



## Asociación de niveles séricos de paratohormona intacta con marcadores de enfermedad metabólica ósea en prematuros

Alma Gloria Nieto-Flores,<sup>1,\*</sup> José Luis Pinacho-Velázquez,<sup>2</sup> José Iglesias-Leboreiro,<sup>3</sup>  
Isabel Bernárdez-Zapata,<sup>4</sup> Angélica Martínez Ramos-Méndez,<sup>5</sup> Aída Pérez-Lara,<sup>6</sup> Marco Acuña-Tovar<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Pediatra y Neonatóloga del Hospital Español de México; <sup>2</sup> Presidente de la Asociación Mexicana de Pediatría; <sup>3</sup> División de Pediatría y Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales Hospital Español de México; <sup>4</sup> Cúnero Fisiológico del Hospital Español de México; <sup>5</sup> Endocrinóloga Pediatra, Asociada del Hospital Español de México; <sup>6</sup> Departamento de Radiología Pediátrica del Hospital Español de México; <sup>7</sup> Ortopedista y Traumatólogo. Ciudad de México.

### RESUMEN

**Introducción:** La enfermedad metabólica ósea (EMO) es frecuente en prematuros. Estudios recientes sugieren que el nivel sérico de paratohormona intacta (PTHi) podría ser un buen marcador en esta enfermedad. El objetivo de este estudio es determinar la asociación de los niveles séricos de PTHi con marcadores de EMO en prematuros. **Material y métodos:** Estudio observacional y longitudinal realizado en una unidad de cuidados intensivos neonatales de un hospital privado de la Ciudad de México. Se midieron marcadores de resorción ósea (calcio, fósforo, magnesio, fosfatasa alcalina, PTHi) y radiografías de huesos largos a las 24 h y a las dos semanas de vida. Se realizó regresión logística para determinar factores asociados con elevación de PTHi. **Resultados:** Se incluyeron 40 prematuros (40% masculinos/60% femeninos). El día uno y 14 de vida extrauterina se detectó elevación de PTHi en 50% y 43.8%, e hiperfosfatemia en 67.5% y 62.5%, respectivamente. Se elevaron los niveles de fosfatasa alcalina a los 14 días en comparación con el primer día ( $p < 0.05$ ). Los niveles de PTHi a los 14 días se correlacionaron inversamente con peso y talla al nacer, mientras que los niveles de PTHi en el primer día de vida se

### ABSTRACT

**Introduction:** Bone metabolic disease (BMD) is common in preterm infants. Recent studies suggest that serum intact parathyroid hormone (iPTH) could be a good marker for this disease. The aim of this study is to determine the association of serum levels of iPTH with BMD markers in preterm infants. **Material and methods:** Observational and longitudinal study performed in a neonatal intensive care unit of a private hospital in Mexico City. Bone resorption markers (calcium, phosphorus, magnesium, alkaline phosphatase, iPTH) and x-rays of long bones were measured at 24 h and at two weeks of life. Logistic regression was performed to determine factors associated with elevation of iPTH. **Results:** We included 40 premature (40% male / 60% female). On day one and 14 of extra-uterine life, elevation of iPTH was detected in 50% and 43.8%, and hyperphosphatemia in 67.5% and 62.5%, respectively. Alkaline phosphatase levels were elevated at 14 days compared to the first day ( $p < 0.05$ ). iPTH levels at 14 days were inversely correlated with weight and height at birth, while iPTH levels on the first day of life were correlated inversely with calcium and alkaline phosphatase two weeks. Factors associated with elevation of iPTH were birth weight,

\* Correspondencia: AGNF, almitanieto@hotmail.com

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no tienen.

**Citar como:** Nieto-Flores AG, Pinacho-Velázquez JL, Iglesias-Leboreiro J, Bernárdez-Zapata I, Martínez Ramos-Méndez A, Pérez-Lara A et al. Asociación de niveles séricos de paratohormona intacta con marcadores de enfermedad metabólica ósea en prematuros. Rev Mex Pediatr 2018; 85(6):201-206.

[Association of serum levels of intact parathormone with markers of metabolic bone disease in premature infants]

correlacionaron inversamente con calcio y fosfatasa alcalina a las dos semanas. Los factores asociados con elevación de PTHi fueron peso al nacimiento, calcio corregido y fosfemia. **Conclusiones:** En prematuros parece ser apropiado medir PTHi, junto con otros marcadores de resorción ósea, para determinar la presencia de EMO.

**Palabras clave:** PTHi, enfermedad ósea metabólica, prematuros, calcio, fósforo.

corrected calcium, and phosphemia. **Conclusions:** In premature seems appropriate measure iPTH, along with other markers of bone resorption, for the presence of BMD.

**Key words:** iPTH, metabolic bone disease, premature, calcium, phosphorus.

## INTRODUCCIÓN

La definición de enfermedad metabólica ósea (EMO) varía en la literatura y no existe un consenso sobre su diagnóstico en prematuros. Rustico y cols. definieron la EMO como una disminución del contenido mineral óseo en relación con el nivel esperado de mineralización para un feto o lactante de tamaño o edad gestacional comparable, además de alteraciones bioquímicas (hipocalcemia, hipofosfatemia) o radiográficas (osteopenia, “cambios raquíuticos y/o adelgazamiento de la cortical”).<sup>1</sup>

La EMO se ha reportado en 23% de los recién nacidos de muy bajo peso al nacer (MBPN).<sup>2,3</sup> Otros factores de riesgo de EMO del recién nacido incluyen la alimentación con leche materna, género masculino, uso de corticosteroides, síndromes genéticos como Prader-Willi, deficiencia de vitamina D secundaria a la alimentación al seno materno exclusiva sin aporte, alteraciones renales y otras condiciones asociadas con deficiencia de vitamina D.<sup>4,5</sup>

En el abordaje diagnóstico de EMO se recomienda la medición seriada de calcio, fósforo y fosfatasa alcalina. También se ha considerado medir la reabsorción tubular de potasio.<sup>6,7</sup>

Es de señalar que estudios recientes han revelado que los niveles de paratohormona intacta (PTHi) se encuentran elevados en prematuros con MBPN<sup>8</sup> en cifras incluso superiores a 200 pg/mL (cuatro veces el valor normal); sin embargo, en la actualidad no se considera medir PTHi en las recomendaciones.<sup>9</sup>

Con base en lo anterior y dado que la PTHi se secreta cuando hay hipocalcemia (lo cual forma parte de la EMO), en el presente estudio se planeó para determinar la asociación de los niveles séricos de PTHi con marcadores de enfermedad metabólica ósea (calcio, fósforo, fosfatasa alcalina) y cambios radiológicos en prematuros.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio observacional, longitudinal y prospectivo se realizó en recién nacidos prematuros de la Unidad de

Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) del Hospital Español de México en el periodo de agosto de 2013 a febrero de 2014.

Se incluyeron neonatos menores de 36 semanas de gestación, con peso menor de 2,500 g, quienes potencialmente podrían tener estancia prolongada en UCIN sin importar el diagnóstico. Se excluyeron pacientes con malformaciones congénitas y se eliminaron pacientes que no tuvieron seguimiento mínimo de dos semanas.

Se obtuvieron muestras de sangre venosa en ayuno a las 24 horas y a las dos semanas del nacimiento con la finalidad de cuantificar niveles séricos de calcio, fósforo, magnesio, PTHi y fosfatasa alcalina. Los electrolitos séricos se midieron con un equipo automatizado por química seca (VITROS 5600, Immunodiagnostic System); mientras que las concentraciones de PTHi y fosfatasa alcalina se cuantificaron por electro-quimioluminiscencia con un coeficiente de variación intra-ensayo e inter-ensayo < 5%.

Se tomaron como puntos de corte para hipocalcemia 4.5 mg/dL y para PTHi elevada 65 pg/mL. Este último, de acuerdo con lo sugerido por Dowa y cols.<sup>10</sup>

### Aporte de nutrientes a los prematuros

Durante el seguimiento se suministró aporte complementario de 100-150 mg/kg de calcio de 5 mg/kg de magnesio y de 400 UI de vitamina D a todos los prematuros.

### Análisis estadístico

Las variables cualitativas se presentan como frecuencias absolutas y porcentajes; las cuantitativas con promedio y desviación estándar (DE). Con prueba de t para muestras relacionadas se compararon los cambios en calcio, fósforo, magnesio, PTHi y fosfatasa alcalina a las dos semanas con respecto a las 24 horas. Con prueba t de muestras independientes y  $\chi^2$  se determinó la diferencia entre pacientes con y sin PTHi elevada. La relación de PTHi con marcadores de EMO se realizó

con el coeficiente de correlación de Pearson. Mediante análisis multivariado tipo regresión logística con modelo hacia delante (paso a paso) se identificaron las variables asociadas con PTHi elevada a las 24 horas y a las dos semanas. Se consideró significativa una  $p < 0.05$ .

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 23.0 (IBM).

Previo a su realización, este estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital Español de México. Para incluir a los pacientes, sus padres autorizaron la participación mediante firma de carta de consentimiento bajo información.

## RESULTADOS

### Características clínicas de los prematuros

Se incluyó un total de 40 prematuros con edad gestacional promedio de  $34.2 \pm 1.4$  semanas de gestación (SDG) y peso promedio de  $1,841.5 \pm 394.8$  g; 35% ( $n = 14$ ) tenían peso bajo para edad gestacional, de los cuales sólo un paciente tuvo peso MBPN ( $< 1,000$  g). Las comorbilidades más frecuentes fueron hiperbilirrubinemia, hipoglucemia y sepsis (*Tabla 1*).

### Marcadores bioquímicos y radiológicos de EMO

En la *Tabla 2* se describen los datos de marcadores bioquímicos de EMO. Puede apreciarse que los cambios fueron mínimos a las dos semanas con respecto a las 24 horas de vida en calcio, calcio corregido y magnesio. Sin embargo, en comparación con las 24 horas de vida, el fósforo sérico se redujo significativamente a las dos semanas ( $p = 0.011$ ), la fosfatasa alcalina tendió a incrementarse a las dos semanas y la PTHi a disminuir (*Tabla 2*).

No se detectaron casos de hipocalcemia a las 24 h, pero sí a las dos semanas. Se identificó hiperfosfatemia y elevación de PTHi en al menos 50% de los pacientes a las 24 horas y su frecuencia disminuyó un poco a las dos semanas de vida (*Figura 1*).

En cuanto a los hallazgos radiológicos a las 24 horas y a las dos semanas de vida, se observó que más de 50% de los pacientes prematuros tuvieron anomalías radiológicas compatibles con EMO (*Figura 2*).

### Asociación de PTHi con otros marcadores de EMO y parámetros clínicos

Se encontró una correlación inversa significativa de la PTHi a las 24 horas con calcio, calcio corregido y fosfa-

**Tabla 1: Características generales de los 40 prematuros incluidos.**

| Características                    | Promedio $\pm$ DE   | Mínimo-máximo |
|------------------------------------|---------------------|---------------|
| Edad (SDG)                         | $34.2 \pm 1.4$      | 32-37         |
| Peso al nacer (g)                  | $1,841.5 \pm 394.8$ | 960-3,475     |
| Longitud (cm)                      | $44.2 \pm 2.3$      | 37-49         |
|                                    | n                   | %             |
| Sexo                               |                     |               |
| Masculino                          | 16                  | 40            |
| Femenino                           | 24                  | 60            |
| Peso bajo para la edad gestacional | 14                  | 35            |
| Comorbilidades                     |                     |               |
| Hipoglucemia                       | 12                  | 30.0          |
| Hiperbilirrubinemia                | 15                  | 37.5          |
| Sepsis                             | 5                   | 12.5          |
| Hipertensión pulmonar              | 4                   | 10.0          |
| Enterocolitis necrosante           | 3                   | 7.5           |
| Anemia                             | 2                   | 5.0           |
| ERGE                               | 2                   | 5.0           |

DE = Desviación estándar, SDG = Semanas de gestación.

tasa alcalina a las dos semanas; mientras que la PTHi a la semana dos se correlacionó inversamente de forma significativa con el peso y la talla al nacer (*Tabla 3*).

Posteriormente, se compararon parámetros clínicos y marcadores de EMO en neonatos con y sin elevación de PTHi y se observó que el fósforo fue significativamente mayor en neonatos con elevación de PTHi a las 24 horas. No hubo diferencias con otros datos (*Tabla 4*).

Finalmente, en el análisis multivariado se evidenció que el único factor significativamente asociado con elevación de PTHi a las 24 horas fue el fósforo sérico ( $B = -0.833$ ; ExpB 0.435, IC 95% 0.435-0.828,  $p = 0.11$ ). A las dos semanas de vida extrauterina los predictores de elevación de PTHi fueron el peso al nacimiento ( $B = 0.008$ ; ExpB 1.008, IC 95% 1.002-1.014,  $p = 0.007$ ) y el calcio corregido a las 24 horas (ExpB 9.5, IC 95% 1.224-73.4,  $p = 0.031$ ).

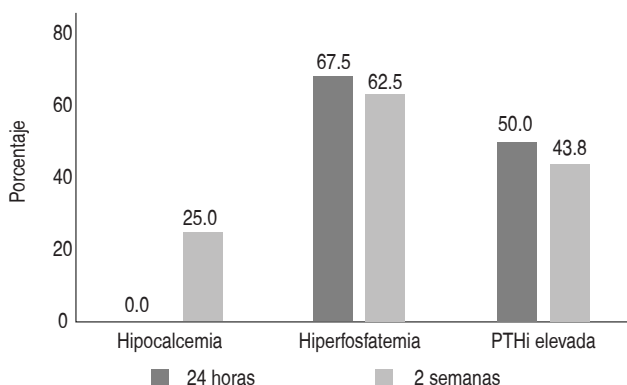
## DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la asociación de la PTHi con marcadores de EMO en el prematuro. En primer

**Tabla 2: Marcadores séricos de enfermedad metabólica ósea a las 24 horas y a las dos semanas de vida (n = 40).**

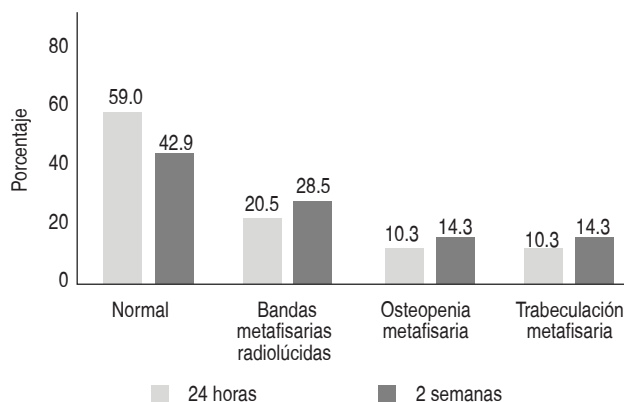
| Marcador                  | 24 horas de vida | Dos semanas de vida | p*     |
|---------------------------|------------------|---------------------|--------|
|                           | Promedio ± DE    | Promedio ± DE       |        |
| Calcio (mg/dL)            | 8.0 ± 0.7        | 8.1 ± 2.2           | NS     |
| Calcio corregido (mg/dL)  | 9.1 ± 0.7        | 9.1 ± 2.3           | NS     |
| Fósforo (mg/dL)           | 5.4 ± 1.5        | 4.9 ± 1.6           | 0.09   |
| Magnesio (mg/dL)          | 2.2 ± 0.4        | 2.1 ± 0.3           | NS     |
| Fosfatasa alcalina (UI/L) | 175.2 ± 34.6     | 242.7 ± 139.9       | < 0.05 |
| PTHi (pg/mL)              | 75.9 ± 73.9      | 62.0 ± 37.0         | NS     |

\* Prueba t de muestras relacionadas.

**Figura 1:** Frecuencia de hipocalcemia, hiperfosfatemia y elevación de PTHi a las 24 horas y dos semanas después del nacimiento en prematuros.

lugar, los valores de calcio a las 24 h de vida extrauterina (VEU) fueron normales en todos los prematuros, lo cual se explica posiblemente por la contribución materna a mantener la homeostasis del calcio en las primeras horas de vida, dado que el calcio fetal es aportado por la placenta por transporte activo y se ha reportado la existencia de un gradiente de calcio 1:4 materno:fetal.<sup>11</sup> Además, se ha descrito que el nadir fisiológico de calcio en el recién nacido a término se presenta a las 48 horas de VEU y esto podría ocurrir en el prematuro.<sup>6</sup>

Los neonatos prematuros tuvieron una frecuencia de hiperfosfatemia superior a 60% junto con elevación

**Figura 2:** Frecuencia de hallazgos radiológicos de EMO a las 24 horas y dos semanas.**Tabla 3: Coeficientes de correlación de Pearson de PTHi a 24 h y dos semanas después del nacimiento con marcadores de EMO, peso, talla y edad gestacional.**

|                                | PTHi, 24 horas | PTHi, semana 2 |
|--------------------------------|----------------|----------------|
| Edad gestacional al nacimiento | -0.085         | -0.309         |
| Peso al nacer                  | 0.095          | -0.636*        |
| Talla al nacer                 | 0.160          | -0.551*        |
| Calcio 24 horas                | -0.231         | -0.068         |
| Calcio corregido 24 horas      | -0.276         | -0.020         |
| Fósforo 24 horas               | 0.253          | -0.270         |
| Magnesio 24 horas              | 0.282          | 0.217          |
| Fosfatasa alcalina 24 horas    | 0.157          | 0.088          |
| Calcio, semanas 2              | -0.420*        | -0.090         |
| Calcio corregido, semana 2     | -0.439*        | -0.053         |
| Fósforo, semana 2              | 0.025          | -0.122         |
| Magnesio, semana 2             | -0.162         | -0.037         |
| Fosfatasa alcalina, semana 2   | -0.365*        | -0.005         |

\* &lt; 0.05.

de PTHi (por arriba de 65 pg/mL) en 50%. Esta elevación de la PTHi podría explicar la hiperfosfatemia y estudios previos en neonatos prematuros han demostrado que los niveles de PTHi se elevan en neonatos pretérmino en comparación con los sanos nacidos a término.<sup>12</sup> Pero es de llamar la atención que el porcentaje de pacientes con elevación de PTHi > 65 pg/mL a los

**Tabla 4: Comparación de características clínicas bioquímicas a las 24 horas de vida en pacientes con y sin elevación de PTHi (n = 40).**

| Característica                    | PTHi elevada     | PTHi normal      | p <sup>&amp;</sup> |
|-----------------------------------|------------------|------------------|--------------------|
|                                   | Promedio<br>± DE | Promedio<br>± DE |                    |
| Edad (SDG)                        | 34.4 ± 1.4       | 34.1 ± 1.5       | 0.50               |
| Peso (g)                          | 1,889.7 ± 439.7  | 1,793.2 ± 348.7  | 0.44               |
| Longitud (cm)                     | 44.2 ± 1.8       | 44.2 ± 2.7       | 0.91               |
| Calcio 24 horas (mg/dL)           | 8.1 ± 0.8        | 7.9 ± 0.7        | 0.37               |
| Calcio corregido 24 horas (mg/dL) | 9.2 ± 0.8        | 9.1 ± 0.7        | 0.72               |
| Fósforo 24 (mg/dL)                | 6.1 ± 1.4        | 4.7 ± 1.4        | 0.002              |
| Magnesio 24 horas (mg/dL)         | 2.2 ± 0.4        | 2.2 ± 0.4        | 0.93               |
| Fosfatasa alcalina 24 horas (U/L) | 178.5 ± 34.5     | 171.9 ± 35.2     | 0.55               |
| Anormalidades radiológicas (%)    | 36.8             | 40.0             | 0.83*              |

DE: desviación estándar; SDG: semanas de gestación  
<sup>&</sup> Prueba t de muestras independientes; \*  $\chi^2$

14 días de vida en nuestro estudio fue superior (43.8%) al 14.7% reportado por Dowa y cols. en prematuros japoneses de edad gestacional similar.<sup>10</sup>

La elevación sostenida de PTHi a los 14 días de VEU y la presencia de hipocalcemia al mismo tiempo se explican porque la falta de aporte materno de calcio, vitamina D activa, PTH y PTHrp (a través de la placenta) obligan al neonato a producir PTHi para nivelar los niveles de calcio, lo cual logra mediante el aumento de la resorción ósea y de la síntesis de vitamina D activa, la cual, a su vez, incrementa la absorción intestinal y la reabsorción renal de calcio.<sup>13</sup>

Lo anterior es mayor en el prematuro; así, la suspensión abrupta de nutrientes y hormonas maternas puede afectar la mineralización del hueso, apareciendo alteraciones radiológicas como las observadas en el presente estudio, en el 41% de los pacientes a las 24 horas y en 57.1% de a los 14 días de VEU. En el presente estudio se utilizó el criterio de Brook y Lucas para clasificar los hallazgos radiológicos de pacientes

con EMO: bandas metafisarias radiolúcidas, osteopenia metafisaria y trabeculación metafisaria.<sup>14</sup>

La elevación de fosfatasa alcalina en prematuros ha sido explicada como resultado de la alta tasa de formación ósea en estos pacientes, que tiene como finalidad la recuperación de la masa ósea y el crecimiento del esqueleto.<sup>15</sup>

Por otra parte, la relación de PTHi con parámetros clínicos queda establecida por la correlación inversa de la PTHi a la semana dos y el peso y la talla al nacer, es decir, cuanto mayor es el peso y longitud, menores son los niveles de PTHi. Mientras que la relación inversamente proporcional de PTHi a las 24 h con calcio podría ser el resultado de una respuesta anticipada del organismo mediante la producción de PTH a la inminente reducción de calcio en el neonato, la cual se hace clínicamente evidente, por lo general, a partir de las 48 h de VEU. En el análisis multivariado la edad gestacional y los niveles séricos de calcio corregido a las 24 h se identificaron como predictores independientes de elevación de PTHi, a las dos semanas de vida, lo que podría indicar que aun dentro de niveles de calcio considerados normales al nacimiento, podrían predecir una elevación de PTHi en neonatos prematuros. Sin embargo, no se encontraron estudios o reportes previos para contextualizar o comparar estos hallazgos.

Por otro lado, la relación inversa de PTHi a las 24 h con la fosfatasa alcalina a las dos semanas de VEU podría indicar que los individuos con menor resorción ósea al nacimiento (PTHi baja) tienden a elevar en mayor grado los niveles de fosfatasa alcalina a las dos semanas y viceversa; se conoce que una PTHi elevada refleja mayor desequilibrio y por lo tanto mayor requerimiento de incrementar la síntesis de hueso. De hecho, los niveles de fosfatasa alcalina se elevaron a las dos semanas en los prematuros del presente estudio, posiblemente por el incremento de la formación ósea que ocurre con el paso de las semanas. De hecho, Lucas y cols. demostraron incremento en los niveles de fosfatasa alcalina en las mediciones al menos hasta las nueve semanas de VEU en prematuros.<sup>15</sup>

Finalmente, es importante señalar que a los prematuros estudiados se les brindó calcio, vitamina D y magnesio conforme a las guías de práctica clínica de la Sociedad de Endocrinología; sin embargo, las alteraciones del metabolismo mineral-óseo del prematuro permanecieron.<sup>16,17</sup>

En conclusión, parece ser apropiado realizar medición seriada de PTHi en prematuros, junto con otros marcadores de metabolismo mineral óseo como fósforo,



calcio, fosfatasa alcalina y mediciones radiográficas, dado que ayudan a identificar pacientes con EMO.

# REFERENCIAS

1. Rustico SE, Calabria AC, Garber SJ. Metabolic bone disease of prematurity. *J Clin Transl Endocrinol*. 2014; 1(3): 85-91.
2. Vachharajani AJ. Metabolic bone disease of prematurity. *Neoreviews*. 2010; 10: 402-411. doi: 10.1542/neo.10-8-e402.
3. Lothe A, Sinn J, Stone M. Metabolic bone disease of prematurity and secondary hyperparathyroidism. *J Paediatr Child Health*. 2011; 47(8): 550-553. doi: 10.1111/j.1440-1754.2011.02019.x.
4. Koike T, Iwamoto M, Shimazu A, Nakashima K, Suzuki F, Kato Y. Potent mitogenic effects of parathyroid hormone (PTH) on embryonic chick and rabbit chondrocytes. Differential effects of age on growth, proteoglycan, and cyclic AMP responses of chondrocytes to PTH. *J Clin Invest*. 1990; 85(3): 626-631. doi: 10.1172/JCI114484.
5. Backström MC, Kuusela AL, Mäki R. Metabolic bone disease of prematurity. *Ann Med*. 1996; 28(4): 275-282.
6. Rehman MU, Narchi H. Metabolic bone disease in the preterm infant: Current state and future directions. *World J Methodol*. 2015; 5(3): 115-121.
7. Kelly A, Kovatch KJ, Garber SJ. Metabolic bone disease screening practices among U.S. neonatologists. *Clin Pediatr (Phila)*. 2014; 53(11): 1077-1083.
8. Moreira A, February M, Geary C. Parathyroid hormone levels in neonates with suspected osteopenia. *J Paediatr Child Health*. 2013; 49(1): E12-E16.
9. Rustico SE, Kelly A, Monk HM, Calabria AC. Calcitriol treatment in metabolic bone disease of prematurity with elevated parathyroid hormone: a preliminary study. *J Clin Transl Endocrinol*. 2014; 2(1): 14-20.
10. Dowa Y, Kawai M, Kanazawa H, Iwanaga K, Matsukura T, Heike T. Screening for secondary hyperparathyroidism in preterm infants. *Pediatr Int*. 2016; 58(10): 988-992.
11. Kovacs CS, Kronenberg HM. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium and lactation. *Endocr Rev*. 1997; 18: 832-872.
12. Saggese G, Baroncelli GI, Bertelloni S, Bottone E. Intact PTH levels in healthy term neonates (HTN) and in early neonatal hypocalcemia (ENH). *Pediatric Research*. 1988; 23: 138.
13. Bozzetti V, Tagliabue P. Metabolic Bone Disease in preterm newborn: an update on nutritional issues. *Ital J Pediatr*. 2009; 35(1): 20.
14. Brooke OG, Lucas A. Metabolic bone disease in preterm infants. *Arch Dis Child*. 1985; 60(7): 682-685.
15. Lucas A, Brooke OG, Baker BA, Bishop N, Morley R. High alkaline phosphatase activity and growth in preterm neonates. *Arch Dis Child*. 1989; 64(7): 902-909.
16. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(7): 1911-1930.
17. Abrams SA; Committee on Nutrition. Calcium and vitamin d requirements of enterally fed preterm infants. *Pediatrics*. 2013; 131(5): e1676-e1683.