



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**RELACIÓN ENTRE LA DOSIS ACUMULADA DE GLUCOCORTICOIDES Y  
LAS CONCENTRACIONES DE VITAMINA D SOBRE LOS CAMBIOS EN EL  
COCIENTE RANKL/OPG EN NIÑOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA  
AGUDA EN TRATAMIENTO**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

M. EN C. SALVADOR ATILANO MIGUEL

MATRICULA: 2202800942

CORREO ELECTRÓNICO: atilanosalvador@gmail.com

ORCID: 0009-0008-9484-3477

CODIRECTORA: DRA. MARÍA DE LOURDES BARBOSA CORTÉS

CODIRECTORA: DRA. ALDA ROCÍO ORTIZ MUNIZ

ASESOR: DR. JORGE MALDONADO HERNÁNDEZ

JURADO

DRA. ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑIZ

PRESIDENTA

DRA. MARÍA DE LOURDES BARBOSA CORTÉS

SECRETARIA

DR. JORGE MALDONADO HERNÁNDEZ

VOCAL

DR. MIGUEL KLUNDER KLUNDER

VOCAL

DRA. LAURA ESTELA CASTRILLÓN RIVERA

VOCAL

IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO A 18 DE DICIEMBRE DE 2024

El presente trabajo fue realizado en la de Unidad de Investigación Médica en Nutrición, UMAE, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, bajo la dirección del Dra. María de Lourdes Barbosa Cortés y de la Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz del Departamento de Ciencias de la Salud de (DCBS), Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo del Dr. Jorge Maldonado Hernández.

El autor agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 778461, que comprendió del periodo de septiembre de 2019 a agosto de 2024. El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Sistema Nacional de Posgrados del CONAHCyT, con número de referencia 001480, así como al departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, y Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México. Por su financiamiento para la adquisición de consumibles.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

Salvador Atilano Miguel

Fecha de aprobación de la tesis: 09 de diciembre de 2024

JURADO:



Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

---

Presidente



Dra. María de Lourdes Barbosa Cortés

---

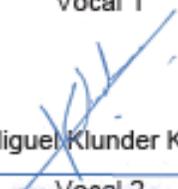
Secretario



Dr. Jorge Maldonado Hernández

---

Vocal 1



Dr. Miguel Klunder Klunder

---

Vocal 2



Dra. Laura Estela Castrillón Rivera

---

Vocal 3

## **Agradecimientos**

Gracias a mi familia, a mi madre, hermano, hermanas y a mi sobrina, por ser mi fuerza y motivo de superación.

A mis directoras de tesis, la Dra. María de Lourdes Barbosa Cortés y Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz, así como a mi asesor el Dr. Jorge Maldonado Hernández, su por tiempo y paciencia, para poder realizar este trabajo.

A mis compañeros y amigos, por su amistad y apoyo durante estos años de trabajo, así como a nuestro equipo de colaborados de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición y Departamento Clínico de Hematología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS.



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

### Declaración de originalidad

El que suscribe Salvador Atilano Miguel, alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa y autor de la tesis o titulada: ***“RELACIÓN ENTRE LA DOSIS ACUMULADA DE GLUCOCORTICOIDES Y LAS CONCENTRACIONES DE VITAMINA D SOBRE LOS CAMBIOS EN EL COCIENTE RANKL/OPG EN NIÑOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA EN TRATAMIENTO”***,

Declaro que:

1. La tesis que presento ante el Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, para lo obtención del grado de Doctor es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y/o fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 12 de 12 del 2024.

Atentamente

  
Salvador Atilano Miguel



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

### Carta de Cesión de Derechos

En la Ciudad de México, el día 12 de 12 del año 2024, quien suscribe Salvador Atilano Miguel, alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, manifiesta que es autor intelectual de la tesis titulada ***“RELACIÓN ENTRE LA DOSIS ACUMULADA DE GLUCOCORTICOIDES Y LAS CONCENTRACIONES DE VITAMINA D SOBRE LOS CAMBIOS EN EL COCIENTE RANKL/OPG EN NIÑOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA EN TRATAMIENTO”***, bajo la dirección del Comité Tutoral conformado por Dra. María de Lourdes Barbosa Cortés (Codirectora), Dra. Alda Rocío Ortiz Muniz (Codirectora) y el Dr. Jorge Maldonado Hernández (Asesor), cede los derechos del trabajo de tesis a la Universidad Autónoma Metropolitana para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso del autor o del Comité Tutoral del trabajo. Con el fin de solicitar autorización, los usuarios podrán escribir al correo electrónico [atilanosalvador@gmail.com](mailto:atilanosalvador@gmail.com); si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el seguimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**Salvador Atilano Miguel**  
**2202800942**

## Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	9
<b>Capítulo I. Marco teórico</b> .....	14
<b>I.I Leucemia linfoblástica aguda</b> .....	14
I.I.I Epidemiología .....	14
I.I.II Etiología de la LLA.....	14
I.I.III Tratamiento de la LLA.....	16
I.I.IV Glucocorticoides y sus efectos sobre el hueso.....	17
I.I.V Densidad mineral ósea y fracturas en pacientes con LLA .....	18
I.I.VI Remodelado óseo.....	18
I.I.VII Vía de señalización Wnt y metabolismo óseo.....	20
I.I.VIII Sistema RANK/RANKL/OPG y glucocorticoides .....	21
<b>Capítulo II. Antecedentes</b> .....	24
II.I Sistema RANK/RANKL/OPG en LLA.....	24
II.II Vitamina D y sistema RANK/RANKL/OPG en LLA.....	24
<b>Planteamiento del problema</b> .....	28
<b>Justificación</b> .....	29
<b>Pregunta de investigación</b> .....	30
<b>Hipótesis</b> .....	31
Objetivo general .....	32
Objetivos particulares.....	32
<b>Capítulo III. Material y Métodos</b> .....	33
III.I Diseño del estudio .....	33
III.II Población de estudio .....	33
III.II Criterios de selección de los sujetos de estudio.....	33
III.II.I Inclusión:.....	33
III.II.II Exclusión: .....	33
III.II.III Eliminación: .....	33
<b>III.III Tamaño de la muestra</b> .....	34
<b>III.IV Definición de las variables</b> .....	35

<b>III.V Procedimientos</b> .....	39
III.VI Muestras biológicas.....	40
III.VII Medición de 25(OH)D.....	40
III.VIII Medición de las concentraciones de RANKL, OPG y marcadores del metabolismo óseo.....	41
III.IX Mediciones antropométricas .....	41
III.IX.I Peso y composición corporal.....	41
III.IX.II Estatura.....	42
<b>III.X Aspectos éticos</b> .....	44
<b>III.XI Riesgos y molestias</b> .....	44
<b>III.XII Confidencialidad</b> .....	44
<b>III.XIII Plan de análisis estadístico</b> .....	45
<b>Capítulo IV. Resultados</b> .....	46
IV.I Características clínicas y demográficas de los pacientes con LLA .....	48
IV.II Evaluación de los marcadores de metabolismo óseo .....	50
IV.III Correlaciones entre la dosis de corticosteroides con la concentración de 25(OH)D y la concentración de marcadores del recambio óseo. ....	61
IV.IV. Asociación entre la dosis de glucocorticoides, las concentraciones de 25(OH)D y el cociente RANKL/OPG en pacientes pediátricos con LLA en tratamiento. ....	62
<b>Capítulo V. Discusión</b> .....	64
<b>Capítulo VI. Conclusiones</b> .....	70
<b>Capítulo VII. Perspectivas</b> .....	70
<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	71
Anexos .....	84
I. Dictamen de la Comité Local de Investigación en Salud .....	84
II. Carta de consentimiento .....	85
III. Carta de asentimiento .....	88
IV. Formato de recolección de datos.....	90
V. Quimioterapia protocolo HP06 .....	94
VI Artículo .....	97

## Índice de figuras y cuadros

Figura 1. Remodelado óseo.....	22
Figura 2. Efecto de la vía de señalización Wnt, glucocorticoides y deficiencia de vitamina D sobre el proceso de remodelado óseo.....	27
Cuadro 1. Definición de las variables de estudio.....	35
Figura 3. Esquema de los procedimientos realizados a los pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica de células B durante el seguimiento. ....	43
Figura 4. Diagrama de flujo del estudio en pacientes con leucemia linfoblástica aguda en tratamiento. ....	47
6	
Cuadro 2. Características de los pacientes con LLA al momento del diagnóstico. ....	49
Cuadro 3. Cambios en las concentraciones de 25(OH)D, los marcadores de recambio óseo y el cociente RANKL/OPG de acuerdo con el riesgo de recaída de LLA. ....	51
Figura 5. Cambios en las concentraciones de 25(OH)D, marcadores de recambio óseo y cociente RANKL/OPG entre grupos de riesgo de recaída para LLA.....	53
Figura 6. Cambios en PTH, fósforo y calcio iónico entre grupos de riesgo de recaída para LLA.....	54
Cuadro 4. Modelos de regresión lineal para predictores de cambios en los $\Delta$ de RANKL/OPG, $\Delta$ de RANKL y $\Delta$ de OPG. ....	55
Cuadro 5. Modelos de regresión lineal para predictores de cambios en los $\Delta$ de RANKL/OPG, $\Delta$ de RANKL y $\Delta$ de OPG. ....	55
Cuadro 6. Cambios en los marcadores de recambio óseo y en el cociente RANKL/OPG por estado de nutrición de vitamina D.....	57
Figura 7. Cambios en las concentraciones de 25(OH)D, marcadores de recambio óseo y cociente RANKL/OPG entre grupos estado de nutrición de vitamina D en los niños con LLA. ....	59
Cuadro 7. Modelos de regresión lineal para predictores de cambios en los $\Delta$ de RANKL/OPG, $\Delta$ de RANKL y $\Delta$ de OPG. ....	60
Figura 8. Análisis de correlación de Spearman de $\Delta$ OPG y $\Delta$ RANKL en pacientes con LLA.....	61
Cuadro 8. Modelos de regresión lineal para predictores de cambios en los $\Delta$ de RANKL/OPG, $\Delta$ de RANKL y $\Delta$ de OPG. ....	62
Cuadro 9. Modelo de regresión lineal para predictores de las concentraciones de OPG durante la remisión. ....	63
Cuadro 10. Modelo de regresión lineal para predictores de las concentraciones de OPG durante la remisión. ....	63
Figura 9. Integración de los resultados observados en las modificaciones del proceso de remodelado óseo en pacientes con LLA en tratamiento. ....	69

## **Abreviaturas**

**LLA** Leucemia linfoblástica aguda

**DMO** Densidad mineral ósea

**RANK** Receptor activador del factor nuclear-  $\kappa$ B,

**RANKL** Ligando receptor activador del factor nuclear-  $\kappa$ B

**OPG** Osteoprotegerina

**SNC** Sistema nervioso central

**CT** Calcitonina

**PTH** Hormona paratiroidea

**IGF** Factor de crecimiento insulínico

**TGF** Factor de crecimiento transformante

**FGF** Factor de crecimiento fibroblastos

**EGF** Factor de crecimiento epidérmico

**c-fms** receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos

**TRAF** Factor asociado al receptor TNF

**NF-  $\kappa$ B** Factor nuclear-  $\kappa$ B

**MAP** Proteína activada por mitógeno

**TGF- $\beta$**  Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**BMP** Proteínas morfogénicas óseas

**ARNm** Ácido Ribonucleico mensajero

**miRNA** micro RNA

**UPLC-MS-MS** Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución acoplada a un Espectrómetro de Masas

## Resumen

La Ciudad de México tiene una de las tasas de mayor incidencia de leucemia linfoblástica aguda (LLA) reportadas en el mundo, al ubicarse entre 55 a 59 casos por cada millón de niños menores de 14 años.

En el paciente pediátrico con LLA, la administración de dosis elevadas y prolongadas de glucocorticoides se asocia con el desarrollo de efectos adversos, incluyendo una disminución en la densidad mineral ósea (DMO) y un aumento de la resorción ósea, debido a que ejercen una acción directa sobre los osteoblastos y aumento del número de ciclos de remodelado óseo, disminuyendo la matriz ósea, lo que en conjunto ocasiona un desequilibrio en el proceso de recambio óseo.

Por otra parte, el proceso de remodelado óseo permite mantener el volumen y la estructura ósea, dicho proceso es controlado por factores locales y sistémicos, destacando entre ellos el sistema del receptor activador del factor nuclear-  $\kappa$ B (RANK), su ligando natural RANKL (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG), vía determinante en el equilibrio entre la resorción y la formación ósea. Disrupciones en este complejo, originados por factores tales como la administración de glucocorticoides y la deficiencia de vitamina D reportada en estos pacientes, pueden conducir a modificaciones del proceso de remodelado óseo, generando un incremento en la reabsorción ósea, alterando la arquitectura ósea y aumentando el riesgo de fracturas en los pacientes con LLA. A la fecha son escasos los estudios que han explorado la relación entre el sistema RANK/RANKL/OPG y la deficiencia o insuficiencia de vitamina D con marcadores de recambio óseo en el paciente pediátrico con LLA. **Objetivo general.** Evaluar la relación entre la dosis acumulada de glucocorticoides y la deficiencia de vitamina D sobre los cambios en el cociente RANKL/OPG y marcadores del metabolismo óseo en niños con LLA a la remisión. **MATERIAL Y MÉTODOS.** *Diseño:* Estudio de cohorte, prospectivo. *Población:* pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA provenientes del Servicio de Hematología, UMAE Hospital de Pediatría de CMNSXXI, IMSS, Ciudad de México. **PROCEDIMIENTOS.** Una vez confirmados los criterios de selección, se procedió a explicar su participación y solicitar a los padres y al niño, su autorización por escrito. Se realizó la historia clínica del paciente y las mediciones antropométricas. Los pacientes fueron citados en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición del Hospital de Pediatría del CMNSXXI, en condiciones de ayuno y se tomó una muestra de sangre periférica para determinar los niveles séricos de 25(OH)D, RANKL, OPG y otros marcadores del metabolismo óseo. El análisis de la Vitamina D se realizó por el método de cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas. Las concentraciones de RANKL, OPG y calcitonina fueron determinadas en suero utilizando la técnica de Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Las mediciones se realizaron al diagnóstico y al final de la remisión. **PLAN DE ANÁLISIS.** Los datos se presentan como

media  $\pm$  desviación estándar y/o como mediana (mínimo y máximo) de acuerdo con su distribución. Para comparar el cambio entre las variables cuantitativas a lo largo del tiempo (diagnóstico y final de la remisión), se realizó un análisis con prueba de Wilcoxon o t-Student para muestras relacionadas y prueba de U de Mann-Whitney o t-Student para dos muestras independientes para comparar diferencias entre los grupos de riesgo de recaída y por estado de nutrición de vitamina D. Se realizó el análisis de asociación entre la relación RANKL/OPG, las concentraciones de 25(OH)D y dosis acumulada de glucocorticoides. Análisis multivariado realizado con regresión lineal. **RESULTADOS:** Treinta y tres pacientes (4-17 años) de 71 pacientes elegibles con LLA de células B recién diagnosticada fueron incluidos en este trabajo. De acuerdo con el análisis realizado el grupo de riesgo alto presentó un aumento en la relación RANKL/OPG en la remisión comparada con la medición basal ( $p < 0.006$ ). El grupo de pacientes con deficiencia-insuficiencia de vitamina D, presentó un incremento significativo en las concentraciones de RANKL y el cociente RANKL/OPG en la remisión ( $p = 0.002$  y  $p = 0.002$ , respectivamente). La deficiencia-insuficiencia de vitamina D se detectó en el 90% de los pacientes en el momento del diagnóstico de la LLA. Encontramos una correlación inversa entre la  $\Delta$  de RANKL y  $\Delta$  OPG ( $\rho = -0,454$ ,  $p = 0.008$ ) y asociación entre la disminución de las concentraciones de vitamina D y el incremento de RANKL con la disminución OPG ( $Rho = 0.378$ ,  $p = 0.03$ ). **CONCLUSIONES:** Con estos resultados demostramos un incremento de las concentraciones de RANKL, el cociente RANKL/OPG y una disminución de las concentraciones de OPG en la fase temprana del tratamiento en el grupo de riesgo alto y de deficiencia de vitamina. Además, de una alta frecuencia de hipovitaminosis D y asociación entre la disminución de las concentraciones de vitamina D y el incremento de RANKL con la disminución de OPG. Estos hallazgos sugieren modificaciones en el metabolismo óseo que pueden incrementar el riesgo de fracturas durante y posterior al tratamiento. Futuros estudios deberán centrarse en la búsqueda de nuevas acciones de intervención en la prevención y control de la resorción ósea en los sobrevivientes de LLA mediante la suplementación con vitamina D.

#### Palabras clave

Leucemia linfoblástica aguda, relación RANKL/OPG, ligando RANK, osteoprotegerina, 25(OH)D, corticosteroides, marcadores de recambio óseo.

## Abstract

Mexico City has one of the highest rates of acute lymphoblastic leukemia (ALL) reported in the world, with 55 to 59 cases per million children under 14 years old.

In pediatric patients with ALL, the administration of high and prolonged doses of glucocorticoids is associated with the development of adverse effects, including a decrease in bone mineral density (BMD) and an increase in bone resorption, because they exert direct action on the osteoblasts and increase the number of cycles of bone remodeling, decreasing the bone matrix, which together causes an imbalance in the process of bone turnover.

On the other hand, the process of remodeling allows them to maintain the volume and the bone structure. This process is controlled by local and systemic factors, highlighting among them the system of the receptor activator of the nuclear factor  $\kappa$ B (RANK), its natural ligand RANKL (RANKL) and osteoprotein (OPG), a determinant pathway in the balance between resorption and bone formation. Disruptions in this complex, caused by factors such as glucocorticoid administration and vitamin D deficiency reported in these patients, may lead to modifications of the bone remodeling process, generating an increase in bone resorption, altering the bone architecture and increasing the risk of fractures in patients with ALL. Few studies to date have explored the relationship between the RANK/RANKL/OPG system and vitamin D deficiency or insufficiency with bone turnover markers in pediatric patients with ALL. **General objective.** To assess the relationship between cumulative glucocorticoid dose and vitamin D deficiency on changes in RANKL/OPG ratio and bone metabolism markers in children with remission ALL. **MATERIAL AND METHODS.** Design: Prospective cohort study. Population: pediatric patients diagnosed with ALL from the Hematology Service, UMAE Pediatrics Hospital of CMNSXXI, IMSS, Mexico City. **PROCEDURES.** Once the selection criteria were confirmed, they explained their participation and asked for the parents and the child's written consent. The patient's medical history and anthropometric measurements were performed. Patients were referred to the Medical Research Unit in Nutrition of the Pediatric Hospital of CMNSXXI, under fasting conditions and a peripheral blood sample was taken to determine serum levels of 25(OH)D, RANKL, OPG, and other markers of bone metabolism. **ANALYSIS PLAN.** The data are presented as mean standard deviation and/or as median (minimum and maximum) according to their distribution. To compare the change between quantitative variables over time (diagnosis and end of remission), an analysis was performed with a Wilcoxon or t-Student test for related samples and a Mann-U test Whitney or t-Student for two independent samples to compare differences between relapse risk groups

and vitamin D nutritional status. The association analysis was performed between the RANKL/OPG ratio, 25(OH) concentrations, and cumulated doses of glucocorticoids. Multivariate analysis was performed with linear regression. **RESULTS:** Thirty-three patients (4-17 years) of 71 eligible patients with newly diagnosed B-cell ALL were included in this study. According to the analysis performed, the high-risk group presented an increase in the RANKL/OPG ratio in remission compared with the baseline measurement ( $p < 0.006$ ). The group of patients with vitamin D deficiency-insufficiency presented a significant increase in RANKL concentrations and the ratio RANKL/OPG at remission ( $p = 0.002$  and  $p = 0.002$ , respectively). Vitamin D deficiency-insufficiency was detected in 90% of patients at the time of diagnosis of ALL. We found an inverse correlation between RANKL and OPG ( $\rho = -0.454$ ,  $p = 0.008$ ) and the association between the decrease in vitamin D concentrations and the increase in RANKL with the decrease in OPG ( $\rho = 0.378$ ,  $p = 0.03$ ). **CONCLUSIONS:** With these results, we demonstrated an increase in the concentrations of RANKL, the ratio RANKL/OPG and a decrease in the concentrations of OPG at the early stage of treatment in the high-risk group and vitamin deficiency. In addition, there is a high frequency of hypovitaminosis D and the association between the decrease in vitamin D concentrations and the increase in RANKL with the decrease in OPG. These findings suggest changes in bone metabolism that may increase the risk of fractures during and after treatment.

Future studies should focus on finding new interventions in the prevention and control of bone resorption in ALL survivors through vitamin D supplementation.

#### Keywords

Acute lymphoblastic leukemia, RANKL/OPG ratio, RANK Ligand, Osteoprotegerin, 25(OH)D, Corticosteroids, Bone turnover markers.

## **Capítulo I. Marco teórico**

### **I.I Leucemia linfoblástica aguda**

#### **I.I.I Epidemiología**

Las leucemias son un grupo de enfermedades caracterizadas por un aumento en el número de leucocitos en la sangre o/y médula ósea. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) se caracteriza por la presencia de translocaciones cromosómicas y mutaciones somáticas (1), las cuales permiten la proliferación desordenada de células inmaduras de la línea linfóide (blastos) que surgen a partir de una célula madre (*stem cell*) enferma en la médula ósea. El crecimiento desordenado de las células blancas en la médula ósea bloquea el desarrollo normal de la hematopoyesis originando la acumulación de blastos en alguna etapa de su desarrollo (2).

La LLA es la neoplasia maligna más frecuente durante la edad pediátrica, esta constituye aproximadamente el 25 % de todas las neoplasias diagnosticadas en niños menores de 15 años (3) y el 80 % de todas las leucemias agudas (2). La LLA tiene su mayor pico de incidencia entre los 2 a 5 años (2,4), siendo mayor en los niños que en las niñas y acentuándose esta diferencia durante la adolescencia (5). La incidencia anual de acuerdo con Pui y cols., es de 30 casos por millón (4).

En México, el cáncer es un problema prioritario de salud pública por su alta incidencia y tasa de mortalidad. Estimaciones recientes señalan que anualmente se diagnostican de 2,600-3,120 casos de cáncer en menores de 18 años (6), donde los tumores malignos son la quinta causa de mortalidad en preescolares, y la segunda en edad escolar, siendo la LLA de células B la segunda causa de muerte en el grupo de 5 a 14 años (7). Un estudio realizado por Fajardo y cols., refiere, que la Ciudad de México tiene una de las tasas de mayor incidencia de leucemia reportadas en el mundo, entre 55 a 59 casos por cada millón de niños menores 14 años (8).

#### **I.I.II Etiología de la LLA**

Los eventos etiopatogénicos precisos que conducen al desarrollo de la LLA se desconocen, sin embargo, se considera que su origen es multifactorial. Se ha descrito que la LLA es el producto de mutaciones sucesivas que difieren según la fase de maduración de las células blásticas y donde también, los factores epigenéticos y ambientales tienen una participación importante en la etiopatogenia y progresión de la enfermedad (9,10). Entre los factores ambientales se encuentran principalmente las radiaciones ionizantes, que pueden inducir daño genético en los precursores hematopoyéticos, la exposición a pesticidas, hidrocarburos, campos magnéticos y en distintos

momentos de la concepción el abuso en el consumo de alcohol o sustancias psicoactivas en la mujer gestante (2). También ciertas condiciones genéticas, como el síndrome de Down, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, neurofibromatosis, ataxia telangiectasia y síndrome de Li-Fraumeni, se consideran factores de riesgo para la LLA (3).

El desarrollo de la tumorigénesis de LLA involucra una expresión anormal de diferentes genes, incluyendo *TEL-AML1*, *BCR-ABL1*, *RAS* y *PI3K*, que llevan a una desregulación del ciclo celular (11). Estudios genómicos han identificado la asociación de LLA con variantes no codificantes en al menos 13 *loci*, relacionados con la transcripción hematopoyética y de genes supresores de tumores (*ARID5B*, *BK1*, *CDKN2A/CDKN2B*, *BMI1-P1P4K2A*, *CEBPE*, *ELK2*, *ERG*, *GATA3*, *IGF2BP1*, *IKZF1/IKZF3*, *USP7* y *LHPP*). Adicionalmente, los análisis genómicos germinales han descrito la asociación de la presencia de hiperdiploidía (cromosomas X, 2, 4, 6, 10, 14, 17 y 18 ) en la LLA de células B con mutaciones en diversos genes (*NBN*, *ETV6*, *FLT3*, *SHA2* y *CREBBP*), en el síndrome de Down asociado a LLA B (*IKZF1*, *NBN*, *RTEL1*) y con LLA de células T con mutaciones en la vía de señalización Fanconi-BRCA (12,13). Las alteraciones genéticas en la LLA también incluyen la presencia de hipodiploidía con menos de 44 cromosomas; y translocaciones recurrentes incluyendo t(12;21)(p13;q22) que codifica ETV6-RUNX1, t(1;19)(q23;p13) que codifica TCF3-PBX1, t(9;22)(q34;q11) que codifica BCR- ABL1, reordenación de MLL en 11q23 con una amplia gama de genes asociados (13).

En el caso de la LLA infantil, la quimioterapia es el primer tratamiento empleado para intentar que la enfermedad entre en remisión (que no se encuentren células leucémicas en médula ósea y se restablezca la hematopoyesis normal); se utilizan grupos de riesgo de recaída en lugar de estadios para planificar el tratamiento y se describen como sigue: 1) Riesgo estándar o bajo que incluye niños >1 año a <7 años, recuento inicial de leucocitos de 20,000/mm<sup>3</sup> en el momento del diagnóstico, ausencia de infiltración al sistema nervioso central (SNC), ausencia de masa mediastinal e inmunofenotipo de células B; 2) Riesgo intermedio >7 años a <10 años, recuento inicial de leucocitos de >20,000/mm<sup>3</sup>- <50,000/mm<sup>3</sup> en el momento del diagnóstico, 3) Riesgo alto, incluye a los niños <1 año y >10 años, y aquellos niños con un recuento de glóbulos blancos de 50,000/μL o más en el momento del diagnóstico, presencia de masa mediastinal, inmunofenotipo de células T e infiltración al SNC. Otros factores que afectan el grupo de riesgo se relacionan con ciertos cambios en los cromosomas de los linfoblastos (ETV6–RUNX1, TCF3–PBX1, BCR–ABL1, MLL), la rapidez con que la leucemia responde al tratamiento inicial y si la leucemia se diseminó hacia el cerebro, la médula espinal, los testículos u otras partes del cuerpo (13).

Desde el punto de vista morfológico la LLA pediátrica se basa en los criterios establecidos por el grupo Franco Americano Británico (FAB), el cual los clasifica en L1, L2 y L3 (tipo Burkitt) de acuerdo con las características morfológicas del blasto que considera el tamaño, núcleo, nucléolo, citoplasma y basofilia (14,15).

### **I.I.III Tratamiento de la LLA**

El tratamiento principal es la quimioterapia, aunque la radioterapia puede usarse en ciertos casos y el trasplante de médula ósea se utiliza principalmente en los pacientes de muy riesgo alto. La optimización de las dosis y pautas de los fármacos utilizados en la quimioterapia en función de las características biológicas de las células leucémicas, ha permitido alcanzar una elevada tasa de supervivencia (16). Actualmente, los protocolos modernos incluyen principalmente tres fases: 1) terapia de inducción a la remisión, 2) consolidación y 3) mantenimiento, y una profilaxis a sistema nervioso central (SNC) (16).

El protocolo utilizado en este estudio es el HP09 el cual se basa en el protocolo Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) 95 (17). Este consta de una fase inicial (ventana esteroidea), en la cual el paciente recibe una dosis de 50 mg/m<sup>2</sup>/d de prednisona durante 7 días (17).

Durante la terapia de inducción, el objetivo principal del tratamiento de inducción a la remisión (IR) es erradicar más del 99% de las células leucémicas, sin evidencia de blastos y restaurar la hematopoyesis normal y un estado funcional saludable (16). Esta etapa incluye principalmente la administración de múltiples fármacos durante la inducción de la remisión (29-33 días), prednisona 60 mg/m<sup>2</sup>/d durante 28 días, y vincristina 1.5 mg/m<sup>2</sup>/d (4 dosis), daunorrubicina 30 mg/m<sup>2</sup>/d (2, 3 ó 4 dosis, para riesgo estándar, intermedio y alto, respectivamente), L-asparaginasa 5000 UI/m<sup>2</sup>/d (8 dosis para riesgo estándar e intermedio, 6 dosis a riesgo alto), y quimioterapia intratecal (3 dosis). (17) (Ver Anexo 19.4).

La meta de las terapias de consolidación e intensificación es destruir las células leucémicas restantes que pueden no estar activas, pero que pueden comenzar una nueva expansión clonal y causar una recaída (18). En la etapa de consolidación, se administran dosis altas de metotrexate 500 mg/m<sup>2</sup>/dosis, pulsos frecuentes de vincristina 1.5 mg/m<sup>2</sup>, glucocorticoides (dexametasona 20-60 mg/m<sup>2</sup> y L-asparaginasa 25000 UI/dosis durante 20-30 semanas (17); con el propósito de seguir la erradicación de las células malignas residuales y terapia de reinducción con fármacos similares a los administrados durante la inducción a la remisión. Durante la fase de mantenimiento se administran al paciente dosis diarias de mercaptopurina 50 mg/m<sup>2</sup>/día y metotrexate 50 mg/m<sup>2</sup>/semana, con o sin pulso de vincristina (1.5 mg/m<sup>2</sup>/dosis) y dexametasona (6 mg/m<sup>2</sup>/día) (17).

#### **I.I.IV Glucocorticoides y sus efectos sobre el hueso**

Los glucocorticoides son un grupo de medicamentos utilizados ampliamente en diferentes enfermedades pediátricas por su acción antiinflamatoria (19). No obstante, sus beneficios y su uso, se asocian con numerosos efectos adversos, los cuales, principalmente se relacionan con dosis altas y tiempos prolongados de administración, de los cuales destacan el síndrome de Cushing, diabetes, obesidad abdominal, glaucoma, cataratas, retraso en el crecimiento, hipertensión y afecciones del sistema músculo esquelético como miopatía, osteonecrosis y osteoporosis (20). La incidencia de estos efectos se ha reportado que es mayor con dexametasona que con prednisona (21,22).

Los glucocorticoides disminuyen la formación de hueso y favorecen el aumento de la resorción ósea, debido a que ejercen una acción directa sobre los osteoblastos y aumentan el número de ciclos de remodelado óseo, disminuyendo la matriz ósea, lo que en conjunto ocasiona un desequilibrio en el proceso de recambio óseo (23). Se sugiere que la osteoporosis inducida por los glucocorticoides ocurre en dos fases. Una fase inicial rápida de pérdida ósea, originada por una resorción excesiva y una segunda más lenta ocasionada principalmente por la disminución de la formación ósea (24). El estudio de Soyka y cols., reporta una disminución en la masa ósea en niños que recibieron menos que 0.16 mg/kg/d de prednisona (25). Por su parte, el Panel de Consenso sobre la Prevención de Osteoporosis, Diagnóstico y Terapia, estableció que cualquier paciente que recibe una dosis oral de 5 mg/d de glucocorticoides o más, por un tiempo mayor a dos meses estaría en riesgo alto de presentar osteoporosis. Durante el tratamiento de LLA de riesgo estándar, un niño recibe una dosis acumulada aproximada de 2,000 mg/m<sup>2</sup> (26).

La osteoporosis inducida por glucocorticoides es actualmente la principal causa iatrogénica de osteoporosis (27). Este padecimiento se caracteriza por una DMO baja y una microarquitectura deteriorada que conduce a una disminución de la resistencia ósea (28). La disminución de la DMO se ha descrito en diferentes patologías pediátricas que incluyen en su tratamiento el uso de glucocorticoides, como es el caso las leucemias, la artritis reumatoide juvenil, falla renal crónica, lupus eritematoso sistémico juvenil, asma y dentro de los trastornos neuromusculares la Distrofia Muscular de Duchenne (7,29,30). En el paciente pediátrico onco-hematológico, la administración de dosis elevadas y prolongadas de glucocorticoides, citotóxicos como el metotrexate y radioterapia tienen un efecto negativo sobre la DMO, ocasionando una reducción significativa de esta y alteración en el funcionamiento de la hormona de crecimiento, con efectos sobre el metabolismo óseo (31–33). La incidencia estimada de osteoporosis inducida por glucocorticoides es del 50% más entre los pacientes tratados durante más de seis meses (19,34).

### **I.I.V Densidad mineral ósea y fracturas en pacientes con LLA**

El desarrollo del tejido óseo es susceptible a padecimientos como el cáncer y a su complejo tratamiento terapéutico que a menudo tienen graves repercusiones en el proceso de crecimiento óseo longitudinal y mineralización ósea (35). La disminución de la DMO destaca como uno de los potenciales efectos adversos en el tratamiento oncohematológico, tanto en pacientes que recibieron quimioterapia (36,37) como en aquellos que recibieron trasplante de células hematopoyéticas (38,39). Algunos estudios han demostrado una disminución de la DMO en pacientes con LLA en tratamiento (40–44). Inaba y cols., en un estudio realizado en 340 pacientes con LLA, recibiendo quimioterapia convencional sin irradiación craneal, con el propósito de monitorear los cambios en la DMO, entre el diagnóstico y durante el tratamiento, utilizando tomografía computarizada cuantitativa (QTC, por sus siglas en inglés), reportaron una disminución en el z-score de la DMO de 0.06 a -1.08 DE entre el diagnóstico y la semana 120 de tratamiento, mientras que en aquellos pacientes que presentaron una DMO baja al diagnóstico (z-score <1.5 DE), ésta permaneció disminuida en la semana 120 y a los 2 años de terapia (37). Por su parte Athanassidou y cols. evaluando el metabolismo óseo en un grupo de niños con LLA después de la inducción a la remisión y comparando con un grupo control de niños sanos, reportan una DMO disminuida en los pacientes con LLA (z-score -0.817) con respecto a los niños sanos (z-score -0.353) ( $p = 0.04$ ) (45). En contraposición Muszynska-Roslan y cols., en un estudio de tipo transversal en niños en remisión y una edad promedio de  $12 \pm 0.5$  años, los autores concluyen que no todos los pacientes con LLA están en riesgo de presentar una masa ósea baja (46).

Las fracturas son una causa importante de morbilidad en los pacientes con LLA, se ha reportado la presencia de fracturas entre el 16 % - 39 % de los pacientes con LLA en tratamiento y del 28 % - 36 % durante los primeros 5-6 años de seguimiento (35). En este sentido Ward y cols., reportaron una incidencia acumulada de fracturas vertebrales del 32.5 % y del 23 % de fracturas no vertebrales, cabe destacar que el 71.3 % de las fracturas se presentaron durante los dos primeros años del tratamiento y el 39 % de los niños con fracturas vertebrales eran asintomáticos (47).

### **I.I.VI Remodelado óseo**

El sistema óseo, se renueva constantemente mediante dos procesos, el modelado y la remodelación ósea (48,49). La remodelación ósea se produce continuamente para reparar el daño esquelético generado por la carga física diaria, evitar la acumulación de hueso frágil e hipermineralizado y mantener la homeostasis mineral, liberando las reservas de calcio y fósforo. Dicho proceso se ve organizado por la unidad básica multicelular, constituida por tres tipos de células principales: 1) los

osteoblastos, derivados de las células madre mesenquimales, tienen como característica principal expresar proteínas constitutivas como fosfatasa alcalina y colágeno de tipo I, lo que les confiere la propiedad de sintetizar la matriz ósea (50). Adicionalmente, se encargan de la producción de moléculas reguladoras, como la osteocalcina, osteopontina y osteonectina, RANKL y OPG (50,51); 2) los osteoclastos, células altamente especializadas derivadas de los preosteoclastos y miembros del sistema mononuclear fagocítico, llevan a cabo el proceso de resorción, lo que significa la destrucción del tejido «viejo» o dañado para su posterior reemplazo por matriz ósea nueva que, subsecuentemente, será mineralizada (50–53). Esta función la realizan a través de la acidificación y proteólisis de los componentes de la matriz y finalmente 3) el osteocito, célula estructural del hueso, deriva de la diferenciación y mineralización de los osteoblastos, aunque algunos autores no lo reconocen como parte de la unidad básica multicelular (54,55). Adicionalmente, el osteocito expresa a RANK en su membrana, que le permiten tener una función reguladora de la maduración de los osteoclastos (54–56). Esta estrecha coordinación entre la resorción y la formación garantiza el mantenimiento de la integridad estructural y permite la sustitución de hasta un 10% del esqueleto cada año (48,57). Por otra parte, el deterioro en el proceso de remodelación ósea a menudo resulta en la progresión a la osteoporosis, un importante problema de salud mundial. El ciclo de remodelación se compone de siete fases secuenciales (quiescencia, activación, reabsorción, reversión, formación, mineralización y terminación) y está controlado por diversos factores locales y sistémicos (58). Durante este proceso se producen diferentes marcadores de formación ósea, como la fosfatasa alcalina ósea (FAO), osteocalcina y de resorción ósea, como la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP-5b, por sus siglas en inglés) (59).

La calcitonina (CT), la hormona parathormona (PTH), la vitamina D3 (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) y los estrógenos son los principales reguladores hormonales de la resorción ósea osteoclástica. Sin embargo, cada vez es más evidente que los factores de crecimiento como el factor de crecimiento insulínico (IGF), el factor de crecimiento transformante (TGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) desempeñan un papel importante en la regulación de la remodelación ósea fisiológica (58). Entre estos factores reguladores, destacan el sistema RANK/RANKL/OPG, el cual genera señales locales y sistémicas, determinantes para el mantenimiento del equilibrio y el momento de la resorción y formación ósea dentro del ciclo de remodelado óseo (48).

### I.I.VII Vía de señalización Wnt y metabolismo óseo

La vía de señalización Wnt puede clasificarse en dos vías principales: canónica y no canónica. De ellas, la vía de señalización Wnt canónica promueve la osteogénesis (60). Esta se produce a través de la interacción con los receptores Frizzled (Fz) y si es necesario también a través de la interacción con correceptores como la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 5 y 6 (LRP5/6) (61). La vía de señalización canónica Wnt está mediada por la  $\beta$ -catenina. En ausencia de estimulación Wnt, la  $\beta$ -catenina citoplasmática es fosforilada por un complejo de glucógeno sintasa quinasa  $\beta$ -3 (GSK-3), coli poliposis adenomatosa (APC) y axina. La  $\beta$ -catenina fosforilada es además ubiquitinada y rápidamente degradada por el sistema proteasomal para evitar su acumulación citoplasmática. Por otro lado, la estimulación de Wnt suprime la actividad de GSK-3 e induce la acumulación citoplasmática de  $\beta$ -catenina. La  $\beta$ -catenina acumulada se transloca al núcleo donde induce la expresión de genes diana con el complejo factor de células T (TCF)/factor potenciador de linfocitos 1 (LEF1) y proteína de unión a CREB (CBP) (60,61).

Los ligandos Wnt se unen a los dominios BP para inducir la transducción de señales a través de la vía de señalización canónica Wnt. La familia de proteínas Dickkopf (DKK) y la esclerostina inhiben la señalización Wnt uniéndose de forma competitiva a esta región BP. La vía de señalización no canónica es un término genérico utilizado para vías no mediadas por  $\beta$ -catenina. Ligandos como Wnt5a y Wnt11 activan las vías Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  y Wnt/PCP sin inducir la acumulación intracelular de  $\beta$ -catenina. En la vía Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ , el aumento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  activa la proteína quinasa II dependiente de calmodulina (CaMK II) y la proteína quinasa C (PKC). En la vía Wnt/polaridad celular planar (PCP), pequeñas proteínas G como Rac y Rho se activan para aumentar la motilidad celular, así como para determinar la dirección y localización de los cilios. Wnt5a se une al dominio rico en cisteína (CRD) del receptor huérfano tipo tirosina quinasa (Ror) 1/2, un receptor transmembrana tipo tirosina quinasa de paso único, que contiene dominios tirosina quinasa, ricos en serina/treonina y ricos en prolina (60,61).

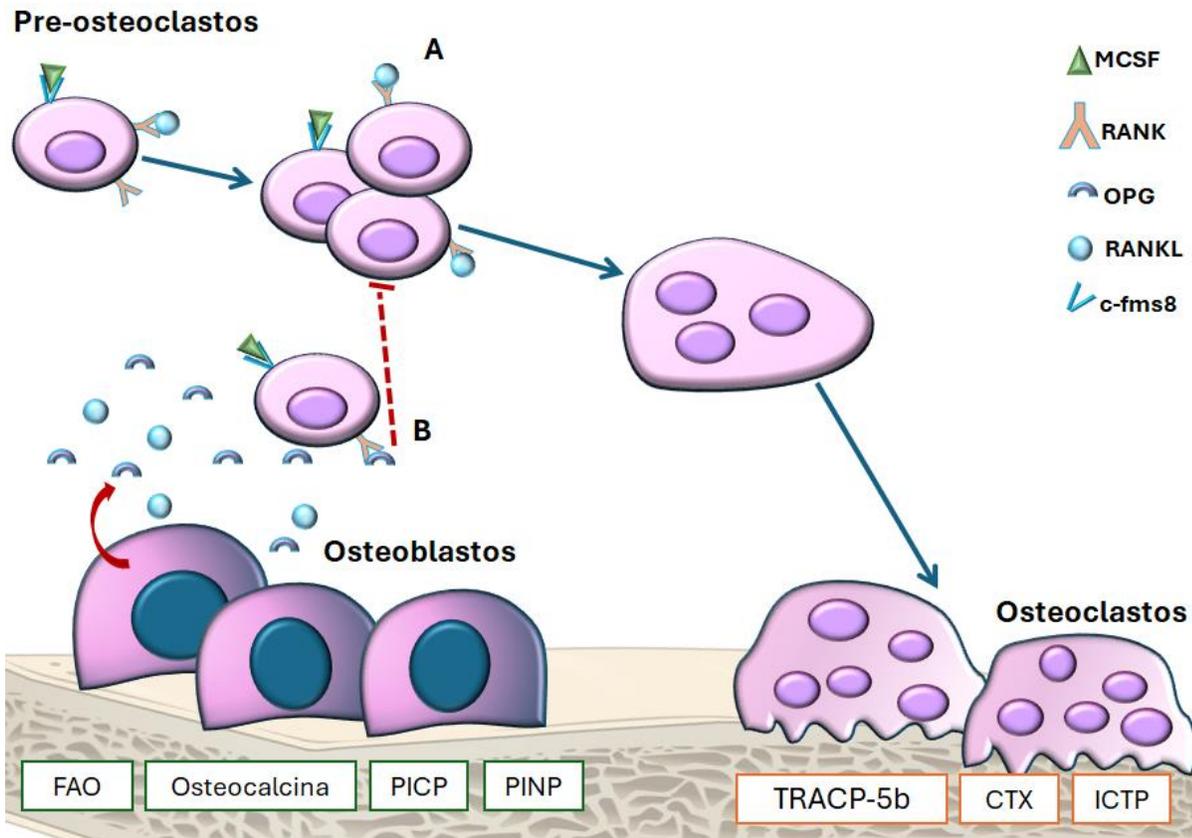
La señal canónica dependiente de  $\beta$ -catenina induce la formación ósea mediante la promoción de la osteoblastogénesis y la expresión de OPG, mientras que las señales no canónicas independientes de la  $\beta$ -catenina promueven la diferenciación de los osteoblastos mediante LRP5/6. Por otra parte la vía de señalización canónica Wnt en los precursores de osteoclastos suprime la osteoclastogénesis de forma independiente de OPG, probablemente mediante la inhibición de NFATc1 dependiente de vía AMPc-PKA (60).

### **I.I.VIII Sistema RANK/RANKL/OPG y glucocorticoides**

El sistema RANK/RANKL/OPG induce la diferenciación y activación de osteoclastos y osteoblastos, equilibrando el ciclo de remodelado entre la formación y resorción (58). RANK es una proteína homotrímica de transmembrana tipo I, que inicialmente fue detectada en células precursoras de osteoclastos (49). Mientras que RANKL es una proteína expresada por los osteoblastos y sus precursores, bajo el control de hormonas, citocinas y factores de crecimiento pro-resortivos y diversos factores osteo-activos, incluyendo glucocorticoides y vitamina D3 (36).

La interacción de RANKL/RANK induce la formación de osteoclastos maduros multinucleados, conduciendo a la resorción ósea (49,57,62,63). Un tercer integrante, la OPG, también es producida por los osteoblastos y su unión a RANKL inhibe la interacción RANKL/RANK y subsecuentemente la osteoclastogénesis. La unión de RANKL a su receptor natural RANK promueve la activación de la vía de señalización intracelular del factor nuclear- $\kappa$ B, como resultado, genera la diferenciación de los preosteoclastos en osteoclastos maduros, facilitando la resorción del hueso (54). Los precursores de osteoclastos expresan el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (c-fms) que, al ser estimulado, promueve la expresión de RANK. Los osteoblastos controlan la diferenciación de los precursores de los osteoclastos mediante la producción de RANKL, molécula de la superficie celular que es el efector principal del receptor RANK, y la OPG, receptor soluble para RANKL (54,62,63). La unión de RANKL al dominio extracelular de RANK conduce a la expresión de genes específicos involucrados en la diferenciación y sobrevivencia de osteoclastos y resorción ósea. El paso inicial de esta vía de señalización es la unión del factor asociado al receptor de TNF (TRAF, por sus siglas en inglés de Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor) dentro del dominio citoplasmático de RANK (49), lo que conduce a la activación del NF- $\kappa$ B y a su translocación al núcleo. Los TRAFs constituyen una familia de proteínas adaptadoras y, la mayoría de ellas participan en la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y de los miembros de la familia de la proteína activada por mitógenos (MAP, por sus siglas en inglés de Mitogen-Activated Protein). Diferentes estudios sugieren que TRAF6 juega un papel crítico en la diferenciación y activación de los osteoclastos (49,64–66). Al menos siete vías de señalización son activadas por la proteína quinasa mediada por RANK, cuatro de ellas regulan la osteoclastogénesis y tres regulan la activación de osteoclastos (63). Por su parte, OPG actúa como un receptor señuelo bloqueando la unión de RANKL a su receptor celular RANK (67), por lo tanto, es un regulador negativo de la señalización de RANK, capaz de inhibir la osteoclastogénesis (64). La OPG también es producida por los osteoblastos en respuesta a agentes anabólicos como los estrógenos y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ , por sus siglas en inglés de Transforming

growth factor  $\beta$ ) relacionado a las BMPs y a la vía de Wnt/ -  $\beta$  catenina (67,68). En estudios realizados en ratones con deficiencia de OPG, se ha reportado la presencia de osteoporosis. Mientras que la sobreexpresión de OPG o administración de dosis altas de OPG exógena inducen cambios similares a la osteopetrosis, destacando la relevancia fisiológica de la OPG (69–71) (Figura 1).



**Figura 1. Remodelado óseo.** El sistema RANK/RANKL/OPG se encuentra regulada por el receptor activador del factor nuclear-  $\kappa$ B (RANK), el cual es expresado en la superficie de los pre-osteoclastos, mientras que el ligando del receptor activador del factor nuclear- B (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG) son expresados por los osteoblastos. A) La unión de RANK con su ligando natural permite la diferenciación de los pre-osteoclastos a osteoclastos, B) en contraste la unión de RANKL con OPG inhibe este proceso. RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B; OPG, osteoprotegerina; c-fms, receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos, FAO, fosfatasa

alcalina ósea; TRACP-5b, fosfatasa ácida tartrato-resistente; PINP, propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I; PICTP, propéptido C-terminal del procolágeno tipo I; CTX, telopéptido C-terminal del colágeno tipo I; ICTP, telopéptido C-terminal entrecruzado del colágeno.

Un efecto importante de los glucocorticoides en el sistema óseo está mediado por RANKL y OPG (72,73). Se ha informado que los glucocorticoides estimulan la diferenciación de los osteoclastos directamente por el aumento de la señalización de RANK e indirectamente por la inhibición de la producción del interferón- $\beta$ , que se sabe suprime la diferenciación de los osteoclastos y estimula la producción de RANKL y la inhibición de OPG por parte de las células osteoblásticas, lo que favorece la osteoclastogénesis y la resorción ósea. Todos estos factores pueden contribuir a la fase inicial de la pérdida ósea inducida por los glucocorticoides. Cuando esto ocurre, los pacientes pueden presentar un estado de remodelación ósea disminuida (74,75). Humphrey y cols., evaluando el efecto de diferentes ligandos de los receptores de glucocorticoides sobre la producción y expresión de OPG y RANKL en líneas celulares osteoblásticas humanas, demostraron que el Deflazacort fue al menos 10 veces menos potente como inhibidor de la producción de OPG en comparación con la prednisolona. A pesar de esta diferencia de potencia, a la dosis máxima probada (10  $\mu$ M), el Deflazacort fue tan eficaz como la prednisolona y la dexametasona inhibiendo la producción de OPG. También, demostraron que el Deflazacort estimula la expresión de RANKL en 1.2 veces más, mientras que la prednisolona lo hace hasta 6 veces más (76).

Específicamente se ha reportado que la dexametasona incrementa la expresión de RANKL mediante la disminución de la expresión del miRNA-338-3p y del miRNA 17/20a, los cuales se han descrito como reguladores negativos de la expresión de RANKL. La reducción en la expresión de estos miRNAs favorece la diferenciación y activación de los osteoclastos inducida por glucocorticoides (77,78). Adicionalmente se ha demostrado que los receptores de glucocorticoides *NR3C1* incrementan la actividad del promotor de RANKL, a través de la unión directa a los elementos de respuestas de glucocorticoides en el sitio +352 de la región del promotor de RANKL, favoreciendo la expresión del RNAm de RANKL (79). Por otra parte, el silenciamiento de *NR3C1* ocasiona una ligera disminución del RNAm de RANKL, sugiriendo que *NR3C1* se encuentra involucrado en la regulación transcripcional de RANKL. Por otro lado, la dexametasona modula la expresión de OPG a diferentes niveles de la transcripción del RNAm a la secreción de proteínas. Esto ocurre a partir de tres mecanismos de transcripción principales, que incluyen a AP-1, Runx2 y la vía de señalización canónica Wnt-b catenina (80).

También el exceso de glucocorticoides genera un descenso de la absorción y resorción de calcio, así como un incremento de la PTH, favoreciendo a una disminución de la osteoblastogénesis e incremento de la apoptosis de los osteoblastos (81).

## **Capítulo II. Antecedentes**

### **II.I Sistema RANK/RANKL/OPG en LLA**

Como se mencionó anteriormente el sistema RANK/RANKL/OPG tiene un papel importante durante el remodelado óseo (58,67). Adicionalmente, se han reportado alteraciones en las concentraciones plasmáticas y séricas en diversas patologías pediátricas (82–85). Recientemente, un estudio realizado en un modelo murino demostró que la expresión de RANKL en células leucémicas tiene un papel importante en la destrucción ósea (86). En este sentido, Muggeo y cols., evaluaron las concentraciones de marcadores de recambio óseo en 39 pacientes con LLA que ya habían concluido la fase de intensificación ( $7.64 \pm 4.47$  años) y 49 controles ( $8.7 \pm 4.7$  años). Los autores, reportaron concentraciones mayores de RANKL (1,954 pmol/L vs. 3,759 pmol/L), OPG (3.7 vs. 4.3 pmol/L) y una relación RANKL/OPG (581 vs. 762) mayor en los pacientes con LLA comparado con el grupo control (87). Por otra parte, el estudio realizado por Hablas y cols., cuyo objetivo fue evaluar la relación entre el eje RANK/RANKL/OPG, y el estado de nutrición de vitamina D en 60 sobrevivientes de LLA ( $10.25 \pm 3.27$  años) y 60 controles ( $10.1 \pm 3.33$  años) pareados por género y edad. Los autores observaron que los sobrevivientes de LLA presentaron concentraciones mayores de RANK (73.5 ng/mL vs. 64.7 ng/mL), RANKL (523 pg/mL vs. 367 pg/mL) y menores niveles de OPG (3.9 ng/mL vs. 5.6 ng/mL) comparado el grupo de niños sanos (88). Estas modificaciones en el metabolismo óseo pueden influir en la DMO e incremento en el riesgo de presentar a largo mayor frecuencia de fracturas.

### **II.II Vitamina D y sistema RANK/RANKL/OPG en LLA**

La vitamina D tiene un papel bien conocido en el mantenimiento de la homeostasis del calcio y la salud ósea. En lo que respecta a su acción no sólo está relacionada con el metabolismo óseo y el equilibrio de fósforo/calcio sino también con efectos importantes en múltiples tipos celulares (43). La exposición baja al sol, las deficiencias nutricionales, la disminución de la actividad física, la administración de metotrexate sistémico o intratecal, el tratamiento con glucocorticoides a largo plazo y la radiación, son los posibles factores de riesgo de deterioro del estado nutricional de la 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) y del metabolismo óseo en los pacientes con LLA. Esto incrementa el riesgo de osteoporosis, así como la de enfermedades cardiovasculares y neoplasias nuevas en los sobrevivientes de LLA (89). Hun Ju Lee y cols., al evaluar la concentración de vitamina D en 97 pacientes con leucemia mieloblástica

aguda, reportaron que el 35% de los pacientes presentaron niveles insuficientes de vitamina D (20-31.9 ng/ml) y un 30% fueron clasificados como deficientes (< 20 ng/ml). En otro estudio, Thomas y cols., observaron que las concentraciones más bajas de 25(OH)D circulantes se relacionaban con una etapa avanzada de la enfermedad y una mala respuesta a la terapia. Los autores señalan que la concentración sérica disminuida de vitamina D es un marcador potencial de pronóstico en pacientes con leucemia (90). Simmons JH y cols., en una cohorte de 75 niños y adolescentes sobrevivientes de LLA, que recibieron terapia convencional (14.5 años) o fueron tratados con trasplante de células madre (15.6 años), reportan que el 53% de los pacientes presentaron concentraciones insuficientes de vitamina D (15-29 ng/dL) y 12% fueron deficientes (<15 ng/dL) (91). Esta deficiencia/insuficiencia de vitamina D en los sobrevivientes de LLA fue similar a la reportada en población pediátrica de los Estados Unidos. La deficiencia/insuficiencia de vitamina D puede resultar en hiperparatiroidismo secundario, lo cual provoca un aumento en la actividad osteoclástica, y por lo tanto, se activa la resorción de hueso (92), que conduce al desarrollo de osteoporosis y fracturas (93).

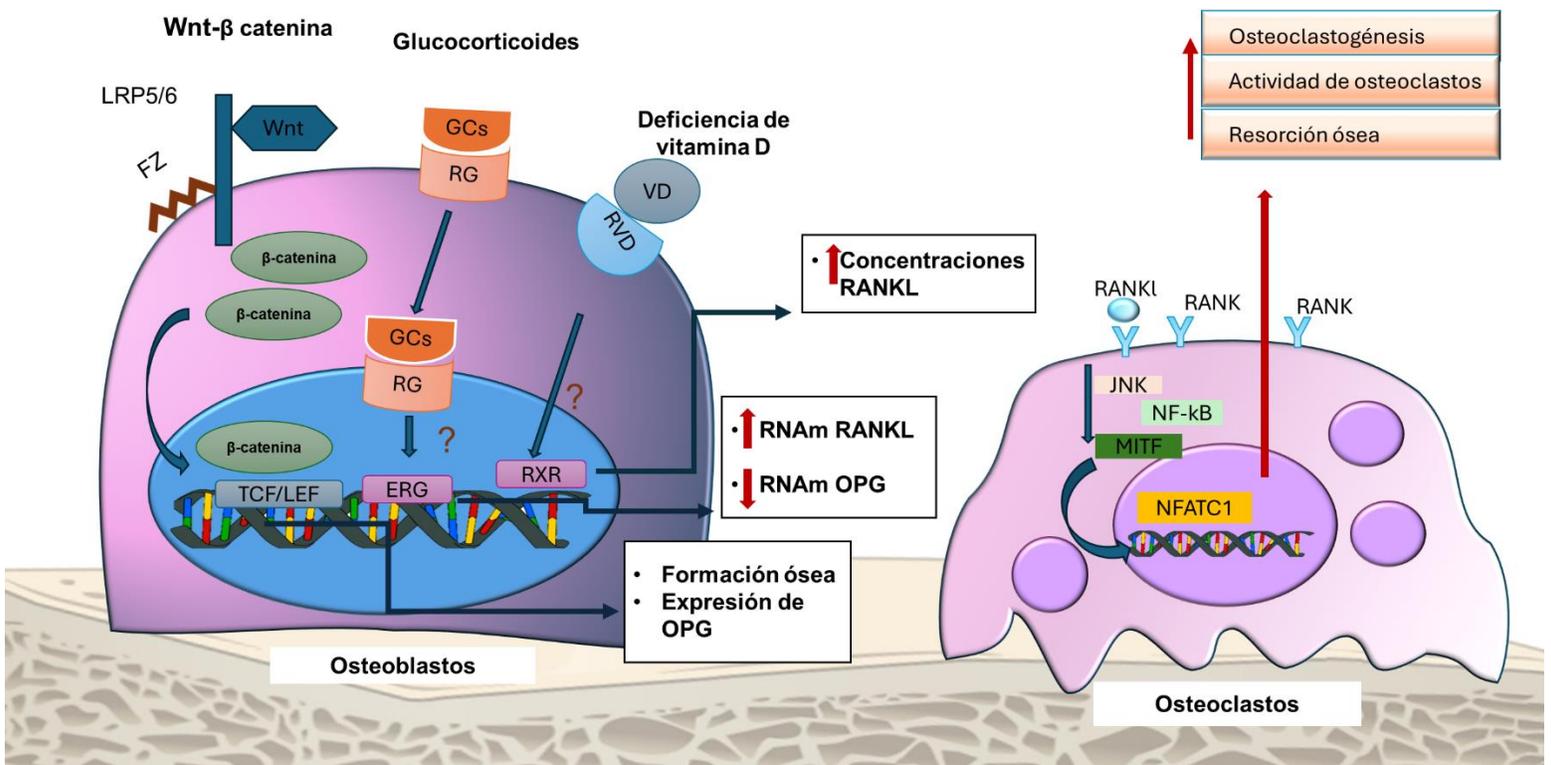
Para nuestro conocimiento, son escasos los estudios donde exploren la relación entre la deficiencia de vitamina D y el cociente RANKL/OPG en población pediátrica con LLA. En el estudio realizado por Hablas y cols., reportaron una correlación negativa entre las concentraciones de RANK ( $r = -0.477$ ,  $p = 0.002$ ) y RANKL ( $r = -0.685$ ,  $p = 0.001$ ), y positiva con las concentraciones de OPG ( $r = 0.347$ ,  $p = 0.028$ ) y las concentraciones de vitamina D de sobrevivientes de LLA (88). En relación con los pacientes con LLA en tratamiento, Solmaz y cols., realizaron una intervención en niños con diagnóstico reciente de LLA ( $N = 29$ ), donde asignaron aleatoriamente a 15 niños al grupo de suplementación durante 6 meses (10 µg/d de calcitriol + 100 µg/d de vitamina K) y 14 niños en el grupo control (terapia estándar). Los resultados de este estudio muestran que la relación OPG/RANKL incrementó significativamente en el grupo tratado al mes de suplementación ( $0.44 \pm 0.3$  vs.  $0.70 \pm 0.24$ ;  $p = 0.015$ ). A los 6 meses no hubo diferencias, entre grupos. Los autores sugieren que la combinación de estas vitaminas tuvo un efecto positivo sobre la estructura ósea, sugiriendo que el incremento observado del cociente OPG/RANK, se asocia con un balance entre la actividad osteoclástica y osteoblástica, favoreciendo la formación ósea (94).

En este contexto, la exploración de la relación entre las concentraciones vitamina D y la administración de glucocorticoides sobre el cociente RANKL/OPG en el paciente pediátrico con LLA, resulta relevante, dado que un desbalance en la expresión o función de algún componente de este sistema puede inducir la desregulación del ciclo de remodelado y generar modificaciones en la densidad mineral ósea, aumentando en el paciente pediátrico con LLA el riesgo a largo plazo de presentar

fracturas. Adicionalmente, se ha reportado que la relación RANKL/OPG, se asocia de forma inversa con las contracciones de 25 hidroxivitamina D en suero, lo cual se traduce en un aumento de los niveles de RANKL, generando un aumento en la formación de osteoclastos y la resorción ósea (Figura 2) (73).

En resumen, diferentes estudios han demostrado el efecto de la deficiencia de vitamina D y el impacto de la administración de corticoides sobre el incremento de las concentraciones de RANKL, la relación RANKL/OPG y disminución de las concentraciones de OPG en pacientes pediátricos con LLA en tratamiento. Este desequilibrio en la expresión o función de cualquier componente de este sistema puede inducir la desregulación del ciclo de remodelado y generar modificaciones en la DMO. Estos efectos pueden aumentar el riesgo a largo plazo de osteoporosis y fracturas en pacientes pediátricos con LLA.

Por lo tanto, es necesario analizar los cambios en los niveles de RANKL, OPG y 25(OH)D, la relación RANKL/OPG y otros marcadores de recambio óseo en pacientes con LLA durante el tratamiento.



**Figura 2.** Efecto de la vía de señalización Wnt, glucocorticoides y deficiencia de vitamina D sobre el proceso de remodelado óseo. La vía canónica Wnt, mediante la unión al receptor LRP5/6 y FZ, generan un incremento en producción de β-catenina, la cual al translocar al núcleo y unirse a TCF/LEF, favorece a la producción de OPG., mediante La administración de glucocorticoides produce un incremento en las concentraciones de RANKL mediante un incremento en el mRNA de RANKL y una disminución de los niveles de OPG al reducir el RNAm de OPG. Adicionalmente, la deficiencia de vitamina D produce un incremento en las concentraciones de RANKL. Estas alteraciones generan un incremento en la osteoclastogénesis y actividad de los osteoclastos. RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear kB; OPG, osteoprotegerina; TCF/LEF, factor de células T/factor potenciador linfoide; proteína 5/6 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad; FZ, frizzled; GCs, glucocorticoides; RG, receptor de glucocorticoides; ERG, elementos de respuesta a glucocorticoides; VD, vitamina D; RVD, receptor de vitamina D; RXR, receptor X retinoide; JNK, cinasas c-Jun N-terminal; NF-kB, factor nuclear kappa B; MITF, factor de transcripción asociado con microftalmia, NFATC1, factor nuclear de células T activada.

## **Planteamiento del problema**

En el paciente pediátrico con LLA en tratamiento se ha documentado la disminución de la densidad mineral ósea, así como la presencia de fracturas entre el 16% - 39% de los pacientes, lo cual afecta gravemente el pico máximo óseo y la calidad de vida de los sobrevivientes de LLA. La administración de dosis elevadas y prolongadas de glucocorticoides tienen un efecto negativo sobre el metabolismo óseo. La osteoporosis inducida por glucocorticoides es actualmente la principal causa iatrogénica de osteoporosis.

La terapia a base de glucocorticoides induce un incremento en la expresión de RANKL y una disminución de la expresión de OPG, favoreciendo la maduración, actividad y supervivencia de los osteoclastos en la tasa de resorción ósea en estos pacientes. Adicionalmente, se ha reportado una relación inversa entre las concentraciones bajas de 25(OH)D y RANKL, lo que en conjunto ocasiona un desequilibrio en el proceso de recambio óseo, que se refleja en una disminución de la DMO, una alteración de la arquitectura del hueso y a largo plazo mayor riesgo de presentar fracturas.

A la fecha son pocos los estudios que han explorado la relación entre la dosis acumulada de glucocorticoides y la deficiencia de vitamina D sobre el cociente RANKL/OPG y marcadores de recambio óseo en el paciente pediátrico con LLA.

## Justificación

La Ciudad de México tiene una de las tasas de mayor incidencia de leucemia reportadas en el mundo (55 a 59 casos/millón de niños menores 14 años). Los glucocorticoides son un grupo de medicamentos utilizados ampliamente en diferentes enfermedades pediátricas por su acción antiinflamatoria. No obstante, sus beneficios, su uso se asocia con efectos adversos, de los cuales destacan afecciones como osteonecrosis y osteoporosis.

En el paciente pediátrico onco-hematológico, la administración de dosis elevadas y prolongadas de glucocorticoides, así como de citotóxicos como el metotrexate y radioterapia tienen un efecto negativo sobre el metabolismo óseo, ocasionando una disminución de la densidad mineral ósea. Durante el tratamiento de LLA de riesgo estándar, un niño recibe una dosis acumulada aproximada de 2,000 mg/m<sup>2</sup>. Un efecto importante de los glucocorticoides en el sistema óseo está mediado por RANKL y OPG. Además, la deficiencia de vitamina D reportada en estos pacientes, se asocia con un aumento en la relación RANKL/OPG, lo cual incrementa la formación y actividad de osteoclastos y la resorción ósea.

En este contexto, la exploración de la influencia de la administración de glucocorticoides y las concentraciones de vitamina D y sobre el cociente RANKL/OPG y marcadores del metabolismo óseo en el paciente pediátrico con LLA, resulta particularmente relevante, ya que permite identificar alteraciones en los componentes del sistema RANK/RANKL/OPG que pueden inducir la desregulación del ciclo de remodelado y generar modificaciones en la densidad mineral ósea, aumentando en el paciente pediátrico con LLA el riesgo a largo plazo de presentar osteoporosis y fracturas.

### **Pregunta de investigación**

¿Cuál es la relación entre la dosis acumulada de glucocorticoides y las concentraciones de vitamina D sobre los cambios en el cociente RANKL/OPG en niños con leucemia linfoblástica aguda en tratamiento?

## **Hipótesis**

Los pacientes con LLA que reciban dosis altas de glucocorticoides y presenten deficiencia de vitamina D, mostrarán una relación inversa con los cambios en el cociente RANKL/OPG y alteraciones en los marcadores del metabolismo óseo a la remisión.

### **Objetivo general**

Evaluar la relación entre la dosis acumulada de glucocorticoides y la deficiencia de vitamina D sobre los cambios en el cociente RANKL/OPG y marcadores del metabolismo óseo en niños con LLA a la remisión.

### **Objetivos particulares**

1. Reportar la dosis acumulada de prednisona de la ventana esteroidea y de la remisión de una cohorte de niños con LLA en tratamiento.
2. Determinar y comparar los cambios en las concentraciones séricas de vitamina D entre el diagnóstico y el final de la remisión de una cohorte de niños con LLA en tratamiento.
3. Determinar y comparar los cambios en las concentraciones RANKL, OPG el cociente RANKL/OPG entre el diagnóstico y el final de la remisión, de una cohorte de niños con LLA en tratamiento.
4. Determinar y comparar los cambios en las concentraciones de los marcadores de remodelado óseo (fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina, TRACP-5b, PTH, fósforo, Ca iónico) entre el diagnóstico y la remisión de una cohorte de niños con LLA tratamiento con glucocorticoides.

## **Capítulo III. Material y Métodos**

### **III.I Diseño del estudio**

Estudio de cohorte, prospectivo, analítico, observacional.

### **III.II Población de estudio**

Pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA provenientes del Servicio de Hematología del Hospital de Pediatría de CMNS XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

### **III.II Criterios de selección de los sujetos de estudio**

#### **III.II.I Inclusión:**

1. Pacientes sin distinción de sexo.
2. Pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de *novo* de LLA de células B.
3. Edad:  $\geq 4$  -  $\leq 17$  años 11 meses.
4. Pacientes cuyos padres o tutores aceptaran participar en el estudio y firmaran la carta de consentimiento y sentimiento informado (niños  $\geq 8$  años)

#### **III.II.II Exclusión:**

1. Con tratamiento previo con glucocorticoides.
2. Pacientes con enfermedad renal/hepática o síndrome de Down.

#### **III.II.III Eliminación:**

1. Pacientes que rechazaran continuar con el estudio.
2. Pacientes que durante la etapa de evaluación desarrollaran falla renal/hepática. secundaria al tratamiento.
3. Pacientes con seguimiento incompleto.

### III.III Tamaño de la muestra

Para el cálculo del tamaño de muestra se utilizó el estudio Wasilewska y cols. (95), donde se cuantificó la RANKL/OPG en plasma en un grupo de pacientes con síndrome nefrótico y se comparó con la concentración de un grupo control sano ( $0.11 \pm 0.12$  vs.  $0.06 \pm 0.08$ ,  $p = <0.01$ ), considerando un valor de  $\alpha = 0.05$  y un valor de  $\beta = 0.20$ . Para determinar los cambios en la vitamina D, se utilizó el estudio de Maddheshiya y cols. (96), en el cual se reportan un incremento en el porcentaje de pacientes con deficiencia/insuficiencia de vitamina D al finalizar la quimioterapia (62% vs. 89.4%,  $p = 0.00$ ), considerando un valor de  $\alpha = 0.05$  y un valor de  $\beta = 0.20$ , fueron necesarios 32 pacientes con LLA. Considerando un 20 % de pérdidas, fueron reclutados 40 pacientes con diagnóstico de LLA de *novo*.

### III.IV Definición de las variables

**Cuadro 1.** Definición de las variables de estudio.

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable y unidades
<b>Variable independiente</b>			
<b>Dosis acumulada de glucocorticoides</b>	Cantidad total de glucocorticoides que se administra a un paciente en un tiempo determinado.	<p>Se registró la administración de la dosis de glucocorticoides durante la venta esteroidea y al final de la etapa de remisión de acuerdo con el grupo de riesgo.</p> <p><b>Riesgo alto:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Niños &lt;1 año &gt;10 años,</li> <li>• Recuento de glóbulos blancos <math>\geq 50,000/\mu\text{l}</math> al diagnóstico</li> <li>• Presencia de masa mediastinal</li> <li>• Inmunofenotipo de células T</li> <li>• Infiltración al sistema nervioso central (SNC).</li> </ul> <p><b>Riesgo intermedio:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• &gt;7 - &lt;10 años</li> <li>• Recuento inicial de leucocitos de <math>&gt; 20,000/\text{mm}^3</math> - <math>&lt; 50,000/\text{mm}^3</math> en el momento del diagnóstico</li> <li>• Inmunofenotipo de células T</li> </ul> <p><b>Riesgo estándar:</b></p> <p>Inmunofenotipo de células B</p> <p>&gt;1 año - &lt;7 años</p>	<b>Cuantitativa continua</b> <b>mg/m<sup>2</sup> de superficie corporal</b>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>•Recuento de glóbulos &lt; 50,000/<math>\mu</math>l al momento del diagnóstico</li> <li>•Ausencia de infiltración a SNC</li> <li>•Ausencia de masa mediastinal</li> </ul>	
<b>Variables dependientes</b>			
<b>Cociente RANKL/OPG</b>	El cociente RANKL/OPG es un indicador de la integridad y de remodelado del tejido óseo.	El cociente de RANKL/OPG se determinó mediante la relación de los valores de RANKL y de OPG. Se comparó entre la medición basal y al final la etapa de remisión.	<b>Cuantitativa, continua</b>
<b>RANKL</b>	El ligando del receptor activador del factor nuclear $\kappa$ B (RANKL), es expresado por los osteoblastos y su señalización permite la diferenciación y actividad de los osteoclastos y osteoclastogénesis.	Se determinó en plasma mediante un ensayo comercial de ELISA al diagnóstico y al final de la etapa de remisión.	<b>Cuantitativa, continua, pmol/L</b>
<b>OPG</b>	La osteoprotegerina (OPG) es una proteína que actúa como receptor señuelo del RANKL. Su actividad biológica contrarresta los efectos del RANKL al competir por la activación del RANK y de esta forma inhibe la	Se determinó en plasma mediante ensayo comercial de ELISA al diagnóstico y al finalizar la etapa de remisión.	<b>Cuantitativa, continua pmol/L</b>

	diferenciación y activación de osteoclastos y disminuye la resorción ósea.		
<b>25 (OH)D</b>	Prohormona con múltiples efectos en diferentes de tejidos y procesos fisiológicos. Su acción está relacionada, con el metabolismo mineral ósea y el equilibrio fosforo cálcico.	Se determinó en suero por Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución acoplada a un Espectrómetro de Masas al diagnóstico y al finalizar la etapa de remisión.	<b>Cuantitativa continua</b> <b>ng/mL</b> <b>Puntos de corte (97):</b> <b>Suficiencia</b> ≥30ng/mL <b>Insuficiencia</b> 21-29 ng/mL <b>deficiencia</b> <20ng/mL
<b>Osteocalcina</b>	Proteína sintetizada por el osteoblasto. Es la proteína no colágena más abundante la matriz ósea.	Se determinó en plasma mediante un ensayo comercial de ELISA al diagnóstico y al final de la etapa de remisión.	<b>Cuantitativa continua</b> <b>pg/dL</b>
<b>Fosfatasa alcalina específica del hueso (FAO)</b>	La isoforma de fosfatasa alcalina esquelética, o específica del hueso, es una proteína producida por los osteoblastos. Esta enzima juega un papel muy importante en la mineralización y en la formación osteoide.	La FAO se determinó en plasma utilizando un kit de ELISA durante la etapa de remisión.	<b>Cuantitativa continua</b> <b>U/L</b>
<b>Fosfatasa ácida resistente al tartrato-5b (TRACP-5b)</b>	Enzima expresada en osteoclastos. Está juega un papel importante como regulador de la resorción	TRACP-5b se determinó en plasma utilizando un kit de ELISA.	<b>Cuantitativa continua</b> pg/mL

	<p>ósea y la función metabólica de los osteoblastos.</p>		
<b>Calcio iónico</b>	<p>Es la fracción activa del calcio, desde el punto de vista metabólico, fisiológico y bioquímico. El calcio ionizado representa el 40% del calcio total.</p>	<p>Los valores de las concentraciones de calcio iónico se obtuvieron a partir del expediente clínico durante la venta esteroidea y al final de la etapa de remisión.</p>	<p><b>Cuantitativa continua</b> <b>mg/dL</b></p>
<b>Hormona paratiroidea</b>	<p>Hormona sintetizada y secretada por las glándulas paratiroides. La principal función de la PTH es el mantenimiento de la homeostasis del calcio en la sangre, regula la masa ósea de forma endocrina. La disminución de la PTH se manifiesta con el desarrollo de hipocalcemia.</p>	<p>Los valores de las concentraciones de PTH se obtuvieron a partir del expediente clínico durante la venta esteroidea y al final de la etapa de remisión.</p>	<p><b>Cuantitativa continua</b> <b>mg/dL</b></p>
<b>Fósforo</b>	<p>El fósforo es un mineral que constituye el 1% del peso corporal total de una persona. Es el segundo mineral más abundante en el cuerpo. Está presente en cada célula del cuerpo. La mayor parte del fósforo</p>	<p>Los valores de las concentraciones de fósforo se obtuvieron a partir del expediente clínico durante la venta esteroidea y al final de la etapa de remisión.</p>	<p><b>Cuantitativa continua</b> <b>mg/dL</b></p> <p>3-9 años: 3.2-5.8 mg/dL 10-15 años: 3.3-5.4 mg/dL</p>

	en el organismo se encuentra en los dientes y en los huesos.		>15 años: 2.4-4.4 mg/dL (98)
<b>Variables confusoras</b>			
<b>Pronóstico de riesgo de recaída</b>	Factores pronósticos que determinan el esquema de tratamiento, la respuesta al tratamiento oncológico y supervivencia del paciente con LLA. Se categorizarán de acuerdo con las siguientes características:	Registro de la estratificación de riesgo de recaída para LLA en: <ol style="list-style-type: none"> <li><b>1. Riesgo alto</b></li> <li><b>2. Riesgo intermedio</b></li> <li><b>3. Riesgo estándar</b></li> </ol>	<b>Cualitativa</b> <b>politómica</b> <b>Riesgo alto</b> <b>Riesgo intermedio</b> <b>Bajo riesgo</b>
<b>Edad</b>	Corresponde a los años que ha vivido una persona desde nuestro nacimiento hasta un punto determinado de la vida.	Se registró la edad en años transcurridos desde el nacimiento hasta el momento del estudio.	<b>Cuantitativa</b> <b>continua</b> <b>Años/meses</b>
<b>Sexo biológico</b>	Son las características biológicas que definen a los seres humanos como hombre o mujer.	Se registró el sexo biológico de los pacientes como F (femenino) y M (masculino)	<b>Cualitativa</b> <b>dicotómica</b> <b>Hombre</b> <b>Mujer</b>

### III.V Procedimientos

Los pacientes fueron reclutados de acuerdo con los criterios de selección. Una vez identificados, se procedió a explicar y solicitar a los padres y al niño (cuando así se requirió por la edad) la participación

en el estudio y su autorización por escrito (Anexo I y II). A cada paciente se le informó acerca del objetivo del proyecto, el carácter voluntario de su participación, así como la posibilidad de retirarse del estudio en cualquier momento, sin que por ello se viera afectada su atención médica. Al momento del diagnóstico se realizó la historia clínica del paciente y registró de las mediciones antropométricas. Los pacientes fueron citados en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional S XXI, en condiciones de ayuno y se tomó una muestra de sangre periférica para determinar los niveles séricos de 25(OH)D, RANKL, OPG, osteocalcina, fosfatasa alcalina ósea (FAO) y fosfatasa ácida resistente al tartrato-5b (TRACP-5b, por sus siglas en inglés). Otros marcadores del metabolismo óseo como PTH, fósforo y calcio iónico se obtuvieron del expediente clínico (Figura 3).

### **III.VI Muestras biológicas**

Posterior al consentimiento informado y con ayuno de al menos 8 horas se tomó una muestra de sangre (7 mL) periférica que se colectó en un tubo Vacutainer™(5 mL por tubo) heparinizado para la determinación de 25(OH)D, RANKL, OPG, fosfatasa alcalina ósea, TRACP-5b y otros marcadores de metabolismo óseo (PTH, fósforo y calcio iónico), al momento del diagnóstico y final de la inducción la remisión. Las muestras fueron tomadas por personal capacitado y siempre que fue posible coincidir con la cita de laboratorio se tomaron el mismo día para reducir el número de punciones.

La muestra de sangre se centrifugó a 3500 rpm, durante 10 minutos. El suero y plasma se separó en alícuotas y se almacenó a -80°C para su posterior cuantificación de 25(OH)D, RANKL, OPG, calcitonina, FAO y TRACP-5b.

### **III.VII Medición de 25(OH)D**

El análisis de la 25(OH)D se llevó a cabo por el método de Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución acoplada a un Espectrómetro de Masas (UPLC-MS-MS), técnica analítica que combina la capacidad de separación física de la cromatografía de líquidos con la capacidad de detección selectiva y confirmación de la identidad molecular del espectrómetro de masas. La UPLC-MS-MS, se utiliza para la detección y caracterización de compuestos polares y no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de los analitos, como resultado se pueden analizar un gran número de especies químicas con alta sensibilidad. El equipo de UPLC-MS-MS con el que se cuenta, es un sistema ACQUITY UPLC Clase H con un detector de fotodiodos (PDA) y un espectrómetro de masas (ACQUITY QDA) con modo de Ionización por Electrospray (ESI), además de un sistema de gestión de eluyentes cuaternario y una sensibilidad analítica de 5 ng/mL y un intervalo de 100 ng/mL para

25(OH)D. Dicho equipo permite realizar métodos con mayor resolución, rapidez y sensibilidad para el análisis simultáneo de diversos analitos. Como parte del control de calidad se realizaron curvas estándar y por cada 7 muestras se analiza una muestra de suero control (99).

Las concentraciones de 25(OH)D fueron clasificadas de acuerdo con la Sociedad Americana de Endocrinología de la siguiente manera: deficiencia de vitamina D (< 20 ng/mL), insuficiencia de vitamina D (20–29 ng/mL) y suficiencia de vitamina D ( $\geq$  30 ng/mL) (97).

### **III.VIII Medición de las concentraciones de RANKL, OPG y marcadores del metabolismo óseo**

Las concentraciones de RANKL se determinaron utilizando un ensayo de microesferas magnéticas de RANKL humano (HRNKLMAG-51K-01) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) con una sensibilidad analítica de 0.5 pg/mL y un intervalo de 4.88-20000 pg/mL. La información debe ser consistente, en la tabla de variables indica que es mediante el método de ELISA. Las concentraciones de OPG y osteocalcina se determinaron utilizando un panel de microesferas magnéticas para hueso humano (HBNMAG-51K) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), con una sensibilidad analítica de 1.9 pg/mL y un intervalo de 7-30000 pg/mL para OPG y una sensibilidad analítica de 68.5 pg/mL y un intervalo de 146-600000 para osteocalcina. El cociente RANKL/OPG se calculó para cada paciente dividiendo el valor de RANK entre el valor de OPG.

En una submuestra de 20 pacientes se realizó el análisis de las concentraciones de FAO y TRACP-5b mediante ELISA. La FAO se midió utilizando un kit comercial (MBS60806) (MyBiosource Inc., EE.UU., San Diego, CA), con una sensibilidad analítica de 1.89 U/L y un rango de 3-900 U/L, y los niveles altos se definieron como  $\geq$  percentil 75 (100). TRACP-5b se evaluó utilizando un kit comercial (MBS045195) (MyBiosource Inc., EE.UU., San Diego, CA), que tiene una sensibilidad analítica de 0.1 pg/mL y un rango de 0.5-16 pg/mL. Todas las mediciones se realizaron en el momento del diagnóstico y de la remisión completa.

Los valores de las concentraciones de PTH, calcio ionizado y de fósforo se obtuvieron del expediente clínico de los pacientes.

### **III.IX Mediciones antropométricas**

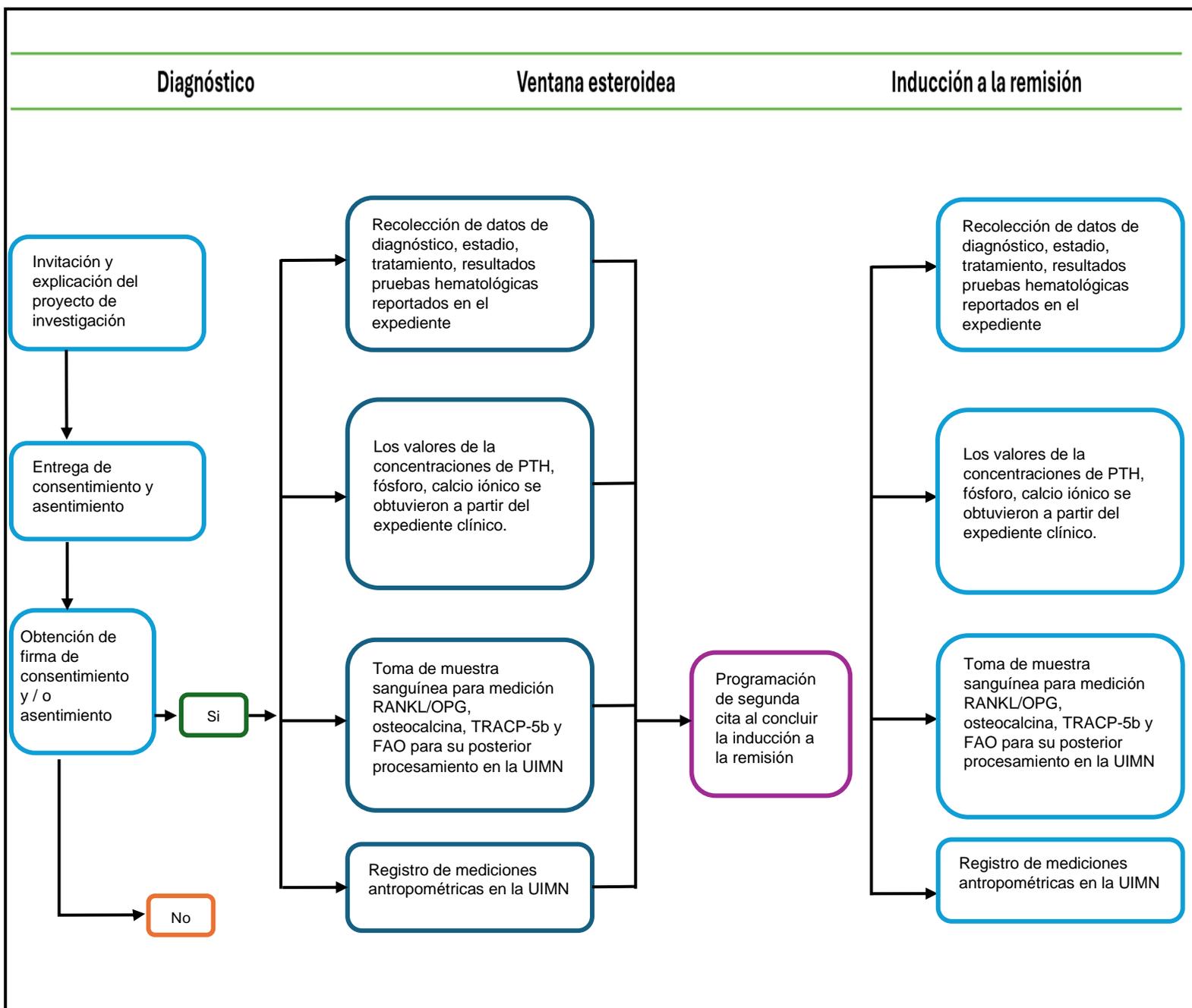
#### **III.IX.I Peso y composición corporal.**

El peso y composición corporal se obtuvieron utilizando una báscula de bioimpedancia eléctrica, InBody 230 (InBody USA, Cerritos, CA, USA) con capacidad máxima de 200 kg y una sensibilidad de 0.1 gramos, previamente calibrada, con el niño de pie sobre la plataforma, sin calzado, ni objetos

metálicos y con la menor ropa posible. Las mediciones se realizaron en el momento del diagnóstico y de la remisión completa.

### **III.IX.II Estatura.**

Se registró utilizando un estadímetro SECA 222 con un rango de medición de 6 cm a 230 cm y divisiones de 1 mm. El niño fue colocado de pie sobre la plataforma, sin zapatos y sin accesorios en la cabeza que pudieran interferir con la medición. Se posicionó en el plano horizontal de Frankfort (línea entre el punto más bajo de la órbita del ojo y el trago), con los brazos colocados libremente al lado del tronco con las palmas de las manos hacia el muslo. Los talones juntos tocando la pared con las puntas separadas en un ángulo de 60°; los glúteos, la espalda y la parte posterior del cráneo deberán estar en contacto con la pared. Se le pidió al niño que inhale profundamente y que mantenga una postura recta sin alterar el equilibrio del peso en ambas piernas. La parte móvil del estadímetro se situó en la parte más superior del cráneo presionando con fuerza suficiente el cabello del sujeto. Todas las mediciones se realizaron en el momento del diagnóstico y de la remisión completa.



**Figura 3.** Esquema de los procedimientos realizados a los pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica de células B durante el seguimiento. PTH, parathormona; RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear kB; OPG, osteoprotegerina; cociente RANKL/OPG; FAO, fosfatasa alcalina ósea; TRACP-5b, fosfatasa ácida tartrato-resistente 5b; UIMN, Unidad de Investigación Médica en Nutrición.

### **III.X Aspectos éticos**

El investigador responsable declara que en este estudio se respetaron las normas internacionales en investigación en seres humanos expresados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial de Principios Éticos para la Investigación Médica en seres humanos adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia y se apega a la Ley General de Salud en México. De acuerdo con el Capítulo I, Artículo 17 del apartado sobre los Aspectos Éticos en Investigación en seres Humanos de la Ley general de Salud en México, la propuesta se clasificó como investigación con riesgo mínimo.

Este proyecto fue registrado ante el Comité Local de Investigación en Salud, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, número de registro institucional **R-2021-3603-063**.

### **III.XI Riesgos y molestias**

La toma de muestra implicó un riesgo mínimo, debido a que en algunas ocasiones el procedimiento puede causar un poco de dolor o una discreta molestia y es posible que se pueda formar un hematoma. Siempre que fue posible se trató de colectar la muestra de sangre al mismo tiempo que el personal del laboratorio, esto para evitar más de una punción venosa. El volumen de sangre extraído no fue motivo para que se alteraran los niveles de hemoglobina.

### **III.XII Confidencialidad**

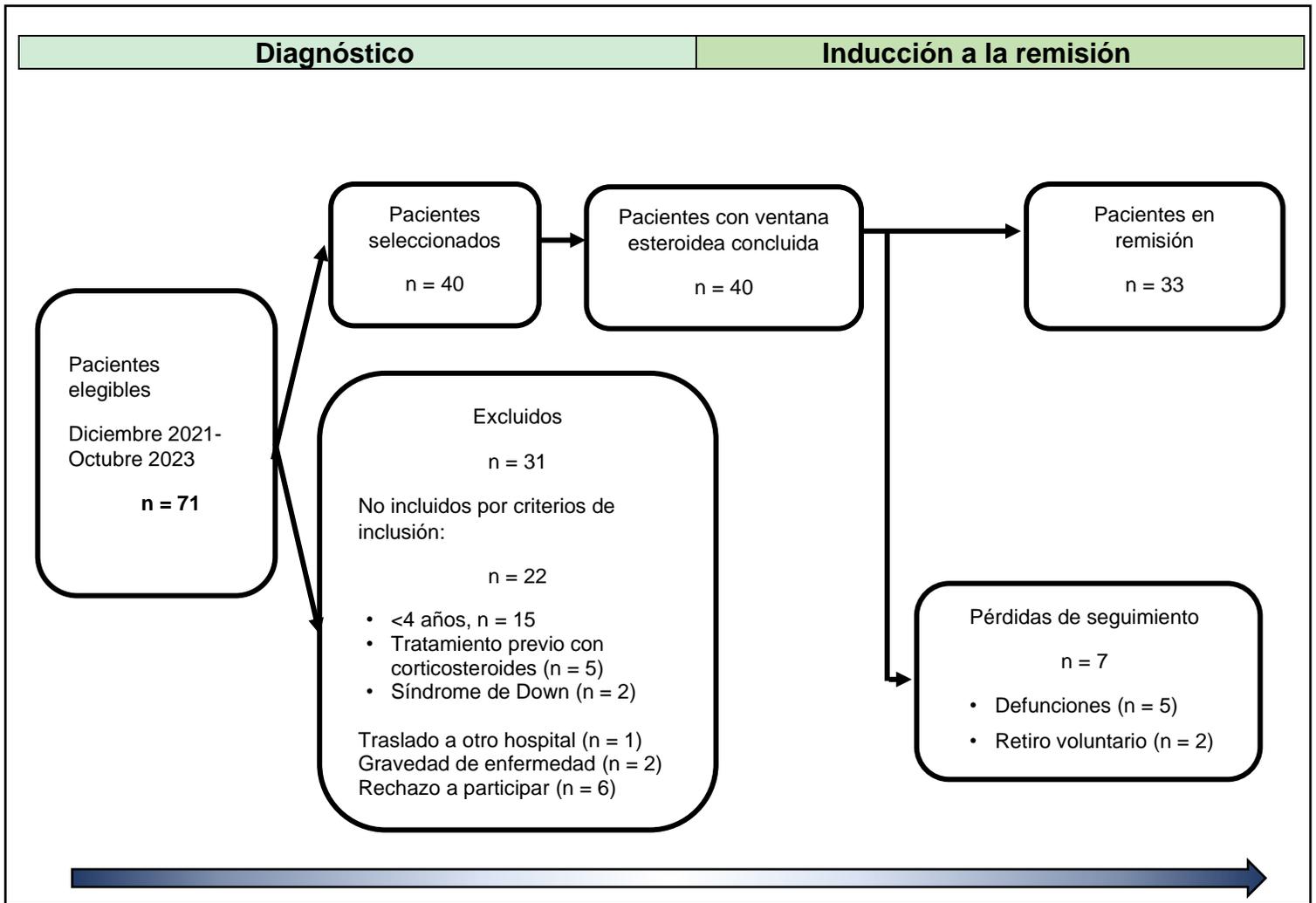
Durante el estudio se respetó el derecho de confidencialidad y de estar informados de las determinaciones de laboratorio y de los resultados de evaluación clínica de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio. Los datos relacionados con el paciente fueron manejados en forma confidencial, para ello se les asignó un número de folio individual consecutivo, con el que se le identificó en la base de datos diseñada para el estudio. No se identificó a ninguno de ellos en las presentaciones o publicaciones que derivaron de este estudio. La información es resguardada en dispositivos electrónicos por el investigador principal (María de Lourdes Barbosa Cortés) durante un periodo de 5 años.

### **III.XIII Plan de análisis estadístico**

Los datos de cada paciente se incorporaron mensualmente en hojas precodificadas para el posteriormente análisis de estas variables, se utilizó el programa SPSS Statistics versión 23.0 (IBM, Armonk, Nueva York). La distribución de los datos se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk. Los datos se presentaron como media  $\pm$  desviación estándar o como mediana e intervalos (mínimo-máximo). Para analizar los cambios en las concentraciones de 25(OH)D, el cociente RANKL/OPG y los marcadores del metabolismo óseo a lo largo del tiempo (diagnóstico y final de la remisión), se utilizó una prueba de t-Student para muestras relacionadas o prueba de rangos de Wilcoxon. Las diferencias entre grupos de riesgo de recaída y estado de nutrición de la vitamina D (deficiencia vs. insuficiencia) se evaluaron mediante la prueba de t-Student o U de Mann-Whitney de acuerdo con la distribución. Para la descripción de las variables cualitativas se aplicó la prueba de  $X^2$  o prueba exacta de Fisher. Para determinar la correlación entre el cociente RANKL/OPG, las concentraciones de 25(OH)D con los marcadores del metabolismo óseo se realizaron correlaciones de Spearman o Pearson. La asociación entre el cociente RANKL/OPG, las concentraciones de los marcadores de metabolismo óseo, de 25(OH)D y la dosis acumulada de glucocorticoides fue determinada mediante una regresión lineal.

## Capítulo IV. Resultados

Durante el periodo comprendido entre diciembre 2021 a octubre 2023, de los 71 pacientes elegibles con LLA de células B, 31 pacientes fueron excluidos; de los cuales 22 no reunieron los criterios de inclusión, un paciente fue trasladado a otro centro hospitalario, dos no fueron considerados por la gravedad del padecimiento al momento del diagnóstico y en seis representantes legales de los pacientes no autorizaron su participación en el estudio. Los 40 pacientes seleccionados al momento del diagnóstico concluyeron la ventana esteroidea. Durante el seguimiento, se presentaron siete pérdidas, cinco de estos fallecieron por complicaciones propias del tratamiento y en el caso de dos pacientes abandonaron el estudio. Hasta esta fase del estudio 33 pacientes concluyeron las dos etapas de evaluación (**Figura 4**).



**Figura 4.** Diagrama de flujo del estudio en pacientes con leucemia linfoblástica aguda en tratamiento.

#### **IV.I Características clínicas y demográficas de los pacientes con LLA**

Las características clínicas y demográficas de los pacientes con LLA se presentan en el cuadro 2. Del total de los pacientes analizados, el 61.0 % de los pacientes fueron varones (n = 20) y el 39.0 % mujeres (n = 13). Al momento del diagnóstico, la mediana de la edad fue de 9.2 años. De acuerdo con las tablas de crecimiento de la OMS (Organización Mundial de la Salud), la mediana para el IMC (17.1 Kg/m<sup>2</sup>) de los pacientes presentó un percentil adecuado. El 60.0 % fue clasificado dentro del grupo de riesgo alto y 40.0 % al de riesgo habitual. En cuanto a los indicadores clínicos el 39.0 %, 94.0 %, 91.0 y 73.0 % de los niños presentó leucopenia, anemia, trombocitopenia y neutropenia respectivamente (Cuadro 2). El 91 % de los pacientes presentaron niveles bajos de vitamina D; de los cuales el 30.0 % (n = 10) se clasificó con insuficiencia (< 30 ng/mL) y el 61.0 % (n = 20) con deficiencia (<20 ng/mL). Cabe señalar que, al momento del diagnóstico, de la muestra total analizada, sólo tres (9.0%) de los niños fueron clasificados con niveles adecuado de niveles de vitamina D (>30 ng/mL). De acuerdo con el valor de la mediana 102.3 UI/L, el análisis de las concentraciones de la fosfatasa alcalina ósea mostró que el 40.0 % de los pacientes se ubicaron en el percentil  $\geq 75$  (**Cuadro 2**).

**Cuadro 2.** Características de los pacientes con LLA al momento del diagnóstico.

Variable	Total (n = 33)
<b>Demográficos</b>	
Sexo biológico	
Hombre, n (%)	20 (61)
Mujer, n (%)	13 (39)
Edad (años)	9.2 (4.0, 17.7)
<b>Antropométricos y composición corporal</b>	
Peso (Kg)	33.4 (13.3, 99.6)
Talla (m)	1.4 ± 0.3
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	17.1 (12.1, 32.5)
IMC (percentil)	54.8 (3.0, 100.0)
Masa muscular (Kg)	12.5 (3.8, 40.7)
Masa grasa (Kg)	6.1 (1.5, 42.2)
Masa grasa (%)	22.5 ± 10.1
<b>Parámetros clínicos</b>	
Clasificación	
Riesgo alto, n (%)	21 (64)
Riesgo intermedio, n (%)	3 (9)
Riesgo habitual, n (%)	9 (27)
Leucocitos (miles/ $\mu$ L)	7.8 (0.9, 425.3)
Leucopenia n (%)	13 (39)
Hemoglobina (g/dL)	9.2 ± 2.2
Anemia, n (%)	31 (94)
Plaquetas (miles/ $\mu$ L)	39.0 (10.0, 425.0)
Trombocitopenia, n (%)	30 (91)
Neutrófilos (miles/ $\mu$ L)	0.6 (0.1, 5.9)
Neutropenia, n (%)	24 (73)
<b>Marcadores del metabolismo óseo</b>	
RANKL (pg/mL)	65.5 (4.0, 343.0)
OPG (pg/mL)	463.9 (210.9, 2,661.7)
RANKL/OPG ratio	0.14 (0.004, 1.06)
Fosfatasa alcalina ósea, (UI/L)	102.3 (44.8, 371.9)
FAO $\geq$ 75 percentil, n (%)	8 (40)
Osteocalcina (pg/mL)	24,098 (8,900, 11,3641.)
TRACP-5b (pg/mL)	0.3 (0.2, 1.1)
Vitamina D (ng/mL)	17.4 (5.7, 61.9)
Suficiencia, n (%)	3 (9)
Insuficiencia, n (%)	10 (30)
Deficiencia n (%)	20 (61)

Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar, mediana (mínimo, máximo) y número (porcentaje). Clasificación de la vitamina D: suficiencia ( $\geq$ 30 ng/mL), insuficiencia (21-29 ng/mL), deficiencia (<20ng/mL). IMC: Índice de Masa Corporal; RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear kB; OPG, osteoprotegerina; FAO, fosfatasa alcalina ósea; TRACP-5b, fosfatasa ácida tartrato-resistente.

## IV.II Evaluación de los marcadores de metabolismo óseo

### IV.II.1. Cambios en las concentraciones de 25(OH)D, los marcadores del recambio óseo y el cociente RANKL/OPG de acuerdo con el riesgo de recaída de LLA.

El análisis por grupos de riesgo de recaída (riesgo estándar-intermedio y riesgo alto) se presenta en el **Cuadro 3**. Se observaron diferencias en la dosis acumulada de prednisona entre los grupos de riesgo ( $p = <0.001$ ). El grupo de riesgo estándar-intermedio presentó concentraciones mayores de 25(OH)D durante la medición basal y remisión, comparado con el grupo de riesgo alto ( $p = 0.036$  y  $p = 0.033$ , respectivamente), así como, una tendencia a presentar una mayor concentración de RANKL y osteocalcina ( $p = 0.069$  y  $p = 0.063$ , respectivamente) al momento del diagnóstico. En cuanto al grupo de riesgo alto, éste presentó concentraciones mayores de Ca iónico ( $p = 0.006$ ) y una tendencia en las concentraciones de PTH ( $p = 0.058$ ), durante la remisión comparado con el grupo de riesgo estándar-intermedio.

El análisis al interior de los grupos de riesgo reveló que el grupo de riesgo estándar intermedio presentó una tendencia a disminuir las concentraciones de 25(OH)D (22.0 ng/mL vs. 20.2 ng/mL,  $p = 0.06$ ) entre la medición basal y la remisión, mientras que el grupo de riesgo alto no mostró cambios durante el seguimiento. En el grupo de riesgo alto observamos un incremento significativo en las concentraciones de RANKL ( $p = 0.006$ ) y el cociente RANKL/OPG ( $p = 0.006$ ), mientras que el grupo de riesgo estándar-intermedio sólo presentó una tendencia a incrementar las concentraciones de RANKL y el cociente RANKL/OPG ( $p = 0.07$   $p = 0.085$ , respectivamente). En cuanto a la concentración de OPG, el análisis mostró una disminución en el grupo de riesgo alto ( $p = 0.025$ ) y una tendencia a disminuir en el grupo de riesgo estándar-intermedio ( $p = 0.06$ ) en la remisión en comparación con el valor basal. Adicionalmente, observamos un aumento de las concentraciones de osteocalcina ( $p = 0.01$  y  $p < 0.001$ ) y Ca iónico ( $p = 0.01$  y  $p < 0.001$ ) en ambos grupos ( $p = 0.028$  y  $p = 0.039$ ) entre el valor basal y la remisión. Sin embargo, no observamos cambios en las concentraciones de FAO, TRACP-5b, PTH y fósforo entre el diagnóstico y la remisión en los grupos de riesgo de recaída.

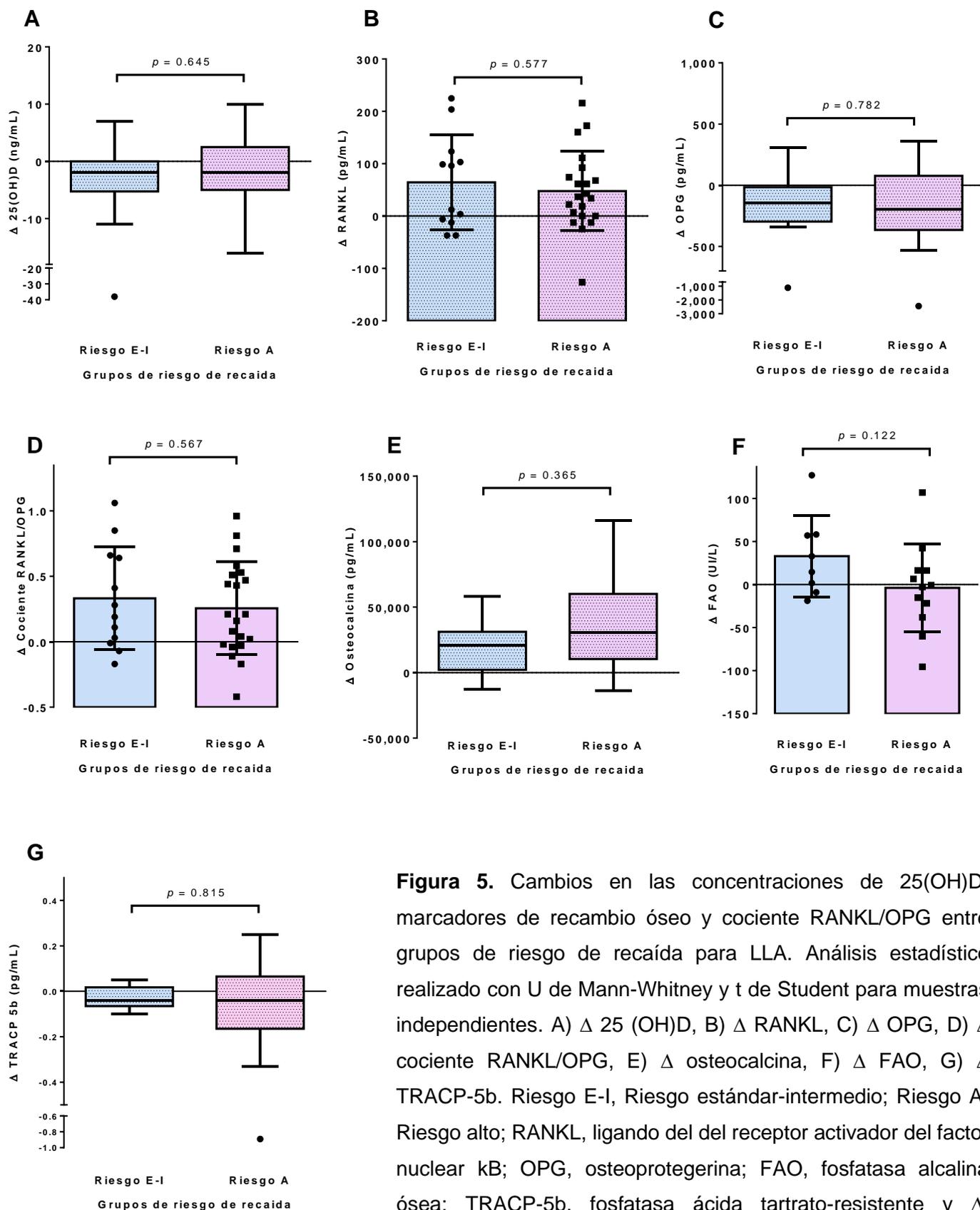
Al comparar los cambios de las concentraciones de 25(OH)D, marcadores de recambio óseo y el cociente RANKL/OPG no se observaron diferencias entre los grupos de riesgo de recaída (**Figura 5 y 6**).

**Cuadro 3.** Cambios en las concentraciones de 25(OH)D, los marcadores de recambio óseo y el cociente RANKL/OPG de acuerdo con el riesgo de recaída de LLA.

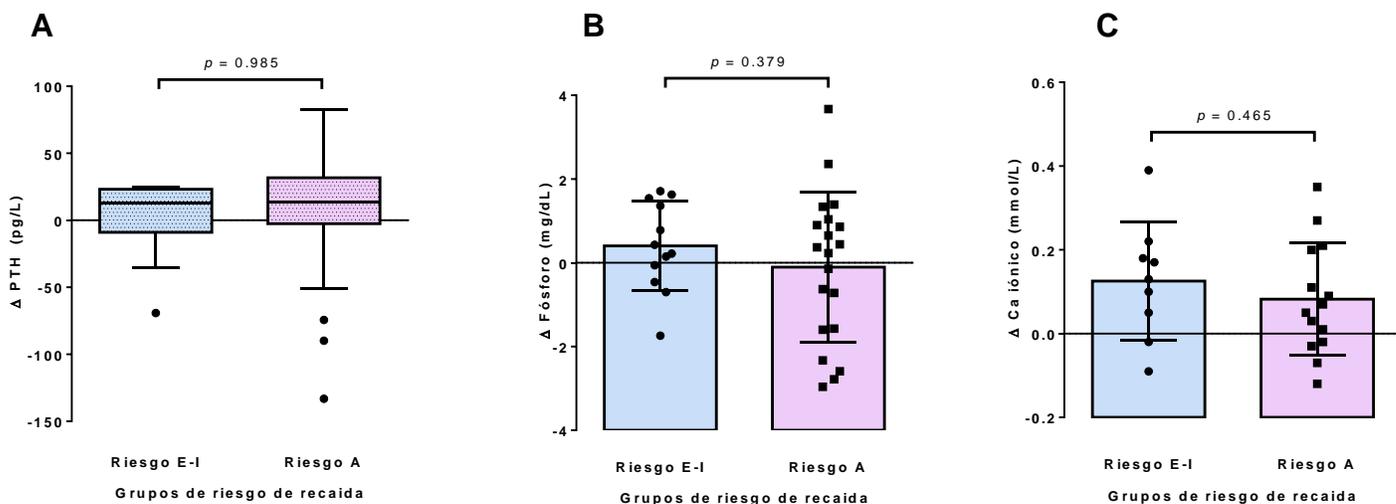
		Riesgo estándar-intermedio	Riesgo alto	<i>p</i>
		N = 12	N = 21	
<b>Dosis acumulada Glucocorticoides, (mg/m<sup>2</sup>)</b>		1,906.1 ± 460.4	3,104.8 ± 875.1	<0.001
<b>25 (OH)D3, (ng/mL)</b>	<i>Basal</i>	22.0 (7.8, 61.9)	15.6 (5.7, 27.7)	<b>0.036</b>
	<i>Remisión</i>	20.2 (9.8, 39.2)	12.7 (5.7, 28.2)	<b>0.033</b>
	<i>p</i>	0.062	0.351	
<b>RANKL, (pg/mL)</b>	<i>Basal</i>	71.6 (30.0, 177.0)	59.3 (4.0, 343.0)	0.069
	<i>Remisión</i>	161.8 (34.0, 318.0)	96.3 (22.0, 281.0)	0.291
	<i>p</i>	0.077	<b>0.006</b>	
<b>OPG, (pg/mL)</b>	<i>Basal</i>	459.5 (247.1, 1440.5)	493.5 (210.9, 2661.7)	0.868
	<i>Remisión</i>	297.2 (189.6, 852.0)	273.0 (171.9, 843.9)	0.956
	<i>p</i>	0.060	<b>0.025</b>	
<b>RANKL/OPG</b>	<i>Basal</i>	0.2 (0.1, 0.7)	0.1 (0.01, 1.1)	0.365
	<i>Remisión</i>	0.2 (0.1, 1.3)	0.5 (0.1, 1.1)	0.518
	<i>p</i>	0.085	<b>0.006</b>	
<b>Osteocalcina (pg/mL)</b>	<i>Basal</i>	29,227 (9935, 48468)	22,090 (8900, 113641)	0.063
	<i>Remisión</i>	49,994 (19969, 93300)	48,379 (512, 186327)	1.000
	<i>p</i>	<b>0.010</b>	<b>&lt;0.001</b>	
<b>FAO (UI/L)</b>	<i>Basal</i>	95.2 (48.3, 144.0)	108.6 (44.0, 372.3)	0.200
	<i>Remisión</i>	91.6 (68.9, 238.6)	98.6 (60.5, 357.1)	0.851
	<i>p</i>	0.401	0.814	
<b>TRACP-5b, (pg/mL)</b>	<i>Basal</i>	0.26 (0.24, 0.37)	0.26 (0.19, 1.09)	0.714
	<i>Remisión</i>	0.25 (0.19, 0.32)	0.22 (0.16, 0.44)	0.664
	<i>p</i>	0.123	0.239	
<b>PTH, (pg/mL)</b>	<i>Basal</i>	20.5 (6.3, 114.6)	25.1 (7.5, 165.4)	0.195
	<i>Remisión</i>	29.0 (16.2, 49.9)	41.2 (14.8, 122.2)	0.058

Continuación		Riesgo estándar-intermedio N = 12	Riesgo alto N = 21	<i>p</i>
	<i>p</i>	0.388	0.247	
Fósforo, (mg/dL)	<i>Basal</i>	4.8 ± 0.8	4.6 ± 1.0	0.675
	<i>Remisión</i>	5.2 ± 1.0	4.7 ± 1.3	0.118
	<i>p</i>	0.214	0.259	
Ca iónico, (mmol/L)	<i>Basal</i>	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.957
	<i>Remisión</i>	1.2 ± 0.05	1.2 ± 0.1	<b>0.006</b>
	<i>p</i>	<b>0.028</b>	<b>0.039</b>	

Los datos se expresan como media ± desviación estándar, mediana (mínimo, máximo) y número (porcentaje). Comparación entre grupos realizado con U de Mann-Whitney y t de Student para muestras independientes. Diferencias intragrupo realizado con prueba de rangos con signo de Wilcoxon y t de Student para muestras relacionadas. RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear kB; OPG, osteoprotegerina; FAO, fosfatasa alcalina ósea; TRACP-5b, fosfatasa ácida tartrato-resistente; PTH, parathormona y Ca iónico, Calcio iónico.



**Figura 5.** Cambios en las concentraciones de 25(OH)D, marcadores de recambio óseo y cociente RANKL/OPG entre grupos de riesgo de recaída para LLA. Análisis estadístico realizado con U de Mann-Whitney y t de Student para muestras independientes. A)  $\Delta$  25 (OH)D, B)  $\Delta$  RANKL, C)  $\Delta$  OPG, D)  $\Delta$  cociente RANKL/OPG, E)  $\Delta$  osteocalcina, F)  $\Delta$  FAO, G)  $\Delta$  TRACP-5b. Riesgo E-I, Riesgo estándar-intermedio; Riesgo A, Riesgo alto; RANKL, ligando del del receptor activador del factor nuclear kB; OPG, osteoprotegerina; FAO, fosfatasa alcalina ósea; TRACP-5b, fosfatasa ácida tartrato-resistente y  $\Delta$ , diferencias entre la medición basa y remisión.



**Figura 6.** Cambios en PTH, fósforo y calcio iónico entre grupos de riesgo de recaída para LLA. Análisis estadístico realizado con U de Mann-Whitney y t de Student para muestras independientes. A) PTH, parathormona; B) Fósforo; C) Ca iónico, Calcio iónico. PTH, parathormona; Ca iónico, Calcio iónico y  $\Delta$ , diferencias entre la medición basa y remisión.

#### IV.II.II Asociación entre las concentraciones de los marcadores de recambio óseo y el cociente RANKL/OPG de acuerdo con el riesgo de recaída de LLA.

El análisis multivariado mostró que el modelo con predictores como la edad (años), sexo biológico y grupo de riesgo de recaída no presentaron una asociación con los valores  $\Delta$  del cociente RANKL/OPG,  $\Delta$  de RANKL y  $\Delta$  de OPG (Cuadro 4). Al sustituir en el modelo la variable de riesgo de recaída por  $\Delta$  dosis acumulada de glucocorticoides ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ), nuevamente no se observó una asociación (**Cuadro 5**).

**Cuadro 4.** Modelos de regresión lineal para predictores de cambios en los  $\Delta$  de RANKL/OPG,  $\Delta$  de RANKL y  $\Delta$  de OPG.

	$\Delta$ RANKL/OPG		$\Delta$ RANKL		$\Delta$ OPG	
	$\beta$	<i>p</i>	$\beta$	<i>p</i>	$\beta$	<i>p</i>
Sexo biológico (M/F)	0.166	0.239	38.2	0.213	117.9	0.545
Edad (años)	0.009	0.639	2.67	0.528	-7.0	0.793
Grupos de riesgo de recaída	-0.143	0.446	-35.8	0.379	-20.8	0.936
<b>Modelo</b>	<b>R<sup>2</sup>= 0.080</b>	<b>0.481</b>	<b>R<sup>2</sup>= 0.096</b>	<b>0.393</b>	<b>R<sup>2</sup>= 0.017</b>	<b>0.918</b>

M, masculino; F, femenino;  $\Delta$  RANKL/OPG, diferencias entre la medición basal y remisión del cociente RANKL/OPG;  $\Delta$  RANKL, diferencias las concentraciones del ligando del receptor activador del factor nuclear kB entre la medición basal y remisión;  $\Delta$  OPG, diferencias las concentraciones de osteoprotegerina entre la medición basal y remisión Grupos de riesgo de recaída (riesgo estándar-intermedio y riesgo alto).

**Cuadro 5.** Modelos de regresión lineal para predictores de cambios en los  $\Delta$  de RANKL/OPG,  $\Delta$  de RANKL y  $\Delta$  de OPG.

	$\Delta$ RANKL/OPG		$\Delta$ RANKL		$\Delta$ OPG	
	$\beta$	<i>p</i>	$\beta$	<i>p</i>	$\beta$	<i>p</i>
Sexo biológico (M/F)	0.140	0.342	217.4	0.276	0.159	0.246
Edad (años)	-0.019	0.492	8.3	0.8.22	-0.007	0.602
$\Delta$ Dosis acumulada de glucocorticoides (mg/m <sup>2</sup> )	0.00	0.402	-0.182	0.471	0.012	0.168
<b>Modelo</b>	<b>R<sup>2</sup>= 0.073</b>	<b>0.539</b>	<b>R<sup>2</sup>= 0.062</b>	<b>0.607</b>	<b>R<sup>2</sup>= 0.122</b>	<b>0.280</b>

M, masculino; F, femenino;  $\Delta$  RANKL/OPG, diferencias entre la medición basal y remisión del cociente RANKL/OPG;  $\Delta$  RANKL, diferencias las concentraciones del ligando del receptor activador del factor nuclear kB entre la medición basal y remisión;  $\Delta$  OPG, diferencias las concentraciones de osteoprotegerina entre la medición basal y remisión,  $\Delta$  Dosis acumulada, diferencias las dosis acumuladas de prednisona (mg/m<sup>2</sup>) entre la medición basal y remisión. Grupos de riesgo de recaída (riesgo estándar-intermedio y riesgo alto).

#### IV.II.III *Cambios en los marcadores de recambio óseo y el cociente RANKL/OPG por estado de nutrición de vitamina D.*

Se analizaron las concentraciones de marcadores de recambio óseo y el cociente RANKL/OPG entre el grupo de insuficiencia y deficiencia de vitamina D (**Cuadro 6**). El grupo de insuficiencia de vitamina D presentó concentraciones mayores en la medición basal ( $p < 0.001$ ) y remisión ( $p = 0.001$ ) comparado con el grupo de pacientes con deficiencia de vitamina D. En la medición basal las concentraciones de OPG fueron mayores en el grupo de deficiencia de vitamina D, comparado con el grupo de insuficiencia de vitamina D ( $p = 0.044$ ).

Por otra parte, el grupo con deficiencia de vitamina D incrementó las concentraciones de RANKL ( $p = 0.002$ ), el cociente RANKL/OPG ( $p = 0,002$ ), mientras que la concentración de OPG disminuyó ( $p = 0.01$ ) entre la medición basal y la remisión, así como un incremento en las concentraciones de osteocalcina ( $p = 0.002$ ) y Ca iónico ( $p = 0.025$ ) durante el seguimiento. En el grupo con insuficiencia de vitamina D sólo se observaron incrementos significativos en el cociente RANKL/OPG ( $p = 0.047$ ), en las concentraciones de osteocalcina ( $p = 0.007$ ) y de PTH ( $p = 0.037$ ) (**Cuadro 6**).

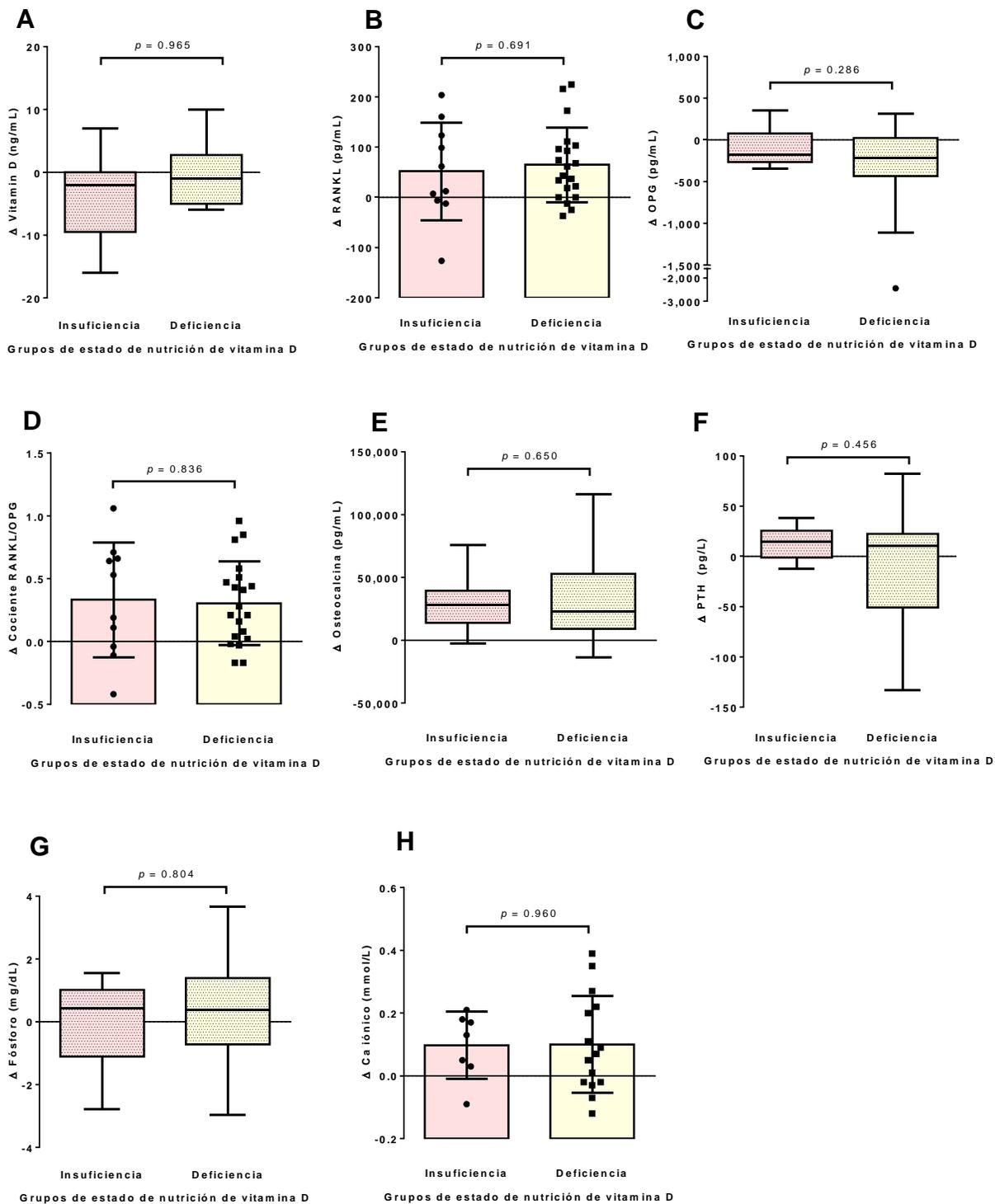
En la **figura 7** se muestra el análisis entre los grupos de estado de nutrición de vitamina D. Los valores de  $\Delta$  de las concentraciones de 25(OH)D, marcadores de recambio óseo y el cociente RANKL/OPG no presentaron diferencias entre los grupos.

**Cuadro 6.** Cambios en los marcadores de recambio óseo y en el cociente RANKL/OPG por estado de nutrición de vitamina D.

		Insuficiencia de vitamina D	Deficiencia de vitamina D	<i>p</i>
		N = 10	N = 20	
<b>Dosis acumulada Glucocorticoides, (mg/m<sup>2</sup>)</b>		2658.3 ± 10660.7	2831.5 ± 847.0	0.636
<b>25 (OH)D3, (ng/mL)</b>	<i>Basal</i>	<b>22.8 (20.6, 29.1)</b>	14.2 (5.7, 19.5)	<b>&lt;0.001</b>
	<i>Remisión</i>	<b>19.1 (12.2, 29.1)</b>	11.7 (5.7, 27.6)	<b>0.001</b>
	<i>p</i>	<b>0.051</b>	0.702	
<b>RANKL, (pg/mL)</b>	<i>Basal</i>	<b>70.1 (19.0, 343.0)</b>	<b>61.3 (4.0, 115.0)</b>	0.169
	<i>Remisión</i>	<b>165.7 (26.0, 318.0)</b>	<b>111.7 (22.0, 296.0)</b>	0.502
	<i>p</i>	<b>0.126</b>	<b>0.002</b>	
<b>OPG, (pg/mL)</b>	<i>Basal</i>	<b>387.8 (8210.9,678.3)</b>	<b>526.3 (276.9, 2661.7)</b>	<b>0.044</b>
	<i>Remisión</i>	255.5 (171.9, 569.0)	286.0 (179.0, 843.9)	1.000
	<i>p</i>	0.285	<b>0.011</b>	
<b>RANKL/OPG</b>	<i>Basal</i>	<b>0.21 (0.09, 1.1)</b>	<b>.012 (0.01, 0.38)</b>	0.091
	<i>Remisión</i>	<b>0.72 (0.05, 1.31)</b>	<b>0.42 (0.05, 1.13)</b>	0.307
	<i>p</i>	<b>0.047</b>	<b>0.002</b>	
<b>Osteocalcina (pg/mL)</b>	<i>Basal</i>	<b>27,576 (11865, 44829)</b>	<b>21819 (8900, 113640)</b>	0.509
	<i>Remisión</i>	<b>54585 (22220, 98229)</b>	<b>447,598 (512, 186327)</b>	0.559
	<i>p</i>	<b>0.007</b>	<b>0.002</b>	
<b>PTH, (pg/mL)</b>	<i>Basal</i>	<b>17.6 (6.3, 39.9)</b>	26.0 (7.5, 165.4)	0.124
	<i>Remisión</i>	<b>31.3 (14.8, 58.3)</b>	39.5 (16.6, 122.2)	0.429
	<i>p</i>	<b>0.037</b>	0.904	
<b>Fósforo, (mg/dL)</b>	<i>Basal</i>	4.9 ± 0.9	4.4 ± 0.9	0.170
	<i>Remisión</i>	4.9 ± 1.0	4.7 ± 1.4	0.630
	<i>p</i>	0.214	0.798	

Continuación		Insuficiencia de vitamina D	Deficiencia de vitamina D	<i>p</i>
		N = 10	N = 20	
Ca iónico, (mmol/L)	<i>Basal</i>	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.688
	<i>Remisión</i>	1.2 ± 0.05	1.2 ± 0.1	0.933
	<i>p</i>	<b>0.052</b>	<b>0.025</b>	

Los datos se expresan como media ± desviación estándar, mediana (mínimo, máximo) y número (porcentaje). Comparación entre grupos realizado con U de Mann-Whitney y t de Student para muestras independientes. Diferencias intragrupo realizado con prueba de rangos con signo de Wilcoxon y t de Student para muestras relacionadas. Clasificación de la vitamina D: insuficiencia (21-29 ng/mL), deficiencia (<20ng/mL). RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear kB; OPG, osteoprotegerina; PTH, parathormona y Ca iónico, Calcio iónico.



**Figura 7.** Cambios en las concentraciones de 25(OH)D, marcadores de recambio óseo y cociente RANKL/OPG entre grupos estado de nutrición de vitamina D en los niños con LLA. Análisis estadístico realizado con U de Mann-Whitney y t de Student para muestras independientes. A) Δ 25 (OH)D, B) Δ RANKL, C) Δ OPG, D) Δ cociente RANKL/OPG, E) Δ osteocalcina, F) Δ PTH, G) Δ Fósforo y H) Ca iónico. RANKL, ligando del del receptor activador del factor nuclear kB; OPG, osteoprotegerina; PTH, parathormona; Ca iónico, Calcio iónico y Δ, diferencias entre la medición basa y remisión.

IV.II.IV Asociación entre las concentraciones 25(OH)D, de los marcadores del recambio óseo y el cociente RANKL/OPG.

Al llevar a cabo el análisis multivariado utilizando en el modelo las variables independientes como sexo biológico, edad (años) y  $\Delta$  de vitamina D, observamos que este modelo no presentó asociación con los valores  $\Delta$  del cociente RANKL/OPG,  $\Delta$  de RANKL y  $\Delta$  de OPG (**Cuadro 7**).

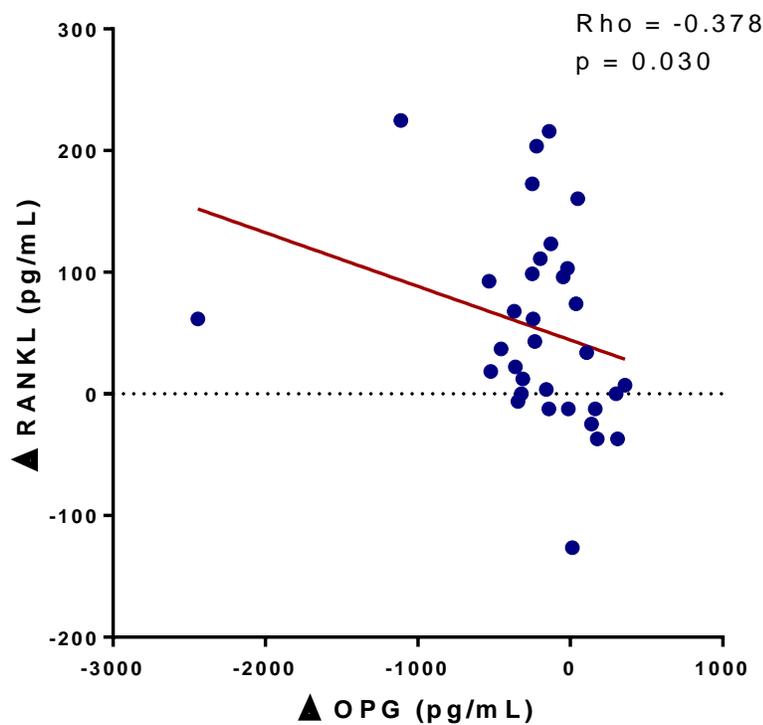
**Cuadro 7.** Modelos de regresión lineal para predictores de cambios en los  $\Delta$  de RANKL/OPG,  $\Delta$  de RANKL y  $\Delta$  de OPG.

	$\Delta$ RANKL/OPG		$\Delta$ RANKL		$\Delta$ OPG	
	$\beta$	<i>p</i>	$\beta$	<i>p</i>	$\beta$	<i>p</i>
Sexo biológico (M/F)	0.159	0.246	39.18	0.198	151.45	0.424
Edad (años)	-0.07	0.602	-0.846	0.791	-1.22	0.951
$\Delta$ 25 (OH)D (ng/mL)	0.012	0.168	1.72	0.354	-13.31	0.254
<i>Modelo</i>	<b>R<sup>2</sup>= 0.122</b>	<b>0.280</b>	<b>R<sup>2</sup>= 0.099</b>	<b>0.379</b>	<b>R<sup>2</sup>= 0.061</b>	<b>0.606</b>

M, masculino; F, femenino;  $\Delta$  RANKL/OPG, diferencias entre la medición basal y remisión del cociente RANKL/OPG;  $\Delta$  RANKL, diferencias las concentraciones del ligando del receptor activador del factor nuclear kB entre la medición basal y remisión;  $\Delta$  OPG, diferencias las concentraciones de osteoprotegerina entre la medición basal y remisión,  $\Delta$  25 (OH)D, diferencias de las concentraciones de 25 (OH)D entre la medición basal y remisión. Grupos de estado de nutrición de vitamina D.

#### IV.III Correlaciones entre la dosis de corticosteroides con la concentración de 25(OH)D y la concentración de marcadores del recambio óseo.

El análisis bivariado no mostró correlación entre los valores de  $\Delta$  de la dosis de prednisona con los valores de  $\Delta$  de las concentraciones séricas de 25(OH)D ( $\rho = 0.216$ ,  $p = 0.236$ ), RANKL ( $\rho = 0.197$ ,  $p = 0.280$ ), OPG ( $\rho = -0.090$ ,  $p = 0.618$ ), osteocalcina ( $\rho = 0.205$ ,  $p = 0.260$ ), FAO ( $\rho = -.140$ ,  $p = 0.566$ ), TRACP-5b ( $\rho = -0.090$ ,  $p = 0.699$ ) y el cociente RANKL/OPG ( $\rho = 0.713$ ,  $p = 0.343$ ). Sin embargo, se observó una correlación negativa del  $\Delta$  de RANKL sobre los  $\Delta$  de OPG ( $\rho = -0.378$ ,  $p = 0.030$ ) (Figura 8)



**Figura 8.** Análisis de correlación de Spearman de  $\Delta$  OPG y  $\Delta$  RANKL en pacientes con LLA. RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear kB; OPG, osteoprotegerina;  $\Delta$ , diferencias entre las concentraciones basales y remisión.

**IV.IV. Asociación entre la dosis de glucocorticoides, las concentraciones de 25(OH)D y el cociente RANKL/OPG en pacientes pediátricos con LLA en tratamiento.**

El análisis multivariado mostró que el modelo con predictores  $\Delta$  de Vitamina D y  $\Delta$  de la dosis de glucocorticoides no presentaron una asociación con los valores  $\Delta$  del cociente RANKL/OPG. Esto fue consistente con el análisis entre los  $\Delta$  de las concentraciones de vitamina D y los  $\Delta$  de la dosis de glucocorticoides, que no mostraron una asociación con los valores de  $\Delta$  RANKL y  $\Delta$  OPG (**Cuadro 8**).

**Cuadro 8.** Modelos de regresión lineal para predictores de cambios en los  $\Delta$  de RANKL/OPG,  $\Delta$  de RANKL y  $\Delta$  de OPG.

	$\Delta$ RANKL/OPG		$\Delta$ RANKL		$\Delta$ OPG	
	$\beta$	<i>p</i>	$\beta$	<i>p</i>	$\beta$	<i>p</i>
$\Delta$ 25(OH)D, (ng/mL)	0.011	0.173	1.9	0.287	-10.9	0.334
$\Delta$ Dosis glucocorticoides	0.04	0.689	0.004	0.847	-0.043	0.743
Modelo	<b>R<sup>2</sup>= 0.087</b>	<b>0.267</b>	<b>R<sup>2</sup>= 0.049</b>	<b>0.480</b>	<b>R<sup>2</sup>= 0.217</b>	<b>0.497</b>

$\Delta$  RANKL/OPG, diferencias entre la medición basal y remisión del cociente RANKL/OPG;  $\Delta$  RANKL, diferencias las concentraciones del ligando del receptor activador del factor nuclear kB entre la medición basal y remisión;  $\Delta$  OPG, diferencias las concentraciones de osteoprotegerina entre la medición basal y remisión,  $\Delta$  25 (OH)D, diferencias de las concentraciones de 25 (OH)D entre la medición basal y remisión. Grupos de riesgo de recaída (riesgo estándar-intermedio y riesgo alto).

Al determinar la relación de las concentraciones de OPG (pg/mL) durante la remisión con los valores de  $\Delta$  de 25(OH)D y  $\Delta$  de RANKL, observamos que por cada ng/mL disminuido de vitamina D se presentó una disminución de 8.8 pg/mL de OPG, mientras que por cada incremento pg/mL de RANKL se relacionó con la disminución de 0.8 pg/mL de OPG (**Cuadro 9**). Al incluir la variable  $\Delta$  dosis de glucocorticoides a este modelo, nuevamente los valores de  $\Delta$  de 25(OH)D y  $\Delta$  de RANKL, presentaron una asociación con las concentraciones de OPG (pg/mL) a la remisión, por cada ng/mL disminuido de vitamina D se presentó una disminución de 6.1 pg/mL de OPG, mientras que por cada incremento pg/mL de RANKL se relacionó con la disminución de 0.8 pg/mL de OPG, sin embargo, los  $\Delta$  dosis de glucocorticoides no presentaron asociación con las concentraciones de OPG a la remisión (**Cuadro 10**).

**Cuadro 9.** Modelo de regresión lineal para predictores de las concentraciones de OPG durante la remisión.

OPG, (pg/mL)		
	$\beta$	<i>p</i>
$\Delta$ 25(OH)D, (ng/mL)	-8.8	0.010
$\Delta$ RANKL, (pg/mL)	-0.8	0.030
Modelo	<b>R<sup>2</sup>= 0.351</b>	<b>0.002</b>

$\Delta$  25(OH)D, diferencias entre las concentraciones de 25(OH)D entre la medición basal y remisión.  $\Delta$  RANKL, diferencias las concentraciones del ligando del receptor activador del factor nuclear kB entre la medición basal y remisión; OPG, osteoprotegerina.

**Cuadro 10.** Modelo de regresión lineal para predictores de las concentraciones de OPG durante la remisión.

OPG, (pg/mL)		
	$\beta$	<i>p</i>
$\Delta$ 25(OH)D, (ng/mL)	-9.14	0.003
$\Delta$ RANKL, (pg/mL)	-0.61	0.037
$\Delta$ Dosis de glucocorticoides	-0.012	0706
Modelo	<b>R<sup>2</sup>= 0.44</b>	<b>0.001</b>

$\Delta$  25(OH)D, diferencias entre las concentraciones de 25(OH)D entre la medición basal y remisión.  $\Delta$  RANKL, diferencias en las concentraciones del ligando del receptor activador del factor nuclear kB entre la medición basal y remisión;  $\Delta$  de dosis de glucocorticoides, diferencias entre las dosis de glucocorticoides entre la medición basal y remisión; OPG, osteoprotegerina.

## Capítulo V. Discusión

En este estudio, analizamos la relación entre la dosis acumulada de glucocorticoides y las concentraciones de 25(OH)D sobre el cociente RANKL/OPG en pacientes pediátricos con LLA en tratamiento entre el diagnóstico y la remisión. Nosotros reportamos una frecuencia alta de insuficiencia-deficiencia de vitamina D en los pacientes con LLA en el diagnóstico y remisión. El grupo de riesgo alto presentó una mayor dosis acumulada de glucocorticoides y concentraciones menores de 25(OH)D en el diagnóstico y remisión. En contraste los marcadores del metabolismo óseo no presentaron diferencias entre los grupos de riesgo de recaída y estado de nutrición de vitamina D.

La vitamina D es una hormona clave en la regulación del metabolismo del calcio y el fósforo y desempeña un papel importante en el mantenimiento de la salud ósea, principalmente en la infancia y la adolescencia (101,102). Además, se ha reportado una relación entre la deficiencia de vitamina D y la mala respuesta al tratamiento en los pacientes con LLA (103). De acuerdo con los niveles séricos de 25(OH)D, confirmamos una prevalencia alta de hipovitaminosis por vitamina D en el diagnóstico (~90%) y en la remisión (94%). Notablemente, este porcentaje fue mayor que lo informado por la ENSANUT 2018 para preescolares y escolares mexicanos sanos (73.2% y 75%, respectivamente) (104). Estos resultados son consistentes con los reportados previamente en varios estudios en pacientes con LLA durante la fase de tratamiento temprano (96,103,105). En contraste con los estudios que han reportado una disminución en los niveles de 25(OH)D durante el tratamiento de niños con LLA, en este estudio sólo observamos una tendencia a la disminución en las concentraciones de 25(OH)D entre el diagnóstico y la remisión ( $p = 0.078$ ). Esto puede explicarse por el tamaño de la muestra de pacientes y la inclusión de pacientes con edades comprendidas entre  $\geq 4$  y  $\leq 18$  años en comparación con estudios anteriores que incluyeron pacientes en edad preescolar (105).

La vía de señalización RANKL/RANK/OPG desempeña un papel esencial en la regulación del metabolismo óseo, especialmente en el remodelado óseo. Este proceso ocurre durante toda la vida y se caracteriza por el equilibrio entre la actividad de los osteoclastos y de los osteoblastos (reabsorción-formación) (106). Diversos estudios han evaluado los niveles de RANKL y OPG y la relación RANKL/OPG en diferentes enfermedades pediátricas (84,95,107–110), pero pocos estudios han investigado los cambios en los parámetros de estos marcadores en pacientes con LLA durante el tratamiento. Solmaz y cols. (94) evaluaron el efecto de la suplementación combinada con vitamina K2 (menaquinona-7 100  $\mu\text{g}/\text{día}$ ) y vitamina D3 (calcitriol 10  $\mu\text{g}/\text{día}$ ) sobre la densidad mineral ósea (DMO)

y los niveles de RANKL, OPG y otros marcadores bioquímicos del recambio óseo en veintinueve pacientes con LLA (1,0-17 años) que fueron asignados aleatoriamente (grupo de estudio, n = 15; grupo de control, n = 14). En este estudio, los pacientes fueron evaluados al inicio y en el primer, segundo, tercer y sexto mes de tratamiento. Sin embargo, no se observaron diferencias en las concentraciones de RANKL u OPG entre los grupos o dentro de estos durante el seguimiento. Sólo hubo diferencias en el cociente OPG/RANKL entre los grupos durante el primer mes (94). Adicionalmente, los autores no reportan la dosis acumulada de glucocorticoides y las concentraciones de 25(OH) y el efecto de estos sobre los marcadores evaluados. El incremento de las concentraciones de RANKL, cociente RANKL/OPG y la disminución de las concentraciones de OPG sugieren en el grupo de riesgo alto y de deficiencia de vitamina D sugiere que, durante la fase inicial del tratamiento de la LLA, la administración de glucocorticoides aumenta la actividad osteoclástica y, en consecuencia, la resorción ósea en estos grupos. Esto podría explicarse en parte por el hecho que el grupo de riesgo alto recibió una dosis acumulada de glucocorticoides más alta que el grupo de riesgo estándar-intermedio, lo que condujo a un incremento de los niveles de RANKL y disminución de las concentraciones de OPG durante la remisión (35). En este sentido, Humphrey y cols. ( 64), reportaron en dos líneas celulares osteoblásticas humanas que la administración de dexametasona, la prednisolona y el deflazacort inhibe la producción de OPG y estimula la producción de RANKL, estas alteraciones son originadas por un aumento de la actividad promotora de RANKL y de la de expresión de ARNm de RANKL, mientras que la OPG podría inhibirse a través de AP-1 y la supresión de la señalización de  $\beta$ -catenina por glucocorticoides (80). Además, los niveles bajos de vitamina D se asocian a un aumento de RANKL (88), podría explicar el aumento de RANKL en el grupo de pacientes con deficiencia de vitamina D. Sin embargo, con estos datos no se observó una asociación entre la dosis acumulada de glucocorticoides y las concentraciones de vitamina D y el cociente RANKL/OPG, probablemente por el tamaño de muestra.

El TRACP-5b es una enzima altamente expresada en osteoclastos, es un regulador de la resorción ósea y la función metabólica de los osteoblastos (111). En pacientes pediátricos con LLA, se han reportado concentraciones elevadas de TRACP-5b, cuando se ha comparado con individuos sanos (87). Solmaz y cols., no observaron cambios durante los 6 meses de seguimiento. Aunque nosotros observamos un aumento significativo de los niveles de RANKL y el cociente RANKL/OPG en el momento de la remisión, lo que indica un posible incremento de la osteoclastogénesis y actividad de los osteoclastos, no observamos cambios en las concentraciones de TRACP-5b entre el diagnóstico y la remisión, probablemente porque estas se encuentren elevadas desde el momento del diagnóstico.

En este sentido, Muggeo y col. reportaron mayores concentraciones TRACP-5b en pacientes pediátricos con LLA en inducción, consolidación y reinducción (87).

La fosfatasa alcalina ósea y la osteocalcina son considerados marcadores de formación ósea. La FAO es una isoenzima de la fosfatasa alcalina, que se produce a partir del hueso y es un indicador de la actividad osteoblástica. La osteocalcina es una proteína sintetizada por los osteoblastos maduros que desempeña un papel importante en la regulación metabólica, la mineralización ósea y la homeostasis del ion calcio. Estudios previos han evaluado las concentraciones de osteocalcina y FAO en pacientes con LLA durante la fase temprana del tratamiento (94,112,113). Orgel y cols.(113), evaluaron la estructura ósea, la densidad y los marcadores bioquímicos circulantes del recambio óseo (osteocalcina, FAO y telopéptido C) en el momento del diagnóstico y los cambios tempranos durante el tratamiento de inducción en preadolescentes, adolescentes y adultos jóvenes (n = 38) con LLA e individuos sanos pareados por sexo y edad (n = 38). Los autores informaron de una disminución de la estructura ósea y de la DMO. Sin embargo, no hubo cambios en los niveles de FAO y osteocalcina durante el seguimiento, pero los niveles de C-telopéptido, un marcador de resorción, aumentaron. Nuestros resultados de FAO son consistentes con los de Orgel y cols. (113); en cambio, nosotros informamos de un aumento de los niveles de osteocalcina en pacientes pediátricos con LLA en remisión completa. Esto podría explicarse por el aumento de los niveles de RANKL, ya que el RANKL es un actor central en la activación de los osteoclastos y la destrucción ósea (86). La osteocalcina es producida por los osteoblastos. Sin embargo, la osteocalcina puede unirse a la matriz ósea debido a la presencia de tres residuos de glutamato que pueden ser carboxilados. Esta modificación le permite unirse al calcio y a la hidroxiapatita. De este modo, la resorción de la matriz ósea por los osteoclastos puede dar lugar a la liberación y descarboxilación de la osteocalcina carboxilada unida, lo que podría aumentar los niveles de osteocalcina (114,115).

Se ha demostrado que las células LLA-B pueden generar un incremento de la expresión de RANKL y en el remodelado óseo (71), lo que podría explicar la presencia de fracturas vertebrales en el momento del diagnóstico (116). En nuestro estudio, no observamos diferencias en los niveles de FAO. Esto podría deberse a que el 40% de los pacientes presentaba concentraciones elevadas de FAO ( $\geq$  percentil 75) al momento del diagnóstico y el 45% mantuvo niveles elevados al alcanzar la remisión. Este aumento podría reflejar un mecanismo compensatorio ante los trastornos del metabolismo óseo presentes en estos pacientes, ya que se ha reportado una relación entre niveles elevados de FAO y una disminución de la DMO lumbar, especialmente en mujeres de edad avanzada (117). Además,

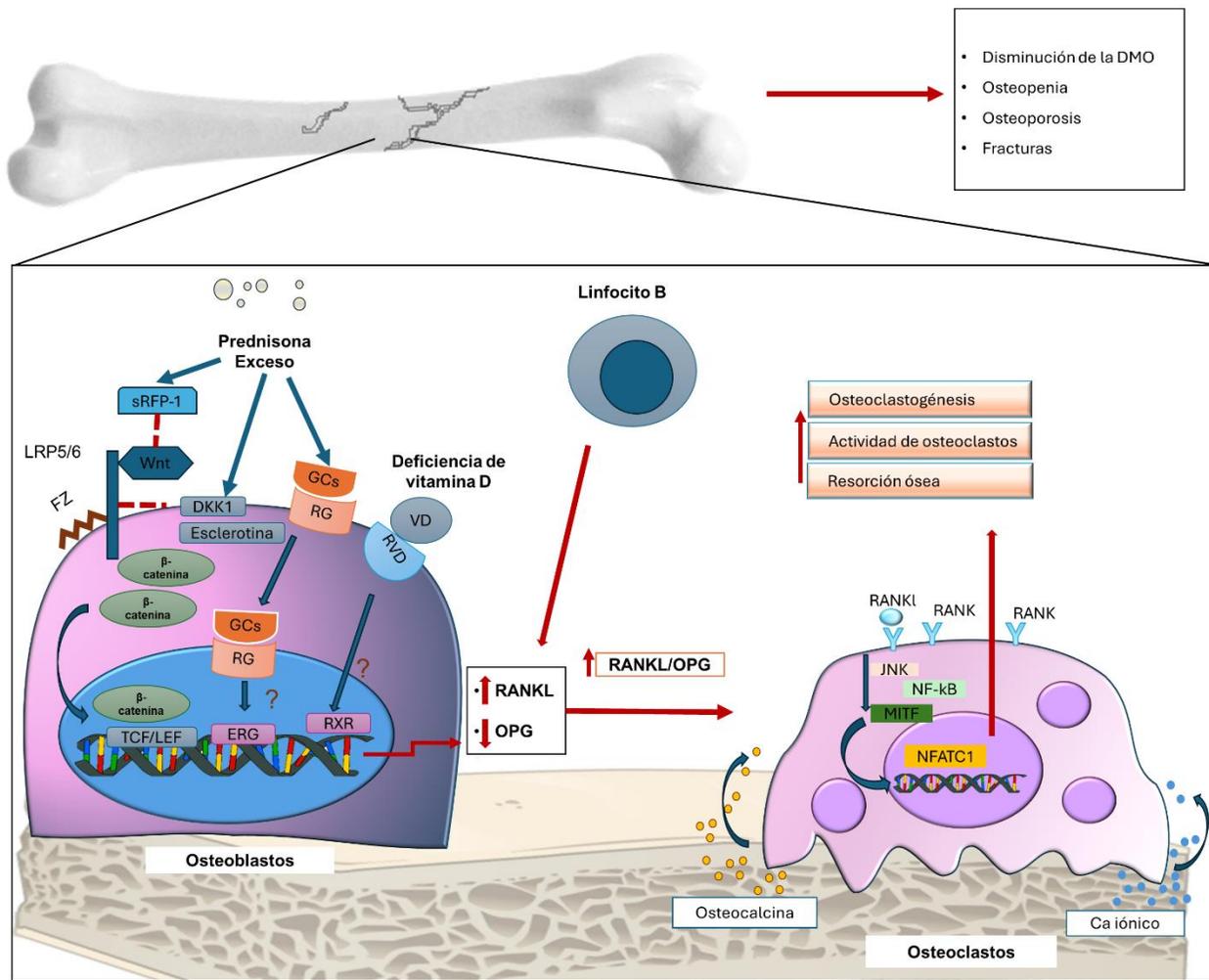
nuestra población de estudio estaba compuesta en gran parte por escolares, un grupo en el cual es común encontrar concentraciones elevadas de FAO (100,118).

No obstante, aunque observamos cambios en los niveles de RANKL, OPG y el cociente RANKL/OPG en los grupos de riesgo alto y con deficiencia de vitamina D, el análisis de correlación de Spearman y la regresión lineal entre la dosis acumulada de glucocorticoides y las concentraciones de 25(OH)D no mostraron una correlación o asociación con los marcadores de recambio óseo. De manera consistente con estos hallazgos, Muggeo y cols., no observaron correlaciones significativas entre los niveles de marcadores de recambio óseo y los niveles de vitamina D (87). Por el contrario, Hablas y cols. informaron de una correlación negativa entre la vitamina D circulante y los niveles de RANKL y una correlación positiva con los niveles de OPG en 60 supervivientes de LLA (88). Esto podría deberse a diferencias en el tamaño de la muestra, la población y, principalmente, la proporción de pacientes con > 30 ng/mL de vitamina D [30% frente a ~9% (dos pacientes)]. Además, el estudio Wasilewska y cols., informó de una asociación positiva entre los niveles de RANKL y el cociente RANKL/OPG y las dosis de corticosteroides y estas asociaciones se observaron en noventa pacientes pediátricos nefróticos (95).

Morbilidades óseas como fracturas patológicas, osteonecrosis y anomalías esqueléticas, son posiblemente el resultado de la alteración del metabolismo mineral y de la reducción del contenido mineral óseo (119). En nuestro estudio no se observaron modificaciones en las concentraciones de PTH y fósforo, entre la medición basal y remisión. Esto concuerda con reportes previos donde no observaron cambios en las concentraciones de fósforo y PTH (45,94,120). Esto podría explicarse en parte por la enfermedad *per se*, así como la administración de los diferentes fármacos administrados durante la inducción a la remisión, los cuales generan modificaciones en los electrolitos séricos (121), así como la administración de soluciones fisiológicas. Sin embargo, nosotros observamos un incremento en las concentraciones de Ca iónico entre el diagnóstico y la remisión, probablemente por una mayor resorción del tejido óseo originada por una mayor actividad de los osteoclastos (122), como lo indica el incremento de la relación RANKL/OPG en la remisión. Los niveles bajos de 25(OH)D disminuyen la absorción de calcio y fósforo, generando un aumento compensatorio agudo de PTH, lo que produce resorción ósea para liberar calcio. La deficiencia de vitamina D persistente induce una resorción ósea excesiva, disminución generalizada de la DMO y defectos de mineralización ósea. Sin embargo, hasta ahora sigue existiendo cierta controversia en torno a los niveles séricos óptimos y deficientes de 25(OH)D, debido principalmente a la gran variación de las concentraciones reportadas de 25(OH)D en los estudios (123–125). En general, los niveles séricos de 25(OH)D inferiores a 12

ng/mL (30 nmol/L) se asocian a deficiencia y niveles entre 12 y 20 ng/mL (30-50nmol/L) ya se consideran inadecuados para la resistencia ósea en niños (126,127).

No obstante, el presente estudio tiene limitaciones. La principal, se relaciona con la falta de un grupo control y que no se incluyó la evaluación de la DMO, además de las pérdidas durante el seguimiento. Sin embargo, este estudio presenta fortalezas, como un mayor número de pacientes analizados que el estudio reportado por Solmaz y cols. (94). Además del seguimiento de una cohorte de niños desde el momento del diagnóstico hasta la remisión, evaluando sus cambios en las concentraciones de 25(OH)D y marcadores como RANKL, OPG y el cociente RANKL/OPG, en etapas tempranas del tratamiento y de los cuales la información es limitada. Adicionalmente, los cambios en las concentraciones de 25(OH)D fueron evaluados mediante cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas, método considerado actualmente como el estándar de oro.



**Figura 9.** Integración de los resultados observados en las modificaciones del proceso de remodelado óseo en pacientes con LLA en tratamiento. La administración prolongada de prednisona genera un incremento en el cociente RANKL/OPG, a través del aumento de las concentraciones de RANKL y una disminución de las concentraciones de OPG. Esto es generado por una inhibición de la vía canónica Wnt y por una acción directa de los RC, adicionalmente, la deficiencia de vitamina D produce un incremento en las concentraciones de RANKL. Estas alteraciones generan un incremento en la osteoclastogénesis y actividad de los osteoclastos, lo cual produce una disminución de la DMO y un incremento del riesgo de fracturas. RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear κB; OPG, osteoprotegerina; TCF/LEF, factor de células T/factor potenciador linfoide; proteína 5/6 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad; FDZ, frizzled; GCs, glucocorticoides; RG, receptor de glucocorticoides; ERG, elementos de respuesta a glucocorticoides; VD, vitamina D; RVD, receptor de vitamina D; RXR, receptor X retinoide; JNK, cinasas c-Jun N-terminal; NF-κB, factor nuclear kappa

B; MITF, factor de transcripción asociado con microftalmia, NFATC1, factor nuclear de células T activada; DMO, densidad mineral ósea.

### **Capítulo VI. Conclusiones**

Nuestros resultados demostraron un incremento de las concentraciones de RANKL, en el cociente RANKL/OPG y una disminución de las concentraciones de OPG en la fase temprana del tratamiento en el grupo de riesgo alto y de deficiencia de vitamina D. Además, de una alta frecuencia de hipovitaminosis D y asociación entre la disminución de las concentraciones de vitamina D y el incremento de RANKL con la disminución OPG. Estos hallazgos sugieren modificaciones en el metabolismo óseo que pueden incrementar el riesgo de fracturas durante y posterior al tratamiento.

### **Capítulo VII. Perspectivas**

Futuros estudios deberán centrarse en la búsqueda de nuevas acciones de intervención en la prevención y control de la resorción ósea en los sobrevivientes de LLA mediante la suplementación con vitamina D.

## Referencias Bibliográficas

1. DeAngelo DJ, Jabbour E, Advani A. Recent Advances in Managing Acute Lymphoblastic Leukemia. *Am Soc Clin Oncol Educ book Am Soc Clin Oncol Annu Meet.* 2020;40:330-342. doi:10.1200/EDBK\_280175
2. Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Current Opinion in Oncology.* 2000;12(1):3-12. doi:10.1097/00001622-200001000-00002
3. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version. In: *PDQ Cancer Information Summaries.* Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); August 28, 2024.
4. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine.* 2006; 354(2):166-178. doi:10.1056/NEJMra052603
5. Rodríguez L, González-Llano O, Mancias C, Pompa T, González G, Sandoval A, et al. Observaciones sobre la incidencia de leucemias agudas en el Noreste de México. *Rev Hematol Mex.*2010;11(2), 78-81.
6. De Revisión A, Jiménez-Morales S, Hidalgo-Miranda A, Ramírez-Bello J, Clave P. Leucemia linfoblástica aguda infantil: una aproximación genómica. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2017;74(1):13–26.
7. Galindo-Zavala R, Bou-Torrent R, Magallares-López B, Mir-Perelló C, Palmou-Fontana N, Sevilla-Pérez B, et al. Expert panel consensus recommendations for diagnosis and treatment of secondary osteoporosis in children. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2020;18(1):20. doi:10.1186/s12969-020-0411-9
8. Fajardo-Gutiérrez A, Juárez-Ocaña S, González-Miranda G, Palma-Padilla V, Carreón-Cruz R, Ortega-Alvárez MC, et al. Incidence of cancer in children residing in ten jurisdictions of the Mexican Republic: Importance of the Cancer registry (a population-based study). *BMC Cancer.* 2007;7:68. doi:10.1186/1471-2407-7-68
9. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet.* 2008;371(9617):1030-1043. doi:10.1016/S0140-6736(08)60457-2

10. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Jose-Eneriz ES, et al. Epigenetic regulation of PRAME gene in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2007;31(11):1521-1528. doi:10.1016/j.leukres.2007.02.016
11. Huang F-L, Liao E-C, Li C-L, Yen C-Y, Yu S-J. Pathogenesis of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: Molecular pathways and disease treatments. *Oncol Lett.* 2020;20(1):448-454. doi:10.3892/ol.2020.11583.
12. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2020;105(11):2524–39. doi:10.3324/haematol.2020.247031
13. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet.* 2013;381(9881):1943-1955. doi:10.1016/S0140-6736(12)62187-4
14. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M -T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol.* 1976;33(4):451-458. doi:10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x
15. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. The Morphological Classification of Acute Lymphoblastic Leukaemia: Concordance among Observers and Clinical Correlations. *Br J Haematol.* 1981;47(4):553-561. doi:10.1111/j.1365-2141.1981.tb02684.x
16. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2020;105(11):2524–39. doi:10.3324/haematol.2020.247031
17. Möricke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dördelmann M, et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood.* 2008;111(9):4477-4489. doi:10.1182/blood-2007-09-112920
18. Pediatric Oncology Imaging Policy CLINICAL GUIDELINES. 2017.
19. Clowes JA, Peel N, Eastell R. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Current Opinion in Rheumatology.* 2001;13(4):326-332. doi:10.1097/00002281-200107000-00015
20. Oray M, Abu Samra K, Ebrahimiadib N, Meese H, Foster CS. Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert Opinion on Drug Safety.* 2016;15(4):457-465. doi:10.1517/14740338.2016.1140743

21. Winick NJ, Carroll WL, Hunger SP. Childhood leukemia - New advances and challenges. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(6):601-603. doi:10.1056/NEJMe048154
22. Stanulla M, Schrappe M. Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Semin Hematol*. 2009;46(1):52-63. doi:10.1053/j.seminhematol.2008.09.007
23. Canalis E, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: Summary of a workshop. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001;86(12):5681-5685. doi:10.1210/jcem.86.12.8066
24. Conaway HH, Henning P, Lie A, Tuckermann J, Lerner UH. Activation of dimeric glucocorticoid receptors in osteoclast progenitors potentiates RANKL induced mature osteoclast bone resorbing activity. *Bone*. 2016;93:43-54. doi:10.1016/j.bone.2016.08.024
25. Soyka LA, Fairfield WP, Klibanski A. Hormonal determinants and disorders of peak bone mass in children. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000;85(11):3951-3963. doi:10.1210/jcem.85.11.6994
26. Komarov FI, Bkarev IN, Smolianitskiĭ AI. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. *Jama*. 2001;285(6):785-795. doi:10.1001/jama.285.6.785
27. Hsu E, Nanes M. Advances in treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2017;24(6):411-417. doi:10.1097/MED.0000000000000368
28. Grover M, Bachrach LK. Osteoporosis in Children with Chronic Illnesses: Diagnosis, Monitoring, and Treatment. *Current Osteoporosis Reports*. 2017;15(4):271-282. doi:10.1007/s11914-017-0371-2
29. Ward LM, Hadjiyannakis S, McMillan HJ, Noritz G, Weber DR. Bone health and osteoporosis management of the patient with Duchenne muscular dystrophy. *Pediatrics*. 2018;142(Suppl 2):S34-S42. doi:10.1542/peds.2018-0333E
30. Leonard MB. Glucocorticoid-induced osteoporosis in children: Impact of the underlying disease. *Pediatrics*. 2007;119 Suppl 2:S166-S174. doi:10.1542/peds.2006-2023J
31. Pérez Martínez A, Alonso Ojembarrena A, Ramírez Orellana M, García Castro J, González-Vicent M, Contra Gómez T, et al. Twenty years of treating childhood acute lymphoblastic leukemia. *An Pediatr*. 2006;65(3):198-204. doi:10.1157/13092154

32. Chemaitilly W, Sklar CA. Endocrine complications in long-term survivors of childhood cancers. *Endocrine-Related Cancer*. 2010;17(3):R141-R159. doi:10.1677/ERC-10-0002
33. Marinovic D, Dorgeret S, Lescoeur B, Alberti C, Noel M, Czernichow P, et al. Improvement in bone mineral density and body composition in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: A 1-year prospective study. *Pediatrics*. 2005;116(1):e102-e108. doi:10.1542/peds.2004-1838
34. Nolla JM, Gómez-Vaquero C, Romera M, Roig-Vilaseca D, Rozadilla A, Mateo L, et al. Osteoporotic vertebral fracture in clinical practice. 669 Patients diagnosed over a 10 year period. *J Rheumatol*. 2001;28(10):2289-2293.
35. Velentza L, Zaman F, Sävendahl L. Bone health in glucocorticoid-treated childhood acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;168:103492. doi:10.1016/j.critrevonc.2021.103492
36. Kaste SC, Rai SN, Fleming K, McCammon EA, Tylavsky FA, Danish RK, et al. Changes in bone mineral density in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;46(1):77-87. doi:10.1002/pbc.20553
37. Inaba H, Cao X, Han AQ, Panetta JC, Ness KK, Metzger ML, et al. Bone mineral density in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2018;124(5):1025-1035. doi:10.1002/cncr.31184
38. Kashyap A, Kandeel F, Yamauchi D, Palmer JM, Niland JC, Molina A, et al. Effects of Allogeneic Bone Marrow Transplantation on Recipient Bone Mineral Density: A Prospective Study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000;6(3A):344-351. doi:10.1016/s1083-8791(00)70061-9
39. Carpenter PA, Hoffmeister P, Chesnut CH, Storer B, Charuhas PM, Woolfrey AE, et al. Bisphosphonate Therapy for Reduced Bone Mineral Density in Children with Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(6):683-690. doi:10.1016/j.bbmt.2007.02.001
40. Van Der Sluis IM, Van Den Heuvel-Eibrink MM, Hähnen K, Krenning EP, De Muinck Keizer-Schrama SMPF. Altered bone mineral density and body composition, and increased fracture risk in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr*. 2002;141(2):204-210.

doi:10.1067/mpd.2002.125728

41. Halton JM, Atkinson SA, Fraher L, et al. Altered mineral metabolism and bone mass in children during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *J Bone Miner Res.* 1996;11(11):1774-1783. doi:10.1002/jbmr.5650111122
42. Strauss AJ, Su JT, Kimball Dalton VM, Gelber RD, Sallan SE, Silverman LB. Bony morbidity in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2001;19(12):3066-3072. doi:10.1200/JCO.2001.19.12.3066
43. Atkinson SA, Halton JM, Bradley C, Wu B, Barr RD. Bone and mineral abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia: Influence of disease, drugs and nutrition. *Int J Cancer.* 1998;11:35-39.
44. Boot AM, Van Den Heuvel-Eibrink MM, Hählen K, Krenning EP, De Muinck Keizer-Schrama SMPF. Bone mineral density in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer.* 1999;35(12):1693-1697. doi:10.1016/s0959-8049(99)00143-4
45. Athanassiadou F, Tragiannidis A, Rousso I, Katsos G, Sidi V, Kolioukas D, et al. Evaluation of bone metabolism in children with acute lymphoblastic leukemia after induction chemotherapy treatment. *Pediatr Hematol Oncol.* 2005;22(4):285-289. doi:10.1080/08880010590935176
46. Muszynska-Roslan K, Panasiuk A, Latoch E, Krawczuk-Rybak M, Konstantynowicz J. Little Evidence of Low Bone Mass in Acute Lymphoblastic Leukemia Survivors. *J Clin Densitom.* 2012;15(1):108-115. doi:10.1016/j.jocd.2011.07.004
47. Ward LM, Ma J, Lang B, Ho J, Alos N, Matzinger MA, et al. Bone Morbidity and Recovery in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of a Six-Year Prospective Cohort Study. *J Bone Miner Res.* 2018 Aug 1;33(8):1435–43.
48. Kenkre JS, Bassett JHD. The bone remodelling cycle. *Annals of Clinical Biochemistry.* 2018;55(3):308-327. doi:10.1177/0004563218759371
49. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research and Therapy.* 2007;9 Suppl 1(Suppl 1):S1. doi:10.1186/ar2165
50. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders.* 2010;11(4):219-227. doi:10.1007/s11154-010-9153-1

51. Vidal C, Formosa R, Xuereb-Anastasi A. Functional polymorphisms within the TNFRSF11B (osteoprotegerin) gene increase the risk for low bone mineral density. *J Mol Endocrinol.* 2011;47(3):327-333. doi:10.1530/JME-11-0067
52. Soysa NS, Alles N. Osteoclast function and bone-resorbing activity: An overview. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2016;476(3):115-120. doi:10.1016/j.bbrc.2016.05.019
53. Song R, Gu J, Liu X, Zhu J, Wang Q, Gao Q, et al. Inhibition of osteoclast bone resorption activity through osteoprotegerin-induced damage of the sealing zone. *Int J Mol Med.* 2014;34(3):856-862. doi:10.3892/ijmm.2014.1846
54. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011;17(10):1231-1234. doi:10.1038/nm.2452
55. Xiong J, O'Brien CA. Osteocyte RANKL: New insights into the control of bone remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2012;27(3):499-505. doi:10.1002/jbmr.1547
56. Neumann E, Schett G. Bone metabolism: Molecular mechanisms. *Z Rheumatol.* 2007;66(4):286-289. doi:10.1007/s00393-007-0182-4
57. Anandarajah AP. Role of RANKL in bone diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2009;20(2):88-94. doi:10.1016/j.tem.2008.10.007
58. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological bone remodeling: Systemic regulation and growth factor involvement. *Physiology.* 2016;31(3):233-245. doi:10.1152/physiol.00061.2014
59. Kuo TR, Chen CH. Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives. *Biomark Res.* 2017;5:18. doi:10.1186/s40364-017-0097-4
60. Maeda K, Kobayashi Y, Koide M, Uehara S, Okamoto M, Ishihara A, et al. The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling. *Int J Mol Sci.* 2019, 20(22). doi:10.3390/ijms20225525
61. Boudin E, Fijalkowski I, Piters E, Van Hul W. The role of extracellular modulators of canonical Wnt signaling in bone metabolism and diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 2013;43(2):220-240. doi:10.1016/j.semarthrit.2013.01.004

62. Grabowski P. Physiology of Bone. *Endocr Dev.* 2015;28:33-55. doi:10.1159/000380991
63. Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Current Osteoporosis Reports.* 2007;5(3):98-104. doi:10.1007/s11914-007-0024-y
64. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond. *Frontiers in Immunology.* 2014;5:511. doi:10.3389/fimmu.2014.00511
65. Park JH, Lee NK, Lee SY. Current understanding of RANK signaling in osteoclast differentiation and maturation. *Molecules and Cells.* 2017;40(10):706-713. doi:10.14348/molcells.2017.0225
66. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends in Molecular Medicine.* 2006;12(1):17-25. doi:10.1016/j.molmed.2005.11.007
67. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-342. doi:10.1038/nature01658
68. Liu W, Zhang X. Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (Review). *Mol Med Rep.* 2015;11(5):3212-3218. doi:10.3892/mmr.2015.3152
69. Bargman R, Posham R, Boskey A, Carter E, Dicarolo E, Verdellis K, et al. High-and low-dose OPG-Fc cause osteopetrosis-like changes in infant mice. *Pediatr Res.* 2012;72(5):495-501. doi:10.1038/pr.2012.118
70. Wu Y, Liu J, Guo H, Luo Q, Yu Z, Liao E, et al. Establishment of OPG Transgenic Mice and the Effect of OPG on Bone Microarchitecture. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:125932. doi:10.1155/2013/125932
71. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998;12(9):1260-1268. doi:10.1101/gad.12.9.1260
72. Piemontese M, Xiong J, Fujiwara Y, Thostenson JD, O'Brien CA. Cortical bone loss caused by glucocorticoid excess requires RANKL production by osteocytes and is associated with reduced OPG expression in mice. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2016;311(3):E587-E593. doi:10.1152/ajpendo.00219.2016

73. Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2003;15(4):454-457. doi:10.1097/00002281-200307000-00013
74. Compston J. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Endocrine*. 2018;61(1):7-16. doi:10.1007/s12020-018-1588-2
75. Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Current osteoporosis reports*. 2005;3(3):98-102. doi:10.1007/s11914-005-0017-7
76. Humphrey EL, Williams JHH, Davie MWJ, Marshall MJ. Effects of dissociated glucocorticoids on OPG and RANKL in osteoblastic cells. *Bone*. 2006;38(5):652-661. doi:10.1016/j.bone.2005.10.004
77. Shi C, Qi J, Huang P, Jiang M, Zhou Q, Zhou H, et al. MicroRNA-17/20a inhibits glucocorticoid-induced osteoclast differentiation and function through targeting RANKL expression in osteoblast cells. *Bone*. 2014;68:67-75. doi:10.1016/j.bone.2014.08.004
78. Zhang XH, Geng GL, Su B, Liang CP, Wang F, Bao JC. MicroRNA-338-3p inhibits glucocorticoid-induced osteoclast formation through RANKL targeting. *Genet Mol Res*. 2016;15(3):10.4238/gmr.15037674. doi:10.4238/gmr.15037674
79. Lovšin N, Marc J. Glucocorticoid Receptor Regulates TNFSF11 Transcription by Binding to Glucocorticoid Responsive Element in TNFSF11 Proximal Promoter Region. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1054. doi:10.3390/ijms22031054
80. Kondo T, Kitazawa R, Yamaguchi A, Kitazawa S. Dexamethasone promotes osteoclastogenesis by inhibiting osteoprotegerin through multiple levels. *J Cell Biochem*. 2008;103(1):335-345. doi:10.1002/jcb.21414
81. Buckley L, Humphrey MB. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. Solomon CG, editor. *N Engl J Med*. 2018;379(26):2547-2556. doi:10.1056/NEJMcp1800214
82. Faienza MF, Brunetti G, Colucci S, Piacente L, Ciccarelli M, Giordani L, et al. Osteoclastogenesis in children with 21-hydroxylase deficiency on long-term glucocorticoid therapy: The role of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand/osteoprotegerin imbalance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(7):2269-2276. doi:10.1210/jc.2008-2446
83. Lien G, Ueland T, Godang K, Selvaag AM, Førre ØT, Flatø B. Serum levels of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor - $\kappa$ B ligand in children with early juvenile idiopathic

arthritis: A 2-year prospective controlled study. *Pediatr Rheumatol*. 2010;8:30. doi:10.1186/1546-0096-8-30

84. Ambroszkiewicz J, Sands D, Gajewska J, Chelchowska M, Laskowska-Klita T. Bone turnover markers, osteoprotegerin and RANKL cytokines in children with cystic fibrosis. *Adv Med Sci*. 2013;58(2):338-343. doi:10.2478/ams-2013-0011
85. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*. 2008;5(7):621-628. doi:10.1038/nmeth.1226
86. Rajakumar SA, Papp E, Lee KK, Grandal I, Merico D, Liu CC, et al. B cell acute lymphoblastic leukemia cells mediate RANK-RANKL-dependent bone destruction. *Sci Transl Med*. 2020;12(561):eaba5942. doi:10.1126/scitranslmed.aba5942
87. Muggeo P, Grassi M, D'Ascanio V, Brescia V, Fontana A, Piacente L, et al. Bone Remodeling Markers in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia after Intensive Chemotherapy: The Screenshot of a Biochemical Signature. *Cancers (Basel)*. 2023;15(9):2554. doi:10.3390/cancers15092554
88. Hablas NM, Keshk WA. OPG/RANK/RANKL Axis in Egyptian Children With Acute Lymphoblastic Leukemia After Maintenance Therapy: Relationship to Bone Mineral and Vitamin D Status. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2023;45(6):e733-e738. doi:10.1097/MPH.0000000000002603
89. Reisi N, Iravani P, Raeissi P, Kelishadi R. Vitamin D and bone minerals status in the long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Prev Med*. 2015;6:87. doi:10.4103/2008-7802.164691
90. Thomas X, Chelghoum Y, Fanari N, Cannas G. Serum 25-hydroxyvitamin D levels are associated with prognosis in hematological malignancies. *Hematology*. 2011;16(5):278-283. doi:10.1179/102453311X13085644679908
91. Simmons JH, Chow EJ, Koehler E, Esbenshade A, Smith LA, Sanders J, et al. Significant 25-hydroxyvitamin D deficiency in child and adolescent survivors of acute lymphoblastic leukemia: Treatment with chemotherapy compared with allogeneic stem cell transplant. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;56(7):1114-1119. doi:10.1002/pbc.22949
92. Bowden SA, Robinson RF, Carr R, Mahan JD. Prevalence of vitamin D deficiency and insufficiency in children with osteopenia or osteoporosis referred to a pediatric metabolic bone

clinic. *Pediatrics*. 2008;121(6):e1585-e1590. doi:10.1542/peds.2007-2111

93. Lips P, Van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. Vol. 25, *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2011. p. 585–91.
94. Solmaz I, Ozdemir MA, Unal E, Abdurrezzak U, Muhtaroglu S, Karakukcu M. . Effect of vitamin K2 and vitamin D3 on bone mineral density in children with acute lymphoblastic leukemia: a prospective cohort study. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2021;34(4):441-447. doi:10.1515/jpem-2020-0637
95. Wasilewska A, Rybi-Szuminska A, Zoch-Zwierz W. Serum RANKL, osteoprotegerin (OPG), and RANKL/OPG ratio in nephrotic children. *Pediatr Nephrol*. 2010;
96. Maddheshiya S, Singh SK, Kumar I, Aggarwal P, Gupta V. Bone Mineral Metabolism During Chemotherapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2021;43(5):172-175. doi:10.1097/MPH.0000000000001908
97. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, 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. doi:10.1210/jc.2011-0385
98. Harriet Lane Service (Johns Hopkins Hospital), Hughes H (Helen K, Kahl L. *The Harriet Lane handbook : a manual for pediatric house officers*. Elsevier, 2017. 1255.
99. van den Ouweland JMW, Beijers AM, Demacker PNM, van Daal H. Measurement of 25-OH-vitamin D in human serum using liquid chromatography tandem-mass spectrometry with comparison to radioimmunoassay and automated immunoassay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010;878(15-16):1163-1168. doi:10.1016/j.jchromb.2010.03.035
100. Fischer DC, Mischek A, Wolf S, Rahn A, Salweski B, Kundt G, et al. Paediatric reference values for the C-terminal fragment of fibroblast-growth factor-23, sclerostin, bone-specific alkaline phosphatase and isoform 5b of tartrate-resistant acid phosphatase. *Ann Clin Biochem*. 2012;49(Pt 6):546-553. doi:10.1258/acb.2012.011274
101. Saggese G, Vierucci F, Boot AM, Czech-Kowalska J, Weber G, Camargo CA, et al. Vitamin D in childhood and adolescence: an expert position statement. *Eur J Pediatr*. 2015;174(5):565-576. doi:10.1007/s00431-015-2524-6

102. Pekkinen M, Viljakainen H, Saarnio E, Lamberg-Allardt C, Mäkitie O. Vitamin D Is a Major Determinant of Bone Mineral Density at School Age. *PLoS One*. 2012;7(7):e40090. doi:10.1371/journal.pone.0040090
103. Bhattacharya S, Verma N, Kumar A. Prevalence of vitamin D deficiency in childhood acute lymphoblastic leukemia and its association with adverse outcomes during induction phase of treatment. *Nutr Cancer*. 2020;72(8):1321-1325. doi:10.1080/01635581.2019.1679196
104. Flores ME, Rivera-Pasquel M, Valdez-Sánchez A, la Cruz-Góngora V De, Contreras-Manzano A, Shamah-Levy T, et al. Vitamin D status in Mexican children 1 to 11 years of age: an update from the Ensanut 2018-19. *Salud Publica Mex*. 2021;63(3):382-393. doi:10.21149/12156
105. Naz A, N Qureshi R, S Shamsi T, Mahboob T. Vitamin D levels in patients of acute leukemia before and after remission-induction therapy. *Pakistan J Med Sci*. 2013;29(1):10-14. doi:10.12669/pjms.291.2764
106. Brunetti G, D'Amato G, Chiarito M, et al. An update on the role of RANKL-RANK/osteoprotegerin and WNT- $\beta$ -catenin signaling pathways in pediatric diseases. *World J Pediatr*. 2019;15(1):4-11. doi:10.1007/s12519-018-0198-7
107. Ali R, Hammad A, El-Nahrery E, Hamdy N, Elhawary AK, Eid R. Serum RANKL, osteoprotegerin (OPG) and RANKL/OPG ratio in children with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2019;28(10):1233-1242. doi:10.1177/0961203319867129
108. Akhtar Ali S, Kang H, Olney R, Ramos-Platt L, Ryabets-Lienhard A, Cheung C, et al. Evaluating RANKL and OPG levels in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Osteoporos Int*. 2019;30(11):2283-2288. doi:10.1007/s00198-019-05077-5
109. Adams KM, Kohlmeier M, Powell M, Zeisel SH. Nutrition in medicine: nutrition education for medical students and residents. *Nutr Clin Pract*. 2010;25(5):471-480. doi:10.1177/0884533610379606
110. Tsentidis C, Gourgiotis D, Kossiva L, Doulgeraki A, Marmarinos A, Galli-Tsinopoulou A, et al. Higher levels of s-RANKL and osteoprotegerin in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus may indicate increased osteoclast signaling and predisposition to lower bone mass: a multivariate cross-sectional analysis. *Osteoporos Int*. 2016;27(4):1631-1643. doi:10.1007/s00198-015-3422-5

111. Lei Y, Fu S, Yang Y, Chen J, Li B, Guo Z, et al. Identification and Functional Analysis of Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Type 5b (TRAP5b) in *Oreochromis niloticus*. *Int J Mol Sci*. 2023;24(8):7179. doi:10.3390/ijms24087179
112. Wiernikowski JT, Barr RD, Webber C, Guo CY, Wright M, Atkinson SA. Alendronate for steroid-induced osteopenia in children with acute lymphoblastic leukaemia or non-Hodgkin's lymphoma: results of a pilot study. *J Oncol Pharm Pract*. 2005;11(2):51-56. doi:10.1191/1078155205jp145oa
113. Orgel E, Mueske NM, Wren TAL, Gilsanz V, Butturini AM, Freyer DR, et al. Early injury to cortical and cancellous bone from induction chemotherapy for adolescents and young adults treated for acute lymphoblastic leukemia. *Bone*. 2016;85:131-137. doi:10.1016/j.bone.2016.01.027
114. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell*. 2010;142(2):296-308. doi:10.1016/j.cell.2010.06.003
115. Rossi M, Battafarano G, Pepe J, Minisola S, Del Fattore A. The Endocrine Function of Osteocalcin Regulated by Bone Resorption: A Lesson from Reduced and Increased Bone Mass Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4502. doi:10.3390/ijms20184502
116. Halton J, Gaboury I, Grant R, Alos N, Cummings EA, Matzinger M, et al. Advanced vertebral fracture among newly diagnosed children with acute lymphoblastic leukemia: results of the Canadian Steroid-Associated Osteoporosis in the Pediatric Population (STOPP) research program. *J Bone Miner Res*. 2009;24(7):1326-1334. doi:10.1359/jbmr.090202
117. Zhu Z, Zhou H, Wang Y, Yao X. Associations between bone turnover markers and bone mineral density in older adults. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2021;29(1):2309499020987653. doi:10.1177/2309499020987653
118. Ladang A, Rousselle O, Huyghebaert L, Bekaert AC, Kovacs S, Le Goff C, et al. Parathormone, bone alkaline phosphatase and 25-hydroxyvitamin D status in a large cohort of 1200 children and teenagers. *Acta Clin Belg*. 2022;77(1):4-9. doi:10.1080/17843286.2020.1769285
119. Demirsoy U, Sarper N, Aylan Gelen S, Zengin E, Kum T, Demir H. The Association of Oral Vitamin D and Calcium Supplementation With Bone Mineral Density in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2017;39(4):287-292. doi:10.1097/MPH.0000000000000797

120. Atkinson SA. Vitamin D status and bone biomarkers in childhood cancer. *Pediatric Blood and Cancer*. 2008;50(2 Suppl):479-486. doi:10.1002/pbc.21406
121. Benitez H, Arreguin L, Velasquez L, Bernaldez R, Juan L, Farfan J, et al. [Electrolytic changes in children with acute lymphoblastic leukemia during remission induction]. *Sangre (Barc)*. 1995;40(3):213–7.
122. Meleleo D, Picciarelli V. Effect of calcium ions on human calcitonin. Possible implications for bone resorption by osteoclasts. *Biometals*. 2016;29(1):61-79. doi:10.1007/s10534-015-9896-y
123. Lips P, Chapuy MC, Dawson-Hughes B, Pols HAP, Holick MF. An international comparison of serum 25-hydroxyvitamin D measurements. *Osteoporos Int*. 1999;9(5):394-397. doi:10.1007/s001980050162
124. Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, Plum L, Lake E, Hansen KE, et al. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(7):3152-3157. doi:10.1210/jc.2003-031979
125. Hintzpeter B, Scheidt-Nave C, Müller MJ, Schenk L, Mensink GBM. Higher prevalence of vitamin D deficiency is associated with immigrant background among children and adolescents in Germany. *J Nutr*. 2008;138(8):1482-1490. doi:10.1093/jn/138.8.1482
126. Munns CF, Shaw N, Kiely M, Specker BL, Thacher TD, Ozono K, et al. Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets. *Horm Res Paediatr*. 2016;85(2):83–106.
127. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D: What Dietetics Practitioners Need to Know. *J Am Diet Assoc*. 2011;111(4):524-527. doi:10.1016/j.jada.2011.01.004

## Anexos

### I. Dictamen de la Comité Local de Investigación en Salud

25/11/2021

SIRELCIS



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



#### Dictamen de Aprobado

Comité Local de Investigación en Salud 3603.  
HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

Registro COFEPRIS 17 CI 09 015 042  
Registro CONBIOÉTICA CONBIOETICA 09 CEI 032 2017121

FECHA Jueves, 25 de noviembre de 2021

Dra. María de Lourdes Barbosa Cortés

**P R E S E N T E**

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de Investigación con título **Asociación entre las concentraciones séricas de 25(OH)D3 y el ligando receptor activador del factor nuclear KB (RANKL), la osteoprotegerina (OPG), la densidad mineral ósea y biomarcadores de recambio óseo en niños con leucemia linfoblástica aguda en tratamiento** que sometió a consideración para evaluación de este Comité, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A P R O B A D O**:

Número de Registro Institucional  
R-2021-3603-063

De acuerdo a la normativa vigente, deberá presentar en junio de cada año un informe de seguimiento técnico acerca del desarrollo del protocolo a su cargo. Este dictamen tiene vigencia de un año, por lo que en caso de ser necesario, requerirá solicitar la reaprobación del Comité de Ética en Investigación, al término de la vigencia del mismo.

ATENTAMENTE

  
Dra. Rocío Cárdenas Navarrete  
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 3603

Imprimir

**IMSS**  
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

## II. Carta de consentimiento



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE  
EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN COORDINACIÓN DE  
INVESTIGACIÓN EN SALUD Y POLÍTICAS DE SALUD

Carta de consentimiento informado para participación en protocolos  
de investigación (padres o representantes legales de niños o  
personas con discapacidad)

### Asociación entre las concentraciones de vitamina D y el cociente RANKL/OPG en niños con leucemia linfoblástica aguda en tratamiento

Número de registro institucional: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Estimado(a) padre, madre o tutor, por este medio estamos realizando una cordial invitación a su hijo(a) a participar en un proyecto de investigación que se lleva a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición y en el Servicio de Hematología de la UMAE Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Realizamos esta invitación debido a que la enfermedad que tiene su hijo(a), conocida como leucemia linfoblástica aguda y su tratamiento, pueden hacer que un nutriente conocido como vitamina D, cambie y esto pueda afectar a los huesos de su hijo(a). La vitamina D es importante ya que ayuda a que nuestros huesos sean fuertes. Esta vitamina la produce nuestro cuerpo cuando salimos al sol y también cuando comemos alimentos como el huevo, la leche y el pescado. El objetivo de nuestro estudio es conocer cuánta vitamina D tiene su hijo (a) en su cuerpo, si cambia con el tratamiento de su hijo (a) y como se relaciona con dos componentes conocidos como RANKL y OPG que hacen que nuestros huesos sean más fuertes o débiles.

#### Procedimientos:

La participación en este estudio es voluntaria por lo que pedimos lea cuidadosamente la información que le proporcionamos y haga las preguntas que quiera antes de decidir si su hijo(a) participara o no en el estudio.

Si usted acepta que participe su hijo (a), pasará lo siguiente:

- 1) Se le pedirá responder una serie de preguntas relacionadas con la enfermedad de su hijo(a), como la edad, el tiempo que lleva enfermo, cuando entro al hospital etc. Estas preguntas se realizarán en un lugar adecuado y la información será confidencial. Si en algún momento de la entrevista, algunas de estas preguntas le hicieran sentir incomodo(a) a usted o a su hijo(a), tienen todo el derecho de no responder a cualquier pregunta que les incomode.

- 2) Para medir la cantidad de la vitamina D y de las sustancias RANKL y OPG, se les pedirá que acudan a la Unidad de Investigación Médica en Nutrición, en ayuno para la toma de una muestra de sangre de su hijo(a), aproximadamente de 7ml (una cucharadita), esto lo haremos en tres ocasiones (antes de iniciar su tratamiento, un mes y medio después de iniciado y cuando cumpla un año de estar en tratamiento).
- 3) También se realizarán las mediciones habituales de peso y talla en su presencia.

### **Posibles riesgos**

La toma de muestra de sangre implica un riesgo mínimo, en algunas ocasiones puede causarle un poco de dolor o una ligera molestia, es posible que se pueda formar un moretón. Siempre que sea posible se tratará de coincidir con el laboratorio clínico para obtener la muestra de un solo piquete. Esta investigación implica un riesgo mínimo de acuerdo con la Ley General de Salud contenida en la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos en materia de Investigación para la salud en seres humanos.

### **Posibles beneficios que recibirá al participar en este estudio**

Posterior a las mediciones, se le informará si su hijo (a) tiene disminución de la cantidad de vitamina D. En el caso de que su hijo(a) tenga una cantidad baja de vitamina D, recibirá un asesoramiento y recomendaciones sobre, si necesitará que salga a tomar baños de sol cambie su alimentación y de ser necesario también de suplementación para poder cubrir las necesidades recomendadas de vitamina D de acuerdo a su edad. El asesoramiento y recomendaciones se las dará una persona del área de nutrición, con la previa aprobación de su médico tratante.

### **Privacidad y confidencialidad**

Para garantizar su privacidad la información que nos proporcione de su hijo(a) será guardada de manera confidencial, al igual que las respuestas de las preguntas y los resultados de la medición en sangre de vitamina D, de las sustancias RANK y LOPG y su peso y estatura.

Cuando los resultados de este estudio sean publicados o difundidos en conferencias, no se dará información que pudiera revelar la identidad de su hijo(a), solo proporcionaremos la información de su hijo(a) si fuera necesario para proteger sus derechos, su bienestar o si lo requiere la ley. En relación con la aplicación de las preguntas y resultados de todas las mediciones que se realicen se protegerá su confidencialidad, para ello se les asignará un número de folio individual y único, con el que se identificará en la base de datos diseñada para el estudio. Usted y su hijo(a) tendrán el derecho de estar informados de los resultados de laboratorio. La información será resguardada en dispositivos electrónicos (computadoras) por el investigador principal (María de Lourdes Barbosa Cortés) durante un periodo de 5 años.

Si usted decide que su hijo(a) no participe en el estudio, seguirá recibiendo la atención brindada por el IMSS y se le ofrecerán los procedimientos y tratamientos habituales. De la misma forma, su hijo(a) podrá abandonar el estudio en el momento que así lo decida, sin que eso afecte el seguimiento o la atención que se le proporciona en el IMSS. Por la participación de su hijo(a) en el estudio usted no tendrá que hacer ningún gasto y tampoco recibirá ningún pago.

**Personal de contacto para dudas o aclaraciones sobre el estudio**

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse con la investigadora responsable la Dra. María de Lourdes Barbosa Cortés al teléfono 56276900 ext. 22484, 22483 de lunes a viernes de las 9:00 a las 15:00 horas, en la Unidad de Investigación Médica del Centro Médico Nacional SXXI.

**Personal de contacto sobre los derechos de su hijo como participante de un estudio de investigación**

Si usted tiene dudas o preguntas sobre los derechos de su hijo(a) al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables del Comité de Ética e Investigación de la UMAE Hospital de Pediatría CMN S XXI del IMSS, a los teléfonos (55) 56 27 69 00 extensión 21230, de 9:00 a 16:00 horas, o si así lo prefiere al correo electrónico: [comité.eticainv@imss.gob.mx](mailto:comité.eticainv@imss.gob.mx).

**Declaración de consentimiento informado.**

Declaro que se me ha informado ampliamente con claridad y he leído (o alguien me ha leído) en que consiste el estudio, además de los posibles riesgos e inconvenientes, molestias y beneficios derivados de la participación de mi hijo(a) en el estudio antes mencionado. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis dudas han sido aclaradas; Al firmar este formato estoy de acuerdo en que participe mi hijo(a) en la investigación que aquí se describe. Después de haber leído y habiéndoseme explicado todas mis dudas acerca de este estudio:

No acepto que mi familiar o representado participe en el estudio.

Si acepto que mi familiar o representado participe y que se tome la muestra solo para este estudio.

Si acepto que mi familiar o representado participe y que se tome la muestra para este estudios y estudios futuros, conservando su sangre hasta por 5 años tras lo cual se destruirá la misma.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de la madre, tutor o representante legal

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del padre, tutor o representante legal

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma

\_\_\_\_\_  
Dirección

\_\_\_\_\_  
Dirección

### III. Carta de asentimiento



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN  
Y POLÍTICAS DE SALUD  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
Carta de asentimiento en menores de edad (8 a 17 años)

### Asociación entre las concentraciones de vitamina D y el cociente RANKL/OPG en niños con leucemia linfoblástica aguda en tratamiento

Número de registro institucional \_\_\_\_\_

Hola, mi nombre es \_\_\_\_\_ y trabajo en este hospital, donde tu acudes a curarte. Te estamos invitando a participar en un estudio debido a que la enfermedad que tienes como su tratamiento pueden cambiar la cantidad de un nutrimento conocido como vitamina D. La vitamina D es importante ya que te ayuda a tener huesos fuertes. Esta vitamina se forma en tu cuerpo cuando sales al sol y también se encuentra en alimentos como el huevo, la leche y el pescado, por lo que queremos saber cuánta cantidad de vitamina D tienes en tu cuerpo y si cambia con tu tratamiento.

Tu participación en el estudio consistirá en asistir con tu papá o mamá a la Unidad de Investigación Médica en Nutrición de este Hospital, y darnos tu permiso para tomar en tres momentos diferentes una muestra de tu sangre, será una cantidad parecida a una cucharadita (7 mL), esto para conocer cuanta vitamina D tienes en tu cuerpo y para medir dos sustancias que se llaman RANKL y OPG, que trabajan en equipo con la vitamina D, para que tengas huesos fuertes. También te tomaremos tu peso y talla.

Tu participación en el estudio es voluntaria, es decir, aun cuando tu papá o mamá hayan dicho que puedes participar, si tú no quieres hacerlo puedes decir que no. Es tu decisión si participas o no en el estudio. También es importante que sepas que, si en algún momento ya no quieres continuar en el estudio, no habrá ningún problema, o si no quieres responder a alguna pregunta, tampoco habrá problema.

Tu información será confidencial. Esto quiere decir que no le diremos a nadie tus respuestas o resultados sin que tú lo quieras, solo lo sabrán tu papa y mamá y las personas que forman parte de este estudio.

Si aceptas participar, te pido que por favor pongas una **(x)** en el cuadrado de abajo que dice “Sí quiero participar” y escribe tu nombre. Si **no** quieres participar, déjalo en blanco.

Si quiero participar

Nombre: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de la persona que obtiene el asentimiento

Fecha: \_\_\_\_\_

#### IV. Formato de recolección de datos

No. de Folio: \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_ Clasificación: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Género:  M  F  
DD/MM/AAAA

Fecha de ingreso al Hospital: \_\_\_\_\_ Fecha de diagnóstico: \_\_\_\_\_  
DD/MM/AAAA DD/MM/AAAA

Médico a cargo: \_\_\_\_\_

#### Esquema de tratamiento

Etapa	Medicamentos	Dosis	Inició <small>DD MM AAAA</small>	Final <small>DD MM AAAA</small>	Observaciones
Ventana esteroidea					
Inducción a la remisión					
Infiltración al Sistema Nervioso					
Consolidación					

## Formato de recolección de datos

### Indicadores antropométricos

No. de Folio: \_\_\_\_\_

	T0			T1			T2		
	DD	MM	AAAA	DD	MM	AAAA	DD	MM	AAAA
Peso (Kg)									
% de peso (Kg)									
Talla (m)									
IMC									
IMC (%)									
Clasificación IMC									
Masa muscular corporal (Kg)									
Masa grasa corporal (Kg)									

## Formato de recolección de datos

No. de Folio: \_\_\_\_\_

### Indicadores bioquímicos

	T0			T1			T2		
	DD	MM	AAAA	DD	MM	AAAA	DD	MM	AAAA
Vitamina D 25(OH)D (ng/ dL)									
RANKL (pmol/L)									
OPG (pmol/L)									
RANKL/OPG									
PTH (mg/ dL)									
Fósforo (mg/ dL)									
Fosfatasa alcalina específica de hueso (U/L)									
Calcio (mg/ dL)									
Calcio iónico (mg/dL)									
Leucocitos (mm <sup>3</sup> )									
Hemoglobina (g/dL)									
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )									



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE  
EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN COORDINACIÓN DE  
INVESTIGACIÓN EN SALUD Y POLITICAS DE SALUD**

**Unidad de Investigación Médica del Centro Médico Nacional SXXI.**

**Asociación entre las concentraciones de vitamina D y el cociente RANKL/OPG en  
niños con leucemia linfoblástica aguda en tratamiento**

**Número de registro institucional R-2021-3603-063**

**Folio:** \_\_\_\_\_

**Nombre del paciente:**

\_\_\_\_\_

**No. de afiliación:**

\_\_\_\_\_

**Lugar de residencia:**

\_\_\_\_\_

**Número de contacto:**

\_\_\_\_\_

## V. Quimioterapia protocolo HP06

### Riesgo normal o habitual

#### Inducción a la remisión

Respuesta a Prednisona: después de siete días con monoterapia con Prednisona 50mg/m<sup>2</sup> SC/d, la presencia de  $1 \times 10^9$  de blastos/L o más en el día 8, se define como pobre respuesta.

La presencia de menos de  $1 \times 10^9$  blastos/L, se define como buena respuesta a la Prednisona.

#### Inducción de remisión (Fase A)

Prednisona	60 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Días +1 al +28 del ciclo
Vincristina	1.5 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Días +1, +8, +22 del ciclo
Daunorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Días +8 y +15 del ciclo
L- asparginasa	5,000 UI/m <sup>2</sup> SC/dosis	Días +12, +15, +18, +21, +24, +27, +30, +33 del ciclo
Quimioterapia IT triple droga, de acuerdo a edad		Días +1, +12 y +33

Aspirado de MO día +33 del ciclo

#### Quimioterapia de consolidación (Fase B)

6-mercaptopurina	60 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Del +36 al +63 (por 28 días)
Ciclofosmida (i.v./una hora)	100 mg/m <sup>2</sup> /dosis	Los días +36 y +64
ARA-C	75 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Los días +38 al +41, +45 al +48, +52 al +55, +59 al ----
Quimioterapia IT triple droga, de acuerdo a edad		Días +46 y +59

#### Quimioterapia de consolidación (Fase C)

(Extra compartamental)

Metotrexate	1500 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Los días +8, +22, +36, +50
6-mercaptopurina	2.5 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Por 24 días del +1 al +56
Quimioterapia IT triple droga, de acuerdo a edad		Días 8, 22, 36, 50

#### Quimioterapia de Intensificación (Fase D)

Prednisona	60 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Días +1 al +28 del ciclo
------------	-----------------------------	--------------------------

Vinicristina	1.5 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Días +1, +8, +15, +22 del ciclo
Daunorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Días +8 y +15 del ciclo
L-asparginasa	50,000 UI/m <sup>2</sup> SC/día	Días +1, +8, +15, +22 del ciclo

### Quimioterapia de mantenimiento

6-Mercaptopurina	60 mg/m <sup>2</sup> SC/día VO cada 24 h
Metotrexate	20 mg/m <sup>2</sup> SC/día VO semanal

### Quimioterapia de riesgo alto

#### Inducción de remisión

Prednisona	60 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Días +1 al +28 del ciclo
Vincristina	1.5 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Días +1, +8, +15, +22 del ciclo
Daunorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Días +8, +15, +21 y +29 del ciclo
L- asparginasa	5,000 UI/m <sup>2</sup> SC/dosis	Días +12, +15, +18, +21, +24, +27, +30, +33 del ciclo
Quimioterapia IT triple droga, de acuerdo a edad		Días +1, +12 y +33

Aspirado de MO día +33 del ciclo

#### Quimioterapia de consolidación AR 1

Dexametasona	20 mg/m <sup>2</sup> SC/días IV	Días +1 al +5
Metotrexate	1500 mg/m <sup>2</sup> SC/día	En infusión continua para 24h dividido en 2, para 12 h cada una
Ciclofosfamida	200 mg/m <sup>2</sup> SC/dosis	Días +2 al +4 cada 12 h (cinco dosis)
Ara-C	1500 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Día +5, en infusión de 3 h, cada 12 h
L-asparginasa	25,000 UI/m <sup>2</sup> SC/día	Día +6 del ciclo
Quimioterapia IT triple droga, de acuerdo a edad		Día +1
Factor estimulante de colonias	300 μ/ SC	Días +11, +12, +13, +14 y +15 del ciclo

### Quimioterapia de consolidación AR 2

Dexametasona	30 mg/m <sup>2</sup> SC/días IV	DÍAS +1 al +5
Vincristina	1.5 mg/m <sup>2</sup> SC/día IV	Días +1 y +6
Daunorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> SC/día IV	El día +5
Ifosfamida	500 mg/m <sup>2</sup> SC/dosis IV cada 12h	Días +2 al +4 (cinco dosis)
L-Asparginasa	25 UI/m <sup>2</sup> SC/dosis IM	El día +6
Quimioterapia IT triple droga, de acuerdo a edad		El día +5
Factor estimulante de colonias	300 μ/ SC	Días +11, +12, +13, +14 y +15 del ciclo

### Quimioterapia de consolidación AR 3

Dexametasona	30 mg/m <sup>2</sup> SC/día VO	Días +1 al +5
Ara-C	1500 mg/m <sup>2</sup> SC/día	En infusión de 3 h
Etopósido (VP 16)	100 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Días +3 al +5 en infusión de 1 h
L-Asparginasa	25 000 UI/m <sup>2</sup> SC/dosis IM	Día +6
Quimioterapia IT triple droga, de acuerdo a edad		Día +5
Factor estimulante de colonias	300 μ/ SC	Días +11, +12, +13, +14 y +15 del ciclo

### Quimioterapia de intensificación

Prednisona	60 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Vía oral por 28 días
Vincristina	1.5 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Días +1, +8, +15, +22 del ciclo
Daunorrubicina	30 mg/m <sup>2</sup> SC/día	Días +8, +15, +21 y +29 del ciclo
L-Asparginasa	5000 UI/m <sup>2</sup> SC/dosis IM	Días +8, +11, +15, +18 del ciclo

### Quimioterapia de mantenimiento AR

6- Mercaptopurina	60 mg/m <sup>2</sup> SC/día	VO cada 24 h
Metotrexate	20 mg/m <sup>2</sup> SC/día	VO semanal

Article

## Changes in RANKL, OPG, and 25(OH)D Levels in Children with Leukemia from Diagnosis to Remission

Salvador Atilano-Miguel <sup>1,2,3</sup>, Lourdes Barbosa-Cortés <sup>2,\*</sup>, Rocío Ortiz-Muñoz <sup>1,3</sup>, Jorge Maldonado-Hernández <sup>2</sup>, Jorge A. Martín-Trejo <sup>4</sup>, Maricela Rodríguez-Cruz <sup>2</sup>, Lourdes Balcázar-Hernández <sup>5</sup>, Karina A. Solís-Labastida <sup>4</sup>, Benito A. Bautista-Martínez <sup>4</sup>, Azalia Juárez-Moya <sup>4</sup>, Zayra Hernández-Piñón <sup>4</sup>, Raeline A. Galindo-Rodríguez <sup>2</sup>, Adriana Chávez-Anaya <sup>2</sup>, Rosa E. Valdez-Avilez <sup>3</sup>, Juan M. Domínguez-Salgado <sup>2</sup>, Judith Villa-Morales <sup>2</sup> and María E. Rodríguez-Palacios <sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México 14387, Mexico; atilanosalvador@gmail.com (S.A.-M.); arom@xanum.uam.mx (R.O.-M.)
  - <sup>2</sup> Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Ciudad de México 06720, Mexico; jormh@yahoo.com.mx (J.M.-H.); maricela.rodriguez.cruz@gmail.com (M.R.-C.); raeline.2405@gmail.com (R.A.G.-R.); adriahavez03@hotmail.com (A.C.-A.); jmdomin6@outlook.com (J.M.D.-S.); jusyvm@hotmail.com (J.V.-M.); mrodriguezp2401@alumno.ipn.mx (M.E.R.-P.)
  - <sup>3</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de México 9340, Mexico; rosa\_5elena@hotmail.com
  - <sup>4</sup> Departamento Clínico de Hematología, Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Ciudad de México 06720, Mexico; jorge.martintr@imss.gob.mx (J.A.M.-T.); kas\_anastacia@yahoo.com (K.A.S.-L.); bbautistamartinez@yahoo.com (B.A.B.-M.); dra.ajuarez@gmail.com (A.J.-M.); zayra\_hp@hotmail.com (Z.H.-P.)
  - <sup>5</sup> Departamento de Endocrinología, Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Ciudad de México 06720, Mexico; ludab@comunidad.unam.mx
- \* Correspondence: bcmariade@hotmail.com; Tel./Fax: +52-55-56276944



**Citation:** Atilano-Miguel, S.; Barbosa-Cortés, L.; Ortiz-Muñoz, R.; Maldonado-Hernández, J.; Martín-Trejo, J.A.; Rodríguez-Cruz, M.; Balcázar-Hernández, L.; Solís-Labastida, K.A.; Bautista-Martínez, B.A.; Juárez-Moya, A.; et al. Changes in RANKL, OPG, and 25(OH)D Levels in Children with Leukemia from Diagnosis to Remission. *Cancers* **2024**, *16*, 2811. <https://doi.org/10.3390/cancers16162811>

Academic Editors: M. Walid Qoronfleh and Nader Al-Dewik

Received: 15 June 2024  
Revised: 9 July 2024  
Accepted: 10 July 2024  
Published: 10 August 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** Advances in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) have led to a marked improvement in the survival rate of patients. Nevertheless, these patients may develop adverse effects during and after treatment, such as bone abnormalities and vitamin D deficiency. Bone remodeling allows for bone volume and structure to be maintained, which is controlled by the receptor activator of the nuclear factor- $\kappa$ B (RANK)/RANK ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) system—determining pathway in the balance between bone formation and resorption. Some reports have explored the role of corticosteroids in modulating the RANKL and OPG levels and RANKL/OPG ratio in pediatric patients. Nevertheless, studies evaluating the role of RANKL and OPG in the bone health of pediatric ALL patients during treatment are limited. During remission, we observed an increase in the RANKL/OPG ratio, increased RANKL levels, and decreased OPG levels in ALL patients. These changes may predispose such patients to the development of bone health disorders in their adult lives.

**Abstract:** Background: The receptor activator of the nuclear factor- $\kappa$ B (RANK)/RANK ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) pathway is a determining pathway in the balance between bone formation and resorption, and disruptions in this complex can affect bone metabolism. Methods: This study analyzes the changes in RANKL, OPG, and 25(OH)D levels; the RANKL/OPG ratio; and other bone turnover markers (BTMs) from diagnosis to complete remission in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). This is a prospective observational cohort study, carried out at the Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, including 33 patients (4–17 years) with newly diagnosed B-cell ALL. The patients were treated with the HP09 chemotherapy protocol. Children who had previously been treated with corticosteroids were excluded. A peripheral blood sample at diagnosis and remission was collected to determine the 25(OH)D and BTM concentrations. Results: Increased RANKL ( $p = 0.001$ ) and osteocalcin ( $p < 0.001$ ) levels and RANKL/OPG ratio ( $< 0.001$ )

and a decreased OPG level ( $p = 0.005$ ) were observed at remission, predominantly in the high-risk (HR) relapse and vitamin D deficiency groups. A negative association between RANKL and OPG ( $r = -0.454$ ,  $p = 0.008$ ) was observed. Conclusions: we suggest that the RANKL/OPG ratio could serve as a bone remodeling marker in ALL patients.

**Keywords:** acute lymphoblastic leukemia; RANK ligand; osteoprotegerin; 25(OH)D; corticosteroids; bone turnover markers

## 1. Introduction

Advances in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) have led to a marked improvement in the survival rate of patients, ranging from almost fatal to curable in 85–90% of patients [1]. Nevertheless, ALL patients may develop adverse effects during and after treatment [2–4], including decreased bone mineral density (BMD), osteopenia/osteoporosis, osteonecrosis, fragility fractures, and vitamin D deficiency [5–9].

Childhood and adolescence are critical stages for bone development, mineralization, and the attainment of peak bone mass [10]. Bone remodeling is a tightly regulated process that involves the repair of microdamage and replacement of old bone with new bone through osteoclastic resorption and osteoblastic bone formation [11]. The RANK/RANKL/OPG pathway controls osteoclastogenesis [12] and bone resorption [13]. The RANK/RANKL interaction induces the formation of multinucleated mature osteoclasts, leading to bone resorption, while the binding of OPG to RANKL inhibits osteoclastogenesis [14,15], and disruptions in this complex result in excessive or impaired bone remodeling [13].

Corticosteroids are among the most potent osteotoxic drugs that are routinely prescribed to treat serious childhood illnesses, including leukemia [16]. Corticosteroids affect bone formation by decreasing the number and differentiation of osteoblastic lineage cells, as well as stimulating osteoclast differentiation and function through increased RANKL production, decreased OPG production by osteoblasts, an increase in the RANKL/OPG ratio, and excessive osteocyte apoptosis, leading to increased bone resorption and increased fracture risk [17,18]. Additionally, low vitamin D levels are associated with increases in RANKL expression and the RANKL/OPG ratio [19]. Childhood ALL patients are at risk of impaired vitamin D status and bone metabolism, which could be caused by limited sun exposure, nutritional factors [20], decreased physical activity, corticosteroids, and methotrexate therapy [21,22]. In vivo studies have shown that corticosteroid administration downregulates the expression of the CYP24A7 and CYP27B1 mRNAs, both of which are essential for controlling the availability of the active metabolite of vitamin D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D [23,24].

Some reports have explored the role of corticosteroids in modulating RANKL and OPG levels and the RANKL/OPG ratio in pediatric patients with chronic disorders, immobility, and corticosteroid exposure, as well as its relationship with bone health [19,25,26]. Nevertheless, studies evaluating the role of RANKL and OPG in bone health in pediatric patients during and after treatment are limited [9,27]. Muggeo et al. assessed the levels of bone turnover markers in ALL patients after the intensification phase and reported higher levels of RANKL and OPG in the ALL group than in the control group [9]. Hablas et al. reported higher concentrations of RANKL in ALL survivors than in healthy patients. Additionally, vitamin D levels were positively correlated with OPG and negatively correlated with RANKL levels [27]. In this context, the exploration of vitamin D [25(OH)D] levels and the impact of the administration of corticoids on the RANKL/OPG ratio in pediatric patients with ALL is relevant, as an imbalance in the expression or function of any component of this system can induce deregulation of the remodeling cycle and generate modifications in BMD. These effects can increase the long-term risk of osteoporosis and fractures in pediatric patients with ALL.

Therefore, our aim was to analyze the changes in RANKL, OPG, and 25(OH)D levels; the RANKL/OPG ratio; and other bone turnover markers (BTM) [osteocalcin, tartrate-resistant acid phosphatase type 5b (TRACP-5b), and bone alkaline phosphatase (BAP)] from diagnosis to complete remission in children with ALL.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design and Participants

This prospective observational cohort study (from diagnosis to complete remission) was carried out in the Medical Nutrition Research Unit and the Clinical Department of Hematology of the Pediatric Hospital of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) in Mexico City, Mexico. The eligibility criterion was patients who were newly diagnosed with ALL before the beginning of chemotherapy treatment between December 2021 and November 2023. Children who had previously been treated with chemotherapy at another institution, who had Down syndrome, or who had previously been treated with corticosteroids were excluded. A total of 71 patients were newly diagnosed with B-cell ALL, of which 22 patients were excluded as they did not meet the inclusion criteria, while 2 others were excluded due to the severity of the disease. One patient was transferred to another hospital, and in six patients the legal representative did not authorize their participation in this study. Thus, 40 boys were enrolled in this study; however, five patients died from complications inherent to treatment, and two patients left the study. Therefore, 33 patients (4–17 years old) were included in the analysis. Patients were followed from the time of diagnosis of leukemia to remission (Figure 1). The patients were treated with the HP09 chemotherapy protocol based on the BFM 95 protocol [28]. The patients were stratified according to their risk of relapse as follows: standard risk (SR; >1 year to <7 years, initial leucocyte count of  $20,000/\text{mm}^3$ ), intermediate risk (IR; >7 years to <10 years, initial leucocyte count of  $>20,000/\text{mm}^3$  and  $<50,000/\text{mm}^3$ ), and high risk (HR; <1 year and >10 years, initial leucocyte count of  $>50,000/\text{mm}^3$ ). Patients received monotherapy during the first seven days ( $50 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{d}$  prednisone), multiple drugs during remission induction (29–33 days), prednisone  $60 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{d}$  for 28 days, and vincristine  $1.5 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{d}$  (4 doses), daunorubicin  $30 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{d}$  (2, 3, or 4 doses at standard, intermediate, and high risk, respectively), L-asparaginase  $5000 \text{ IU}/\text{m}^2/\text{d}$  (8 doses to standard and intermediate, 6 doses to high risk), and 3 doses of intrathecal chemotherapy. According to the HP09 chemotherapy protocol, the complete remission (less than 5% blast) of the patient was monitored at 33 days by bone marrow aspirate. Recruitment, follow-up, and remission of the patients were at different times. Patients reached remission at 39 (32–39) days in the standard and intermediate risk group (SI-risk) and 38 (34–43) days in the high-risk (H-risk) group.

### 2.2. Clinical Data

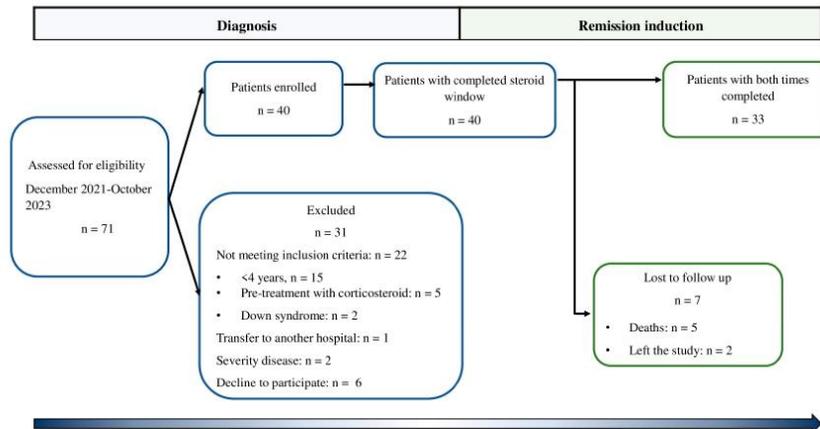
The demographic and clinical characteristics of the patients were collected during recruitment (diagnosis) and follow-up (at complete remission). Body weight (kg) and body composition were measured by impedance using an InBody 230 (InBody USA, Cerritos, CA, USA) while the patients were wearing lightweight clothing. Height was measured with a wall-mounted stadiometer (Seca 222, Seca Corp., Oakland Center, Columbia, MD, USA). Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by the square of the height (m); BMI scores were obtained from the World Health Organization (WHO) normative curves [29].

### 2.3. Analytical Methods

#### 2.3.1. Blood Samples

Peripheral blood samples at baseline, just before starting chemotherapy (diagnostic time), and during complete remission in the absence of relapse were collected between 8:00 and 9:00 am after an 8–12 h overnight fast. Clotted blood samples were centrifuged for 15 min at 3000 rpm under cold conditions ( $4^\circ\text{C}$ ). Aliquots of serum and plasma were

immediately frozen ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) and used to determine the serum concentrations of 25(OH)D and the plasma concentrations of RANKL, OPG, osteocalcin, BAP, and TRACP-5b. According to the HP09 chemotherapy protocol based on the BFM 95, complete remission (less than 5% blast) of the patient was monitored at 33 days according to bone marrow aspirate.



**Figure 1.** Study flow-chart in patients with ALL.

### 2.3.2. Biochemical Assays

Serum concentrations of 25(OH)D were determined through a chemiluminescent microparticle immunoassay using a kit from Abbott (Abbott Park, IL, USA). The 25(OH)D concentrations were classified according to the Endocrine Society as follows: vitamin D deficiency was defined as 25(OH)D < 20 ng/mL, vitamin D insufficiency was defined as 25(OH)D of 21–29 ng/mL, and sufficiency was defined as 25(OH)D  $\geq$  30 ng/mL [30].

The concentrations of RANKL were determined using a Human RANKL Magnetic Bead assay (HRNKL MAG-51K-01; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) with an analytical sensitivity of 0.5 pg/mL and a range of 4.88–20,000 pg/mL. OPG and osteocalcin concentrations were determined using a Human Bone Magnetic Bead Panel (HBNMAG-51K; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) with an analytical sensitivity of 1.9 pg/mL and a range of 7–30,000 pg/mL for OPG and an analytical sensitivity of 68.5 pg/mL and a range of 146–600,000 for osteocalcin. The RANKL/OPG ratio was calculated for each patient through dividing the value of RANKL by that of OPG.

In a subsample of 20 patients, we analyzed BAP and TRACP-5b levels through ELISA. BAP was measured using a commercial kit (MBS60806; MyBiosource Inc., San Diego, CA, USA) with an analytical sensitivity of 1.89 IU/L and a range of 3–900 IU/L, where high levels were defined as  $\geq$ 75th percentile [31]. TRACP-5b was assessed using a commercial kit (MBS045195; MyBiosource Inc., San Diego, CA, USA) with an analytical sensitivity of 0.1 IU/L and a range of 0.5–16 IU/L.

### 2.4. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS Statistics version 23.0 software (IBM, Armonk, NY, USA). The data were analyzed according to total sample size ( $n = 33$ ), vitamin D deficiency/insufficiency group, and risk of ALL relapse from diagnosis to complete remission. The data distribution was assessed with the Shapiro-Wilk test. The quantitative data are presented as the means  $\pm$  standard deviations (SDs) for normally distributed data or as the medians (minimal, maximal). Categorical variables are presented as percentages. To analyze changes in 25(OH)D levels, the RANKL/OPG ratio, and the levels of MBT during the follow-up, we used a Wilcoxon test or paired Student's *t*-test according to

the data distribution. The differences between groups by relapse risk were evaluated by Student's *t*-test or the Mann–Whitney U-test. To examine the associations between 25(OH)D and corticosteroid dose and the RANKL/OPG ratio, Spearman's correlation analysis was performed. The sample size had a value of  $\alpha = 0.05$ ,  $\beta = 0.1$ , and a statistical power of  $1 - \beta = 0.9$ . Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

### 3. Results

The demographic, anthropometric, body composition, clinical parameters, and BTM data of the ALL patients at diagnosis are presented in Table 1.

**Table 1.** Characteristics at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia in children.

Variable	All N = 33
Demographic	
Gender	
Male, n (%)	20 (61)
Female, n (%)	13 (39)
Age (y)	9.2 (4.0, 17.7)
Anthropometric and body composition	
Body weight (Kg)	33.4 (13.3, 99.6)
Height (m)	1.4 ± 0.3
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	17.1 (12.1, 32.5)
BMI (percentile)	54.8 (3.0, 100.0)
Eutrophic (BMI pc > 5 pc < 85) n (%)	21 (64)
Undernourished (BMI pc ≤ 5) n (%)	4 (12)
Overweight (BMI pc > 85) n (%)	4 (12)
Obese (BMI pc > 95) n (%)	4 (12)
BMI (Z-score)	0.2 ± 1.5
Lean body mass (Kg)	12.5 (3.8, 40.7)
Fat mass (Kg)	6.1 (1.5, 42.2)
Fat mass (%)	22.5 ± 10.1
Clinical parameters	
Classification	
High risk, n (%)	21 (64)
Intermediate risk, n (%)	3 (9)
Standard risk, n (%)	9 (27)
Immunophenotype	
Pre-B, n (%)	33 (100)
Leucocytes (miles/μL)	7.8 (0.9, 425.3)
Leucopenia, n (%)	13 (39)
Hemoglobin (g/DL)	9.2 ± 2.2
Anemia, n (%)	31 (94)
Platelets (miles/μL)	39.0 (10.0, 425.0)
Thrombocytopenia, n (%)	30 (91)
Neutrophils (miles/μL)	0.6 (0.1, 5.9)
Neutropenia, n (%)	24 (73)
Bone metabolism markers	
RANKL (pg/mL)	65.5 (4.0, 343.0)
OPG (pg/mL)	463.9 (210.9, 2661.7)

Table 1. Cont.

Variable	All N = 33
RANKL/OPG ratio	0.14 (0.004, 1.06)
BAP (IU/L) *	102.3 (44.8, 371.9)
BAP $\geq$ 75th percentile, n (%)	8 (40)
Osteocalcin (pg/mL)	24,098.4 (8900.3, 113,640.9)
TRAP (pg/mL) *	0.3, (0.2, 1.1)
25(OH)D (ng/mL)	17.4 (5.7, 61.9)
Sufficiency, n (%)	3 (9)
Insufficiency, n (%)	10 (30)
Deficient, n (%)	20 (61)

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation, median (interquartile range), or number (percentage). Vitamin D classification: sufficiency ( $\geq 30$  ng/mL), insufficiency (21–29 ng/mL), deficiency ( $< 20$  ng/mL). \* Sample size analyzed n = 20. RANKL: receptor activator for nuclear factor  $\kappa$ B ligand; OPG: osteoprotegerin; BAP: bone alkaline phosphatase; TRACP-5b: tartrate-resistant acid phosphatase-5b.

### 3.1. Changes in Bone Turnover Markers and the RANKL/OPG Ratio

Figure 2 shows the changes in 25(OH)D and BTM concentrations in the study population. The 25(OH)D levels tended to decrease between baseline and remission. We observed an increase in the serum concentrations of RANKL (65.5 pg/mL vs. 127.6 pg/mL,  $p = 0.001$ ) and osteocalcin (24,098 pg/mL vs. 48,789 pg/mL,  $p < 0.001$ ), as well as an increase in the RANKL/OPG ratio (0.137 vs. 0.427,  $p < 0.001$ ) between baseline and remission. OPG concentrations were decreased at remission compared with basal levels (463.9 pg/mL vs. 273.0 pg/mL,  $p = 0.005$ ). Moreover, the TRACP-5b concentration tended to decrease at remission compared with baseline ( $p = 0.073$ ). BAP did not change during the follow-up.

### 3.2. Changes in Bone Turnover Markers and the RANKL/OPG Ratio According to the Risk of Relapse

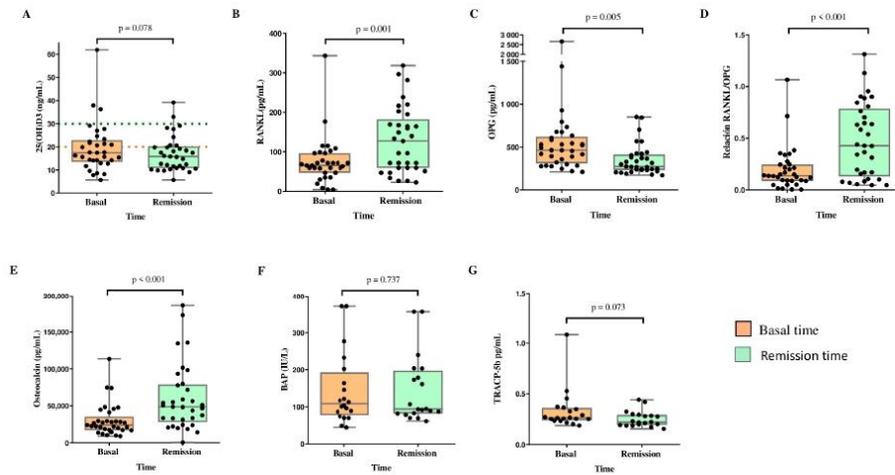
Comparisons of 25(OH)D and BTMs levels between baseline and remission according to the risk of relapse in SI-R vs. HR were performed. In the SI-R group, we observed increased osteocalcin concentrations (29,227.2 pg/mL vs. 49,993.5 pg/mL,  $p = 0.01$ ) between baseline and remission, with a tendency toward increased RANKL levels and RANKL/OPG ratio and decreased 25(OH)D and OPG concentrations at remission. However, we did not observe changes in BAP or TRACP-5b concentrations.

The HR group presented increased levels of RANKL (59.3 ng/mL vs. 96.3 ng/mL,  $p = 0.01$ ), osteocalcin (22,090 pg/mL vs. 48,739 pg/mL,  $p < 0.001$ ), and RANKL/OPG ratio (0.125 vs. 0.424,  $p = 0.01$ ); moreover, the OPG level (493.5 pg/mL vs. 272.0 pg/mL,  $p = 0.02$ ) was decreased at remission compared with baseline. There were no changes in the 25(OH)D, BAP, or TRACP-5b concentrations (Figure 3).

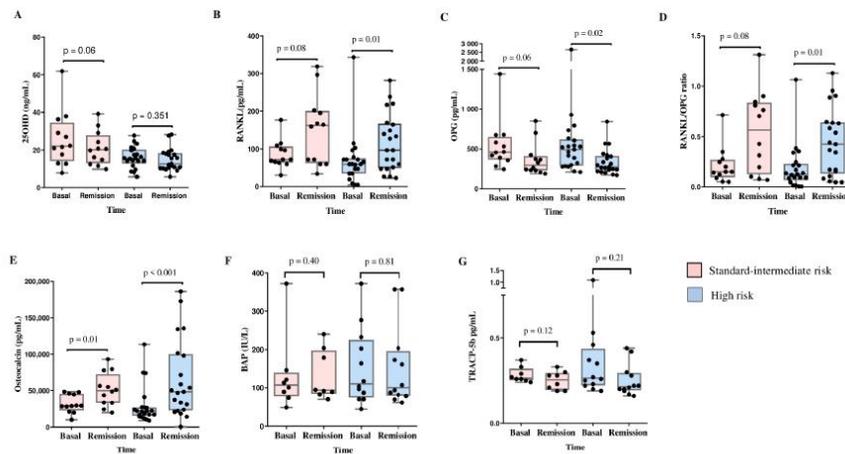
As expected, a difference in the cumulative dose of prednisone between the SI-R and HR groups was observed ( $1906.1 \pm 460.4$  mg/m<sup>2</sup> vs.  $2972.6 \pm 1003.3$  mg/m<sup>2</sup>, respectively;  $p = 0.002$ ).

### 3.3. Changes in Biochemical Bone Turnover Markers and the RANKL/OPG Ratio According to Vitamin D Status

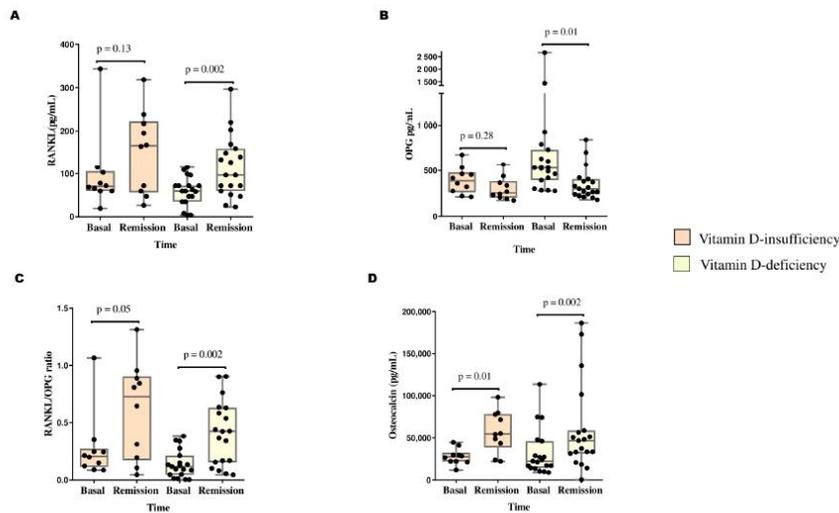
BTMs and the RANKL/OPG ratio were compared between baseline and at remission according to vitamin D deficiency status (Figure 4). The vitamin D-deficient group presented increases in RANKL (54.3 pg/mL vs. 96.3 pg/mL,  $p = 0.002$ ), osteocalcin (22,413 pg/mL vs. 46,816 pg/mL,  $p = 0.002$ ), and the RANKL/OPG ratio (0.118 vs. 0.424,  $p = 0.002$ ) and decreased OPG (530.6 pg/mL vs. 299.0 pg/mL,  $p = 0.01$ ). Moreover, the vitamin D-insufficient group presented increases in osteocalcin levels (27,575.5 pg/mL vs. 57,215.0 pg/mL,  $p = 0.01$ ) and the RANKL/OPG ratio (0.207 vs. 0.727,  $p = 0.05$ )—see Figure 4.



**Figure 2.** Changes in 25(OH)D, BMT, and RANKL/OPG ratio between diagnosis (baseline) and remission time in patients with ALL. Significant differences between the two time points were determined by Wilcoxon signed rank test. (A) 25(OH)D; (B) RANKL, receptor activator for nuclear factor  $\kappa$ B ligand; (C) OPG, osteoprotegerin; (D) RANKL/OPG ratio; (E) osteocalcin; (F) BAP, bone alkaline phosphatase; (G) TRACP-5b, tartrate-resistant acid phosphatase. BAP and TRACP-5b, sample size analyzed  $n = 20$ . Sufficiency 25(OH)D  $\geq 30$  ng/mL (dotted green), and deficiency 25(OH)D  $< 20$  ng/mL (dotted red).



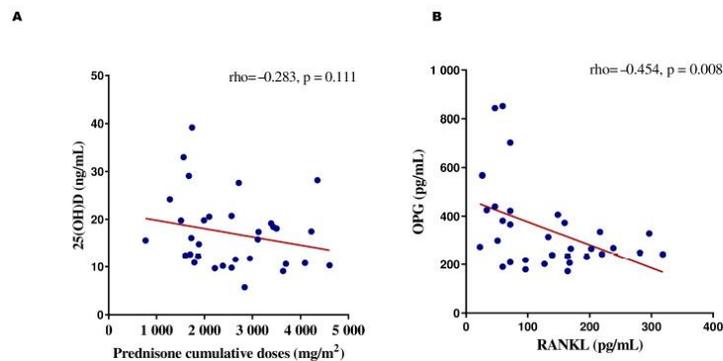
**Figure 3.** Changes in 25(OH)D<sub>3</sub>, bone turnover markers, and RANKL/OPG ratio between diagnosis (baseline) and remission time by risk of relapse in patients with ALL. Significant differences between the two time points were determined by Wilcoxon signed rank test. (A) 25(OH)D<sub>3</sub>; (B) RANKL, receptor activator for nuclear factor  $\kappa$ B ligand; (C) OPG, osteoprotegerin; (D) RANKL/OPG ratio; (E) osteocalcin; (F) BAP, bone alkaline phosphatase; (G) TRACP-5b, tartrate-resistant acid phosphatase. Standard or intermediate risk of relapse ( $n = 12$ ) and high risk of relapse ( $n = 21$ ). BAP and TRACP-5b sample size analyzed  $n = 20$ . Sufficiency 25(OH)D  $\geq 30$  ng/mL (dotted green), and deficiency 25(OH)D  $< 20$  ng/mL (dotted red).



**Figure 4.** Changes in bone turnover markers and RANKL/OPG ratio between diagnosis (baseline) and remission time according to vitamin D status in patients with ALL. Significant differences between the two time points were determined by Wilcoxon signed rank test. (A) RANKL, receptor activator for nuclear factor  $\kappa$ B ligand; (B) OPG, osteoprotegerin; (C) RANKL/OPG ratio; (D) osteocalcin. Insufficient vitamin D ( $n = 10$ ) levels, deficient vitamin D levels ( $n = 20$ ).

#### 3.4. Associations among Bone Turnover Markers, 25(OH)D Concentration, and Corticosteroid Dose

The correlations among the BTM concentration, 25(OH)D concentration, and corticosteroid dose were analyzed during remission. A negative correlation was observed between RANKL and OPG plasma levels ( $r = -0.454$ ,  $p = 0.008$ ). The dose of prednisone did not correlate with the serum 25(OH)D, RANKL, OPG, osteocalcin, BAP, or TRACP-5b concentrations or the RANKL/OPG ratio ( $r = -0.283$ ,  $r = 0.183$ ,  $r = -0.240$ ,  $r = 0.178$ ,  $r = 0.213$ ,  $r = -0.283$ , and  $r = 0.182$ , respectively;  $p \geq 0.99$ ; Figure 5).



**Figure 5.** Spearman's correlations between (A) vitamin D concentrations and cumulative corticosteroid doses and (B) OPG and RANKL in patients with ALL at remission time.

#### 4. Discussion

In this report, we present an analysis of changes in RANKL and OPG levels and the RANKL/OPG ratio in children with ALL from diagnosis to remission without any intervention in addition to hematological treatment. In this study, we observed increases in RANKL levels, osteocalcin levels, and the RANKL/OPG ratio, as well as a decrease in OPG levels at remission. When relapse risk and vitamin D were considered, patients with an HR of relapse or vitamin D deficiency presented these changes, which may reflect accelerated bone remodeling.

The RANKL/RANK/OPG axis plays an essential role in the regulation of bone metabolism, especially in bone remodeling. This lifelong process is characterized by an equilibrium between the activities of osteoclasts and osteoblasts [12]. Several studies have evaluated RANKL and OPG levels and the RANKL/OPG ratio in different pediatric diseases [19,25,26,32,33], but few studies have evaluated changes in bone health parameters in patients with ALL during treatment and without any intervention. In this sense, Solmanz et al. [34] have evaluated the effect of a combination of vitamin K2 (menaquinone-7 100 µg/day) and vitamin D3 (calcitriol 10 µg/day) on BMD, RANKL, and OPG levels, among other biochemical markers of bone turnover, in 29 patients with ALL (1.0–17 years) who were randomized into a study group (n = 15) and a control group (n = 14). Patients were evaluated from diagnosis to the first, second, third, and sixth months of treatment in this study. Nevertheless, they did not find any differences in RANKL or OPG concentrations between groups or within groups during the follow-up. The OPG/RANKL ratio differed between groups in the first month. In contrast, even though we had a shorter follow-up time than Solmaz et al. [34], and without any intervention with vitamin D, we observed an increase in the RANKL concentration and the RANKL/OPG ratio, as well as a decrease in OPG level between diagnosis and remission; these results suggest that, during the early phase of ALL treatment, glucocorticoid administration mainly increased osteoclastic activity and, consequently, bone resorption in these patients. Similarly, we observed the same changes in the HR and vitamin D deficiency groups. This observation could be explained, in part, by the higher cumulative glucocorticoid dose in the HR group than in the SI-R group; consequently, this group presented increased RANKL levels and decreased OPG levels during follow-up [18]. In addition, low vitamin D levels are associated with increased RANKL [27], which could explain the increase in RANKL in the vitamin D-deficient group of patients. We know that glucocorticoids are some of the most potent osteotoxic drugs that are routinely prescribed to treat serious childhood illnesses such as leukemia. The reduction in bone mass by glucocorticoids involves systemic and direct effects on bone cells, leading to the induction of apoptosis in osteoblasts and osteocytes, as well as suppression of their differentiation, which can be explained by a mechanism involving the suppression of cytokines such as interleukin 11 and activator protein 1 (AP-1) [35]. On the other hand, glucocorticoids increase the proliferation and differentiation of osteoclastic precursors by synthesizing receptor RANKL, an essential stimulator of osteoclastogenesis. Humphrey et al. have reported that dexamethasone, prednisolone, and deflazacort inhibited OPG production and stimulated RANKL mRNA in two human osteoblastic cell lines, where these changes were accentuated with increasing dose, and these cellular effects of glucocorticoids are mediated by the glucocorticoid receptor [36]. The glucocorticoid receptor causes an increase in RANKL promoter activity and increased RANKL mRNA expression level [37], while OPG could be inhibited through AP-1 and the suppression of b-catenin signaling by glucocorticoids [38].

According to the 25(OH)D serum levels, there was a high prevalence of hypovitaminosis D both at diagnosis (~90%) and at remission (94%). Remarkably, this percentage was higher than that reported by ENSANUT 2018 for healthy Mexican preschoolers and schoolchildren (73.2% and 75%, respectively) [39]. These results are consistent with those reported previously in several studies on patients with ALL receiving early-phase treatment [21,40,41]. In contrast to studies that have reported a decrease in 25(OH)D levels

during the treatment of children with ALL, we only found a trend toward a decrease in the level of 25(OH)D during remission.

In addition, we observed a negative correlation between RANKL and OPG plasma levels, which could explain the increase in the RANKL/OPG ratio. This is important, as a high RANKL/OPG ratio has been associated with increased bone resorption [42]. Additionally, the increase in RANKL may be associated with an initial increase in the signaling and activity of osteoclasts, which could lead to a predisposition to osteopenia and osteoporosis [33]. We hypothesized that the increase in both molecules could result in bone abnormalities, such as decreased bone mineral density; however, more research is required to further understand the impact on healthy bone.

TRAP-5b is an enzyme that is highly expressed in osteoclasts and is a regulator of bone resorption [43]. In pediatric patients with ALL, circulating TRACP-5b concentrations are reportedly greater than those in healthy individuals [9]. Solmaz et al. [34] did not observe changes during the 6 months of follow-up. Although we observed a significant increase in RANKL levels at remission, we found a tendency toward a decrease in TRACP-5b levels only between diagnosis and remission. A decrease in TRACP-5b has been reported in patients with myeloma who underwent induction treatment with vincristine–doxorubicin–dexamethasone–pamidronate [44]. In particular, long-term glucocorticoid treatment reduces TRACP-5b concentrations. These results could be partly explained by disruptions in the cytoskeleton of osteoclasts generated by long-term glucocorticoids that reduce their activity [45].

Moreover, BAP and osteocalcin are considered markers of bone formation. BAP is an isoenzyme of alkaline phosphatase which is produced from bone and is an indicator of osteoblastic activity, while osteocalcin is a protein synthesized by mature osteoblasts that plays an important role in metabolic regulation, bone mineralization, and calcium homeostasis. Orgel et al. [46] have evaluated bone structure, density, and circulating BTM at diagnosis and changes during induction therapy in pre-adolescents, adolescents, and young adults ( $n = 38$ ) with ALL and sex-matched healthy controls ( $n = 38$ ). The authors reported a decrease in bone structure and BMD. However, there were no changes in BAP or osteocalcin levels during follow-up, while the levels of C-telopeptide—a resorption marker—were increased. Our BAP results are consistent with those of Orgel et al.; in contrast, we reported increased osteocalcin levels in pediatric patients with ALL in complete remission. This could be explained by the increase in RANKL levels, as RANKL is a central player in osteoclast activation and bone destruction [47]. Osteocalcin can bind to the bone matrix, as it contains three glutamate residues that can be carboxylated; this modification allows it to bind to calcium and hydroxyapatite. Hence, the resorption of the bone matrix by osteoclasts can result in the release and decarboxylation of bound carboxylated osteocalcin, which could increase osteocalcin levels [48,49]. A modification of bone metabolism generated by ALL-B cells has been previously demonstrated [47], which explains the presence of vertebral fractures at diagnosis [50]. We did not observe significant differences in BAP levels, which could be explained by the fact that 40% of patients had elevated concentrations of BAP ( $\geq 75$ th percentile) at diagnosis, while 45% had elevated concentrations of BAP at remission. This is most likely compensatory to disorders of bone metabolism present in these patients, as high levels of BAP and its association with decreased lumbar BMD have been reported, especially in older women [51]. Additionally, our study population was largely composed of schoolchildren, and studies have reported the highest levels of BAP in this population [31,52].

Nevertheless, even though we detected changes in the RANKL level, OPG level, and RANKL/OPG ratio in the deficient and HR groups, Spearman correlation analysis of the bivariate BTM did not reveal a significant association between vitamin D concentration and corticoid dose. Similarly, Muggeo et al. [9] did not observe significant correlations between bone turnover marker levels and vitamin D levels. In contrast, Hablas et al. reported a negative correlation between circulating vitamin D and RANKL levels and a positive correlation with OPG levels in 60 ALL survivors. This was probably due to differences in

sample size, population, and, mainly, the proportion of patients with >30 ng/mL vitamin D (30% vs. ~9% [two patients]).

The principal limitations of this study were the lack of a control group and the evaluation of BMD. However, our study used a larger sample than that of Solmaz et al. [34], providing good statistical power. In addition, we explored the changes in a cohort from diagnosis to complete remission according to 25(OH)D status, risk of relapse, and cumulative doses of corticosteroids. We analyzed the evolution of the same group of patients at diagnosis and remission, in contrast with other studies [9]. Another strength of this study was evaluating the changes in BTM and the RANKL/OPG ratio in a cohort of patients with ALL without any intervention in addition to early hematological treatment.

## 5. Conclusions

During remission, we observed an increase in RANKL and osteocalcin levels and a decrease in OPG levels. When relapse risk and vitamin D levels were considered, patients with an HR of relapse or vitamin D deficiency presented these changes. Therefore, the RANKL/OPG ratio could be a good marker of bone remodeling in patients with ALL. Hypovitaminosis D and increased RANKL/OPG may predispose such patients to the development of bone health disorders, such as osteopenia, osteoporosis, and increased bone fragility, in their adult lives. To better understand bone remodeling markers in children with leukemia, it is necessary to conduct future studies.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.A.-M. and L.B.-C.; methodology, S.A.-M., L.B.-C., R.O.-M., J.M.-H., and J.A.M.-T.; validation, S.A.-M., L.B.-C., R.A.G.-R., and A.C.-A.; formal analysis, S.A.-M. and L.B.-C.; investigation, S.A.-M., L.B.-C., R.O.-M., J.M.-H., J.A.M.-T., M.R.-C., K.A.S.-L., B.A.B.-M., A.J.-M., Z.H.-P., R.A.G.-R., A.C.-A., R.E.V.-A., J.M.D.-S., J.V.-M., and M.E.R.-P.; resources, L.B.-C. and J.M.-H.; data curation, S.A.-M., L.B.-C., R.A.G.-R., and A.C.-A.; writing—original draft preparation, S.A.-M.; writing—review and editing, L.B.-C., R.O.-M., J.M.-H., J.A.M.-T., and L.B.-H.; visualization, S.A.-M., L.B.-C., R.O.-M., J.M.-H., J.A.M.-T., and L.B.-H.; supervision, L.B.-C., R.O.-M., and J.M.-H.; project administration, L.B.-C.; funding acquisition, S.A.-M. and R.O.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported in part by the Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, and Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México (UAM740101AR1; apoyotdcb@xanum.uam.mx).

**Institutional Review Board Statement:** This study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and was approved by the Research and Ethics Committee of the Pediatric Hospital (R-2021-3603-063), IMSS, in Mexico City, Mexico.

**Informed Consent Statement:** All parents, legal guardians, and patients ( $\geq 8$  years old) provided written informed consent before participation.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available upon request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** We are grateful to the Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) Mexico, through a grant for doctoral studies awarded to Salvador Atilano Miguel.

**Conflicts of Interest:** The authors have no conflicts of interest relevant to this article to disclose.

## References

1. Pui, C.H.; Robison, L.L.; Look, A.T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **2008**, *371*, 1030–1043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Levy, E.; Samoilenko, M.; Morel, S.; England, J.; Amre, D.; Bertout, L.; Drouin, S.; Laverdière, C.; Krajcinovic, M.; Sinnett, D.; et al. Cardiometabolic Risk Factors in Childhood, Adolescent and Young Adult Survivors of Acute Lymphoblastic Leukemia—A Petale Cohort. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 17684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Morel, S.; Léveillé, P.; Samoilenko, M.; Franco, A.; England, J.; Malaquin, N.; Tu, V.; Cardin, G.B.; Drouin, S.; Rodier, F.; et al. Biomarkers of cardiometabolic complications in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 21507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sheng, X.; Mittelman, S.D. The role of adipose tissue and obesity in causing treatment resistance of acute lymphoblastic leukemia. *Front. Pediatr.* **2014**, *2*, 53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Inaba, H.; Cao, X.; Han, A.Q.; Panetta, J.C.; Ness, K.K.; Metzger, M.L.; Rubnitz, J.E.; Ribeiro, R.C.; Sandlund, J.T.; Jeha, S.; et al. Bone mineral density in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* **2018**, *124*, 1025–1035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. van der Sluis, I.M.; van den Heuvel-Eibrink, M.M.; Hählen, K.; Krenning, E.P.; de Muinck Keizer-Schrama, S.M. Altered bone mineral density and body composition, and increased fracture risk in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Pediatr.* **2002**, *141*, 204–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Watsky, M.A.; Carbone, L.D.; An, Q.; Cheng, C.; Lovorn, E.A.; Hudson, M.M.; Pui, C.H.; Kaste, S.C. Bone turnover in long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* **2014**, *61*, 1451–1456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Cox, C.L.; Zhu, L.; Kaste, S.C.; Srivastava, K.; Barnes, L.; Nathan, P.C.; Wells, R.J.; Ness, K.K. Modifying bone mineral density, physical function, and quality of life in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* **2018**, *65*, e26929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Muggeo, P.; Grassi, M.; D'Ascanio, V.; Brescia, V.; Fontana, A.; Piacente, L.; Di Serio, F.; Giordano, P.; Faienza, M.F.; Santoro, N. Bone Remodeling Markers in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia after Intensive Chemotherapy: The Screenshot of a Biochemical Signature. *Cancers* **2023**, *15*, 2554. [[CrossRef](#)]
10. Maggioli, C.; Stagi, S. Bone modeling, remodeling, and skeletal health in children and adolescents: Mineral accrual, assessment and treatment. *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **2017**, *22*, 1–5. [[CrossRef](#)]
11. Eriksen, E.F. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2010**, *11*, 219–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Brunetti, G.; D'Amato, G.; Chiarito, M.; Tullo, A.; Colaianni, G.; Colucci, S.; Grano, M.; Faienza, M.F. An update on the role of RANKL-RANK/osteoprotegerin and WNT- $\beta$ -catenin signaling pathways in pediatric diseases. *World J. Pediatr.* **2019**, *15*, 4–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ono, T.; Hayashi, M.; Sasaki, F.; Nakashima, T. RANKL biology: Bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm. Regen.* **2020**, *40*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Boyce, B.F.; Xing, L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2007**, *5*, 98–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Boyce, B.F.; Xing, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res. Ther.* **2007**, *9* (Suppl. S1). [[CrossRef](#)]
16. Ward, L.M. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Why Kids Are Different. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 576. [[CrossRef](#)]
17. Compston, J. Glucocorticoid-induced osteoporosis: An update. *Endocrine* **2018**, *61*, 7–16. [[CrossRef](#)]
18. Velentza, L.; Zaman, F.; Säwendahl, L. Bone health in glucocorticoid-treated childhood acute lymphoblastic leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2021**, *168*, 103492. [[CrossRef](#)]
19. Ali, R.; Hammad, A.; El-Nahrery, E.; Hamdy, N.; Elhawary, A.K.; Eid, R. Serum RANKL, osteoprotegerin (OPG) and RANKL/OPG ratio in children with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **2019**, *28*, 1233–1242. [[CrossRef](#)]
20. Oosterom, N.; Dirks, N.F.; Heil, S.G.; de Jonge, R.; Tissing, W.J.E.; Pieters, R.; van den Heuvel-Eibrink, M.M.; Heijboer, A.C.; Pluijm, S.M.F. A decrease in vitamin D levels is associated with methotrexate-induced oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Support. Care Cancer* **2019**, *27*, 183–190. [[CrossRef](#)]
21. Bhattacharya, S.; Verma, N.; Kumar, A. Prevalence of vitamin D deficiency in childhood acute lymphoblastic leukemia and its association with adverse outcomes during induction phase of treatment. *Nutr. Cancer* **2020**, *72*, 1321–1325. [[CrossRef](#)]
22. Kızılocak, H.; Okcu, F. Late Effects of Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Survivors. *Turk. J. Haematol.* **2019**, *36*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zayny, A.; Almokhtar, M.; Wikvall, K.; Ljunggren, Ö.; Ubhayasekera, K.; Bergquist, J.; Kibar, P.; Norlin, M. Effects of glucocorticoids on vitamin D3-metabolizing 24-hydroxylase (CYP24A1) in Saos-2 cells and primary human osteoblasts. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2019**, *496*, 110525. [[CrossRef](#)]
24. Shymanskyi, I.; Lisakovska, O.; Mazanova, A.; Labudzynski, D.; Veliky, M. Vitamin D3 Modulates Impaired Crosstalk between RANK and Glucocorticoid Receptor Signaling in Bone Marrow Cells after Chronic Prednisolone Administration. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 303. [[CrossRef](#)]
25. Wasilewska, A.; Rybi-Szuminska, A.; Zoch-Zwierz, W. Serum RANKL, osteoprotegerin (OPG), and RANKL/OPG ratio in nephrotic children. *Pediatr. Nephrol.* **2010**, *25*, 2067–2075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Akhtar Ali, S.; Kang, H.; Olney, R.; Ramos-Platt, L.; Ryabets-Lienhard, A.; Cheung, C.; Georgia, S.; Pitukcheewanont, P. Evaluating RANKL and OPG levels in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Osteoporos. Int.* **2019**, *30*, 2283–2288. [[CrossRef](#)]
27. Hablas, N.M.; Keshk, W.A. OPG/RANK/RANKL Axis in Egyptian Children with Acute Lymphoblastic Leukemia after Maintenance Therapy: Relationship to Bone Mineral and Vitamin D Status. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **2023**, *45*, e733–e738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Mörcke, A.; Reiter, A.; Zimmermann, M.; Gadner, H.; Stanulla, M.; Dördelmann, M.; Löning, L.; Beier, R.; Ludwig, W.D.; Ratei, R.; et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: Treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM95. *Blood* **2008**, *111*, 4477–4489. [[CrossRef](#)]

29. de Onis, M.; Onyango, A.W.; Borghi, E.; Siyam, A.; Nishida, C.; Siekmann, J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull. World Health Organ.* **2007**, *85*, 660–667. [[CrossRef](#)]
30. Holick, M.F.; Binkley, N.C.; Bischoff-Ferrari, H.A.; Gordon, C.M.; Hanley, D.A.; Heaney, R.P.; Murad, M.H.; Weaver, C.M. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An Endocrine Society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 1911–1930. [[CrossRef](#)]
31. Fischer, D.C.; Mischek, A.; Wolf, S.; Rahn, A.; Salweski, B.; Kundt, G.; Haffner, D. Paediatric reference values for the C-terminal fragment of fibroblast-growth factor-23, sclerostin, bone-specific alkaline phosphatase and isoform 5b of tartrate-resistant acid phosphatase. *Ann. Clin. Biochem.* **2012**, *49 Pt 6*, 546–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ambroszkiewicz, J.; Sands, D.; Gajewska, J.; Chelchowska, M.; Laskowska-Klita, T. Bone turnover markers, osteoprotegerin and RANKL cytokines in children with cystic fibrosis. *Adv. Med. Sci.* **2013**, *58*, 338–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tsentidis, C.; Gougiotis, D.; Kossiva, L.; Doulgeraki, A.; Marmarinos, A.; Galli-Tsinopoulou, A.; Karavanaki, K. Higher levels of s-RANKL and osteoprotegerin in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus may indicate increased osteoclast signaling and predisposition to lower bone mass: A multivariate cross-sectional analysis. *Osteoporos. Int.* **2016**, *27*, 1631–1643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Solmaz, I.; Ozdemir, M.A.; Unal, E.; Abdurrezzak, U.; Muhtaroglu, S.; Karakukcu, M. Effect of vitamin K2 and vitamin D3 on bone mineral density in children with acute lymphoblastic leukemia: A prospective cohort study. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **2021**, *34*, 441–447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rauch, A.; Seitz, S.; Baschant, U.; Schilling, A.F.; Illing, A.; Stride, B.; Kirilov, M.; Mandic, V.; Takacz, A.; Schmidt-Ullrich, R.; et al. Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell Metab.* **2010**, *11*, 517–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Humphrey, E.L.; Williams, J.H.; Davie, M.W.; Marshall, M.J. Effects of dissociated glucocorticoids on OPG and RANKL in osteoblastic cells. *Bone* **2006**, *38*, 652–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lovšin, N.; Marc, J. Glucocorticoid Receptor Regulates TNFSF11 Transcription by Binding to Glucocorticoid Responsive Element in TNFSF11 Proximal Promoter Region. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kondo, T.; Kitazawa, R.; Yamaguchi, A.; Kitazawa, S. Dexamethasone promotes osteoclastogenesis by inhibiting osteoprotegerin through multiple levels. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *103*, 335–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Flores, M.E.; Rivera-Pasquel, M.; Valdez-Sánchez, A.; De la Cruz-Góngora, V.; Contreras-Manzano, A.; Shamah-Levy, T.; Villalpando, S. Vitamin D status in Mexican children 1 to 11 years of age: An update from the Ensanut 2018–19. *Salud Pública Méx.* **2021**, *63*, 382–393. [[CrossRef](#)]
40. Maddheshiya, S.; Singh, S.K.; Kumar, I.; Aggarwal, P.; Gupta, V. Bone Mineral Metabolism During Chemotherapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **2021**, *43*, 172–175. [[CrossRef](#)]
41. Naz, A.; Qureshi, R.N.; Shamsi, T.S.; Mahboob, T. Vitamin D levels in patients of acute leukemia before and after remission-induction therapy. *Pak. J. Med. Sci.* **2013**, *29*, 10–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Jura-Pótorak, A.; Szeremeta, A.; Olczyk, K.; Zoiń-Giebel, A.; Komosińska-Vashev, K. Bone Metabolism and RANKL/OPG Ratio in Rheumatoid Arthritis Women Treated with TNF- $\alpha$  Inhibitors. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 2905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Lei, Y.; Fu, S.; Yang, Y.; Chen, J.; Li, B.; Guo, Z.; Ye, J. Identification and Functional Analysis of Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Type 5b (TRAP5b) in *Oreochromis niloticus*. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 7179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Terpos, E.; de la Fuente, J.; Szydło, R.; Hatjiharissi, E.; Viniou, N.; Meletis, J.; Yataganas, X.; Goldman, J.M.; Rahemtulla, A. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b: A novel serum marker for monitoring bone disease in multiple myeloma. *Int. J. Cancer* **2003**, *106*, 455–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Chotiyanwong, P.; McCloskey, E.V. Pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis and options for treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2020**, *16*, 437–447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Orgel, E.; Mueske, N.M.; Wren, T.A.; Gilsanz, V.; Butturini, A.M.; Freyer, D.R.; Mittelman, S.D. Early injury to cortical and cancellous bone from induction chemotherapy for adolescents and young adults treated for acute lymphoblastic leukemia. *Bone* **2016**, *85*, 131–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Rajakumar, S.A.; Papp, E.; Lee, K.K.; Grandal, I.; Merico, D.; Liu, C.C.; Allo, B.; Zhang, L.; Grynpas, M.D.; Minden, M.D.; et al. B cell acute lymphoblastic leukemia cells mediate RANK-RANKL-dependent bone destruction. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, eaba5942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Ferron, M.; Wei, J.; Yoshizawa, T.; Del Fattore, A.; DePinho, R.A.; Teti, A.; Ducy, P.; Karsenty, G. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* **2010**, *142*, 296–308. [[CrossRef](#)]
49. Rossi, M.; Battafarano, G.; Pepe, J.; Minisola, S.; Del Fattore, A. The Endocrine Function of Osteocalcin Regulated by Bone Resorption: A Lesson from Reduced and Increased Bone Mass Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4502. [[CrossRef](#)]
50. Halton, J.; Gaboury, I.; Grant, R.; Alos, N.; Cummings, E.A.; Matzinger, M.; Shenouda, N.; Lentle, B.; Abish, S.; Atkinson, S.; et al. Advanced vertebral fracture among newly diagnosed children with acute lymphoblastic leukemia: Results of the Canadian Steroid-Associated Osteoporosis in the Pediatric Population (STOPP) research program. *J. Bone Miner. Res.* **2009**, *24*, 1326–1334. [[CrossRef](#)]

51. Zhu, Z.; Zhou, H.; Wang, Y.; Yao, X. Associations between bone turnover markers and bone mineral density in older adults. *J. Orthop. Surg.* **2021**, *29*, 2309499020987653. [[CrossRef](#)]
52. Ladang, A.; Rousselle, O.; Huyghebaert, L.; Bekaert, A.C.; Kovacs, S.; Le Goff, C.; Cavalier, E. Parathormone, bone alkaline phosphatase and 25-hydroxyvitamin D status in a large cohort of 1200 children and teenagers. *Acta Clin. Belg.* **2022**, *77*, 4–9. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00158

Matricula: 2202800942

RELACION ENTRE LA DOSIS ACUMULADA DE GLUCOCORTICOIDES Y LAS CONCENTRACIONES DE VITAMINA D SOBRE EL COCIENTE RANKL/OPG EN NIÑOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA EN TRATAMIENTO.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 18 del mes de diciembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ  
DR. JORGE MALDONADO HERNANDEZ  
DR. MIGUEL KLÜNDER KLÜNDER  
DRA. LAURA ESTELA CASTRILLON RIVERA  
DRA. MARIA DE LOURDES BARBOSA CORTES



SALVADOR ATILANO MIGUEL  
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: SALVADOR ATILANO MIGUEL

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

**Aprobar**

REVISÓ  
  
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ

VOCAL

DR. JORGE MALDONADO HERNANDEZ

VOCAL

DR. MIGUEL KLÜNDER KLÜNDER

VOCAL

DRA. LAURA ESTELA CASTRILLON RIVERA

SECRETARIA

DRA. MARIA DE LOURDES BARBOSA CORTES