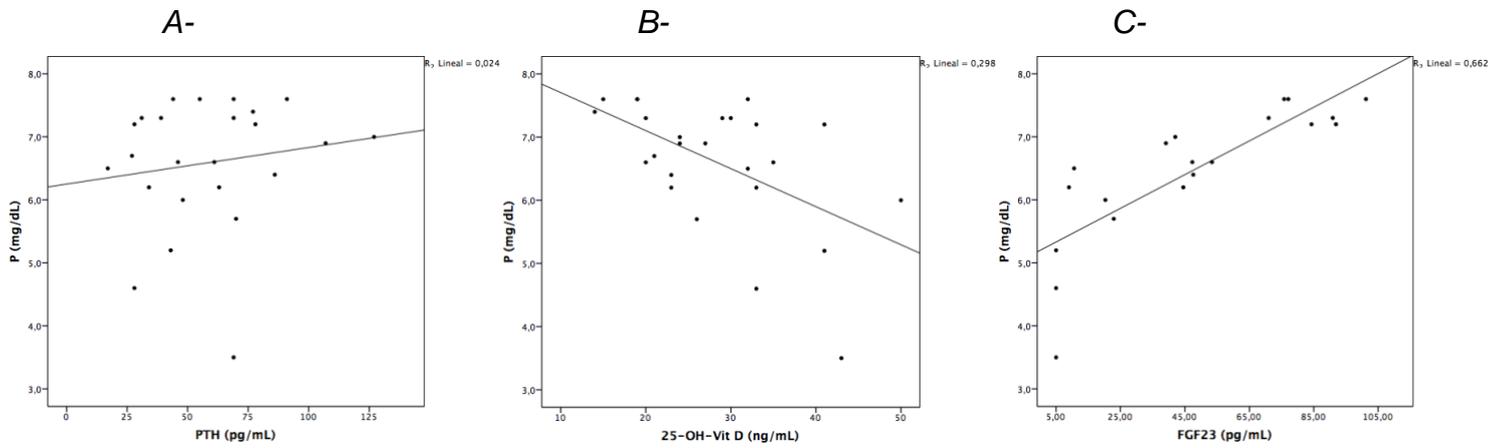
PTH: hormona paratiroidea, 25-OH-Vit D: 25 hidroxicoalciferol (o calcidiol), 1-25-2OH-vit D: 1,25 dihidroxicoalciferol (o calcitriol), FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23, uCr: Creatinina en orina, uCa: calcio en orina, uP: fosforo en orina, TRP: reabsorción tubular de fosfato.

Figura 7. A- Correlación entre PTH y calcio. B- Correlación entre 25-OH-VitD y calcio. C-Correlación entre FGF23 y calcio.



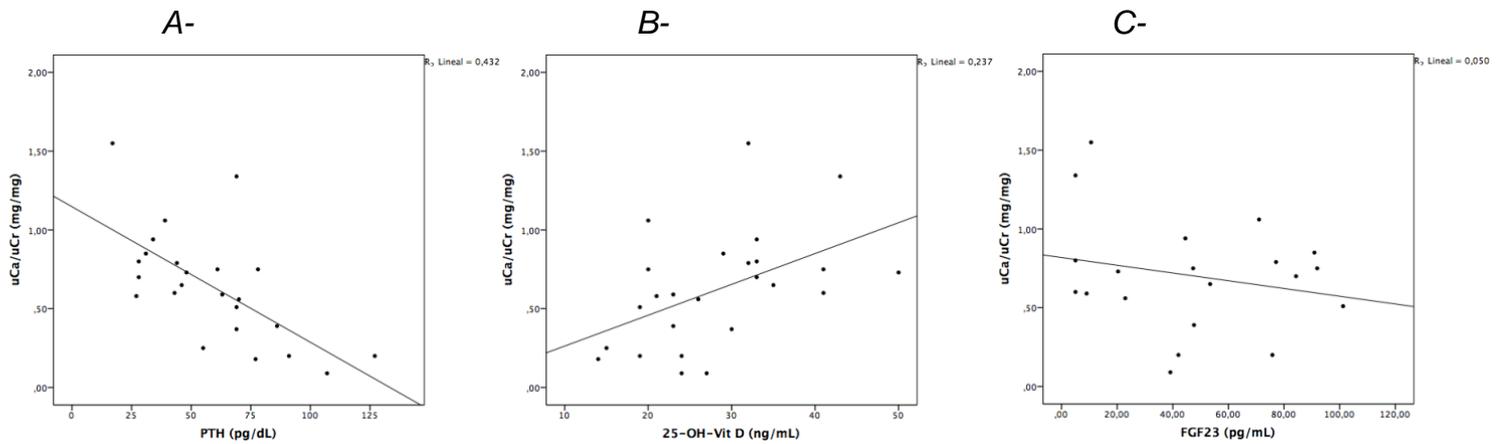
tCa: calcio total; PTH: hormona paratiroidea, 25-OH-Vit D: 25 hidroxicoalciferol (o calcidiol), FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23.

Figura 8. A- Correlación entre PTH y fosforo. B- Correlación entre 25-OH-VitD y fosforo. C-Correlación entre FGF23 y fosforo.



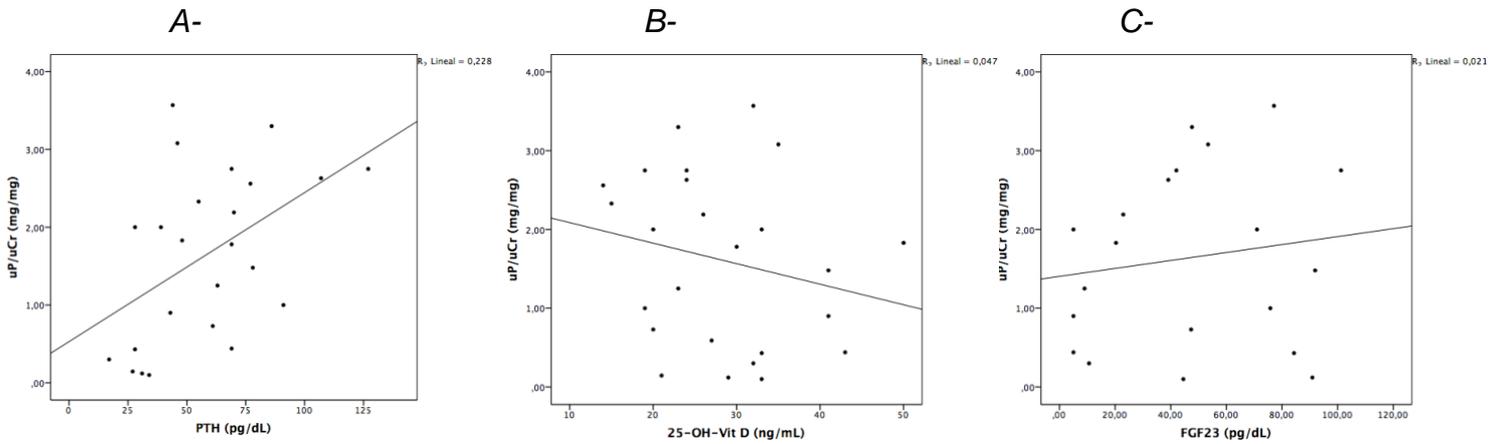
PTH: hormona paratiroidea, P: Fosforo, 25-OH-Vit D: 25 hidroxicolecalciferol (o calcidiol), FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23.

Figura 9. A- Correlación entre PTH y uCa/uCr. B- Correlación entre 25-OH-VitD y uCa/uCr. C-Correlación entre FGF23 y uCa/uCr.



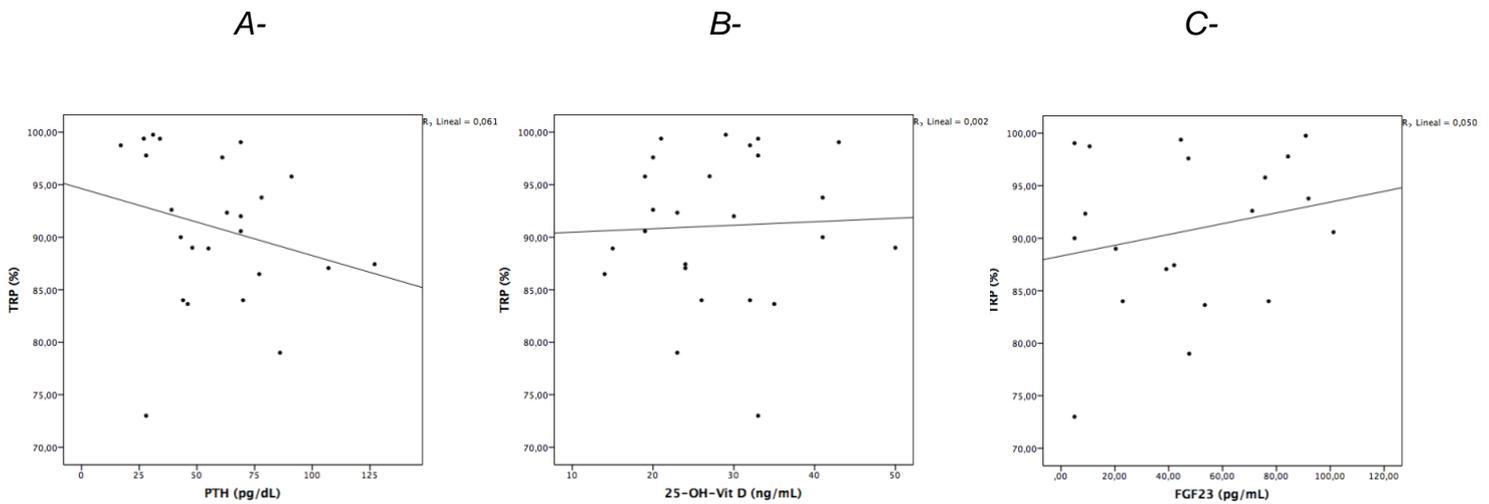
PTH: hormona paratiroidea, uCa/uCr: cociente calcio/creatinina en orina, 25-OH-Vit D: 25 hidroxicolecalciferol (o calcidiol), FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23.

Figura 10. A- Correlación entre PTH y uP/uCr. B- Correlación entre 25-OH-VitD y uP/uCr. C-Correlación entre FGF23 y uP/uCr.



PTH: hormona paratiroidea, UP/uCr: cociente fosforo/creatinina en orina, 25-OH-Vit D: 25 hidroxicalciferol (o calcidiol), FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23.

Figura 11. A- Correlación entre PTH y RTP (reabsorción tubular de fosfato). B- Correlación entre 25-OH-VitD y RTP. C-Correlación entre FGF23 y RTP.

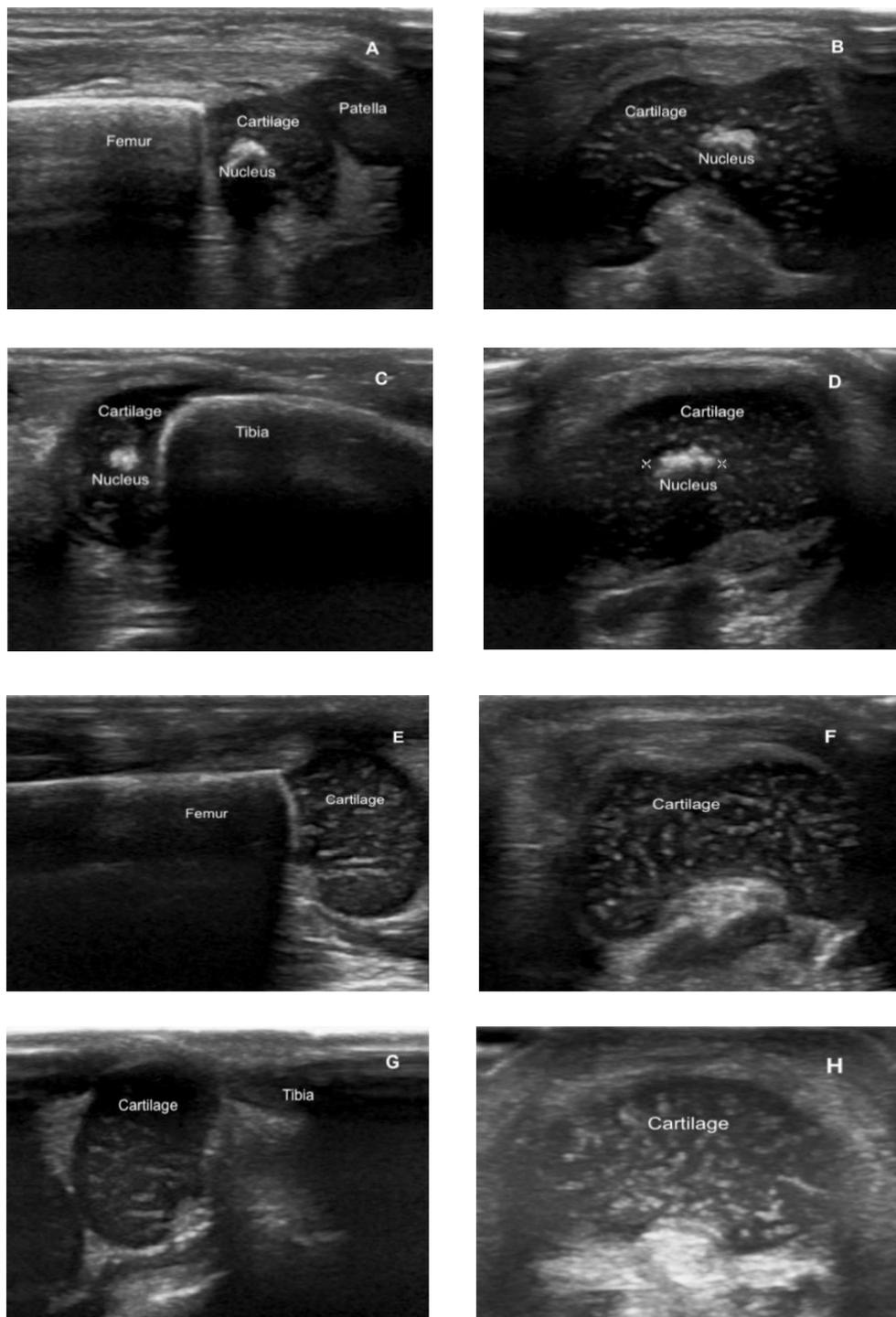


PTH: hormona paratiroidea, 25-OH-Vit D: 25 hidroxicalciferol (o calcidiol), FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23.

4.4. Estudio ecográfico

Se realizó el análisis de los núcleos de osificación en los 25 pacientes del estudio. La figura 12 muestra las imágenes ecográficas de la epífisis femoral distal y tibial proximal de uno de los pacientes del estudio, tanto con la presencia como sin la presencia de los núcleos de osificación. Estos núcleos de osificación se visualizan como estructuras hiperecoicas en el interior de los cartílagos epifisarios.

Figura 12. Imagen ecográfica de la epífisis femoral distal (EFD) y la epífisis tibial proximal (ETP).



Las imágenes A-D muestran la presencia del núcleo de osificación EFD en los cortes longitudinal (A) y transversal (B) y del núcleo ETP en los cortes longitudinal (C) y transversal (D) y corresponden a un varón pretérmino de 31+2, a las 36 semanas de edad postmenstrual. Las imágenes E-H muestran el cartilago EFD sin núcleo en los cortes longitudinal (E) y transversal (F) y el cartilago ETP sin núcleo en los cortes longitudinal (G) y transversal (H).

4.4.1. NÚCLEO DE OSIFICACIÓN FEMORAL DISTAL

La constató la presencia del núcleo de osificación en la epífisis femoral distal (EFD) en 23 pacientes por parte de ambos observadores. Dos pacientes fueron dados de alta antes de la aparición del núcleo de osificación EFD, a las 35 semanas de edad posmenstrual. El núcleo de osificación en la EFD apareció a las 37,14 semanas de mediana (RIQ 35,85-40), con un rango entre 34,57 y 45,14 semanas. Se observó en 9 pacientes (39,13%) por encima de la semana 38 y en 6 pacientes (26,09%) por encima de la semana 40. Existió acuerdo total entre los dos observadores (coeficiente kappa de 1, $p < 0,001$).

4.4.2. NÚCLEO DE OSIFICACIÓN TIBIAL PROXIMAL

Se observó la presencia del núcleo de osificación en la epífisis tibial proximal (ETP) en 6 pacientes. El resto de los pacientes fueron dados de alta antes de la aparición de este núcleo. El núcleo de osificación en la ETP apareció a las 40,07 semanas de edad postmenstrual de mediana (RIQ 36,14-46,14), con un rango entre 35,71 y 49,14. Se encontró un acuerdo total entre los observadores (coeficiente kappa de 1, $p < 0,001$). En todos los casos, el núcleo de osificación en la epífisis femoral distal ya estaba presente cuando se observaba por primera vez el núcleo en la tibia proximal. La tabla 8 recoge las medidas de los núcleos de osificación de las epífisis femoral distal y tibial proximal así como el grosor del cartílago, según cada observador.

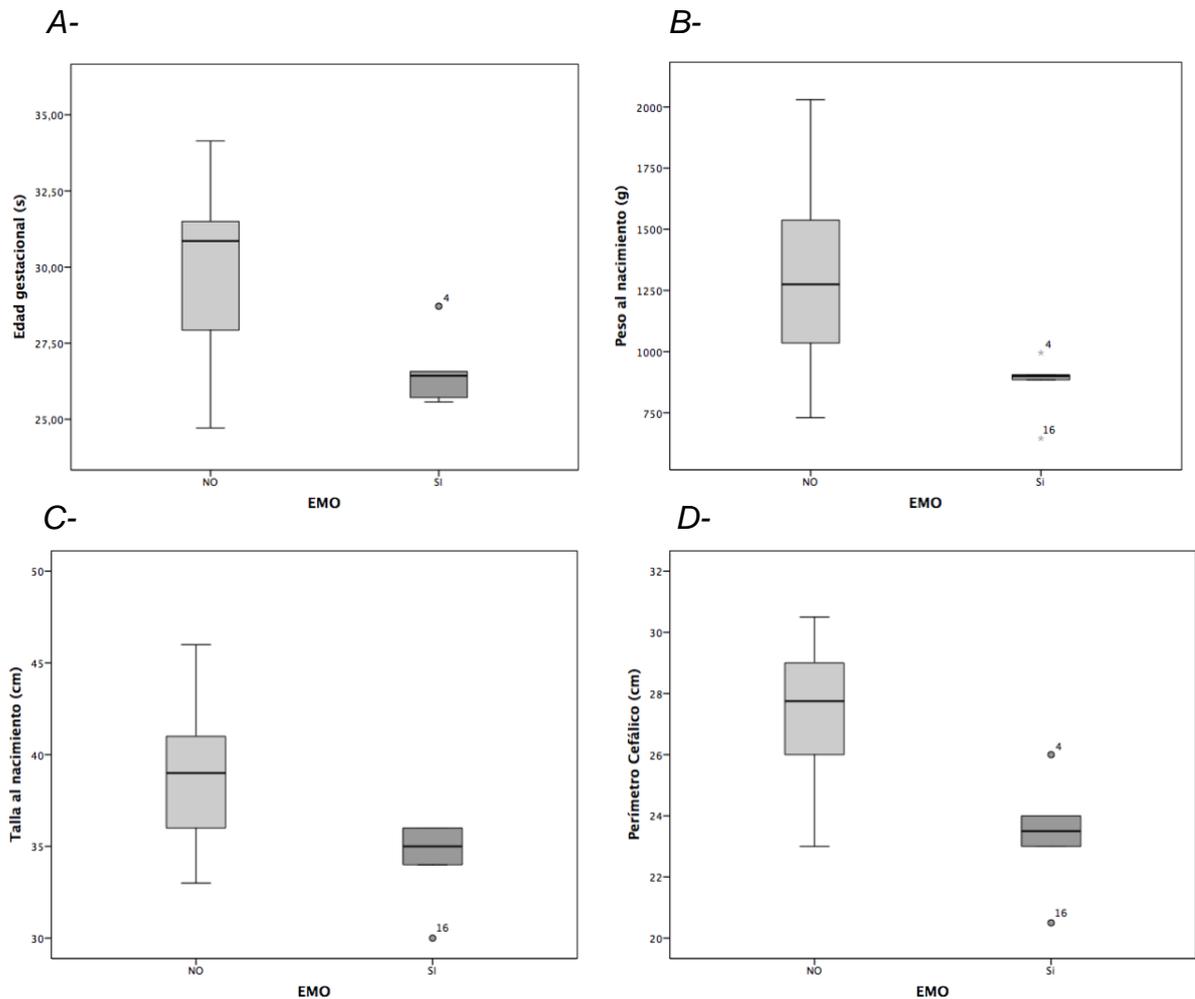
Tabla 8. Medidas de los núcleos de osificación y grosor del cartílago de crecimiento en las epífisis femoral distal (EFD) y tibial proximal (ETP).

| | Observador 1, mediana (RIQ) | Observador 2, mediana (RIQ) |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Núcleo EFD | | |
| - Diámetro longitudinal | 0,3 cm (0,22-0,32) | 0,29 cm (0,23-0,33) |
| - Diámetro transversal | 0,37 cm (0,33-0,46) | 0,39 cm (0,34-0,48) |
| Cartílago EFD | | |
| - Grosor longitudinal | 0,47 cm (0,38-0,51) | 0,43 cm (0,4-0,49) |
| - Grosor transversal | 0,43 cm (0,39-0,48) | 0,4 cm (0,37-0,48) |
| Núcleo ETP | | |
| - Diámetro longitudinal | 0,37 cm (0,24-0,44) | 0,35 cm (0,25-0,42) |
| - Diámetro transversal | 0,55 cm (0,41-0,59) | 0,56 cm (0,43-0,59) |
| Cartílago ETP | | |
| - Grosor longitudinal | 0,49 cm (0,40-0,59) | 0,48 cm (0,44-0,53) |
| - Grosor transversal | 0,43 cm (0,38-0,49) | 0,44 cm (0,39-0,51) |

4.5. Factores clínicos asociados con EMO

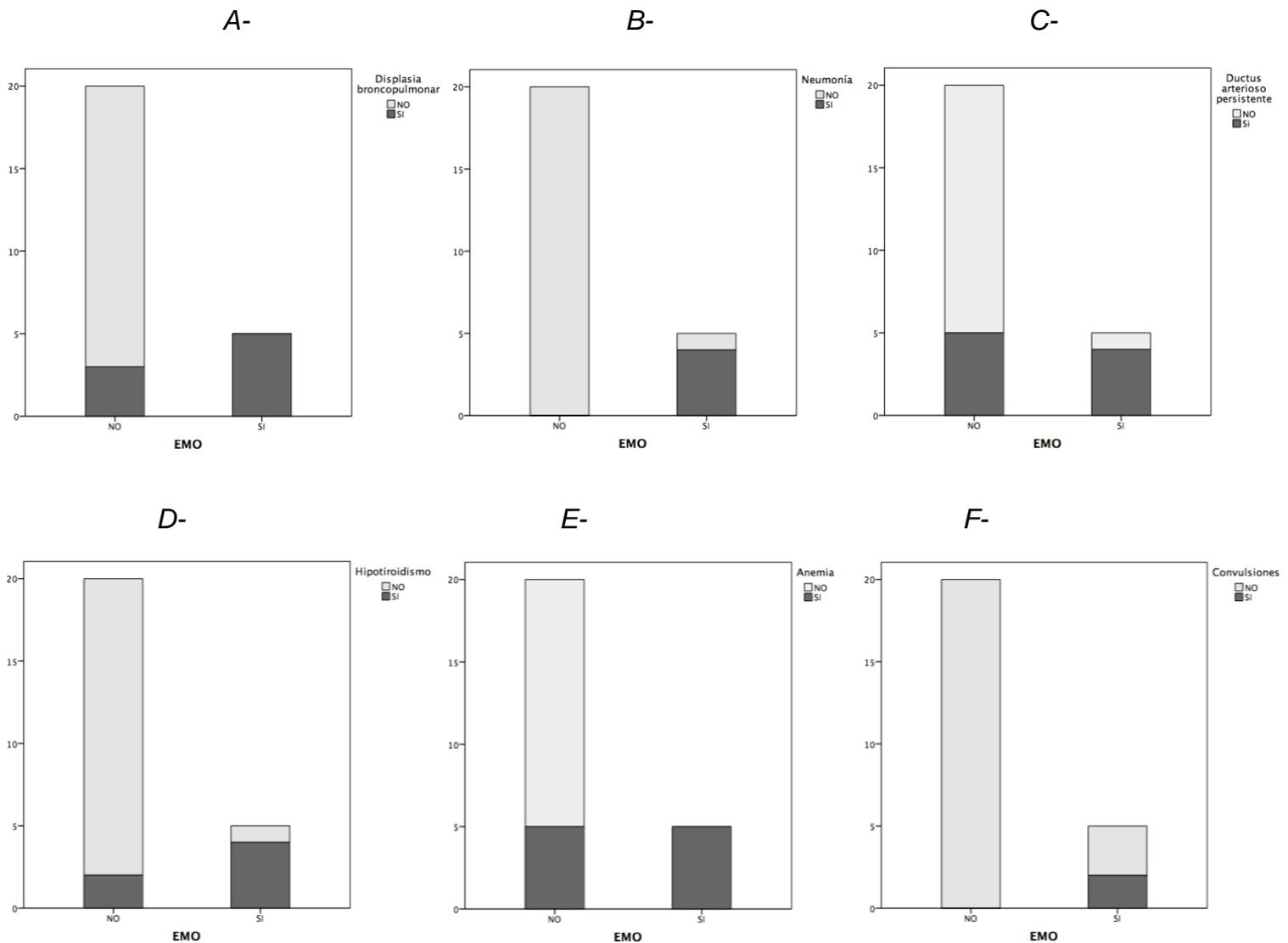
La edad gestacional y el peso al nacimiento se asociaron de forma estadísticamente significativa con la presencia de EMO. Los pacientes afectados presentaron una edad gestacional más baja y un peso al nacimiento menor en comparación con los no afectados (26,4 vs 30,85 semanas y 900 vs 1275 gramos, respectivamente, $p = 0,021$). Además mostraron valores absolutos más bajos de talla y perímetro cefálico (figura 13). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los percentiles de peso, talla ni perímetro craneal.

Figura 13. Diagrama de caja mostrando la distribución de la edad gestacional (A), el peso al nacimiento (B), la talla al nacimiento (C) y el perímetro craneal (D) en los pacientes sanos y los que desarrollan EMO.



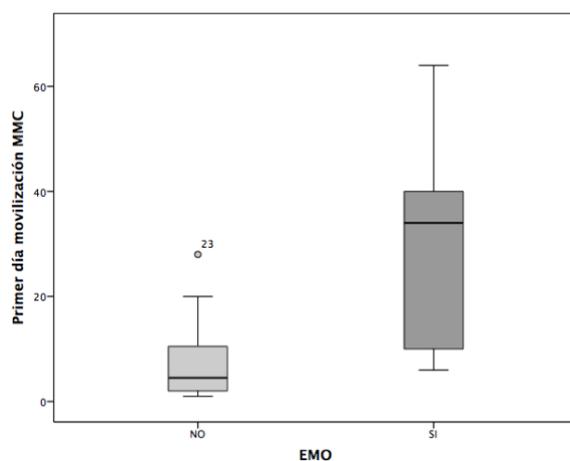
Las patologías que mostraron una asociación estadísticamente significativa con la enfermedad metabólica ósea fueron la displasia broncopulmonar (100 vs 15%, $p < 0,001$), la neumonía (80 vs 0%, $p < 0,001$), el ductus arterioso persistente (80 vs 25%, 0,04), el hipotiroidismo (80 vs 10%, $p < 0,005$), la anemia (100 vs 20%, $p < 0,005$) y las convulsiones neonatales (40 vs 0%, $p < 0,033$) (Figura 14).

Figura 14. Gráfico de sectores mostrando la distribución de displasia broncopulmonar (A), neumonía (B), ductus arterioso persistente (C), hipotiroidismo (D), anemia (E), convulsiones (F) en los pacientes sanos y en los que desarrollan enfermedad metabólica ósea (EMO).



También se encontró una asociación entre la EMO y el retraso en el inicio de la movilización con método madre canguro, con una mediana de 34 días en pacientes con EMO vs 4,5 días en aquellos no afectados (p 0,008), figura 15.

Figura 15. Diagrama de caja mostrando la distribución del primer día de inicio de la movilización con método madre canguro (MMC), en los pacientes sanos y en los que desarrollan enfermedad metabólica ósea (EMO).



El tratamiento farmacológico a las 3-4 semanas de vida con hidroclorotiazida, espironolactona, fenobarbital, levetiracetam, opioides, meropenem, vancomicina y fluconazol también mostró una asociación estadísticamente significativa con la enfermedad metabólica ósea de la prematuridad.

Todos estos datos se pueden consultar en la tabla 9.

Tabla 9. Factores clínicos asociados con enfermedad metabólica ósea de la prematuridad.

| | Todos (25) | EMO (5) | No EMO (20) | p |
|------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|------------------|
| Edad gestacional (s) | 30 (26,6-31,2) | 26,4 (25,6-27,64) | 30,85 (27,89-31,54) | 0,021 |
| Sexo femenino | 15 (60) | 4 (80) | 11(55) | 0,615 |
| Antropometría al nacimiento | | | | |
| -Peso (g) | 1180 (900-1445) | 900 (765-950) | 1275 (987,5-1568,75) | 0,021 |
| -Percentil peso | 54,12 (21,63-70,98) | 56,1 (26,18-70,32) | 52,66 (11,95-71,06) | 0,587 |
| -Talla (cm) | 38 (35,5-40,5) | 35 (32-36) | 39 (36-41) | 0,017 |
| -Percentil talla | 30,92 (17,24-63,09) | 34,26 (13,17-66,64) | 31,13 (16,95-62,22) | 0,838 |
| -Perímetro cefálico (cm) | 27 (24-28,75) | 23,5 (21,75-25) | 27,75 (25,75-29,5) | 0,005 |
| -Percentil perímetro cefálico | 37.5 (11,72-69) | 37,5 (10,87-45,08) | 42,67 (11,49-76,48) | 0,341 |
| Diagnósticos | | | | |
| -Apnea de la prematuridad | 20 (80) | 5 (100) | 15 (75) | 0,544 |
| -Membrana hialina | 17 (68) | 5 (100) | 12 (60) | 0,14 |
| -Displasia broncopulmonar | 8 (32) | 5 (100) | 3 (15) | 0,001 |
| -Neumotórax | 1 (4) | 0 | 1 (5) | 1 |
| -Ductus arterioso persistente | 9 (36) | 4 (80) | 5 (25) | 0,04 |
| -Comunicación interauricular | 1 (4) | 1 (100) | 0 | 0,2 |
| -Canal auriculoventricular | 1 (4) | 0 | 1 (5) | 1 |
| -Hipoglucemia precoz | 14 (56) | 1 (20) | 13 (65) | 0,133 |
| -Hipotiroidismo | 6 (24) | 4 (80) | 2 (10) | 0,005 |
| -Anemia | 10 (40) | 5 (100) | 5 (25) | 0,005 |
| -Trombocitopenia | 2 (8) | 0 | 2 (10) | 1 |
| -Reacción leucoeritroblástica | 2 (8) | 1 (20) | 1 (5) | 0,367 |
| -Ictericia de la prematuridad | 13 (52) | 3 (60) | 10 (50) | 1 |
| -Colestasis neonatal | 2 (8) | 1 (20) | 1 (5) | 0,367 |
| -Hemorragia intraventricular | 5 (20) | 2 (40) | 3 (15) | 0,252 |
| -Convulsiones | 2 (8) | 2 (40) | 0 | 0,033 |
| -Enterocolitis necrotizante | 2 (8) | 1 (20) | 1 (5) | 0,367 |
| -Sepsis | 5 (20) | 2 (40) | 3 (15) | 0,252 |
| -Neumonía | 4 (16) | 4 (80) | 0 | <0,001 |
| -Meningitis | 1 (4) | 1 (20) | 0 | 0,2 |
| -Peritonitis | 1 (4) | 0 | 1 (5) | 1 |
| -Infecciones víricas | 3 (12) | 0 | 3 (15) | 1 |
| -Cirugía | 2 (8%) | 1 (20) | 1 (5) | 0,367 |
| Primera movilización en canguro(d) | 5 (2,5-13-5) | 34 (8-52) | 4,5 (2-11,25) | 0,008 |
| Tratamiento farmacológico | 17 (80) | 5 (100) | 12 (60) | 0,14 |
| -Cafeína | 15 (60) | 5 (100) | 10 (50) | 0,061 |
| -Levotiroxina | 4(16) | 2 (40) | 2 (10) | 0,166 |
| -Hierro | 3 (12) | 0 | 3 (15) | 1 |
| -Furosemina | 1 (4) | 1 (20) | 0 | 0,2 |
| -Hidroclorotiazida | 2 (8) | 2 (40) | 0 | 0,033 |
| -Espironolactona | 2 (8) | 2 (40) | 0 | 0,033 |
| -Fenobarbital | 2 (8) | 2 (40) | 0 | 0,033 |
| -Levetiracetam | 2(8) | 2 (40) | 0 | 0,033 |
| -Opiáceos | 3 (12) | 3 (60) | 0 | 0,004 |
| -Cisatracurio | 1 (4) | 1 (20) | 0 | 0,2 |
| -Dopamina | 1 (4) | 1 (20) | 0 | 0,2 |
| -Dexametasona | 1 (4) | 1 (20) | 0 | 0,2 |
| -Ibuprofeno | 1 (4) | 0 | 1 (5) | 1 |
| -Fluconazol | 3 (12) | 3 (60) | 0 | 0,004 |
| -Meropenem | 2 (8) | 2 (40) | 0 | 0,033 |
| -Cefotaxima | 2 (8) | 1 (20) | 1 (5) | 0,367 |
| -Vancomicina | 2 (8) | 2 (40) | 0 | 0,033 |
| -Gentamicina | 1 (4) | 1 (20) | 0 | 0,2 |
| -Clindamicina | 1 (4) | 0 | 1 (5) | 1 |
| -Ampicilina | 1 (4) | 0 | 1 (5) | 1 |

EMO: Enfermedad metabólica ósea de la prematuridad. Las variables se expresan como n (%) o mediana (RIQ).

4.5.1. FACTORES NUTRICIONALES

Además de presentar un menor peso al nacimiento, los pacientes con EMO mostraron una menor ganancia de peso durante el primer y segundo mes de vida (Figuras 16 y 17 y tabla 10). Sin embargo, la pérdida máxima de peso fue variable en ambos grupos y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (tabla 10).

Observamos que los pacientes con EMO recibieron nutrición parenteral durante una mediana de 15 días en el primer mes de vida, en comparación con los 8 días de los pacientes no afectados, resultando estas diferencias estadísticamente significativas (p 0,007). Además, los pacientes con EMO experimentaron más días con nutrición parenteral exclusiva (a dieta absoluta), más días con nutrición parenteral durante el segundo mes de vida y más días con alimentación por sonda enteral (figura 18, tabla 10).

El tipo de dieta enteral (leche humana fortificada o fórmula específica para prematuros) no mostró asociación con la EMO. Sin embargo, observamos un mayor retraso en el inicio del fortificante de leche materna en pacientes con EMO, con una mediana de 12 días en comparación con 7 días en los pacientes no afectados (p 0,028). No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la ingesta diaria de líquidos, calorías, proteínas, calcio y fósforo y el desarrollo de EMO. Tampoco se encontró asociación con la ingesta de vitamina D ni con el día de inicio de la suplementación vitamínica.

Todos los datos se encuentran disponibles en la tabla 10.

Figura 16. Diagrama de caja mostrando la ganancia de peso semanal en el primer mes (A) y en el segundo mes (B); en los pacientes sanos y los que desarrollan enfermedad metabólica ósea (EMO)

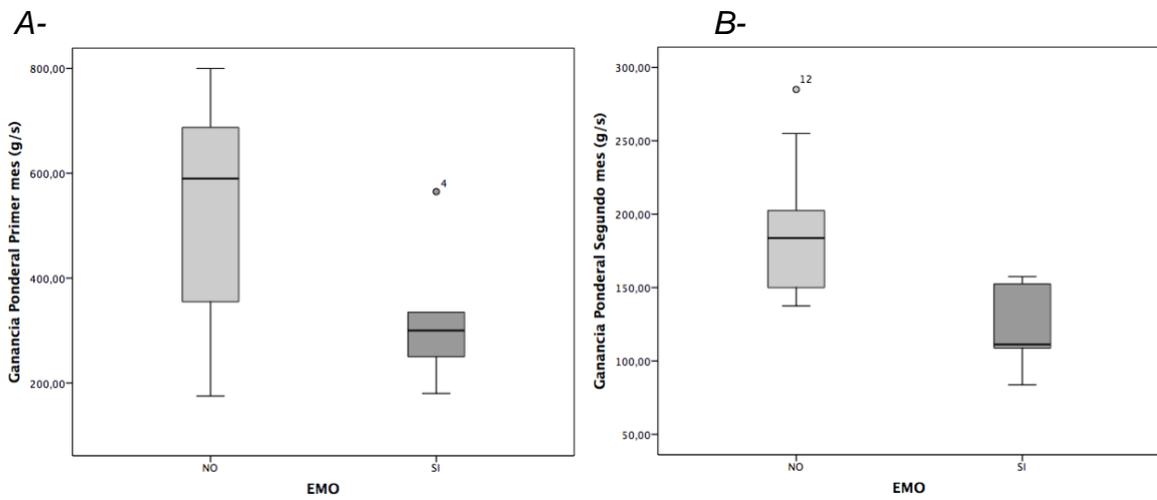
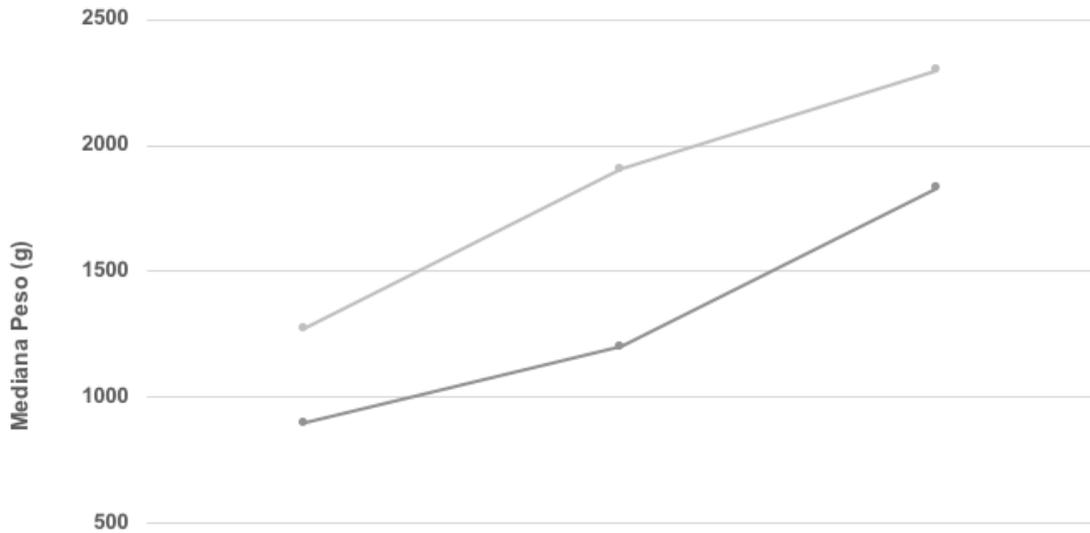


Figura 17. Gráfico de líneas mostrando las medianas de peso al nacimiento, peso en el primer mes y peso en el segundo mes; en los pacientes sanos y los que desarrollan enfermedad metabólica ósea (EMO)

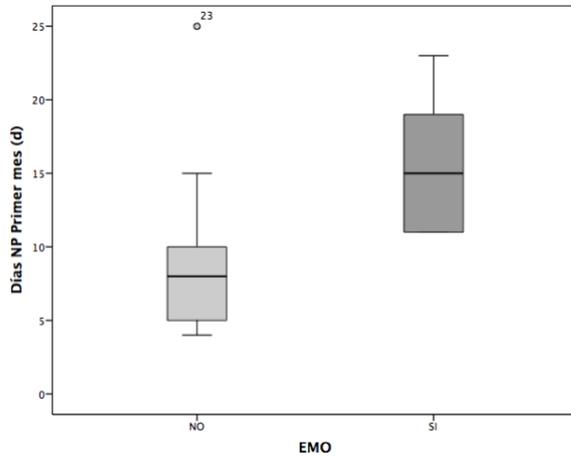


| | Peso Nacimiento | Peso 1er mes | Peso 2º mes |
|--------|-----------------|--------------|-------------|
| EMO | 900 | 1200 | 1830 |
| NO EMO | 1275 | 1905 | 2300 |

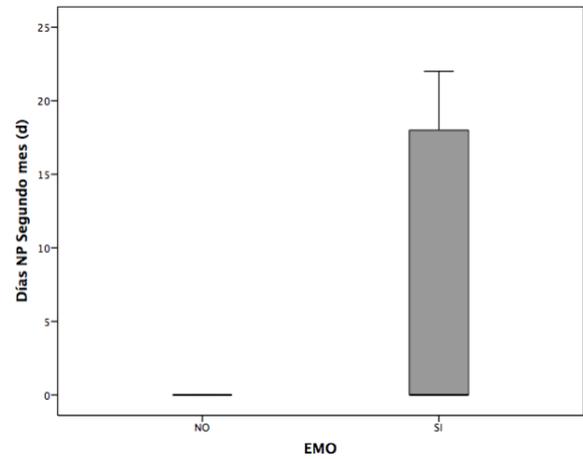
p 0.021 p 0.021 p 0.072

Figura 18. Diagrama de caja mostrando los días de nutrición parenteral en el primer mes (A), los días de nutrición parenteral en el segundo mes (B), los días con nutrición parenteral exclusiva (C), los días totales con alimentación por sonda enteral (D); en los pacientes sanos y los que desarrollan enfermedad metabólica ósea (EMO).

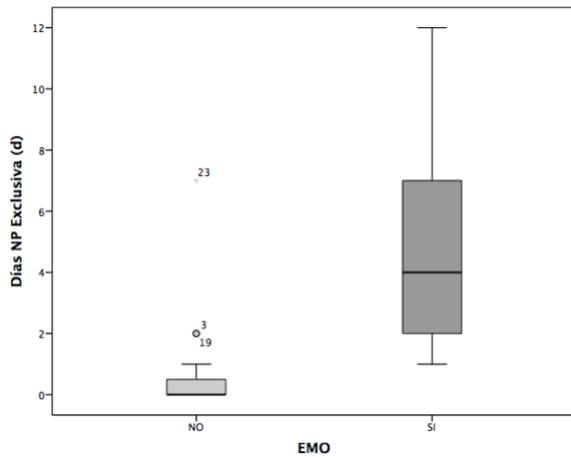
A-



B-



C-



D-

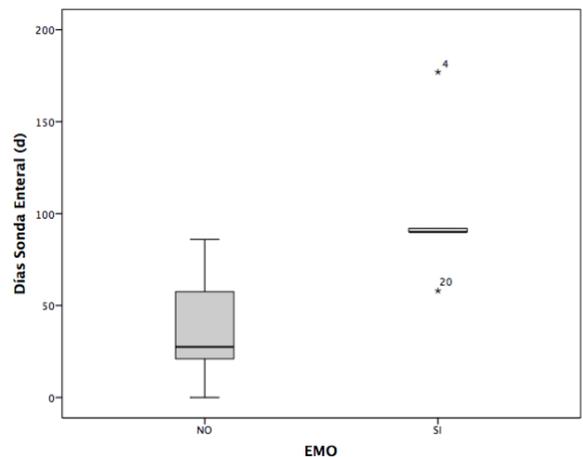


Tabla 10. Factores nutricionales asociados con enfermedad metabólica ósea de la prematuridad.

| | Todos (25) | EMO (5) | No EMO (20) | p |
|--|------------------------|---------------------|------------------------|--------------|
| % Pérdida máxima de peso | 9,9 (4,8-14,5) | 14,4 (0,5-14,8) | 9,2 (4,95-14,48) | 0,892 |
| Peso 1er mes (g) | 1775 (1220-2100) | 1200 (980-1400) | 1905 (1387,5-2147,5) | 0,021 |
| Ganancia peso diario 1er mes (g/d) | 29,28 (16,78-36,07) | 17,85 (10,71-25,71) | 30,35 (21,43-41,24) | 0,035 |
| Ganancia peso semanal 1er mes (g/s) | 127,5 (68,75-170,63) | 75 (53,75-123,75) | 147,5 (85,62-172,5) | 0,103 |
| Días con NP exclusiva 1er mes (d) | 0 (0-2) | 4 (1,5-9,5) | 0 (0-0,75) | 0,001 |
| Días con NP 1er mes (d) | 9 (5,5-12,5) | 15 (11-21) | 8 (5-10) | 0,007 |
| Primer día NE (d) | 1 (1-1) | 1 (1-3,5) | 1 (1-1) | 0,088 |
| Primer día fortificación LM (d) | 9 (6-13) | 12 (9,5-22) | 7 (6-11,5) | 0,028 |
| Tipo de nutrición 1er mes | | | | |
| -Nutrición enteral (%) | 25 (100) | 5 (100) | 20 (100) | 1 |
| -LM fortificada (%) | 21 (84) | 5 (100) | 16 (80) | 0,549 |
| -Fórmula prematuros (%) | 6 (24) | 0 (0) | 6 (30) | 0,289 |
| -Adición de MCTs (%) | 9 (36) | 3 (60) | 6 (30) | 0,312 |
| -Nutrición parenteral (%) | 1 (4) | 1 (20) | 0 | 0,2 |
| Ingestas 1er mes | | | | |
| - Líquidos (ml/kg/d) | 160 (149-168) | 147 (145-150) | 164,5 (157,5-168) | 0,095 |
| - Calorías (kcal/kg/d) | 130,8 (125,6-140,4) | 139,7 (122,5-139,9) | 130,7 (126,3-142,2) | 0,734 |
| - Proteínas (g/kg/d) | 3,7 (3,5-4,5) | 3,6 (IQR 3,6-4,3) | 3,8 (3,4-4,5) | 0,709 |
| - Calcio (mg/kg/d) | 146 (134,3-183,3) | 146 (141,9-176,5) | 150,5 (134,1-185,5) | 0,892 |
| - Fósforo (mg/kg/d) | 83,6 (72,4-100,4) | 87 (76-93,8) | 82,3 (71,7-100,6) | 0,812 |
| - Vitamina D (UI/d) | 600 (600-700) | 800 (500-835) | 600 (600-600) | 0,173 |
| Peso 2º mes (g) | 1927,5 (1557,5-2377,5) | 1830 (1265-1927,5) | 2300 (1585-2715) | 0,072 |
| Ganancia peso semanal 2º mes (g/s) | 155 (130,94-198,75) | 111,25 (96,25-155) | 183,75 (149,38-228,75) | 0,028 |
| Días con NP 2º mes (d) | 0 (0-0) | 0 (0-20) | 0 (0-0) | 0,004 |
| Días totales con nutrición por sonda (d) | 42 (21-74,5) | 90 (74-134,5) | 27,5 (21-58,75) | 0,002 |

EMO: enfermedad metabólica ósea de la prematuridad; NP: Nutrición parenteral; NE: nutrición enteral; LM: leche materna; MCTs: triglicéridos de cadena media. Las variables se expresan como n (%) o mediana (RIQ).

4.6. Variables bioquímicas relacionadas con EMO

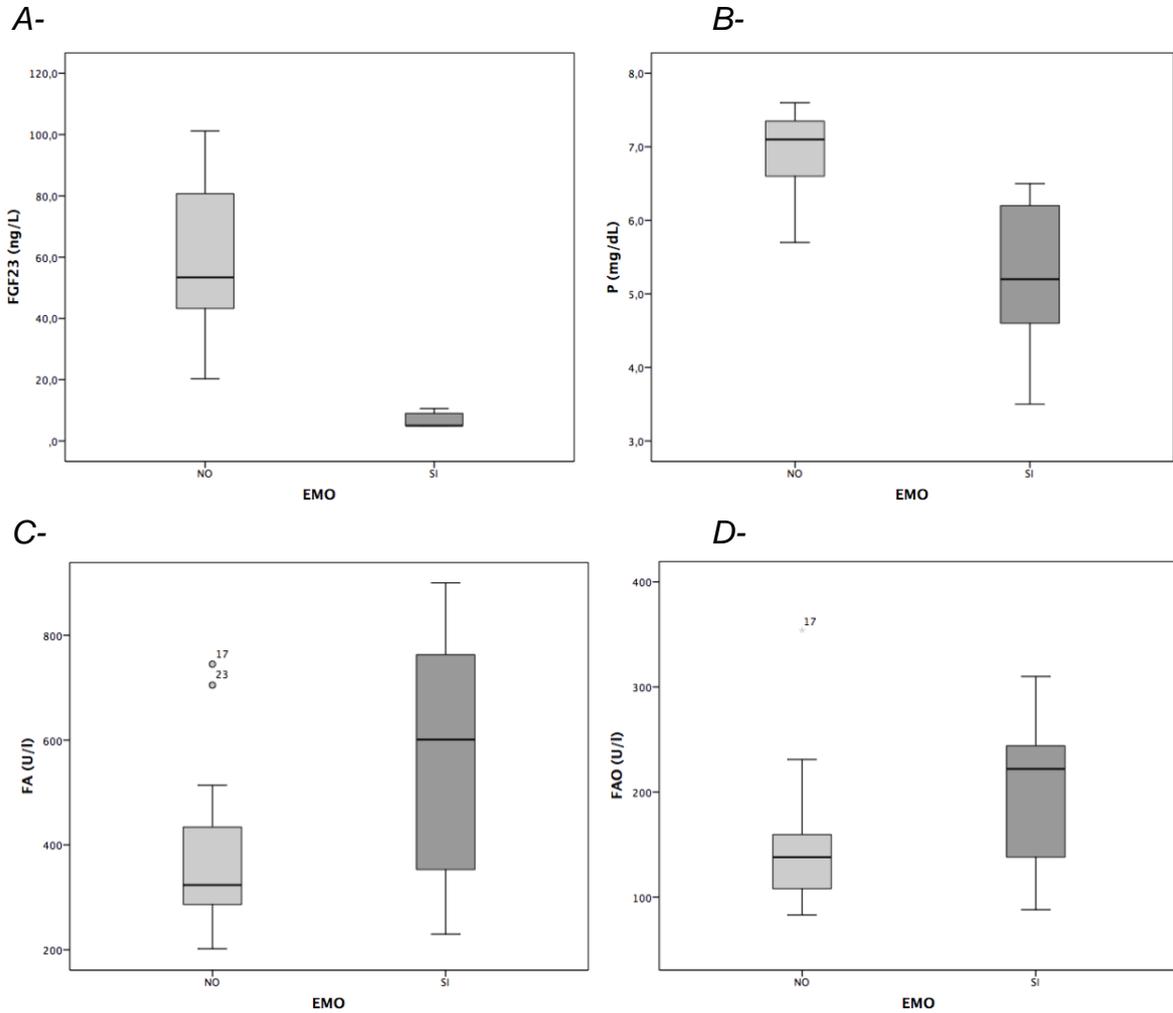
En el momento del screening bioquímico realizado a las 3-4 semanas de vida, las variables que mostraron una asociación estadísticamente significativa con la presencia de EMO fueron los niveles séricos de fosforo y de FGF-23. Los pacientes con EMO presentaron niveles más bajos de fosforo y FGF23 en comparación con los pacientes no afectados. Además, se observaron niveles urinarios más altos de Ca/Cr en los pacientes con EMO. Aunque los niveles de fosfatasa alcalina (FA) sérica y FA ósea fueron mayores en el grupo de pacientes con EMO, estas diferencias no alcanzaron la significación estadística (tabla 11 y figura 19). Los niveles de hormona paratiroidea (PTH) fueron similares en ambos grupos, y ninguno de los 3 pacientes con PTH > 88 pg/mL fue diagnosticado con enfermedad metabólica ósea.

Tabla 11. Factores bioquímicos relacionados con EMO.

| | Todos (25) | EMO (5) | No EMO (20) | p |
|------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|--------------|
| Fosforo (mg/dL) | 6,9 (6.2-7,3) | 5,2 (4,05-6,35) | 7,1 (6,6-7,37) | 0,003 |
| Calcio (mg/dL) | 9,6 (9,450-10) | 9,6 (9,25-10,05) | 9,65 (9,42-9,97) | 0,918 |
| FA (IU/L) | 333 (286,5-485) | 601 (291,5-831,5) | 323,5 (276,75-437,5) | 0,118 |
| FAO (IU/L) | 139 (106-186) | 222 (113-277) | 138 (104-163) | 0,213 |
| Creatinina (mg/dL) | 0,34 (0,27-0,38) | 0,38 (0,23-0,615) | 0,34 (0,28-0,38) | 0,495 |
| Cistatina C (mg/L) | 1,43 (1,31-1,56) | 1,4 (1,17-1,81) | 1,44 (1,3-1,57) | 0,709 |
| FGF23 (ng/L) | 45,9 (13,02-76,77) | 5 (5-9,8) | 53,4 (42-84,3) | 0,001 |
| PTH (pg/mL) | 58 (32,25-75,25) | 43 (22,5-66) | 61 (39-78) | 0,155 |
| 25-OH-Vit D (ng/mL) | 27 (20,5-33) | 33 (27,5-42) | 25 (20-32,75) | 0,083 |
| 1-25-2OH-Vit D (pg/mL) | 102 (81-141) | 97 (48,5-176,5) | 106,5 (87,75-135,75) | 0,941 |
| uP/uCr (mg/mg) | 1,78 (0,51-2,59) | 0,9 (0,37-1,62) | 1,91 (0,62-2,72) | 0,185 |
| TRP (%) | 92 (86,77-97,69) | 92,34 (81,5-98,9) | 91,29 (86,63-97,15) | 0,786 |
| uCa/uCr (mg/mg) | 0,6 (0,31-0,79) | 0,8 (0,59-1,44) | 0,57 (0,21-0,75) | 0,049 |

EMO: Enfermedad metabólica ósea de la prematuridad; FA: fosfatasa alcalina; FAO: fosfatasa alcalina ósea; FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; PTH: paratormona; 25-OH-Vit D: 25-hydroxycholecalciferol; 1-25-2OH-Vit D: 1,25-dihydroxycholecalciferol; uP: fosforo en orina; uCr: creatinina en orina; TRP: Reabsorción tubular de fosforo; uCa: calcio en orina;

Figura 19. A- Diagrama de caja mostrando la distribución de FGF23 según la presencia de EMO. B- Diagrama de caja mostrando la distribución de fosforo según la presencia de EMO. C- Diagrama de caja mostrando la distribución de FA según la presencia de EMO. D- Diagrama de caja mostrando la distribución de FAO según la presencia de EMO.



EMO: Enfermedad metabólica ósea de la prematuridad; FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; P: Fosforo; FA: fosfatasa alcalina; FAO: fosfatasa alcalina ósea.

Los niveles séricos de fósforo y de FGF23, que resultaron significativamente inferiores en el grupo EMO, mostraron asociación significativa en el análisis univariante de regresión logística (tabla 12). Por el contrario, no se mantuvo la significación estadística en el análisis multivariante (tabla 13).

Tabla 12. Análisis univariante de los factores bioquímicos relacionados con EMO.

| | OR (IC 95%) | p |
|------------------------|-----------------------|--------------|
| Fosforo (mg/dL) | 0,064 (0,005-0,8) | 0,033 |
| Calcio (mg/dL) | 0,7 (0,07-7,14) | 0,782 |
| FA (IU/L) | 1,01 (1-1,02) | 0,057 |
| FAO (IU/L) | 1,01 (0,99-1,02) | 0,154 |
| Creatinina (mg/dL) | 897,9 (0,08-10227862) | 0,154 |
| Cistatina C (mg/L) | 1,32 (0,91-1,90) | 0,138 |
| FGF23 (ng/L) | 0,885 (0,79-0,99) | 0,037 |
| PTH (pg/mL) | 0,97 (0,92-1,01) | 0,187 |
| 25-OH-Vit D (ng/mL) | 1,1 (0,9-1,20) | 0,112 |
| 1-25-2OH-Vit D (pg/mL) | 1,1 (0,97-1,03) | 0,925 |
| uP/uCr (mg/mg) | 0,45 (0,15-1,37) | 0,161 |
| TRP (%) | 0,98 (0,86-1,14) | 0,867 |
| uCa/uCr (mg/mg) | 53,4 (1,10-2580) | 0,044 |

OR: Odds Ratio; EMO: Enfermedad metabólica ósea de la prematuridad; FA: fosfatasa alcalina; FAO: fosfatasa alcalina ósea; FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; PTH: paratormona; 25-OH-Vit D: 25-hydroxycholecalciferol; 1-25-2OH-Vit D: 1,25-dihydroxycholecalciferol; uP: fosforo en orina; uCr: creatinina en orina; TRP: Reabsorción tubular de fosforo; uCa: calcio en orina.

Tabla 13. Análisis multivariante de los factores relacionados con EMO.

| | OR (IC 95%) | p |
|------------------|----------------------|-------|
| Sexo | 0,055 (0,00-90,734) | 0,444 |
| Edad gestacional | 1,778 (0,393-8,052) | 0,455 |
| Fosforo (mg/dL) | 0,298 (0,003-30,549) | 0,608 |
| FA (IU/L) | 1,01 (0,987-1,035) | 0,366 |
| FGF23 (ng/L) | 0,911 (0,766-1,084) | 0,294 |

OR: Odds Ratio; EMO: Enfermedad metabólica ósea de la prematuridad; FA: fosfatasa alcalina; FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23.

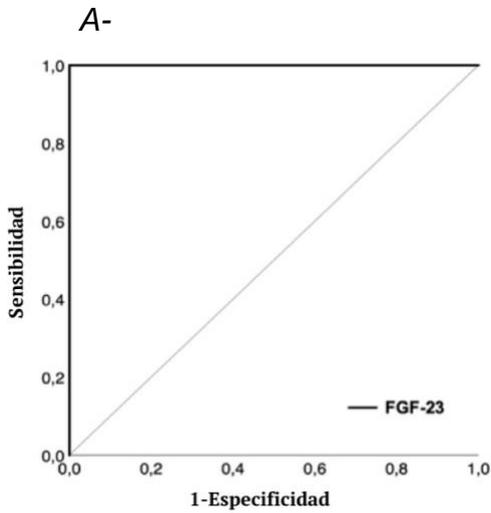
Cuando se comparan los distintos parámetros bioquímicos (Figura 20), se observa que a las 3-4 semanas de vida, FGF23 es superior a los parámetros habituales (FA y fósforo) estableciendo el riesgo de EMO: AUC para FGF23 1 (IC 95% 0,83-1), AUC para *fósforo* 0,93 (IC 95% 0,73-0,99) y AUC para fosfatasa alcalina de 0,73 (IC 95% 0,51-0,88).

El punto de corte óptimo para el FGF23 en el diagnóstico de EMO se establece en 15,45ng/L, con una sensibilidad del 100% (IC 95% 56,55-100) y una especificidad del 100% y (IC 95% 79,61-100).

Por otro lado, el punto de corte para el fósforo de 4 mg/dl presenta una especificidad del 100% pero una sensibilidad del 20%, aumentando al 60% cuando se utiliza el punto de corte de 5,6 mg/dl (manteniendo la especificidad).

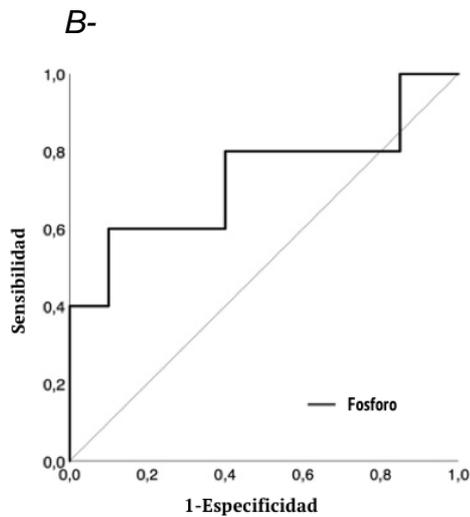
En cuanto a los valores de FA, el punto de corte de 500 UI/L presenta una sensibilidad del 60% y una especificidad del 90%, mientras que el punto de corte de 750 UI/L presenta una especificidad del 100% pero la sensibilidad disminuye al 20%.

Figura 20. A- Análisis de la curva ROC de FGF23 para predecir la EMO. B- Análisis de la curva ROC de fosforo para predecir la EMO. C- Análisis de la curva ROC de FA para predecir la EMO. D- Análisis de la curva ROC de FAO para predecir la EMO.



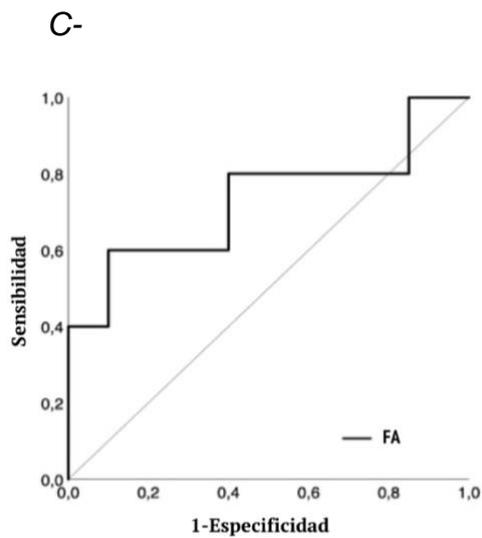
*Área bajo la curva FGF23: 1 (IC 95% 0,83-1)

| Punto de corte | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) | Punto de corte | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) |
|----------------|------------------|-------------------|----------------|------------------|-------------------|
| 7 | 60 | 100 | 50,5 | 100 | 53,3 |
| 9,8 | 80 | 100 | 62,2 | 100 | 46,7 |
| 15,45 | 100 | 100 | 73,4 | 100 | 40 |
| 21,6 | 100 | 93,3 | 76,45 | 100 | 33,3 |
| 31 | 100 | 86,7 | 80,7 | 100 | 26,7 |
| 40,55 | 100 | 80 | 87,6 | 100 | 20 |
| 43,25 | 100 | 73,3 | 91,4 | 100 | 13,3 |
| 45,9 | 100 | 66,7 | 96,55 | 100 | 6,7 |
| 47,45 | 100 | 60 | | | |



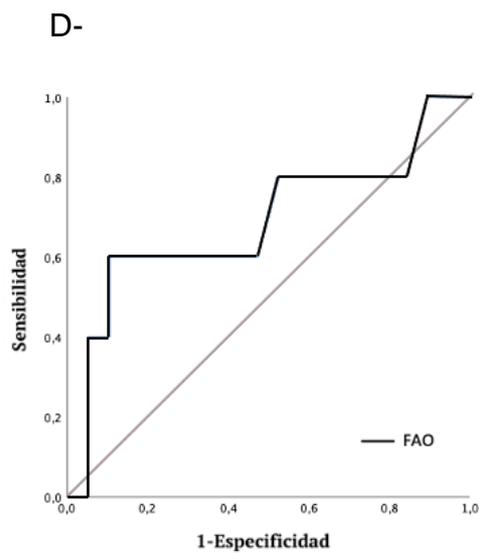
*Área bajo la curva Fosforo: 0,93 (IC 95% 0,73-0,99)

| Punto de corte | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) | Punto de corte | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) |
|----------------|------------------|-------------------|----------------|------------------|-------------------|
| 4,05 | 20 | 100 | 6,65 | 100 | 70 |
| 4,9 | 40 | 100 | 6,8 | 100 | 65 |
| 5,45 | 60 | 100 | 6,95 | 100 | 55 |
| 5,85 | 60 | 95 | 7,1 | 100 | 50 |
| 6,1 | 60 | 90 | 7,25 | 100 | 40 |
| 6,3 | 80 | 85 | 7,35 | 100 | 25 |
| 6,45 | 80 | 80 | 7,5 | 100 | 20 |
| 6,55 | 100 | 80 | | | |



*Área bajo la curva FA: 0,73 (IC 95% 0,51-0,88)

| Punto de corte | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) | Punto de corte | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) |
|----------------|------------------|-------------------|----------------|------------------|-------------------|
| 204 | 100 | 5 | 343 | 80 | 60 |
| 210,5 | 100 | 10 | 361 | 60 | 60 |
| 222,5 | 100 | 15 | 371 | 60 | 65 |
| 245 | 80 | 15 | 400 | 60 | 70 |
| 263,5 | 80 | 20 | 434 | 60 | 75 |
| 286,5 | 80 | 25 | 448,5 | 60 | 80 |
| 306,5 | 80 | 30 | 485 | 60 | 85 |
| 307,5 | 80 | 35 | 557,5 | 60 | 90 |
| 310 | 80 | 40 | 653 | 40 | 90 |
| 313,5 | 80 | 45 | 725 | 40 | 95 |
| 323,5 | 80 | 50 | 754 | 40 | 100 |
| 332,5 | 80 | 55 | 831,5 | 20 | 100 |



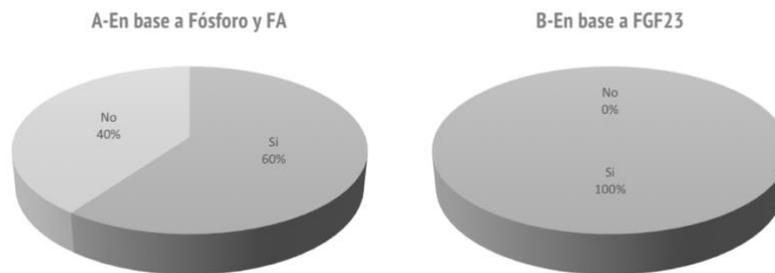
*Área bajo la curva FA-O: 0,68 (IC 95% 0,46-0,86)

| Punto de corte | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) | Punto de corte | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) |
|----------------|------------------|-------------------|----------------|------------------|-------------------|
| 85 | 100 | 5,3 | 147 | 60 | 63,2 |
| 87,5 | 100 | 10,5 | 155 | 60 | 68,4 |
| 93,5 | 80 | 15,8 | 159,5 | 60 | 73,7 |
| 101,5 | 80 | 21,1 | 174,5 | 60 | 78,9 |
| 108 | 80 | 26,3 | 204 | 60 | 89,5 |
| 116 | 80 | 31,6 | 226,5 | 40 | 89,5 |
| 123,5 | 80 | 36,8 | 237,5 | 40 | 94,7 |
| 128 | 80 | 42,1 | 277 | 20 | 94,7 |
| 133,5 | 80 | 47,4 | 332 | 0 | 94,7 |
| 139 | 60 | 52,6 | | | |

FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; FA: fosfatasa alcalina; EMO: Enfermedad metabólica ósea de la prematuridad. S: Sensibilidad. E: Especificidad.

Según los resultados obtenidos, en nuestra cohorte de pacientes prematuros a las 3-4 semanas de vida, solo el 60% de los pacientes fueron clasificados inicialmente como de alto riesgo de EMO utilizando los parámetros bioquímicos habituales ($P < 4$ mg/dl y/o $ALP > 750$ UI/L), mientras que el resto fueron diagnosticados en controles posteriores durante el seguimiento. Sin embargo, al utilizar los niveles de FGF23 y el punto de corte de 15,45ng/L, todos los 5 pacientes (100%) podrían haber sido clasificados como de alto riesgo desde las 3-4 semanas de vida, lo que hubiera permitido anticipar cambios en el tratamiento (Figura 21).

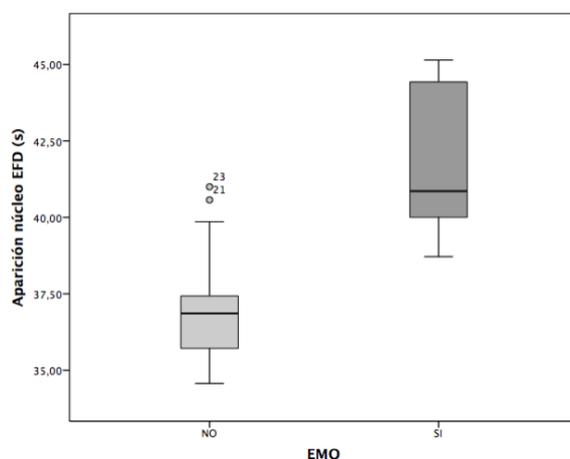
Figura 21. A-Diagrama de sectores del uso de la combinación de Fósforo < 4 mg/dl y/o FA > 750 IU/L a las 3-4 semanas para predecir EMO. B- Diagrama de sectores del uso de FGF23 $< 15,45$ ng/L a las 3-4 semanas para predecir EMO.



4.7. Estudio ecográfico y EMO

Observamos que los 5 pacientes con enfermedad metabólica ósea (100%) presentaron una aparición retardada del núcleo epifisario femoral distal, ocurriendo después de las 38 semanas postmenstruales. Además, la aparición de los núcleos de osificación fue significativamente más tardía en los pacientes con enfermedad metabólica ósea en comparación con los pacientes sanos (40,85 semanas -RIQ 39,36-44,79- vs 36,85 semanas -RIQ 35,64-37,6-; $p < 0,004$) (ver figura 22).

Figura 22. Diagrama de caja mostrando la distribución de la aparición del núcleo de osificación femoral distal (EFD) según la presencia de EMO.



También encontramos una relación entre la edad gestacional y el peso al nacimiento con el retraso en la aparición de los núcleos de osificación. Los pacientes con una osificación retardada tenían una edad gestacional menor y una antropometría al nacimiento más baja en términos de peso, talla y perímetro craneal, aunque no se observaron diferencias significativas al analizar estos parámetros por percentiles.

La osificación retardada también se asoció con otras condiciones médicas como enfermedad de membrana hialina, displasia broncopulmonar, neumonía, ductus

arterioso persistente, hipoglucemia, hipotiroidismo y anemia, varias de las cuales también están relacionadas con la enfermedad metabólica ósea.

Además, se encontró que la movilización mediante método madre canguro también fue más tardía en los pacientes con una aparición retardada de los núcleos de osificación, con un tiempo promedio de 10 días en comparación con 4 días en los pacientes sin retraso (p 0,011).

Asimismo, se observaron diferencias en la evolución ponderal y el uso de nutrición parenteral, en concordancia con los hallazgos previos relacionados con la enfermedad metabólica ósea. Los pacientes con una osificación retardada presentaron un menor peso total y una menor ganancia de peso durante el primer y segundo mes de vida. También recibieron nutrición parenteral durante más días en el primer mes, comenzaron la fortificación de la lactancia materna de manera más tardía y requirieron alimentación mediante sonda enteral durante un periodo más prolongado.

Todos estos factores asociados con la aparición retardada del núcleo epifisario femoral distal se resumen en la tabla 14 y se comparan con los datos del análisis de la enfermedad metabólica ósea, que ya han sido mostrados previamente en las tablas 9 y 10.

Tabla 14. Factores clínicos asociados con aparición retardada de los núcleos de osificación y con EMO.

| | Retardada (9) | Normal (14) | p | Asociación EMO |
|------------------------------------|----------------------|---------------------|------------------|--------------------------|
| Edad gestacional (s) | 26,43 (25,64-28,36) | 31,07 (29,46-32,42) | 0,005 | Sí (p 0,021) |
| Sexo femenino | 4 (44,4) | 5 (35,7) | 1 | No |
| Antropometría al nacimiento | | | | |
| -Peso (g) | 900 (772,5-967,5) | 1410 (1176,25-1600) | 0,009 | Sí (p 0,021) |
| -Percentil peso | 56,1 (25,05-68,76) | 52,66 (7,74-71,87) | 0,6 | No |
| -Talla (cm) | 35 (33-36) | 39,5 (38-41,25) | 0,005 | Sí (p 0,017) |
| -Percentil talla | 34,26 (21,32-66,64) | 31,19 (12,46-62,96) | 0,6 | No |
| -Perímetro cefálico (cm) | 23,7 (23-25) | 28,25 (26,88-29,5) | <0,001 | Sí (p 0,005) |
| -Percentil perímetro cefálico | 37,5 (15,11-47,79) | 56,42 (8,57-83,11) | 0,305 | No |
| Diagnósticos | | | | |
| -EMO | 5 (55,6) | 0 | 0,004 | - |
| -Apnea de la prematuridad | 8 (88,9) | 10 (71,4) | 0,611 | No |
| -Membrana hialina | 9 (100) | 6 (42,9) | 0,007 | No |
| -Displasia broncopulmonar | 7 (77,8) | 1 (7,1) | 0,001 | Sí (p 0,021) |
| -Neumotórax | 0 | 1 (7,1) | 1 | No |
| -Ductus arterioso persistente | 6 (66,7) | 2 (14,3) | 0,023 | Sí (p 0,04) |
| -Comunicación interauricular | 1 (11,1) | 0 | 0,391 | No |
| -Canal auriculoventricular | 1 (11,1) | 0 | 0,391 | No |
| -Hipoglucemia precoz | 2 (22,2) | 12 (85,7) | 0,007 | No |
| -Hipotiroidismo | 6 (100) | 0 | 0,001 | Sí (p 0,005) |
| -Anemia | 8 (88,9) | 2 (14,3) | 0,001 | Sí (p 0,005) |
| -Trombocitopenia | 0 | 2 (14,3) | 0,502 | No |
| -Reacción leucoeritoblástica | 2 (22,2) | 0 | 0,142 | No |
| -Ictericia de la prematuridad | 4 (44,4) | 8 (57,1) | 0,680 | No |
| -Colestasis neonatal | 1 (20) | 1 (5) | 0,367 | No |
| -Hemorragia intraventricular | 3 (33,3) | 2 (14,3) | 0,343 | No |
| -Convulsiones | 2 (22,2) | 0 | 0,142 | Sí (p 0,033) |
| -Enterocolitis necrotizante | 2 (22,2) | 0 | 0,142 | No |
| -Sepsis | 2 (22,2) | 2 (14,3) | 1 | No |
| -Neumonía | 4 (44,4) | 0 | 0,014 | Sí (p < 0,001) |
| -Meningitis | 1 (11,1) | 0 | 0,391 | No |
| -Peritonitis | 1 (11,1) | 0 | 0,391 | No |
| -Infecciones víricas | 0 | 3 (21,4) | 0,253 | No |
| -Cirugía | 2 (22,2) | 0 | 0,142 | No |
| Primera movilización en canguro(d) | 10 (5,5-37) | 4 (1,75-6,75) | 0,011 | Sí (p 0,008) |
| Tratamiento farmacológico | | | | |
| -Cafeína | 8 (88,9) | 6 (42,9) | 0,04 | No |
| -Levotiroxina | 2 (22,2) | 0 | 0,014 | No |
| -Hierro | 0 | 3 (21,4) | 0,253 | No |
| -Furosemida | 1 (11,1) | 0 | 0,391 | No |
| -Hidroclorotiazida | 2 (22,2) | 0 | 0,142 | Sí (p 0,033) |
| -Espironolactona | 2 (22,2) | 0 | 0,142 | Sí (p 0,033) |
| -Fenobarbital | 2 (22,2) | 0 | 0,142 | Sí (p 0,033) |
| -Levetiracetam | 2 (22,2) | 0 | 0,142 | Sí (p 0,033) |
| -Opiáceos | 3 (33,3) | 0 | 0,047 | Sí (p 0,004) |
| -Cisatracurio | 1 (11,1) | 0 | 0,391 | No |
| -Dopamina | 1 (11,1) | 0 | 0,391 | No |
| -Dexametasona | 1 (11,1) | 0 | 0,391 | No |
| -Ibuprofeno | 1 (11,1) | 0 | 0,391 | No |
| -Fluconazol | 3 (33,3) | 0 | 0,047 | Sí (p 0,004) |
| -Meropenem | 2 (22,2) | 0 | 0,142 | Sí (p 0,033) |
| -Cefotaxima | 2 (22,2) | 0 | 0,142 | No |
| -Vancomicina | 2 (22,2) | 0 | 0,142 | Sí (p 0,033) |
| -Gentamicina | 1 (11,1) | 0 | 0,391 | No |
| -Clindamicina | 1 (11,1) | 0 | 0,391 | No |
| -Ampicilina | 1 (11,1) | 0 | 0,391 | No |

| | | | | |
|---|------------------------|---------------------|--------------|---------------------|
| Evolución ponderal | | | | |
| -% Pérdida máxima de peso | 11,9 (1-14,8) | 7,82 (4,85-14,4) | 0,975 | No |
| -Peso 1er mes (g) | 1200 (1010-1470) | 2000 (1683,75-2185) | 0,01 | Sí (p 0,021) |
| -Ganancia peso diario 1er mes (g/d) | 17,85 (12,5-26,43) | 32,14 (26,24-43,39) | 0,038 | Sí (p 0,035) |
| -Peso 2º mes (g) | 1720 (1440-1966,25) | 2550 (1925-2937,5) | 0,04 | No |
| -Ganancia peso semanal 2º mes (g/s) | 143,75 (109,38-156,25) | 197,5 (166,25-270) | 0,019 | Sí (p 0,028) |
| Factores nutricionales | | | | |
| -Días con NP exclusiva 1er mes (d) | 2 (0,5-7) | 0 (0-0) | 0,003 | Sí (p 0,001) |
| -Días con NP 1er mes (d) | 11 (9,5-21) | 6,5 (5-10) | 0,013 | Sí (p 0,007) |
| -Primer día NE (d) | 1 (1-1,5) | 1 (1-1) | 0,406 | No |
| -Primer día fortificación LM (d) | 10 (9-19,5) | 6 (6-9,75) | 0,005 | Sí (p 0,028) |
| -Días con NP 2º mes (d) | 0 (0-9) | 0 (0-0) | 0,071 | Sí (p 0,004) |
| -Días totales con nutrición por sonda (d) | 76 (59-91) | 27,5 (21-58,75) | 0,005 | Sí (p 0,002) |

EMO: enfermedad metabólica ósea de la prematuridad; NP: Nutrición parenteral; NE: nutrición enteral; LM: leche materna. Las variables se expresan como n (%) o mediana (RIQ).

En el análisis de la relación entre la aparición de los núcleos de osificación y las variables bioquímicas relacionadas con el metabolismo óseo (Tabla 15), se encontró que los pacientes con una aparición retardada de los núcleos de osificación (por encima de las 38 semanas de edad postmenstrual) presentaban niveles más bajos de fósforo y de FGF23 en el análisis bioquímico a las 3-4 semanas de vida. Además mostraban niveles más elevados de fosfatasa alcalina y fosfatasa alcalina ósea, con diferencias estadísticamente significativas. Estos hallazgos sugieren una asociación entre el retraso en la aparición de los núcleos de osificación y alteraciones en los marcadores bioquímicos del metabolismo óseo. Los niveles más bajos de fósforo y FGF23 podrían estar relacionados con la deficiente mineralización ósea en estos pacientes, mientras que los niveles elevados de fosfatasa alcalina podrían indicar un aumento en la actividad de formación ósea en respuesta a la falta de mineralización adecuada.

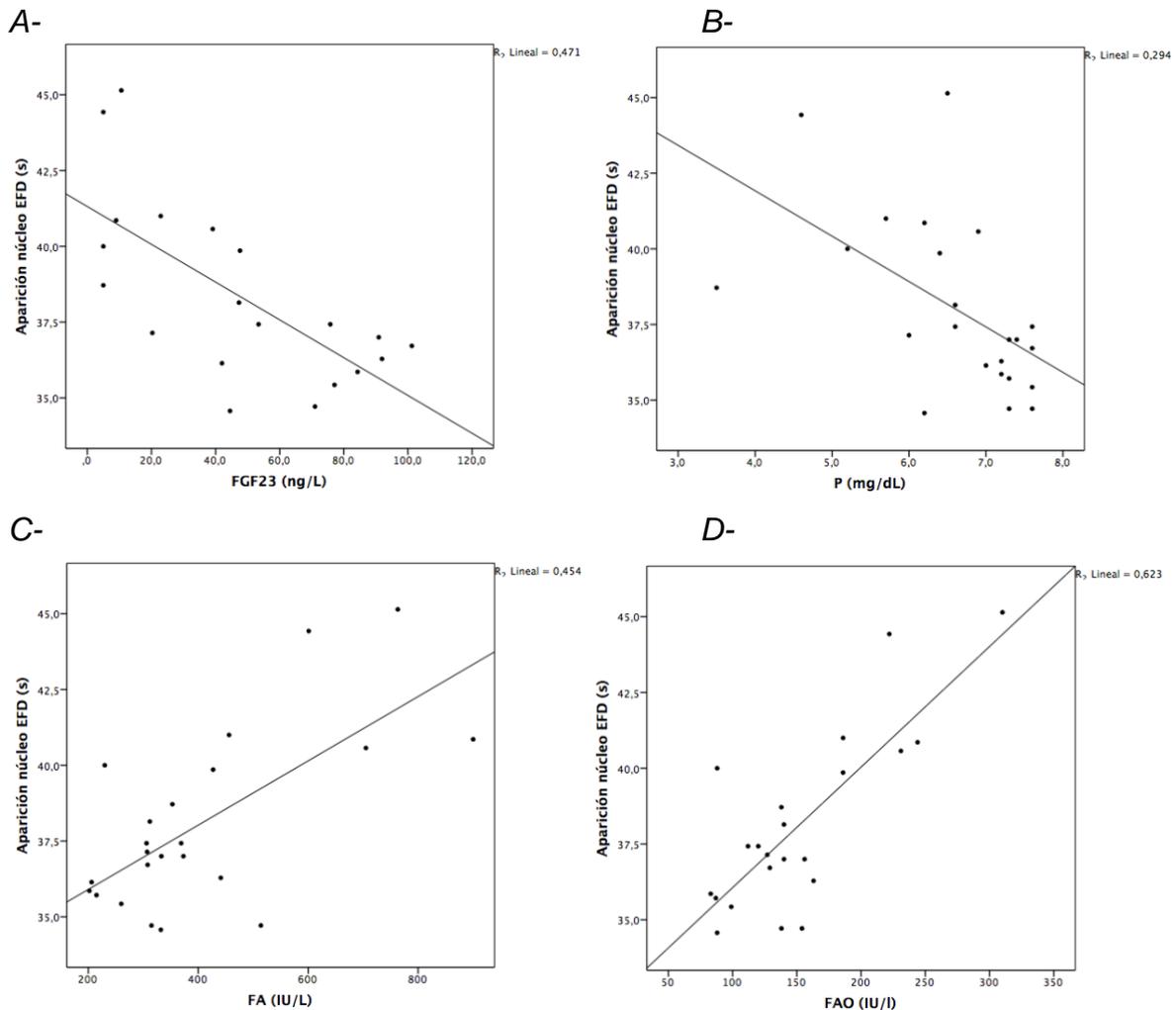
Tabla 15. Variables bioquímicas del metabolismo óseo y su asociación con la aparición retardada de los núcleos de osificación.

| | <i>Retardada (9)</i> | <i>Normal (14)</i> | <i>p</i> |
|------------------------|----------------------|--------------------|------------------|
| Fosforo (mg/dL) | 6,2 (4,9-6,55) | 7,3 (6,9-7,6) | <0,001 |
| Calcio (mg/dL) | 9,6 (8,95-9,9) | 9,65 (9,47-9,93) | 0,410 |
| FA (IU/L) | 456 (332,5-734) | 311,5 (248,75-370) | 0,017 |
| FAO (IU/L) | 186 (139-237,5) | 127 (93,5-147) | 0,007 |
| FGF23 (ng/L) | 10,6 (5-43,2) | 75,8 (44,5-90,9) | 0,002 |
| PTH (pg/mL) | 63 (35,5-78) | 51,5 (37,75-77,25) | 0,925 |
| 25-OH-Vit D (ng/mL) | 26 (23-37) | 29,5 (19-33,5) | 0,658 |
| 1-25-2OH-Vit D (pg/mL) | 111 (78,25-149,25) | 98 (79,5-137,5) | 0,587 |
| uP/uCr (mg/mg) | 1,25 (0,58-2,41) | 1,91 (0,86-2,75) | 0,557 |
| TRP (%) | 90 (81,5-98,18) | 91,29 (87,2-96,28) | 0,557 |
| uCa/uCr (mg/mg) | 0,6 (0,48-1,07) | 0,67 (0,24-0,81) | 0,6 |

EMO: Enfermedad metabólica ósea de la prematuridad. FA: fosfatasa alcalina; FAO: fosfatasa alcalina ósea; FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; PTH: parathormona; 25-OH-Vit D: 25-hydroxycholecalciferol; 1-25-2OH-Vit D: 1,25-dihydroxycholecalciferol; uP: fosforo en orina; uCr: creatinina en orina; TRP: Reabsorción tubular de fosforo; uCa: calcio en orina.

Como se muestra en la figura 23, se observa una correlación positiva fuerte entre la aparición del núcleo DFE y los niveles de fosfatasa alcalina, y especialmente de fosfatasa alcalina ósea, a las 3-4 semanas de vida (Coeficiente de correlación de 0,674 y 0,789, respectivamente, $p < 0,001$). También se encontró una correlación negativa con los niveles de FGF 23 (Coeficiente de correlación de -0,687, $p 0,01$) y una correlación negativa con los niveles de fósforo, aunque esta última no alcanzó la significación estadística (coeficiente de -0,542, $p 0,08$).

Figura 23. Gráficos mostrando la correlación entre la edad postmenstrual de aparición del núcleo de osificación femoral distal (núcleo EFD) y los niveles de FGF23 (A), fósforo (B), fosfatasa alcalina (C) y fosfatasa alcalina ósea (D).



FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; P: fósforo; FA: fosfatasa alcalina; FAO: fosfatasa alcalina ósea.

5- DISCUSIÓN

5. 1. Metabolismo del fósforo en el prematuro

El metabolismo del calcio y la regulación de la calcemia han sido ampliamente estudiados durante décadas. Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio que analiza de manera integral los mecanismos reguladores del fósforo en pacientes prematuros.

Según los conocimientos actuales sobre la fisiología del fósforo en condiciones normales y en pacientes sanos, los niveles séricos se regulan en función de la cantidad de fósforo ingerida en la dieta y a la acción de la PTH, la vitamina D y especialmente el factor de crecimiento de fibroblastos 23, que actúan a nivel renal, intestinal y óseo.

En nuestra muestra de pacientes prematuros encontramos una mediana de fósforo de 6,9 mg/dL (RIQ 6,2-7,3). Se observa una correlación muy fuerte y positiva entre los niveles de fósforo y los niveles de FGF23 (coeficiente de correlación de 0,824, $p < 0,001$), con una fuerza mucho mayor que la relación encontrada con las otras dos hormonas reguladoras, la PTH y la vitamina D. La mediana de FGF23 obtenida es de 45.9 ng/L (RIQ 13,03-76,78) con un rango de 5 a 101,2 ng/L, sin diferencias significativas según la edad gestacional ni el sexo.

Hasta nuestro conocimiento, no existen datos previamente publicados sobre los valores normales de FGF23 en grandes prematuros. Sin embargo, nuestros datos no difieren significativamente de los valores normales publicados en adultos^{83,84} ni en niños sanos con una media de 8 años (35 pg/mL, 8,8-120)⁸⁵. En lactantes, el estudio previo de Enlund-Cerullo⁸⁶ a los 12 y 24 meses, mostró ciertas diferencias por sexo y edad, con una media de FGF23 intacto de 45,2 a los 12 meses y 42,5 pg/mL a los 24 meses en niñas y de 41,4 a los 12 meses y 38,1 pg/mL a los 24 meses en niños. En neonatos, el estudio de Holmlund-Suila⁸⁷ en recién nacidos sanos mostró valores bajos de FGF23 intacto en la sangre de cordón (3 pg/ml, sin diferencias por sexo), con aumento de estos valores a los 3 meses (51,4 en niñas y 25,9 pg/mL en niños) y con buena correlación entre los valores de fosforo y de FGF23 intacto en el grupo de las

niñas (p 0,004). El análisis de los valores FGF23 en nuestra cohorte, por tanto, sugiere que a las 3-4 semanas de vida en grandes prematuros el eje FGF23-Klotho ya es funcionante, de forma similar a los lactantes de mayor edad y adultos.

Por otro lado, encontramos que los niveles de PTH se correlacionan inversamente con la calcemia (p 0,018) y el cociente Ca/Cr en orina (p <0,001), y se correlacionan directamente con el cociente urinario P/Cr (p 0,018). Es decir, niveles más altos de PTH se relacionan con niveles bajos de calcio en sangre, niveles bajos de calcio en orina y niveles altos de fósforo en orina. Sin embargo, a diferencia de otros estudios en adultos⁸⁴, no encontramos una correlación significativa entre los niveles de PTH y la fosfatemia, aunque sí encontramos relación inversa entre la fosfatemia y el cociente Ca/Cr (p 0,028), lo cual concierda con el mecanismo de acción de la PTH, cuyo efecto sobre el riñón es fosfatúrico y ahorrador de calcio.

En cuanto a la vitamina D, observamos una correlación débil negativa entre los niveles de fosfatemia y los niveles de 25-OH-VitD (p 0,005). Sin embargo, no encontramos una correlación significativa entre los niveles de vitamina D activa (1-25-2OH-vit D) y los niveles de fosfatemia en prematuros. Este aspecto no ha sido bien estudiado en prematuros hasta la fecha. En nuestro estudio, pudimos determinar los niveles de vitamina D activa en 23 de los 25 pacientes, obteniendo una mediana de 102 pg/mL (RIQ 81-141).

Aparte de los factores hormonales, el estudio de las ingestas de fósforo no mostró una correlación con la fosfatemia, sin embargo, pueden influir dos factores: que las ingestas en todo el grupo fueron generalmente uniformes y acordes a las recomendaciones establecidas (rango entre 66,4 y 119,35 mg/kg/d) y que, a igual ingesta, puede haber diferencias en la absorción, debidas a mecanismos variables de permeabilidad o daño intestinal, asociados con la propia inmadurez intestinal por la prematuridad o patologías asociadas.

De manera similar a la variabilidad en la absorción intestinal, la prematuridad y las patologías asociadas pueden influir en la respuesta tubular renal en esta población, especialmente teniendo en cuenta que la maduración glomerular y tubular continua hasta las 34 semanas de edad postmenstrual.

La evaluación de la función renal en prematuros es compleja. Los niveles séricos de creatinina presentan una amplia variabilidad a lo largo del tiempo, con un pico en los primeros 5 días de vida y un descenso progresivo. Además, varían en función del grado de prematuridad, con niveles más elevados a menor edad gestacional⁸⁸. En los últimos años, la cistatina C plasmática se ha utilizado como alternativa a la creatinina para estimar el filtrado glomerular, ya que tiene una mayor sensibilidad y no está influenciada por la masa muscular, aunque aún no están bien establecidos sus valores normales en recién nacidos. El estudio de Lee et al.⁸⁹ en los primeros 30 días de vida muestra cómo los prematuros de menos de 28-32 semanas presentan una disminución de la cistatina C plasmática de $1,6 \pm 0,21$ en los primeros tres días a $1,50$ mg/L en el cuarto-sexto días de vida, aumentando gradualmente hasta los 22-30 días, con cifras en torno al mes de vida similares a las encontradas en nuestro estudio. Aunque la cistatina C presenta ventajas respecto a la creatinina, también hay que tener en cuenta que los niveles de cistatina C urinaria se elevan en neonatos con sepsis lo cual puede dificultar su interpretación⁹⁰.

En cuanto a la evaluación de la función tubular, el estudio de la cistatina C y la GGT en orina han mostrado resultados prometedores en estudios recientes.

La cistatina C filtra de forma libre en el glomérulo y se reabsorbe y se cataboliza por completo en el túbulo proximal, sin que se encuentre en cantidades significativas en orina. Por lo tanto, su presencia en la orina puede indicar lesión tubular^{91,92}. Se ha evaluado su utilidad en neonatos como marcador de daño renal agudo en estudios previos^{93,94,95}, y se han encontrado niveles elevados en estos pacientes, al igual que en la paciente de nuestro estudio.

Respecto a la utilidad de la cistatina C como marcador de madurez tubular en prematuros, estudios previos de Askenazi et al.⁹⁶ muestran que los niveles de cistatina C urinaria varían con la edad gestacional evidenciando una correlación negativa entre los valores de uCisC y el cociente uCisC/uCr con la edad gestacional. Los datos de Li et al.⁹⁴ también indican que el pico de cistatina C urinaria se correlaciona negativamente con la edad gestacional y el peso al nacimiento, sin encontrar correlación con la edad postmenstrual ni el sexo.

En nuestro estudio, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de uCisC ni en el cociente uCisC/uCr en función de la edad gestacional ni de la edad corregida. Tampoco se observaron diferencias en relación al peso al nacimiento. Sin embargo, es importante destacar que en el momento del análisis, los pacientes tenían entre 3 y 4 semanas de edad cronológica, lo que implica una edad postmenstrual mayor de 30 semanas en la mayor parte de los casos (80%). Estos resultados se alinean con los datos más recientemente publicados por Askenazi et al.⁹⁷, quienes también encontraron diferencias por edad gestacional a las edades postmenstruales de 24 y 27 semanas, pero estas diferencias se igualaron a las 30 y 34 semanas de edad postmenstrual.

En cuanto a la GGT, es una enzima presente en el túbulo renal proximal y también se encuentra en otros órganos como el hígado, páncreas e intestino. El análisis de GGT en orina se ha utilizado como marcador de daño tubular en pacientes adultos con diversas patologías renales, como la nefropatía diabética o el daño renal agudo^{98,99,100,101,102,103}. Sin embargo, en neonatos prematuros, no se conocen ni se han estudiado los valores normales ni su papel como marcador de disfunción tubular.

En nuestro estudio se obtuvieron valores de GGT urinaria de 23 IU/L (RIQ 17,5-53,5), similares a los valores en adultos^{102,103}, y un cociente uGGT/uCr con una mediana de 176,92 IU/g (RIQ 132,5-366,67). Se observó una ligera correlación positiva entre los niveles de GGT plasmática y urinaria, pero no se encontró correlación con la edad gestacional, la edad corregida, ni con los demás parámetros de función renal.

En resumen, hasta ahora no se han obtenido resultados concluyentes sobre la utilidad de las moléculas Cistatina C y GGT en orina para la evaluación del metabolismo del fósforo en prematuros. No se ha podido establecer su papel como marcadores de función tubular y tampoco han mostrado buena correlación con la reabsorción tubular de fosfato ni con los demás índices urinarios. Por lo tanto, se requieren nuevos estudios en este campo para determinar el papel de estas moléculas en la evaluación de la función tubular en recién nacidos prematuros.

5.2. Prevalencia y factores de riesgo de enfermedad metabólica ósea

En la población estudiada, la prevalencia observada de enfermedad metabólica de la prematuridad es de 17 por cada 100 recién nacidos vivos menores de 32 semanas de edad gestacional o de 1500 gramos. Esto se traduce en 5 casos entre los 29 pacientes nacidos con esas características. De los prematuros menores de 32 semanas o de 1500 gramos participantes en el estudio, un 20% han presentado EMO. Estas cifras están en línea con estudios previos que reportan una variabilidad en la prevalencia de EMO, con valores que oscilan entre el 16 y el 60%^{30,31,32}.

Estos resultados sugieren que la enfermedad metabólica ósea es una complicación relativamente frecuente en los recién nacidos prematuros y que se encuentra dentro del rango de prevalencia observado en investigaciones anteriores. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la prevalencia puede variar en diferentes poblaciones y contextos, por lo que estos datos son específicos para su estudio en particular.

Con respecto a los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad metabólica ósea, la prematuridad extrema y el muy bajo y extremo bajo peso al nacimiento son dos de los factores mejor descritos^{28,40,41,42}, y nuestros resultados respaldan esta asociación. En nuestro estudio, los pacientes con EMO presentaron una edad gestacional más baja (24,6 vs 30,85 semanas, $p < 0,021$) y un menor peso al nacimiento (900 vs 1275 gramos, $p < 0,021$), en comparación con los pacientes sin EMO. Estos resultados son consistentes con los hallazgos previos de Hung et al.⁶⁰ quienes observaron que los pacientes con EMO tenían una menor edad gestacional (27,2 vs 30,3 semanas) y un menor peso al nacimiento (959 vs 1283 gramos). La prematuridad conlleva una pérdida de la mineralización máxima que ocurre en el tercer trimestre de la gestación, y el bajo peso al nacer se asocia tanto con la prematuridad como con la insuficiencia placentaria, que puede afectar al transporte de minerales al feto. Los factores relacionados con insuficiencia placentaria, como la preeclampsia y el crecimiento

intrauterino restringido, también se han relacionado con esta enfermedad^{32,39}. Aunque los datos específicos del embarazo no se recopilaron en nuestro estudio, no se pudo demostrar asociación con el percentil de peso al nacimiento corregido por la edad gestacional.

En cuanto a los factores de riesgo postnatales, en nuestra muestra, se observó una mayor prevalencia de displasia broncopulmonar (100 vs 15%), ductus arterioso persistente (80 vs 25%), neumonía (80 vs 0%), anemia (100 vs 20%), hipotiroidismo (80 vs 10%) y convulsiones (40 vs 0%) en el grupo de pacientes con enfermedad metabólica ósea, con diferencias estadísticamente significativas. Estudios previos también han mostrado una asociación entre la enfermedad metabólica ósea y otras patologías como la displasia broncopulmonar, enfermedades neurológicas, sepsis, colestasis, daño intestinal y enfermedad renal^{33,36,44}. Entre los posibles mecanismos causales, la displasia broncopulmonar, la neumonía, el ductus y la anemia comparten una base fisiopatológica común, ya que aumentan los requerimientos energéticos, lo que puede comprometer el suministro de minerales al hueso³³. Las enfermedades neurológicas severas pueden ocasionar periodos prolongados de inmovilización lo que promueve un aumento de la resorción ósea por falta de estimulación mecánica, según el modelo “mecanostático”^{33,54}. Este efecto también puede observarse en pacientes inestables, en los cuales se retrasa el inicio de la movilización fuera de la incubadora en la práctica clínica. En nuestro estudio, encontramos que el inicio del método madre canguro fue significativamente más tardío en los pacientes con EMO que en los pacientes sanos (34 vs 4,5 días, $p < 0,008$).

Además de los factores mencionados anteriormente, el papel de la nutrición también ha sido ampliamente estudiado como un factor de riesgo modificable en la enfermedad metabólica ósea. Se ha demostrado desde hace décadas que los recién nacidos alimentados exclusivamente con leche materna presentan niveles más bajos de fósforo en comparación con aquellos que reciben fórmulas especiales o suplementos minerales⁴⁹, y los prematuros alimentados con leche materna no fortificada tienen un riesgo del 40% de desarrollar raquitismo en comparación con el 16% de aquellos alimentados con fórmulas especiales⁵⁰.

En nuestra muestra no encontramos diferencias en función del tipo de alimentación recibida (materna o fórmula). No obstante, es importante destacar que los fortificantes de la leche materna se administraron universalmente según las recomendaciones actuales. Tampoco encontramos diferencias en las ingestas diarias de líquidos, calorías, proteínas, calcio ni fósforo. Sin embargo, observamos que los pacientes con EMO comenzaron la fortificación de la leche materna de forma más tardía, con una mediana de 12 días en pacientes con EMO en comparación con 7 días en pacientes sanos (p 0,028). Además, a pesar de no haber diferencias significativas en los aportes calórico-proteicos, los pacientes con EMO presentaron una menor ganancia ponderal durante el primer mes en comparación con los pacientes sin EMO (17,9 g/d vs 30,4 g/d, p 0,035).

Por último, la nutrición parenteral prolongada también mostró una asociación estadísticamente significativa con la presencia de EMO, con una mediana de 15 días en el grupo de pacientes con EMO en comparación con los 8 días en los pacientes sanos (p 0,007). La nutrición parenteral prolongada es un factor de riesgo bien establecido para el desarrollo de EMO^{33,40,44,51} debido a que la ingesta de minerales es menos efectiva en lactantes con mala tolerancia digestiva⁵¹ y, además, la nutrición parenteral exclusiva dificulta alcanzar los requerimientos fisiológicos de minerales, debido a los problemas de estabilidad y precipitación calcio-fosfato en las preparaciones parenterales^{40,47}.

Además de lo previamente descrito, el uso de ciertos medicamentos como diuréticos, glucocorticoides, antiácidos, cafeína o antibióticos también se ha relacionado con enfermedad metabólica ósea^{33,36,40,44,52}. Aunque en este estudio se recopilaron los tratamientos farmacológicos que recibían los pacientes al momento de la extracción, estos datos por si solos no permiten inferir una relación causal, ya que no eran parte del objetivo del estudio.

5.3. Marcadores bioquímicos de enfermedad metabólica ósea

En cuanto a los marcadores bioquímicos de la enfermedad metabólica ósea de la prematuridad (EMO), no existe un único marcador que pueda ser utilizado de forma aislada para su diagnóstico^{33,44,104}. Sin embargo, este estudio muestra que en comparación con los marcadores más ampliamente utilizados, como la fosfatasa alcalina (FA) y fósforo, el FGF23 (factor de crecimiento de fibroblastos 23) presenta una mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico temprano de la EMO.

Para comprender el papel de los marcadores bioquímicos en la EMO es necesario entender las bases fisiopatológicas de la enfermedad.

En un estado de calcipenia, que puede ocurrir debido a una ingesta o absorción inadecuadas de calcio, o a una deficiencia de vitamina D, la hormona paratiroidea (PTH) actúa movilizando calcio y fósforo del hueso, y excretando fósforo en la orina, con el fin de normalizar los niveles de calcio en sangre. Esto lleva a situación de hipofosfatemia debido a la disminución de los niveles de fósforo en sangre. Lo mismo ocurre en situaciones con bajos aportes dietéticos de fósforo o incremento de las pérdidas de fósforo en la orina. Así, tanto la calcipenia como la fosfopenia resultan en una situación de hipofosfatemia, que es factor final que causa el raquitismo^{33,105}.

En el raquitismo ocurren dos procesos principales relacionados con la hipofosfatemia; por un lado, en el cartílago de crecimiento, la hipofosfatemia provoca la detención de la apoptosis en los condrocitos hipertróficos, lo que provoca raquitismo; mientras que por otro, en los osteoblastos, la hipofosfatemia inhibe la maduración y la mineralización, lo que resulta en osteomalacia¹⁰⁵.

Estudios in vitro en condrocitos primarios han demostrado que el fosfato actúa como mediador en la apoptosis de los condrocitos hipertróficos mediante la activación de la vía mitocondrial dependiente de caspasa-9^{105,106}. Además, el proceso de diferenciación de los osteoblastos y la mineralización de la matriz ósea también requieren la participación del fósforo. La actividad enzimática de

la fosfatasa alcalina produce fosfato libre que ingresa a la célula a través de un transportador de fosfato dependiente de sodio, lo cual regula la transcripción de genes y la función celular en los osteoblastos^{107,108}. La baja concentración intracelular de fosfato estimula la osteocalcina 1 (un factor paracrino que promueve el transporte de fosfato) y la expresión de ALP, para mantener el fosfato intracelular y la expresión de osteopontina en niveles normales y facilitar la formación ósea. Por lo tanto, para la mineralización de los osteocitos, es necesario mantener una concentración intracelular de fosfato adecuada, lo cual no siempre es posible en un estado de fosfopenia.

5.3.1. FÓSFORO

Según los estudios realizados hasta el momento, la hipofosfatemia se ha identificado como el marcador más temprano de alteración en el metabolismo mineral, manifestándose desde los 7-14 días de vida⁴⁴. En la muestra analizada en este estudio, a las 3-4 semanas de vida, los pacientes con EMO presentaron niveles séricos de fósforo más bajos que los controles (5,2 vs 7,1 mg/dl, p 0,003), con una sensibilidad del 60% y especificidad del 100% para el diagnóstico de EMO cuando se usa el punto de corte de 5,6 mg/dl. Un punto de corte de 4 mg/dl muestra una alta especificidad (100%), pero una sensibilidad más baja (20%), lo que lo hace menos adecuado para detectar pacientes de alto riesgo.

En relación al fosforo, un estudio realizado por Catache et al.⁵⁷ demostró que los niveles de fosforo por debajo de 3,6 mg/dl (1,16 mmol/L) en recién nacidos amamantados con leche materna indicaban un mayor riesgo de EMO. Otro estudio realizado por Backstrom et al.⁵⁸, encontró que niveles de fósforo por debajo de 5,6 mg/dl (<1,8 mmol/L) en prematuros con edad gestacional media de 30 semanas y 1490 gramos, se relacionaban con la presencia de raquitismo radiológico, lo que concuerda con los resultados del presente estudio. Además, Viswanathan et al.³⁶ observaron diferencias significativas en los valores de fósforo entre casos y controles ya desde las primeras 1-4 semanas de vida (5,61 vs 5,95 mg/dl, p0,04).

5.3.2. CALCIO

En cuanto al calcio, a diferencia del fósforo, no es un buen marcador de enfermedad metabólica ósea. En el presente estudio, los niveles séricos de calcio fueron similares en ambos grupos (alrededor de 9,6 mg/dL de mediana en ambos grupos, p 0,918), en concordancia con los hallazgos de otros estudios previos³⁶.

El calcio no se utiliza comúnmente como marcador de la EMO debido a que los niveles en sangre se mantienen dentro del rango normal incluso en situaciones de depleción de calcio⁴⁴, gracias a la acción de la hormona paratiroidea.

5.3.3. FOSFATASA ALCALINA Y FOSFATASA ALCALINA ÓSEA

Respecto a la fosfatasa alcalina (FA) y la fosfatasa alcalina ósea (FAO), la FA ha sido ampliamente estudiada y utilizada como marcador de la EMO. Niveles de FA superiores a 500 U/L se han asociado con alteración del metabolismo óseo y niveles superiores a 700 U/L con desmineralización ósea^{59,60}. En el presente estudio, los niveles de FA a las 3 semanas de vida fueron mayores en el grupo de pacientes con EMO (601 vs 323,5 UI/L) aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística (p 0,118).

En el estudio realizado por Backstrom et al.⁵⁸ con 43 pacientes prematuros menores de 33 semanas, se demostró que niveles de FA superiores a 900 UI/L junto con niveles de fósforo inferiores a 5,6 mg/dL, tenían una sensibilidad y especificidad diagnóstica del 70 y 100% respectivamente, cuando estos se determinaban a los 3 meses de vida. Cuando se evaluó la FA a las 3 semanas de vida, los niveles fueron mayores en el grupo de EMO (1019 vs 817 UI/L), pero nuevamente las diferencias tampoco alcanzaron la significación estadística (p 0,06).

Por otro lado, Viswanathan et al.³⁶ demostraron que niveles pico de FA superiores a 500 IU/L en prematuros menores de 30 semanas de gestación se asociaban con la EMO, con una sensibilidad del 76,1% y una especificidad del 66,6%. Observaron que las diferencias en los niveles de FA entre los casos y los controles solo eran significativas en el periodo de vida entre las 5-8 semanas (459,3 vs 353,4 UI/L, p 0,001), y no resultaba ser un buen marcador en las primeras 1-4 semanas de vida (354,4 vs 325,3 UI/L, p 0,48), lo cual concuerda con los resultados del presente estudio.

La FA aumenta fisiológicamente durante las primeras 3 semanas de vida, alcanzando un pico a las 6-12 semanas⁵⁹. Además, la FA se expresa en múltiples tejidos (hígado, hueso, riñón, intestino, cerebro, etc.), lo cual hace que aumente en otras patologías como la colestasis neonatal¹⁰⁹. La FA aumenta paralelamente a los niveles de bilirrubina directa durante las primeras 8 semanas de vida³⁶, lo que dificulta su análisis.

La variabilidad fisiológica en sus niveles y la asociación con la colestasis, dificultan la interpretación de la FA como marcador de EMO. En este sentido, el análisis de la isoenzima específica de hueso (FAO) tampoco ha resultado determinante, ya que aunque los niveles de FAO fueron mayores en el grupo de pacientes afectados, estas diferencias no alcanzaron la significación estadística (222 vs 138 UI/L, p 0,213).

El uso de los niveles de FAO no mejoró el rendimiento diagnóstico (área bajo la curva de FA 0,73 y de FA-O 0,68), lo cual concuerda con lo descrito en el estudio de Backstrom et al.⁵⁸, donde encontraron una correlación fuerte entre los niveles totales de FA y los de FAO en todos periodos de edad estudiados (3 semanas de edad cronológica y 3-6 meses de corregida), sin mejoría en el rendimiento diagnóstico para la EMO, con un área bajo la curva de 76,4% para la FA y de 65,8% para la FAO a los 3 meses.

En resumen, aunque la FA y la FAO parecen ser buenos marcadores de desmineralización en el seguimiento, su utilidad disminuye cuando se usan a las 3-4 semanas, que es cuando se recomienda iniciar el screening.

5.3.4. OTROS MARCADORES

Diversos estudios sugieren que los niveles de PTH por encima de 100 pg/ml en recién nacidos de bajo peso extremo pueden indicar riesgo de enfermedad metabólica ósea^{32,61}. Sin embargo, en la muestra de este estudio no se encontraron diferencias significativas en los valores de PTH entre los pacientes afectados y sanos, y ninguno de los 2 pacientes con niveles de PTH superiores 100 pg/ml fue diagnosticado con EMO.

Los niveles altos de PTH, junto al estudio de los índices urinarios, pueden ser útiles para evaluar la causa subyacente de la hipofosfatemia. Una baja reabsorción tubular de fosfato (TRP) con una PTH elevada sugiere una deficiencia de calcio como mecanismo causal, mientras que una TRP alta con una PTH normal o baja sugiere deficiencia de fósforo³².

En nuestra muestra de estudio, no se encontraron diferencias significativas en la TRP entre sanos y afectados, aunque tres de los cinco pacientes con EMO presentaban una TRP alta (>91%). Tampoco hubo diferencias significativas en el cociente uP/uCr. Sin embargo, se observó que los pacientes con EMO tenían un cociente Ca/Cr en orina superior en comparación con los sanos (0,8 vs 0,57 mg/mg, p 0,049) y una correlación negativa entre los niveles de PTH y el cociente uCa/uCr (-0,657, p <0,001). Esto puede sugerir que el principal mecanismo subyacente a la EMO en esta muestra es la hipofosfatemia y no la hipocalcemia.

5.3.5. FGF23

En relación con el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23), se encontró que los pacientes con EMO tenían niveles más bajos de FGF23 que los pacientes no afectados (5 vs 53,4 ng/L, p 0,001). Es sorprendente que, a pesar de la relevancia fisiopatológica de la hipofosfatemia en el raquitismo, no se haya estudiado hasta la fecha el papel de FGF23 como marcador de esta enfermedad.

Según los datos obtenidos, el punto de corte de FGF23 de 15,45 ng/L a las 3-4 semanas de vida presenta una sensibilidad y especificidad del 100% para el diagnóstico de EMO, siendo de forma temprana más preciso que marcadores convencionales, como el fósforo y la fosfatasa alcalina (área bajo la curva de 1 para FGF23, de 0,93 para fósforo y de 0,73 para fosfatasa alcalina).

En comparación con los marcadores habituales utilizados en nuestra muestra, retrospectivamente, encontramos que sólo tres de los cinco pacientes (60%) se clasificaron inicialmente como de alto riesgo según los parámetros convencionales ($P < 4$ mg/dl y/o $ALP > 750$ UI/L). Sin embargo, utilizando FGF23 y el punto de corte de 15,45 ng/L los cinco pacientes (100%) podrían haber sido clasificados como de alto riesgo desde las primeras semanas de vida, permitiendo anticipar cambios en el tratamiento.

5.4. Marcadores radiológicos de enfermedad metabólica ósea

En cuanto a los marcadores radiológicos de la enfermedad metabólica ósea (EMO), es importante tener en cuenta que técnicas como la densitometría ósea (DEXA)^{65,66,68} o el ultrasonido cuantitativo (QUS)^{69,70,71}, son utilizadas en estudios de investigación para evaluar la densidad mineral ósea con resultados excelentes. Sin embargo, en la práctica clínica de las unidades neonatales, estas técnicas no suelen estar disponibles y no forman parte del manejo clínico de la enfermedad metabólica ósea.

La radiografía simple es ampliamente utilizada y puede detectar signos de osteopenia y fracturas. En la muestra, uno de los cinco pacientes con EMO presentó fracturas costales en la radiografía, lo que representa un porcentaje de fracturas del 20%, similar a lo encontrado en otras publicaciones (entre el 17-34%)^{34,35,36}. Aunque se utiliza rutinariamente, esta técnica tiene la limitación de que no detecta signos de desmineralización hasta etapas tardías^{44,64}, lo que disminuye su utilidad en la toma de decisiones tempranas.

El estudio mediante ultrasonidos de los núcleos de osificación epifisarios de la rodilla ha mostrado ser una técnica inocua y sencilla de realizar por pediatras o neonatólogos no expertos, con excelente acuerdo entre observadores (coeficiente Kappa de 1, $p < 0,001$ para ambos núcleos).

La aparición del núcleo de osificación epifisario femoral distal (EFD) se observó a las 37,14 semanas de mediana (RIQ 35,85-40), de forma más precoz que el núcleo de osificación epifisario tibial proximal (ETP), que se observó a las 40,07 semanas de edad postmenstrual de mediana (RIQ 36,14-46,14). Los datos en fetos en condiciones normales muestran una presencia del núcleo EFD en el 94% de los fetos a las 34-35 semanas y en el 100% a las 37 semanas, y una presencia del ETP del 80% a las 37 semanas, y del 100% a las 40 semanas^{72,73}. En nuestro estudio el núcleo EFD aparece en 9 pacientes (39,13%) por encima de la semana 38 y en 6 pacientes (26,09%) por encima de la semana 40, mostrando por tanto una aparición retardada de los núcleos de osificación en

recién nacidos prematuros respecto a lo que sucede en fetos que llegan al término del embarazo.

El estudio de Windschall et al.⁷⁴ en 178 recién nacidos de diferentes edades gestacionales (entre 24 y 41 semanas) también mostró una aparición retardada de estos núcleos, con una presencia del EFD del 86% a las 37 semanas y del ETP del 61% a las 37 semanas y del 87% a las 40 semanas de edad corregida, no obstante, con gran variabilidad en la aparición de los núcleos de osificación entre las semanas 30 y 42 postmenstruales. Este estudio, al igual que los realizados en fetos, muestra buena correlación entre las dimensiones del núcleo y la edad postmenstrual; sin embargo, destaca que hay varios recién nacidos en los que el núcleo EFD está ausente a las 41-42 semanas postmenstruales, sin que existan razones aparentes para un retraso del desarrollo esquelético.

En nuestro estudio destaca que la aparición de los núcleos de osificación fue más tardía en los pacientes con enfermedad metabólica ósea que en los pacientes sanos, con diferencias estadísticamente significativas (40,85 semanas -RIQ 39,36-44,79- vs 36,85 semanas -RIQ 35,64-37,6-; p 0,004).

La aparición retardada del núcleo de osificación EFD por encima de las 38 semanas fue más frecuente en recién nacidos de menor edad gestacional al nacimiento (26,43 vs 31,07 semanas de mediana, p 0,005) y menor peso al nacimiento (900 vs 1410 gramos de mediana, p 0,009) y también presentaban menor ganancia ponderal postnatal que los pacientes que no presentaban retraso en la aparición de los núcleos de osificación. Asimismo, estos pacientes también presentaban con mayor frecuencia, enfermedad de membrana hialina, displasia broncopulmonar, neumonía, hipotiroidismo y anemia, y habían recibido nutrición parenteral durante más días, muchos de estos factores también relacionados con EMO.

Además, es destacable que los pacientes con aparición retardada de los núcleos de osificación ya presentaban en el análisis bioquímico a las 3-4 semanas de vida, menores niveles de fósforo (mediana de 6,2 vs 7,3 m/dL, p <0,001) y de FGF23 (mediana de 10,6 vs 75,8 ng/L, p 0,002), así como niveles más elevados

de fosfatasa alcalina (mediana de 456 vs 311,5 IU/L, p 0,017) y fosfatasa alcalina ósea (mediana de 186 vs 127 IU/L, p 0,007); con una fuerte correlación positiva entre las semanas de aparición del núcleo de osificación y los niveles de fosfatasa alcalina y fosfatasa alcalina ósea (Coeficiente de correlación de 0,674 y 0,789, respectivamente, p <0,001).

La fuerte asociación encontrada entre los parámetros bioquímicos del metabolismo óseo y la edad postmenstrual de aparición de los núcleos de osificación, sugieren que la evaluación ecográfica sistemática en las unidades neonatales podría ser de alta utilidad en la monitorización de la salud ósea en los prematuros. Los resultados de nuestro estudio muestran como en ninguno de los pacientes con EMO se observaban núcleos de osificación a las 37 semanas, por lo tanto la ausencia de estos núcleos en semana 38 debería conllevar la evaluación minuciosa en busca de otros datos de enfermedad metabólica ósea. Consideramos que son necesarios nuevos estudios adicionales que evalúen el papel de la monitorización ecográfica de los núcleos de osificación en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad metabólica ósea de la prematuridad.

5.5. Prevención y tratamiento de la EMO

Todos los pacientes de nuestro estudio recibieron aportes minerales similares de calcio y fósforo; sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de fósforo entre unos pacientes y otros, lo cual sugiere que el manejo nutricional de los prematuros ha de individualizarse³³.

Aunque se sabe que los prematuros tienen mayores requerimientos minerales que los nacidos a término, no hay acuerdos universales en las recomendaciones nutricionales entre distintas organizaciones. Así, las recomendaciones enterales de calcio para prematuros varían entre 140-160 mg /100kcal según la Academia Americana de Pediatría (AAP) y 70-140 mg /100kcal según la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN). De la misma forma, las recomendaciones de fosforo varían de 95-108 mg /100kcal según la AAP a 50-87 mg/100 kcal según la ESPGHAN^{39,75}.

Para la nutrición parenteral, ESPGHAN, contando con el respaldo de la junta de la Sociedad Estadounidense de Nutrición Parenteral y Enteral (ASPEN)¹¹⁰, recomienda aportes de calcio de 40 a 120 mg/kg/día (1,3–3,0 mmol/kg/día) y de fosfato de 1,9–2,2 mmol/kg/día, con una relación calcio/fosforo en el rango de 1,3:1 a 1,7:1⁷⁶. Sin embargo, hay informes de hipercalcemia e hipofosfatemia en la primera semana de vida con esta formulación¹¹¹ y las guías ESPGHAN más recientes han sugerido una relación molar de calcio/fosforo entre 0,8:1 y 1:1 en los primeros días, seguido de un aumento a 1,3:1 en los prematuros en crecimiento¹¹².

En muchas ocasiones, los requerimientos posnatales son difíciles de alcanzar debido a factores limitantes como la inestabilidad de la nutrición parenteral o las dificultades para lograr una alimentación enteral completa. Incluso cuando se alcanzan los requerimientos de minerales, la absorción y biodisponibilidad irregulares, o las pérdidas incrementadas debido a la inmadurez del tracto gastrointestinal o de la función tubular renal, pueden conducir a desequilibrios en la homeostasis del calcio y el fosfato.

Está bien demostrado^{33,44,47,48} que proporcionar calcio y fósforo en cantidades adecuadas a los recién nacidos prematuros a través de la fortificación de la leche materna o el uso de fórmulas especialmente diseñadas ayuda a prevenir la enfermedad metabólica ósea de la prematuridad y la suplementación con fósforo ha demostrado mejorar los marcadores bioquímicos de EMO⁴⁶; sin embargo, también la suplementación excesiva de fósforo puede aumentar el riesgo de hiperparatiroidismo secundario (al reducir el calcio ionizado sérico) y empeorar la EMO³³.

A pesar de la relevancia de la hipofosfatemia en la EMO, no hay evidencia para suplementar con fósforo oral de forma universal a todos los prematuros, sino que esta decisión tiene que tomarse de forma individualizada en base a la interpretación correcta de todos los marcadores bioquímicos.

Así, en los estados de calcipenia, con PTH elevada, la suplementación oral con calcio ayuda a normalizar la PTH, el fósforo sérico y la FA^{33,61}. La deficiencia de vitamina D también debe tratarse cuando se identifica. En el estado fosfopénico, se debe investigar la pérdida renal de fosfato y ajustar la suplementación oral. Se sugiere proporcionar suplementos orales cuando los valores séricos de fósforo son menores de 4 mg/dL (1 mmol/L) y considerarlos cuando son inferiores a 5,5 mg/dL (1,3 mmol/L), especialmente si se asocia con aumento de fosfatasa alcalina^{39,44}. En vista de los resultados de este estudio que demuestra que la evaluación de FGF23 permite identificar de forma precoz el estado fosfopénico, consideramos que los niveles séricos bajos de FGF23 también deben sugerir una optimización de los aportes de fósforo.

Además, estudios realizados en ratones han demostrado relación directa entre la ingesta de fósforo en la dieta y los niveles de FGF23¹¹³, lo que sugiere que la monitorización periódica de los niveles de FGF23 puede servir para controlar la respuesta al tratamiento con fósforo oral y evitar estados de infra y sobretratamiento.

5.6. Limitaciones y fortalezas del estudio

5.6.1. LIMITACIONES

Una de las principales limitaciones de este estudio es el tamaño muestral reducido. Aunque la tasa de prematuridad está aumentando en los últimos años, sólo en torno a un 20% de los prematuros nacen con menos de 32 semanas o menos de 1500 gramos, lo que dificulta el reclutamiento y hace que los estudios en esta población sean escasos.

Además, en la misma línea, todos los estudios en esta población plantean dificultades a la hora de realizar las determinaciones analíticas, por las limitaciones y riesgos asociados a la propia extracción y por la escasa volemia total (90ml por kg de peso), ya que se debe tener en cuenta que uno de los principales mecanismos de anemia en prematuros son las extracciones repetidas. La necesidad de minimizar el número de extracciones y el volumen de las mismas ha limitado la obtención de los datos bioquímicos a la fecha de los controles rutinarios y, los problemas de volumen de muestra, han supuesto pérdidas en los datos de una parte de los pacientes.

En cuanto a las limitaciones metodológicas, muchas variables bioquímicas, incluido FGF23, sufren oscilaciones diurnas o en relación con el ayuno²⁰. Para minimizar este sesgo, las extracciones se han realizado de forma rutinaria por la mañana a la misma hora, según el proceder habitual en la unidad neonatal.

Además, específicamente con respecto la variable FGF23, hay otras consideraciones metodológicas que limitan su análisis. De forma general existen dos tipos principales de ensayos comerciales para su determinación: de formas intactas de FGF23 (iFGF23) o de la porción C-terminal (cFGF23). El análisis de cFGF23 puede tener beneficios por su menor variabilidad diurna, sin embargo la acción biológica y el efecto fosfatúrico vienen determinados por la forma intacta, motivo por el cual en el presente estudio se utiliza el kit Human FGF23 (Intact)

ELISA de Immunotopics, para la determinación de la forma intacta. Con este tipo de Kit las concentraciones de FGF23 pueden sufrir variaciones de hasta un 20% por retrasos en el procesamiento de la muestra^{20,114}. Para minimizar este sesgo, todas las muestras fueron centrifugadas de forma inmediata y congeladas a -80 grados hasta su análisis. Además de la estabilidad de la determinación, otro problema que presenta esta variable es que la concordancia analítica entre los diferentes ensayos comerciales de iFGF23 (Immunotopics, Kainos, Millpore) es pobre¹¹⁴, lo que limita la extrapolación de resultados, siendo los puntos de corte propuestos en el estudio válidos únicamente para el mismo tipo de Kit comercial.

Finalmente, se debe de tener en cuenta que las características tan heterogéneas de los pacientes prematuros incluidos, con diferentes comorbilidades y tratamientos, dificultan el análisis estadístico de las diferentes variables; sin embargo consideramos que acercan este estudio a la realidad de las unidades neonatales.

5.6.2. FORTALEZAS

Este estudio presenta varias fortalezas importantes:

Es estudio prospectivo que incluyen todos los grandes prematuros nacidos en la comunidad autónoma durante el periodo de estudio. Esto garantiza una alta representatividad de la población y reduce el sesgo de selección.

Se logró una alta participación por parte de las familias, con un 100% de aceptación para participar en el estudio. Esto demuestra un alto grado de compromiso y colaboración por parte de los participantes.

El estudio cuenta con la participación y el apoyo de diversos profesionales de la salud, incluyendo pediatras, neonatólogos, enfermeras de neonatología y el servicio de bioquímica. Esta colaboración multidisciplinaria fortalece la validez y la calidad de los datos recopilados.

A diferencia de muchos estudios en esta población que son retrospectivos y de baja calidad, este estudio se diseñó de manera rigurosa y recopiló todas las variables clínicas relevantes desde el nacimiento. Además, se realizaron análisis exhaustivos de las diferentes variables bioquímicas del metabolismo fosfocálcico, incluyendo los aportes orales y las pérdidas urinarias. Esto proporciona una imagen completa y detallada de la salud ósea y el metabolismo en los grandes prematuros.

Este estudio se considera el primer a nivel mundial en evaluar de manera integral todas las variables bioquímicas del metabolismo del fósforo y el factor de crecimiento de fibroblastos 23 en una población de grandes prematuros. También es el primer estudio en analizar los cocientes urinarios uGGT/uCr y uCisC/uCr como marcadores de la función tubular en prematuros. Además, plantea la utilidad del análisis ecográfico de los núcleos de osificación epifisarios en la evaluación del desarrollo mineral óseo y la enfermedad metabólica ósea en la prematuridad. Estas contribuciones originales son valiosas para el avance del conocimiento en este campo.

6- CONCLUSIONES

- La prevalencia de enfermedad metabólica ósea de la prematuridad en nuestra comunidad autónoma ha sido de 17 de cada 100 recién nacidos prematuros menores de 32 semanas o de 1500 gramos.
- Los principales factores asociados con enfermedad metabólica ósea de la prematuridad fueron la edad gestacional y el peso al nacimiento, además de la presencia de otras patologías como la displasia broncopulmonar, la neumonía, el ductus arterioso persistente, el hipotiroidismo, la anemia de la prematuridad y las convulsiones neonatales. También encontramos asociación con el retraso en el inicio de la movilización con método madre canguro.
- Entre los aspectos nutricionales, encontramos que la enfermedad metabólica ósea se relacionó con una menor ganancia de peso en el primer y segundo mes de vida, mayor duración de la nutrición parenteral, mayor duración de la nutrición parenteral exclusiva y mayor duración de la nutrición enteral por sonda. También se relacionó con un inicio más tardío de la fortificación de la leche materna. Por el contrario, no encontramos diferencias significativas en cuanto a la ingesta diaria de líquidos, calorías, proteínas, calcio y fósforo o vitamina D.
- El estudio del metabolismo del fósforo mostró una fuerte correlación positiva entre los valores plasmáticos de fósforo y los valores de FGF23. También encontramos una correlación débil negativa entre los niveles de fósforo y la vitamina D (25-OH-VitD), así como relaciones discretas entre el fósforo y el cociente uCa/uCr y éste último con la PTH. Por el contrario, no se encontró asociación significativa entre fósforo y PTH, aunque encontramos correlación directa de esta hormona con la excreción renal de fósforo (el cociente uP/uCr y la RTP).
- La evaluación del cociente uP/uCr y la RTP en el estudio de la regulación renal del fósforo y la enfermedad metabólica ósea no fue concluyente. Tampoco encontramos resultados concluyentes en cuanto al papel de los cocientes urinarios GGT/creatinina y cistatina C/creatinina en la evaluación de la madurez tubular renal en los prematuros.

- Los niveles bajos de fósforo y de FGF23 a las 3-4 semanas de vida se asociaron de forma estadísticamente significativa con la presencia de EMO. Los niveles urinarios de Ca/Cr también fueron más altos en los pacientes con EMO. Aunque la FA sérica y la FA ósea fueron mayores en el grupo de pacientes con EMO, las diferencias no alcanzaron la significación estadística. La PTH tampoco mostró diferencias.
- Al comparar los parámetros bioquímicos, observamos que, a las 3-4 semanas de vida, FGF23 fue superior a los parámetros habituales (FA y fósforo) para establecer el riesgo de EMO, con un área bajo la curva de 1 (IC 95% 0,83-1) frente a 0,93 (IC 95% 0,73-0,99) en el caso del fósforo y 0,73 (IC 95% 0,51-0,88) cuando se utilizó la FA.
- El punto de corte óptimo de FGF23 para el diagnóstico de EMO fue de 15,45 ng/L, con una sensibilidad y especificidad del 100%. En cuanto al fósforo, el punto de corte de 4 mg/dl presentó una especificidad del 100% pero una sensibilidad del 20%, que aumentó al 60% cuando se utilizó el punto de corte de 5,6 mg/dl (manteniendo la especificidad). Para la FA, el punto de corte de 500 UI/L presentó una sensibilidad del 60% y una especificidad del 90% mientras que el punto de corte de 750 UI/L presentó una especificidad del 100% pero la sensibilidad disminuyó al 20%.
- La evaluación ecográfica de los núcleos de osificación mostró cómo los pacientes con enfermedad metabólica ósea presentaron un retraso en la aparición del núcleo de osificación femoral proximal con respecto a los pacientes sanos. Este retraso también se asoció con la edad gestacional, el peso al nacimiento y otros factores de riesgo conocidos de enfermedad metabólica ósea. Además encontramos una fuerte correlación positiva entre las semanas de aparición del núcleo femoral proximal y los niveles de fosfatasa alcalina y fosfatasa alcalina ósea a las 3-4 semanas de vida, además de una correlación negativa con los niveles de FGF23.

- Nuestros resultados muestran que es posible encontrar nuevos marcadores que permitan un abordaje más precoz y adecuado de la enfermedad metabólica ósea de la prematuridad en la práctica clínica.

7- BIBLIOGRAFÍA

1. Nordin BEC. *Calcium, phosphate, and magnesium metabolism: clinical physiology and diagnostic procedures*. Edinburgh; New York New York: Churchill Livingstone; distributed in the United States of America by Longman; 1976.
2. Imel EA, Econs MJ. Approach to the hypophosphatemic patient. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(3):696-706.
3. Singh AK, Williams GH. *Textbook of nephro-endocrinology*. 1st ed. Amsterdam; Boston ; London: Academic; 2009.
4. Christov M, Jüppner H. Phosphate homeostasis disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2018 Oct;32(5):685-706.
5. Virkki L, Biber J, Murer H, Forster I. Phosphate transporters: a tale of two solute carrier families. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293:F643-54.
6. Biber J, Murer H. A molecular view of renal Na-dependent phosphate transport. *Renal Physiol Biochem* 1994; 17:212-5.
7. Giles MM, Fenton MH, Shaw B, et al. Sequential calcium and phosphorus balance studies in preterm infants. *J Pediatr*. 1987;110(4):591-598.
8. Bergwitz C, Jüppner H. Regulation of Phosphate Homeostasis by PTH, Vitamin D, and FGF23. *Annu Rev Med* 2010; 61: 91–104.
9. Malluche HH, Koszewski N, MonierFaugere MC, Williams JP, Mawad H. Influence of the parathyroid glands on bone metabolism. *Eur J Clin Invest* 36 2006; 2:23-33. 15.
10. Dusso, AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289:F8-28.
11. Shimada T, Mizutani S, Muto T, et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(11):6500-6505.
12. Martin A., David V., Quarles L. D. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiological Reviews* 2012;92(1):131–155.
13. ADHR Consortium. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nature Genetics*. 2000;26:p. 345.
14. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic

- nucleus of the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;277:494–498.
15. Krajsnik T, Bjo rklund P, Marsell R et al. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol* 2007; 195:125-31
 16. Di Loreto VE, Lombarte M, Rigalli A. Reguladores clásicos y noveles del metabolismo del fosfato. *Actual. Osteol* 2010; 6(3): 194-205.
 17. Liu S, Zhou J, Tang W, Menard R, Feng JQ, Quarles LD. Pathogenic role of Fgf23 in Dmp1-null mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295:E254-61.
 18. Jain A, Fedarko NS, Collins MT et al. Serum levels of matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) in normal humans correlate with serum phosphorus, parathyroid hormone and bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:4158-61.
 19. Saito H, Maeda A, Othomo S et al. Circulating FGF23 is regulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and phosphorus in vivo. *J Biol Chem* 2005; 280:2543-9. 35.
 20. Kurpas A, Supel K, Idzikowska K, Zielińska M. FGF23: A Review of Its Role in Mineral Metabolism and Renal and Cardiovascular Disease. *Dis Markers*, 2021 May 17;2021:8821292.
 21. Ferrari SL, Bonjour JP, Rizzoli R. Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *J Clin Endocr Metab* 2005; 90(3):1519-24.
 22. Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD. Pathogenic role of FGF23 in Hyp mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291:E38-49.
 23. Liu S., Quarles L. D. How fibroblast growth factor 23 works. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2007;18(6):1637–1647.
 24. Simmonds C.S., Kovacs C.S. Role of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) in regulating mineral homeostasis during fetal development. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20(3):235–273.
 25. Kovacs CS, Calcium, phosphorus, and bone metabolism in the fetus and newborn, *Early Hum Dev* 2015, 91: 623-628
 26. Bozzetti V, Tagliabue P. Metabolic Bone Disease in preterm newborn: an update on nutritional issues. *Ital J Pediatr.* 2009 Jul 14;35(1):20.

27. Chacham, S., Pasi, R., Chegondi, M., Ahmad, N., Mohanty, S.B., 2020. *Metabolic Bone Disease in Premature Neonates: An Unmet Challenge. Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology* 12, 332–339..
Greer FR. Osteopenia of prematurity. *Annu Rev Nutr* 1994;14:169–85.
28. Vachharajani AJ, Mathur AM, Rao R. Metabolic bone disease of prematurity. *NeoReviews* 2009;10:e402–11.
29. Pieltain C, de Halleux V, Senterre T, Rigo J. Prematurity and bone health. *World Rev Nutr Diet.* 2013;106:181-8.
30. Takada M, Shimada M, Hosono S, Tauchi M, Minato M, Takahashi S, Okuni M, Takeuchi S. Trace elements and mineral requirements for very low birth weight infants in rickets of prematurity. *Early Hum Dev.* 1992 Jun-Jul;29(1-3):333-8.
31. Backström MC, Kuusela AL, Mäki R. Metabolic bone disease of prematurity. *Ann Med.* 1996 Aug;28(4):275-82.
32. Rustico SE, Calabria AC, Garber SJ. Metabolic bone disease of prematurity. *J Clin Transl Endocrinol.* 2014 Jul 4;1(3):85-91.
33. Chinoy A, Mughal MZ, Padidela R. Metabolic bone disease of prematurity: causes, recognition, prevention, treatment and long-term consequences. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* 2019;104:F560-F566.
34. Koo WW, Sherman R, Succop P, Krug-Wispe S, Tsang RC, Steichen JJ, Crawford AH, Oestreich AE. Fractures and rickets in very low birth weight infants: conservative management and outcome. *J Pediatr Orthop* 1989;9:326-330
35. Dabezies EJ, Warren PD. Fractures in very low birth weight infants with rickets. *Clin Orthop Relat Res* 1997;335:233–9.
36. Viswanathan S, Khasawneh W, McNelis K, et al. Metabolic bone disease: a continued challenge in extremely low birth weight infants. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2014;38:982–90.
37. Lucas A, Brooke OG, Baker BA, et al. High alkaline phosphatase activity and growth in preterm neonates. *Arch Dis Child* 1989;64:902–9. 20
38. Fewtrell MS, Cole TJ, Bishop NJ, et al. Neonatal factors predicting childhood height in preterm infants: evidence for a persisting effect of early metabolic bone disease? *J Pediatr* 2000;137:668–73.

39. Abrams SA, Committee on Nutrition. Calcium and vitamin d requirements of enterally fed preterm infants. *Pediatrics* 2013; 131:e1676
40. Chen W, Yang C, Chen H, et al. Risk factors analysis and prevention of metabolic bone disease of prematurity. *Medicine* 2018;97:e12861.
41. Ukarapong S, Venkatarayappa SKB, Navarrete C, et al. Risk factors of metabolic bone disease of prematurity. *Early Hum Dev* 2017;112:29–34.
42. Avila-Alvarez A, Urisarri A, Fuentes-Carballal J, Mandiá N, Sucasas-Alonso A, Couce ML. Metabolic Bone Disease of Prematurity: Risk Factors and Associated Short-Term Outcomes. *Nutrients*. 2020 Dec 10;12(12):3786.
43. Salle BL, Delvin EE, Lapillonne A, Bishop NJ, Glorieux FH. Perinatal metabolism of vitamin D. *Am J Clin Nutr*. 2000 May;71(5 Suppl):1317S-24S.
44. Faienza MF, D'Amato E, Natale MP, Grano M, Chiarito M, Brunetti G, D'Amato G. Metabolic Bone Disease of Prematurity: Diagnosis and Management. *Front Pediatr* 2019;7:143
45. Christmann V, Gradussen CJ, Körnmann MN, Roeleveld N, van Goudoever JB, van Heijst AF. Changes in biochemical parameters of the calciumphosphorus homeostasis in relation to nutritional intake in very-low-birthweight infants. *Nutrients* 2016;8:764.
46. Chin LK, Doan J, Teoh YS, Stewart A, Forrest P, Simm PJ. Outcomes of standardised approach to metabolic bone disease of prematurity. *J Padiatr Child Health* 2017;54:665-670.
47. Lee SYR. Prevention of metabolic bone disease of prematurity by optimizing calcium and phosphate contents in parenteral nutrition for premature infants. *J Hum Nutr Food Sci* 2017;5:1106.
48. Harrison CM, Johnson K, McKechnie E. Osteopenia of prematurity: a national survey and review of practice. *Acta Paediatr* 2008;97:407-413.
49. Bandara S, Kariyawasam A. Incidence of osteopenia of prematurity in preterm infants who were exclusively fed breast milk. *Early Hum Dev*. (2010) 86:S18.
50. Adamkin DH, Radmacher PG. Current trends and future challenges in neonatal parenteral nutrition. *J Neonatal Perinatal Med*. (2014) 7:157–64.

51. Mimouni FB, Mandel D, Lubetzky R, Senterre T. Calcium, phosphorus, magnesium and vitamin D requirements of the preterm infant. *World Rev Nutr Diet.* (2014) 110:140–51
52. Montaner Ramón A. Risk factors of bone mineral metabolic disorders. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2020 Feb;25(1):101068.
53. Stalnaker KA, Poskey GA. Osteopenia of prematurity: does physical activity improve bone mineralization in preterm infants? *Neonatal Netw* 2016;35:95-104.
54. Miller ME. The bone disease of preterm birth: a biomechanical perspective. *Pediatr Res.* 2003;53(1):10-15.
55. Chen HL, Lee CL, Tseng HI, Yang SN, Yang RC, Jao HC. Assisted exercise improves bone strength in very low birthweight infants by bone quantitative ultrasound. *J Paediatr Child Health.* 2010;46:653-659.
56. Schulzke SM, Kaempfen S, Trachsel D, Patole SK. Physical activity programs for promoting bone mineralization and growth in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;(4):CD005387.
57. Catache M, Leone CR. Role of plasma and urinary calcium and phosphorus measurements in early detection of phosphorus deficiency in very low birthweight infants. *Acta Paediatr.* (2003) 92:76–80.
58. Backström MC, Kouri T, Kuusela AL, Sievänen H, Koivisto AM, Ikonen RS, et al. Bone isoenzyme of serum alkaline phosphatase and serum inorganic phosphate in metabolic bone disease of prematurity. *Acta Paediatr.* (2000) 89:867e73.
59. Tsakalidis C, Dokos C, Tragiannidis A, Rallis D, Nikolaidis N. Gestational age, body weight and bone metabolism markers in premature infants: a single institution experience of Northern Greece. *Acta Paediatr.* (2010) 99:99.
60. Hung YL, Chen PC, Jeng SF, Hsieh CJ, Peng SS, Yen RF, et al. Serial measurements of serum alkaline phosphatase for early prediction of osteopaenia in preterm infants. *J Paediatr Child Health.* (2011) 47:134–9.
61. Moreira A, February M, Geary C. Parathyroid hormone levels in neonates with suspected osteopenia. *J Paediatr Child Health.* (2013) 49:E12e6.

62. Pohlandt F, Mihatsch WA. Reference values for urinary calcium and phosphorus to prevent osteopenia of prematurity. *Pediatr Nephrol.* (2004) 19:1192–3.
63. Koo WW, Gupta JM, Nayanar VV, Wilkinson M, Posen S. Skeletal changes in preterm infants. *Arch Dis Child.* (1982) 57:447–52. doi: 10.1136/adc.57.6.447
64. Rehman MU, Narchi H. Metabolic bone disease in the preterm infant: current state and future directions. *World J Methodol.* (2015) 5:115–21.
65. Brailon PM, Salle BL, Brunet J, Glorieux FH, Delmas PD, Meunier PJ. Dual energy x-ray absorptiometry measurement of bone mineral content in newborns: validation of the technique. *Pediatr Res.* 1992 Jul;32(1):77-80.
66. Gilsanz V. Bone density in children: a review of the available techniques and indications. *Eur J Radiol.* 1998 Jan;26(2):177-82.
67. Rigo J, Nyamugabo K, Picaud JC, Gerard P, Pieltain C, De Curtis M. Reference values of body composition obtained by dual energy X-ray absorptiometry in preterm and term neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* (1998) 27:184–90.
68. Figueras-Aloy J, Álvarez-Domínguez E, Pérez-Fernández JM, MoretonesSuñol G, Vidal-Sicart S, Botet-Mussons F. Metabolic bone disease and bone mineral density in very preterm infants. *J Pediatr.* (2014) 164:499–504.
69. Altuncu E, Akman I, Yurdakul Z, Ozdogan T, Solakoglu M, Selim N, et al. Quantitative ultrasound and biochemical parameters for the assessment of osteopenia in preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med.* (2007) 2007:401–405.
70. Betto M, Gaio P, Ferrini I, De Terlizzi F, Zambolin M, Scattolin S, et al. Assessment of bone health in preterm infants through quantitative ultrasound and biochemical markers. *J Matern Fetal Neonatal Med.* (2014) 27:1343–7.
71. Rack B, Lochmüller EM, Janni W, Lipowsky G, Engelsberger I, Friese K, et al. Ultrasound for the assessment of bone quality in preterm and term infants. *J Perinatol.* (2012) 32:218–26.

72. Goldstein I, Lockwood C, Belanger K, Hobbins J. Ultrasonographic assessment of gestational age with the distal femoral and proximal tibial ossification centers in the third trimester. *Am J Obstet Gynecol.* 1988 Jan;158(1):127-30.
73. Donne HD Jr, Faúndes A, Tristão EG, de Sousa MH, Urbanetz AA. Sonographic identification and measurement of the epiphyseal ossification centers as markers of fetal gestational age. *J Clin Ultrasound.* 2005 Oct;33(8):394-400.
74. Windschall D, Pommerenke M, Haase R. Ultrasound assessment of the skeletal development of the proximal tibial, proximal femoral, and distal femoral epiphyses in premature and mature newborns. *Ultrasound in Med. & Biol., Vol. 42, No. 2, pp. 451–458, 2016*
75. Agostoni C, Buonocore G, Carnielli VP, et al. Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; 50:85.
76. Koletzko B, Poindexter B, Uauy R (Eds), Karger, Basel, Switzerland 2014. *Nutritional care of preterm infants: Scientific basis and practical guidelines.*
77. Kelly A, Kovatch KJ, Garber SJ. Metabolic bone disease screening practices among U. S. neonatologists. *Clin Pediatr* 2014;53:1077–83.
78. BCNatal (Centro de Medicina Fetal y Neonatal de Barcelona). *Enfermedad metabólica ósea [Archivo PDF].*
79. Narváez Barros A, Linde Sillo A, Clemente León M, Campos Martorell A, Yeste Fernandez D, Carrascosa Lescano A. 2014. *Protocolo de prevención de la osteopenia de la prematuridad/raquitismo [Archivo PDF].*
80. Sáenz de Pipaón M, Zozaya C, Montes MT, Triana M, Fernández Caamaño B, del Pozo S. *Nutrición del recién nacido prematuro [Archivo PDF].*
81. Lyon AJ, McIntosh N, Wheeler K, et al. Radiological rickets in extremely low birthweight infants. *Pediatr Radiol* 1987;17:56–8.
82. Mitchell SM, Rogers SP, Hicks PD, et al. High frequencies of elevated alkaline phosphatase activity and rickets exist in extremely low birth weight infants despite current nutritional support. *BMC Pediatr* 2009;9:47.

83. Yuen SN, Kramer H, Luke A, Bovet P, Plange-Rhule J, Forrester T, Lambert V, Wolf M, Camacho P, Harders R, Dugas L, Cooper R, Durazo-Arvizu R. *Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) Levels Differ Across Populations by Degree of Industrialization.* *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 May;101(5):2246-53.
84. Marsell R, Grundberg E, Krajsnik T, Mallmin H, Karlsson M, Mellström D, Orwoll E, Ohlsson C, Jonsson K.B., Ljunggren Ö, Larsson T.E., 2008. *Fibroblast growth factor-23 is associated with parathyroid hormone and renal function in a population-based cohort of elderly men.* *European Journal of Endocrinology* 158, 125–129
85. Gkentzi D, Efthymiadou A, Kritikou D, Chrysis D. *Fibroblast growth factor 23 and Klotho serum levels in healthy children.* *Bone.* 2014 Sep;66:8-14.
86. Enlund-Cerullo M, Hauta-Alus H, Valkama S, Rosendahl J, Andersson S, Mäkitie O, Holmlund-Suila E. *Fibroblast growth factor 23 concentrations and modifying factors in children from age 12 to 24 months.* *Bone.* 2020 Dec;141:115629.
87. Holmlund-Suila E, Viljakainen H, Ljunggren Ö, Hytinen T, Andersson S, Mäkitie O. *Fibroblast Growth Factor 23 Concentrations Reflect Sex Differences in Mineral Metabolism and Growth in Early Infancy.* *Horm Res Paediatr.* 2016;85(4):232-41.
88. Gallini F, Maggio L, Romagnoli C, Marrocco G, Tortorolo G. *Progression of renal function in preterm neonates with gestational age < or = 32 weeks.* *Pediatr Nephrol.* 2000 Nov;15(1-2):119-24.
89. Lee JH, Hahn WH, Ahn J, Chang JY, Bae CW. *Serum cystatin C during 30 postnatal days is dependent on the postconceptional age in neonates.* *Pediatr Nephrol.* 2013;28:1073-8.
90. Tschoeke SK, Oberholzer A, Moldawer LL. *Interleukin-18: a novel prognostic cytokine in bacteria-induced sepsis.* *Crit Care Med.* 2006;34:1225–1233.
91. Conti M, Moutereau S, Zater M, Lallali K, Durrbach A, Manivet P, Eschwege P, Loric S. *Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction.* *Clin Chem Lab Med.* 2006;44:288–291.
92. Herget-Rosenthal S, Wijk JA, Brocker-Preuss M, Bokenkamp A. *Increased urinary cystatin C reflects structural and functional renal tubular*

- impairment independent of glomerular filtration rate. Clin Biochem. 2007;40:946–951.*
93. Askenazi DJ, Montesanti A, Hundley H, Koralkar R, Pawar P, Shuaib F, Liwo A, Devarajan P, Ambalavanan N. Urine biomarkers predict acute kidney injury and mortality in very low birth weight infants. *J Pediatr.* 2011 Dec;159(6):907-12.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2011.05.045. Epub 2011 Jul 23.
94. Li Y, Fu C, Zhou X, Xiao Z, Zhu X, Jin M, Li X, Feng X. Urine interleukin-18 and cystatin-C as biomarkers of acute kidney injury in critically ill neonates. *Pediatr Nephrol.* 2012 May;27(5):851-60. doi: 10.1007/s00467-011-2072-x. Epub 2012 Jan 8.
95. Askenazi DJ, Koralkar R, Patil N, Halloran B, Ambalavanan N, Griffin R. Acute Kidney Injury Urine Biomarkers in Very Low-Birth-Weight Infants. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016 Sep 7;11(9):1527-35. doi: 10.2215/CJN.13381215. Epub 2016 Jul 28.
96. Askenazi DJ, Koralkar R, Levitan EB, Goldstein SL, Devarajan P, Khandrika S, Mehta RL, Ambalavanan N. Baseline values of candidate urine acute kidney injury biomarkers vary by gestational age in premature infants. *Pediatr Res.* 2011;70:302–306.
97. Askenazi DJ, Halloran BA, Heagerty PJ, Schmicker RH, Brophy P, Juul SE, Hingorani S, Goldstein SL; PENUT Trial Consortium. Gestational age, sex, and time affect urine biomarker concentrations in extremely low gestational age neonates. *Pediatr Res.* 2022 Jul;92(1):151-167.
98. De Carvalho JA, Piva SJ, Hausen BS, Bochi GV, Kaefer M, Coelho AC, Duarte MM, Moresco RN. Assessment of urinary γ -glutamyltransferase and alkaline phosphatase for diagnosis of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta.* 2011 Jul 15;412(15-16):1407-11.
99. Matheson A, Willcox MD, Flanagan J, Walsh BJ. Urinary biomarkers involved in type 2 diabetes: a review. *Diabetes Metab Res Rev.* 2010 Mar;26(3):150-71.
100. Endre ZH, Pickering JW, Walker RJ, Devarajan P, Edelstein CL, Bonventre JV, Frampton CM, Bennett MR, Ma Q, Sabbisetti VS, Vaidya VS, Walcher AM, Shaw GM, Henderson SJ, Nejat M, Schollum JB, George PM. Improved performance of urinary biomarkers of acute kidney

- injury in the critically ill by stratification for injury duration and baseline renal function. Kidney Int. 2011 May;79(10):1119-30.*
101. De Carvalho JA, Bochi GV, Sangoi MB, Moresco RN. *Assessment of urinary γ -glutamyltransferase in type 2 diabetic patients with glomerular hyperfiltration. Clin Chim Acta. 2012 Apr 11;413(7-8):817-8.*
 102. Bollick YS, de Carvalho JAM, Tatsch E, Hausen BS, Moresco RN. *Reference limits of the urinary gamma-glutamyltransferase in a healthy population and effects of short-term storage on the enzyme activity. Clin Chim Acta. 2018 Jul;482:46-49.*
 103. Westhuyzen J, Endre ZH, Reece G, Reith DM, Saltissi D, Morgan TJ. *Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. Nephrol Dial Transplant. 2003 Mar;18(3):543-51.*
 104. Visser F, Sprij AJ, Brus F. *The validity of biochemical markers in metabolic bone disease in preterm infants: a systematic review. Acta Paediatr. 2012 Jun;101(6):562-8.*
 105. Tiosano D, Hochberg Z. *Hypophosphatemia: the common denominator of all rickets. J Bone Miner Metab 2009;27:392–401.*
 106. Sabbagh Y, Carpenter TO, Demay MB (2005) *Hypophosphatemia leads to rickets by impairing caspase-mediated apoptosis of hypertrophic chondrocytes. Proc Natl Acad Sci USA 102:9637– 9642*
 107. Beck GR Jr. *Inorganic phosphate as a signalling molecule in osteoblast differentiation. J Cell Biochem 2003. 90:234–243 31.*
 108. Beck GR Jr, Moran E, Knecht N (2003) *Inorganic phosphate regulates multiple genes during osteoblast differentiation, including Nrf2. Exp Cell Res 2003. 288:288–300.*
 109. Llorente-Pelayo S, Docio P, Lavin-Gomez B, Garcia-Unzueta MT, De las Cuevas I, De la Rubia L, Cabero-Perez MJ, González-Lamuño D. *Modified Serum ALP Values and Timing of Apparition of Knee Epiphyseal Ossification Centers in Preterm Infants with Cholestasis and Risk of Concomitant Metabolic Bone Disease of Prematurity. Nutrients 2020, 12, 3854.*

110. Nehra D, Carlson SJ, Fallon EM, et al. A.S.P.E.N. clinical guidelines: nutrition support of neonatal patients at risk for metabolic bone disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2013;37:570–98.
111. Mulla S, Stirling S, Cowey S, et al. Severe hypercalcaemia and hypophosphataemia with an optimised preterm parenteral nutrition formulation in two epochs of differing phosphate supplementation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2017;102:F451–F455.
112. Mihatsch W, Fewtrell M, Goulet O, et al. ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition: Calcium, phosphorus and magnesium. *Clin Nutr* 2018;37:2360–5.
113. Perwad F, Azam N, Zhang MY, Yamashita T, Tenenhouse HS, Portale AA (2005) Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in mice. *Endocrinology* 146:5358–5364
114. Smith E. R., McMahon L. P., Holt S. G. Method-specific differences in plasma fibroblast growth factor 23 measurement using four commercial ELISAs. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2013;51(10):1971–1981.

8- ANEXOS

8.1. Cuaderno de recogida de datos

Datos generales:

- N° de registro:
- Sexo: V M
- Edad gestacional (semanas):
- Fecha de nacimiento: __/__/__ (día/mes/año)
- Gemelaridad: SI NO
- Peso al nacimiento: (p) Talla: (p) PC: (p)
- Peso 1er mes: (p) Talla: (p) PC: (p)
- Ganancia ponderal semanal:
- Peso 2o mes: (p) Talla: (p) PC: (p)
- Ganancia ponderal semanal:
- Tipo de alimentación (al momento del análisis bioquímico):
 - Nutrición enteral: ml/kg/d Kcal/kg/d Tipo de fórmula:
 - Nutrición parenteral: Kcal/kg/d Composición:
- Inicio de nutrición enteral:
- Inicio de nutrición parenteral:
- Inicio de fortificación de LM:
- Días de nutrición enteral:
- Días de nutrición parenteral:
- Día de inicio de la movilización en canguro:
- Medicaciones y dosis (al momento del análisis bioquímico):
- Enfermedad metabólica ósea: SI NO
- Otras enfermedades del paciente:

Parámetros bioquímicos

Fecha: Días de vida:

Glucosa (mg/dL)

Urea (mg/dL)

Cr (mg/dL)

CisC (mg/L)

CKD-EPI (ml/min/1,73m²)

Na (mEq/L)

K (mEq/L)

Cl (mEq/L)

tCa (mg/dL)

P (mg/dL)

Mg (mg/dL)

FA (IU/L)

FAO (IU/L)

GGT (IU/L)

AST (IU/L)

ALT (IU/L)

BT (mg/dL)

BD (mg/dL)

Prealbúmina (mg/dL)

PTH (pg/mL)

25-OH-Vit D (ng/mL)

1-25-2OH-vit D (pg/mL)

FGF23 (pg/mL)

uCa/uCr

uP/uCr

uGGT/uCr

uCistatinaC/uCr

Parámetros ecográficos:

Núcleo de osificación femoral distal:

Presencia: Fecha: EPM:

- Diámetro longitudinal:
- Diámetro transversal:
- Grosor del cartílago:
 - o Longitudinal:
 - o Transversal:

Núcleo de osificación tibial proximal

Presencia: Fecha: EPM:

- Diámetro longitudinal:
- Diámetro transversal:
- Grosor del cartílago:
 - o Longitudinal:
 - o Transversal:

8.2. Hoja de información al paciente

TÍTULO DEL ESTUDIO: REGULACIÓN DEL FÓSFORO EN EL NIÑO PREMATURO Y SU PAPEL EN LA ENFERMEDAD METABÓLICA ÓSEA DE LA PREMATURIDAD.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: DOMINGO GONZÁLEZ-LAMUÑO LEGUINA

CENTRO: HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA

INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente y respeta la normativa vigente.

Nuestra intención es proporcionarle información adecuada y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en el estudio. Para ello lea con atención esta hoja informativa y luego podrá preguntar cualquier duda que le surja relativa al estudio. Además puede consultar con cualquier persona que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Su participación en este estudio es voluntaria y puede decidir no participar. En caso de que decida participar en el estudio puede cambiar su decisión y retirar su consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico y sin que se produzca perjuicio alguno en su tratamiento. Los derechos de acceso, rectificación, supresión de sus datos, y la limitación u oposición a su tratamiento pueden ejercitarlos ante el Dr. Domingo González-Lamuño del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Los niños prematuros tienen que ir desarrollando los diferentes aparatos del cuerpo humano durante sus primeros meses de vida para un crecimiento

adecuado. Uno de estos aparatos es el hueso. Para el correcto desarrollo de éste último, necesitamos unos niveles adecuados de calcio y fósforo, dos iones que están presentes en la sangre de todas las personas. Sin embargo, cuando el equilibrio de estos dos últimos no está controlado, el hueso puede sufrir problemas de crecimiento, y este control se considera aún más importante durante los primeros meses de vida. Nuestro trabajo consistiría en estudiar todas aquellas sustancias que participan en este equilibrio, y de esta manera poder actuar sobre él a nuestro favor para conseguir que los huesos se desarrollen con normalidad.

La investigación se desarrollará con el máximo respeto de los derechos individuales, según los postulados aceptados internacionalmente por las Naciones Unidas y la Comisión Europea (declaración de Helsinki). Por ello, todas las investigaciones que se lleven a cabo contarán con la aprobación y supervisión de los diferentes Comités de Ética quienes velarán por el cumplimiento de los postulados anteriormente citados. Este estudio se realizará según la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Beneficios de la participación en el estudio.

La participación en el estudio no conlleva ningún beneficio económico para el sujeto participante en el estudio y no le supone coste alguno.

Se espera mejorar el conocimiento científico relativo a la Enfermedad Metabólica Ósea de la Prematuridad, y puede que otros pacientes se beneficien en el futuro. Es posible que usted no reciba ningún beneficio directo en su salud por su participación en este estudio, aunque tampoco conlleva riesgo alguno excepto el derivado de la extracción de la muestra de sangre y recogida de orina que se realiza de forma convencional. La ecografía constituye una prueba diagnóstica no invasiva, y por lo tanto sin riesgos.

Si su médico del estudio considera que seguir participando puede suponer un riesgo para su salud puede retirarle del mismo aún sin su consentimiento.

PROCEDIMIENTO

Este estudio cumple la normativa vigente de la Ley 14/2007 de investigación biomédica en cuanto a la protección de los derechos de los pacientes que quieran libremente participar y el manejo de muestras biológicas.

La muestra de sangre se obtendrá mediante un procedimiento de venopunción, coincidiendo con la extracción del perfil bioquímico que se realiza en la Unidad Neonatal durante la cuarta semana de vida, en aquellos pacientes que cumplen los requerimientos pertinentes (<32 semanas de edad gestacional y/o 1500 gr de peso al nacimiento); para la realización de este estudio se precisa de 1 ml. Por otra parte, se procederá a la recogida simultánea de una muestra de orina mediante bolsa colectora.

Una vez recogidas las muestras, se enviarán por tubo neumático al Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, donde se procesarán y se almacenará el sobrante en congeladores.

Se realizará asimismo un primer estudio ecográfico a la cuarta semana de vida para evaluar la presencia de núcleos de osificación a nivel femoral y tibial, que se repetirá periódicamente cada 2-4 semanas hasta confirmar su formación.

CONFIDENCIALIDAD

El procesamiento de los datos personales se realizará según el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos, y su regulación en España a través de la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre de protección de datos personales y garantía de los derechos digitales. No se cederán datos a terceros, salvo obligación legal. Se le informa de que tiene derecho de acceso,

rectificación, supresión de sus datos, y la limitación u oposición a su tratamiento. Además, podrá ampliar información en materia de protección de datos en la siguiente dirección web: <https://www.idival.org/es/Política-de-Privacidad> Con base en las explicaciones previas se solicita su consentimiento para el tratamiento de sus datos personales para los fines anteriormente indicados.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código de forma que no sea posible la identificación del paciente. Sólo el investigador y personas autorizadas relacionadas con el estudio tendrán acceso a dicho código y se comprometen a usar esta información exclusivamente para los fines planteados en el estudio. Los miembros del Comité Ético de Investigación Clínica o Autoridades Sanitarias pueden tener acceso a esta información en cumplimiento de requisitos legales. Se preservará la confidencialidad de estos datos y no podrán ser relacionados con usted, incluso aunque los resultados del estudio sean publicados.

Tienes derecho a no ser informado de los resultados de los análisis realizados. Cuando esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para ti, se te podrá solicitar ser informado. En todo caso, la comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para estas finalidades.

DATOS DE CONTACTO

Si tiene dudas en cualquier momento puede contactar con:

1.Dr. Domingo González-Lamuño Leguina

E-mail: domingo.gonzalezlamuno@scsalud.es

2.Dra. Sandra Llorente Pelayo

E-mail: sandra.llorente@scsalud.es

3.Dr. Pablo Docio Pérez

E-mail: pablo.docio@scsalud.es

8.3. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO: REGULACIÓN DEL FÓSFORO EN EL NIÑO PREMATURO Y SU PAPEL EN LA ENFERMEDAD METABÓLICA ÓSEA DE LA PREMATURIDAD.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: DOMINGO GONZÁLEZ-LAMUÑO LEGUINA

CENTRO: HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA

D./Dña. _____

(Nombre y apellidos del paciente en MAYÚSCULAS)

He leído y comprendido la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio arriba indicado.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He realizado todas las preguntas que he precisado sobre el estudio.

He hablado con el Dr./Dra. SANDRA LLORENTE PELAYO/PABLO DOCIO PÉREZ con quien he clarificado las posibles dudas.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin dar explicaciones
- Sin que repercuta en mis cuidados médicos

Comprendo que la información personal que aporte será confidencial y no se mostrará a nadie sin mi consentimiento.

Comprendo que mi participación en el estudio implica autorizar ...

Y presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma del investigador

Firma del paciente

Fecha _____

(la fecha debe estar cumplimentada de puño y letra por el paciente)

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. _____

retiro el consentimiento otorgado para mi participación en el estudio arriba citado.

Fecha y firma:

8.4. Difusión de resultados y publicaciones

ARTICULOS CIENTÍFICOS:

- Llorente-Pelayo S, Docio P, Lavín-Gómez BA, García-Unzueta MT, de Las Cuevas I, de la Rubia L, Cabero-Pérez MJ, González-Lamuño D. Modified Serum ALP Values and Timing of Apparition of Knee Epiphyseal Ossification Centers in Preterm Infants with Cholestasis and Risk of Concomitant Metabolic Bone Disease of Prematurity. *Nutrients*. 2020 Dec 17;12(12):3854.
- Llorente-Pelayo S, Docio P, Arriola S, Lavín-Gómez BA, García-Unzueta MT, Ballesteros MA, Cabero-Pérez MJ, González-Lamuño D. Role of Fibroblast Growth Factor-23 as an early marker of Metabolic Bone Disease of Prematurity. *BMC pediatrics* (sometido). Preprint Research Square. November 14th, 2023. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3569877/v1>

COMUNICACIONES:

- "Fosfatasa Alcalina Modificada como parámetro diferenciador en pacientes prematuros con colestasis neonatal y riesgo de enfermedad metabólica ósea de la prematuridad". XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica. 23-25 Septiembre 2021. Santiago de Compostela.
- "Factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23) como biomarcador precoz de enfermedad metabólica ósea de la prematuridad". XXIX Congreso de Neonatología y Medicina Perinatal. 4-6 Octubre 2023. Santiago de Compostela.