

332 M.A. García-Pérez^a
J. Moreno-Mercer^b
A. Cano^b

^aUnidad Mixta de Investigación. Hospital Clínico Universitario. Valencia. ^bDepartamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología. Facultad de Medicina de Valencia. Valencia.

Correspondencia:

Dr. A. Cano.
Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología.
Facultad de Medicina.
Avda. Blasco Ibáñez, 17. 46010 Valencia.
Correo electrónico: acano@uv.es

Fecha de recepción: 8/2/02
Aceptado para su publicación: 26/6/02

Marcadores bioquímicos de remodelado óseo: aspectos descriptivos

Biochemical markers of bone turnover: descriptives aspects

M.A. García-Pérez, J. Moreno-Mercer, A. Cano. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo: aspectos descriptivos.

RESUMEN

La osteoporosis posmenopáusica es un problema de salud pública mundial, y su principal causa es la deficiencia estrogénica. El metabolismo óseo presenta dos actividades opuestas: la formación de hueso nuevo por el osteoblasto y la degradación o resorción de hueso viejo por el osteoclasto. Dado que estas actividades cursan con el vertido a la circulación de una serie de productos, los denominados marcadores bioquímicos de remodelado óseo, nosotros podemos estimar la tasa de ambos procesos determinando los valores séricos o urinarios de estos productos en el laboratorio. Estos marcadores son una poderosa herramienta para el ginecólogo, ya que su determinación es fácil de realizar, es barata, puede ser repetida a menudo y refleja el metabolismo óseo en un momento dado. En los últimos años se han desarrollado marcadores más específicos como los telopeptidos del colágeno tipo I (CTx y NTx), y se están introduciendo métodos automatizados para su determinación que disminuyen la variabilidad

intra e interensayo, aunque existen diversas fuentes de variabilidad que deben tenerse en cuenta a la hora de evaluar su uso.

PALABRAS CLAVE

Marcadores bioquímicos de remodelado óseo. Colágeno. Variabilidad. Ensayos.

ABSTRACT

Postmenopausal osteoporosis is a world-wide public health problem. Its main cause is estrogen deficiency. Bone metabolism displays two contrasting activities: the formation of new bone by osteoblasts and degradation or resorption of old bone by osteoclasts. Since both processes generate products that enter the blood circulation, called biochemical markers of bone turnover, the rate of both processes can be evaluated by assaying the serum or urinary levels of these products in the laboratory. These markers are a powerful tool

for the gynecologist since their determination is easy and inexpensive, can be frequently repeated, and reflects bone metabolism at a given moment. In the last few years, more specific markers have been developed, such as telopeptides of type I collagen (CTx and NTx). Automated methods for their determination are being introduced that diminish intra- and inter-assay variability, although several sources of variability still exist that must be considered before evaluating their use.

KEY WORDS

Biochemical markers of bone remodeling. Collagen. Variability. Assays.

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis posmenopáusica es un problema de salud pública mundial cuyas consecuencias suponen una enorme carga socioeconómica¹. Este problema no parece tener una solución a corto plazo ya que está provocado en gran medida por el incremento en la esperanza de vida y por el estilo de vida propio de los países industrializados, aunque se da cada vez más en países en vías de desarrollo. La deficiencia de estrógeno es la principal causa de osteoporosis posmenopáusica, aunque también contribuye a la osteoporosis en el varón^{2,3}.

El metabolismo óseo presenta dos actividades opuestas: formación de hueso nuevo por el osteoblasto y degradación o resorción de hueso viejo por el osteoclasto. Estas actividades se encuentran acopladas en el espacio y en el tiempo y constituyen las llamadas unidades de remodelado óseo (fig. 1)^{4,5}. La masa ósea depende tanto del equilibrio entre formación y resorción en cada unidad de remodelado como del número de unidades activas en un momento dado. Ya que los procesos de formación y de resorción ósea generan productos que pasan a la circulación sanguínea (los denominados marcadores de recambio óseo), se puede evaluar la tasa de ambos procesos determinando estos marcadores.

Los marcadores se pueden agrupar en tres categorías: a) enzimas o proteínas secretadas por las células implicadas en el remodelado óseo; b) produc-

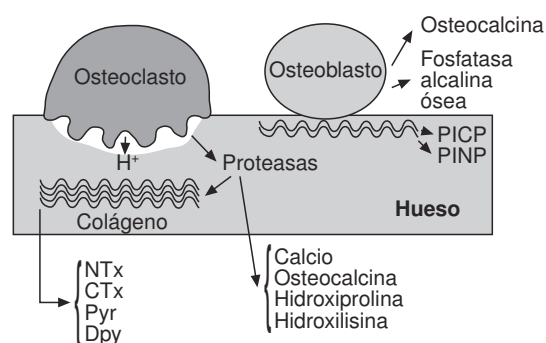


Figura 1. Representación de una unidad de remodelado óseo y los productos que genera. Cuando existe una señal apropiada (p. ej., señal mecánica), los osteoclastos se adhieren al hueso y comienzan a degradarlo mediante acidificación y digestión proteolítica. Con el tiempo, los osteoclastos abandonan el sitio de resorción y son reemplazados por los osteoblastos que empiezan el proceso de formación de hueso nuevo secretando osteoide que más tarde mineralizará. De la acción de ambos procesos se vierten a la circulación productos de degradación del colágeno o de la matriz ósea (resorción ósea) y productos resultantes de la actividad osteoblástica (formación ósea).

tos de rotura generados en el proceso de resorción ósea, y c) productos producidos durante la síntesis de hueso (fig. 1). Ya que formación y resorción ósea son procesos que van ligados^{4,5}, cuando se produce una aceleración del metabolismo óseo –como en el hipogonadismo–, ambas actividades aumentan^{2,3}, por lo que los marcadores reflejan el proceso general de remodelado óseo. Sin embargo, los marcadores se clasifican normalmente como si fuesen procesos separados en marcadores de resorción o de formación ósea.

Existen otros métodos para evaluar el estado óseo, como la histomorfometría dinámica, el estudio de flujos de calcio y el estudio de la densidad mineral ósea (DMO)⁶. La primera de las técnicas es invasiva, cara y se limita a un sitio determinado del esqueleto (cresta ilíaca), con lo que los resultados no son extrapolables a otras regiones. El estudio de los flujos de calcio tampoco es de elección en la osteoporosis posmenopáusica, ya que es una técnica compleja. Por otra parte, el estudio de la DMO, actualmente usada para el diagnóstico de la osteoporosis, no es invasivo y ofrece una evaluación precisa del estado óseo, aunque la DMO es lenta a la hora de revelar cambios, ya que es un reflejo de las variaciones en la densidad ósea ocurridas durante

334 años, por lo que el intervalo entre dos densitometrías debe ser, como mínimo, de un año, y preferiblemente dos. Por contra, la determinación de metabolitos en suero u orina es fácil de realizar, es barata, puede ser repetida a menudo y no supone riesgo para el paciente. Además, los marcadores responden a la terapia de manera rápida e indican el estado del metabolismo óseo en un momento dado⁷. También se ha sugerido su utilidad como predictores de pérdida ósea o de fracturas, y para evaluar la respuesta al tratamiento⁸.

Un marcador ideal debería ser específico de hueso, reflejar el estado de todo el esqueleto, correlacionarse con las medidas clásicas de modelado óseo, como la histomorfometría y los cambios en DMO, y no depender de variables como los ritmos circadianos, la dieta, la edad, el sexo, el ciclo menstrual, la función hepática y la tasa de aclaramiento renal. Como estas premisas no se cumplen para ningún marcador, en la bibliografía científica abundan los datos en los que se describe variabilidad intra e interindividual. Por otra parte, en este tipo de estudios, la población estudiada, el número de pacientes y la técnica empleada son factores determinantes. Por último, aunque son útiles para estudiar el comportamiento del metabolismo óseo en el ámbito poblacional, su utilidad a escala individual es muy discutible.

En la última década se ha puesto mucho énfasis en desarrollar y mejorar indicadores bioquímicos de

remodelado óseo para identificar a personas de riesgo⁸⁻¹¹, realizar un diagnóstico temprano, y monitorizar el efecto de las terapias de una forma rápida y cómoda^{12,13}. Como se verá en esta revisión, las pruebas más específicas usadas hoy día para evaluar formación ósea son los inmunoensayos séricos para la osteocalcina, la fosfatasa alcalina ósea y los péptidos de extensión del colágeno tipo I (PINP y PICP), mientras que los inmunoensayos para piridolinas entrecruzadas de colágeno tipo I y péptidos relacionados lo son para resorción ósea¹⁴.

En conjunto, los avances realizados en este campo en los últimos años permiten establecer que los marcadores bioquímicos representan una técnica de uso clínico relevante en el seguimiento de las oscilaciones en el metabolismo óseo, un área perteneciente a la actividad normal del ginecólogo. El conocimiento de este campo es, por consiguiente, una cuestión ineludible.

MARCADORES DE FORMACIÓN ÓSEA

Estos marcadores deben reflejar la actividad osteoblástica, e incluyen la fosfatasa alcalina total y la específica de hueso, la osteocalcina y productos resultantes de la síntesis del colágeno, como los péptidos de extensión aminoterminal (PINP) y carboxiterminal (PICP) del procolágeno (tabla 1; fig. 1). Todos ellos se determinan en suero.

Tabla 1 Marcadores de formación y resorción ósea

Formación	Resorción
Suero	Suero/plasma
Fosfatasa alcalina total y específica de hueso	NTx y CTx (telopéptidos del colágeno tipo I)
Osteocalcina	Piridinolina (Pyr) y desoxipiridinolina (Dpy) (totales o libres)
Péptidos de extensión del procolágeno tipo I	Fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP)
PICP (carboxiterminal)	
PINP (aminoterminal)	
	Orina
	Calcio/creatinina
	Hidroxiprolina
	Glicósidos de hidroxilisina
	NTx y CTx (telopéptidos del colágeno tipo I)
	Piridinolina (Pyr) y desoxipiridinolina (Dpy) (totales o libres)

Osteocalcina

La osteocalcina (OC) es la proteína no colágena más abundante en el hueso. Es una pequeña proteína específica del osteoblasto, con tres residuos de ácido gammacarboxiglutámico (Gla) que le proporcionan una avidéz elevada por el calcio. Tras su síntesis, dependiente de la vitamina K, una parte se incorpora a la matriz ósea, pero otra parte pasa a la circulación donde puede determinarse mediante inmunoensayo¹⁵ (fig. 1). La síntesis de esta proteína se incrementa con la mineralización y con la diferenciación osteoblástica¹⁶, y se correlaciona altamente con formación ósea¹⁷.

La OC sérica es mayor en niños que en adultos, y se alcanza un máximo en la pubertad. Se correlaciona con la velocidad de crecimiento, y sus cambios son paralelos a los de la fosfatasa alcalina, la hidroxiprolina y el telopéptido aminoterminal del colágeno tipo I (NTx)¹⁸. La OC posee una vida media muy corta y su eliminación renal es muy rápida, por lo que los valores séricos también se ven incrementados cuando existe fallo renal¹⁹. Existen varias formas de OC en el suero como consecuencia de procesamiento proteolítico, lo que ha supuesto una variabilidad considerable²⁰. La molécula intacta representa alrededor de un tercio de la inmunorreactividad total circulante en el suero de sujetos normales. Un tercio está representado por varios fragmentos de pequeño tamaño, y el tercio restante por un fragmento N-terminal medio de gran tamaño. La heterogeneidad de las formas circulantes de OC y la inestabilidad de la molécula intacta son el origen de la discordancia observada entre los diferentes estudios²⁰. Sin embargo, la determinación simultánea de la molécula intacta y de su fragmento N-terminal medio con determinados anticuerpos permite reducir en un 50% la variabilidad intraindividual y aumentar la sensibilidad y la especificidad del ensayo²¹.

Fosfatasa alcalina total y específica del hueso

La fosfatasa alcalina (FA) es una enzima que se localiza en la parte exterior de la membrana celular. Aunque se expresa en varios tejidos, su actividad total sérica representa fundamentalmente la suma de las actividades del hueso, el hígado y, en menor me-

dida, el intestino. La determinación de su actividad sérica es un marcador clásico de la actividad osteoblástica (fig. 1). Hay varios factores que afectan a la FA total, como el sexo, la edad y el estado hormonal (pubertad o menopausia) y, para ambos sexos, la FA total se incrementa sobre los 50 años y es mayor en mujeres posmenopáusicas que en premenopáusicas²². De acuerdo con esto, y debido a su falta de especificidad, en los últimos años se prefiere usar la isoenzima ósea. Sin embargo, se ha descrito que, si no hay incremento en la isoenzima hepática a causa de un proceso patológico, la FA total mantiene un valor aceptable para evaluar el recambio óseo^{23,24}, además existe una alta correlación entre la FA total y la específica de hueso²⁵.

La FA específica de hueso (FA ósea) es una enzima osteoblástica que interviene en la formación y mineralización ósea durante las que se libera a la circulación. Los nuevos inmunoensayos para la FA ósea casi no poseen reacción cruzada con la enzima hepática²⁶, por lo que la FA ósea es marcador sensible del aumento del remodelado óseo posmenopáusico y refleja fielmente los efectos de los tratamientos antirresortivos. Además, mediante estudios de cinéticas de calcio²⁴, se ha determinado que la FA ósea predice la tasa de mineralización ósea.

Propéptidos amino y carboxiterminales del procolágeno I

El colágeno tipo I es el mayoritario en el hueso. Estructuralmente, se forma por la asociación de tres cadenas polipeptídicas que constituyen la molécula de procolágeno, sintetizada por los osteoblastos. Tras ser liberada, dicha molécula sufre una escisión en sus extremos amino y carboxiterminal, cuyo resultado es, por una parte, la formación de la molécula de colágeno y, por otra, la de los propéptidos amino y carboxiterminales del colágeno tipo I (PINP y PICP, respectivamente) (figs. 1 y 2), que parecen desempeñar un papel esencial en la formación de las fibrillas de colágeno²⁷, y que por tanto constituyen un índice de actividad osteoblástica. Una vez liberados, estos propéptidos pasan a la circulación sanguínea. El PICP sigue un ritmo circadiano, dando fluctuaciones intraindividuales de hasta cuatro veces²⁸, y se correlaciona con el crecimiento lineal en la infancia, baja con la edad en el hombre y se in-

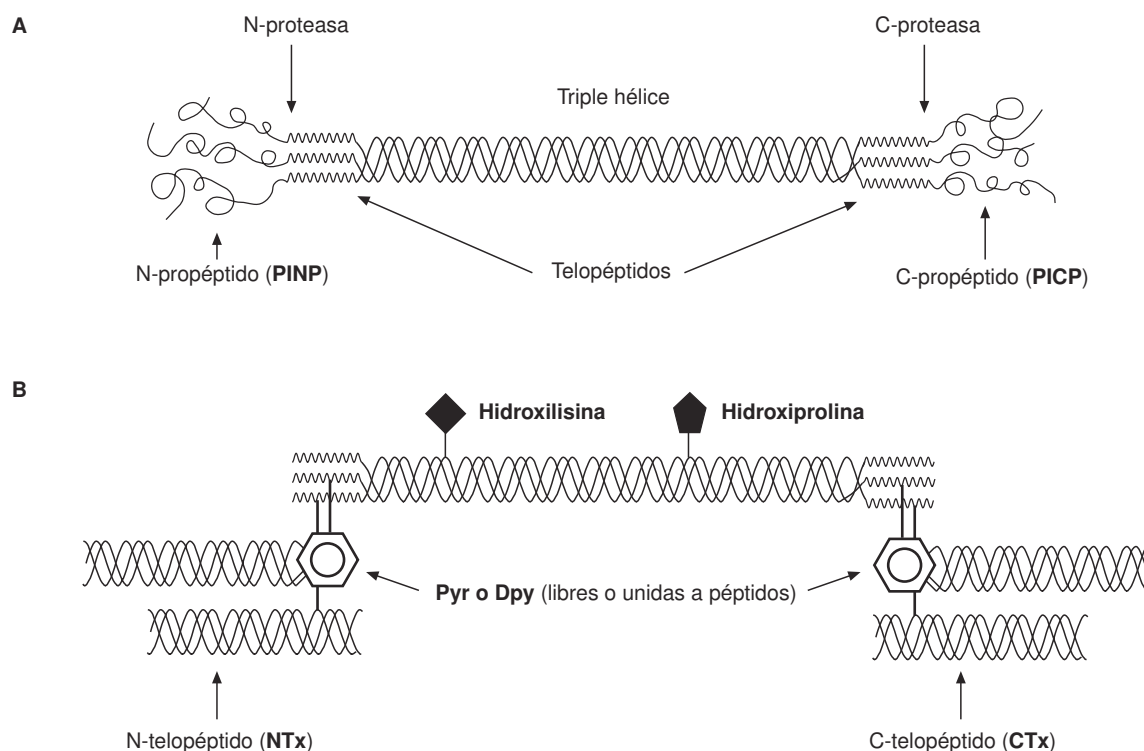


Figura 2. Productos resultantes de la síntesis (A) o degradación (B) del colágeno tipo I, usados como marcadores de metabolismo óseo. A); durante la síntesis y procesamiento del colágeno se producen, por la acción de proteasas y en una relación estequiométrica con el colágeno, los propéptidos amino y carboxiterminales del colágeno (PINP y PICP). B); se muestran los distintos marcadores que, tras la hidrólisis de la molécula del colágeno por parte de los osteoclastos, pasan a la circulación. Las estructuras Pyr y Dpy se pueden encontrar en forma libre o unidas a péptidos.

crementa en la mujer^{28,29}. Estos propéptidos han sido cuestionados por su falta de sensibilidad³⁰, aunque existen nuevos inmunoensayos para la fracción intacta de la parte aminoterminal (PINP) que parecen ser tan útiles como la OC sérica y la FA ósea en la detección del aumento de recambio óseo que acompaña a la menopausia y en la evaluación de la eficacia de los tratamientos antirresortivos^{31,32}.

MARCADORES DE RESORCIÓN ÓSEA

Aunque hay otros marcadores de resorción ósea (tabla 1), hay un acuerdo general en que esta actividad se debe correlacionar con los productos resultantes de la rotura del colágeno óseo (tipo I). El colágeno tipo I es una proteína glicosilada en forma de triple hélice rica en hidroxiprolina y con numerosos

entrecruzamientos covalentes entre residuos de lisina o hidroxilisina que unen los extremos de una cadena de colágeno con la parte media helicoidal de una cadena adyacente (fig. 2). Cuando para el enlace covalente se ha usado una hidroxilisina, el entrecruzamiento final es una estructura en forma de anillo llamada piridinolina³³. Durante el proceso de resorción ósea, los productos resultantes de la degradación del colágeno pasan a la circulación. Estos productos son aminoácidos modificados libres como la hidroxiprolina, la galactosil-hidroxilisina, deoxipiridinolina (Dpy; que deriva de dos hidroxilisinas y una lisina) y la piridinolina (Pyr; deriva de 3 hidroxilisinas), o unidos a péptidos^{33,34} (fig. 2). Para esta revisión son de especial interés las estructuras de piridinolina libre (Pyr y Dpy) o entrecruzada al segmento aminoterminal del colágeno (N-telopeptido, NTx) o al carboxiterminal (C-telopeptido, CTx).

Entrecruzamientos de piridinolina y deoxipiridinolina

La degradación del colágeno da lugar a la liberación de los entrecruzamientos y de distintos péptidos que los contienen. La Pyr y la Dpy son vertidas a la circulación cuando se resorbe hueso en una relación 3:1. Dpy es relativamente específica de hueso, mientras que Pyr también se encuentra en varios tejidos, entre ellos el cartílago articular y tejidos blandos (ligamentos y tendones). Estas estructuras no son absorbidas de la dieta y se filtran por el riñón sin degradarse, ya que no son metabolizadas³⁵, y se excretan en la orina unidas con proteínas (60%) o en forma libre (40%). Se han determinado mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), antes o después de hidrólisis³⁶. No obstante, los nuevos enzoinmunoensayos de piridinolinas entrecruzadas sustituyen y mejoran la determinación de piridinolinas entrecruzadas totales en orina hidrolizada mediante HPLC, y están disponibles para la determinación de Pyr y Dpy libres³⁷ o unidas a péptidos como el CTx y el NTx, tanto en suero como en orina³⁷⁻⁴². Estudios cinéticos de calcio sobre formación y resorción ósea evidencian que estos dos metabolitos entrecruzados se correlacionan altamente con la resorción²⁴. Su determinación en suero antes que en orina resulta en una mejor reproducibilidad, ya que la variabilidad en la concentración iónica de la orina y la necesidad de corregir los datos por la excreción de creatinina introduce una variabilidad adicional al estudio. Además, en la actualidad se pueden determinar varios de estos marcadores mediante técnicas automatizadas que reducen considerablemente las variaciones intra e interensayo^{43,44}.

Fosfatasa ácida resistente al tartrato

La fosfatasa ácida es una enzima lisosomal que se encuentra en hueso aunque también en próstata, plaquetas, eritrocitos, etc. La isoenzima ósea es resistente a tartrato (TRAP), lo que permite diferenciarla del resto. Se determina en sangre, aunque hoy está en desuso por su inespecificidad y laboriosidad. De forma reciente ha aparecido un nuevo inmunoensayo específico para determinar la TRAP 5b sérica, una isoforma de la isoenzima, que es secretada solamente por el osteoclasto, y que parece un refle-

jo más específico de la actividad osteoclástica y, lo más importante, parece no estar influida en pacientes con fallo hepático o renal^{45,46}.

Otros marcadores de resorción

Existen otros marcadores de resorción, aunque la mayoría se está abandonando. La resorción ósea se ha medido hasta hace poco por la concentración urinaria de hidroxiprolina libre y total^{47,48}. La hidroxiprolina es un aminoácido procedente de la destrucción del colágeno presente en los distintos tejidos, e incluso del colágeno de la dieta. Lo primero le confiere una gran inespecificidad y lo segundo obliga a hacer una dieta especial exenta de colágeno, o realizar la determinación en la orina de la segunda micción de la mañana, habiendo permanecido el sujeto en ayunas³⁵. En cualquier caso, la medición de hidroxiprolina hoy recibe poca consideración⁴⁹.

La hidroxilisina, como la hidroxiprolina, es un aminoácido específico del colágeno, que se forma por hidroxilación enzimática de la lisina y se excreta en forma de glucósidos. La determinación en orina de glicósidos de la hidroxilisina es probablemente más sensible que la determinación de la hidroxiprolina^{49,50}. Recientemente se han desarrollado inmunoensayos para su determinación, aunque todavía no están completamente validados⁵¹. Por último, la determinación del calcio urinario de 24 h o de las primeras orinas de la mañana, corregido por la creatinina urinaria, se utilizó durante mucho tiempo como marcador de la resorción ósea, pero en la actualidad su uso está prácticamente abandonado ya que, aunque es útil para detectar un aumento importante de la resorción, carece de especificidad y de sensibilidad.

Otros dos posibles marcadores de recambio óseo son la osteonectina y la sialoproteína II ósea. Ambas proteínas son sintetizadas por los osteoblastos, aunque también por las plaquetas. En cuanto se disponga de anticuerpos monoclonales para determinar las específicas de hueso, estos dos ensayos se pueden convertir en dos marcadores de interés^{52,53}.

VARIABILIDAD DE LOS MARCADORES

Se ha descrito mucha variabilidad en los valores de los marcadores bioquímicos entre distintos estu-

338 dios^{14,54}, por lo que hay que tener en cuenta las posibles fuentes de variabilidad y su impacto sobre resultados individuales antes de evaluar su uso clínico. En general, estas variaciones son más pronunciadas para los marcadores de resorción que para los de formación⁵⁵⁻⁵⁷. Las principales causas de variabilidad intra e interindividual son las diferencias entre las poblaciones estudiadas, el tamaño de la muestra, las características del ensayo y la duración del estudio^{58,59}. En este sentido, en un estudio de cohorte de 259 mujeres posmenopáusicas sanas, con un rango de edad entre los 51 y 89 años, a las que se les realizaron cuatro determinaciones secuenciales a lo largo de 3 años, se obtuvo una variación intraindividual del 12% para la OC, del 14% para la fosfatasa alcalina ósea y del 24% para el CTx urinario⁶⁰.

Al estudiar la respuesta de los niveles de marcadores al tratamiento antirresortivo, Rosen et al plantearon la necesidad de establecer un punto de corte (cambio mínimo significativo) por debajo del cual los cambios se deberían a las variaciones biológicas del marcador y por encima del cual indicarían un cambio significativo⁶¹. Observaron que mientras que los valores de NTx urinario presentaban los descensos más marcados en respuesta al tratamiento, debido a la gran variación que presentaba este marcador, sólo el 57% de los pacientes tratados evidenció un cambio en sus valores de NTx superior al valor del cambio mínimo significativo observado para el mismo. Por otra parte, ya hemos dicho que la determinación en suero mejora la reproducibilidad y que existen ya técnicas automatizadas para la determinación de algunos marcadores, con lo que la variabilidad disminuye^{43,44,62}. Es importante resaltar el estado de ayuno a la hora de la toma de muestras, ya que se han descrito valores mucho más elevados de CTx, de OC y de PINP en pacientes en ayunas respecto a pacientes que no ayunaron^{58,59}, estando este descenso mediado, al menos en parte, por una descarga de insulina⁶³.

Los marcadores de recambio óseo siguen un ritmo circadiano⁶⁴⁻⁶⁷, con lo que hay que estandarizar los tiempos de recogida de muestras para minimizar su influencia. Así, Aoshima et al⁶⁸ observaron que los marcadores de resorción urinarios Dpy y CTx eran un 37 y un 55% más altos por la noche que por el día. La bibliografía es confusa sobre este término, aunque parece haber consenso en cuanto al hecho de que la mayoría de los marcadores tiende a pre-

sentar valores más elevados durante la noche, con picos entre las 2:00 y las 8:00 h^{59,63,65}. Con la estación del año también se ha observado variabilidad, aunque más ligera, en los marcadores. Durante el invierno se produce una aceleración del remodelado óseo manteniéndose formación y resorción acopladas. La OC, la FA ósea, y la Pyr y Dpy parecen ser los marcadores que presentan las mayores variaciones^{69,70}. Estas variaciones son más pronunciadas en las mujeres y en la edad avanzada, y son paralelas a variaciones en la concentración de vitamina D, que suele ser más baja en invierno y también en las personas mayores y con menor actividad física.

Los valores de los marcadores de recambio óseo son altos en la infancia debido al elevado recambio asociado al crecimiento, alcanzándose un pico al inicio de la adolescencia. Los valores prepuberales de estos marcadores son de cuatro a cinco veces más altos que en los adultos, bajando a valores de adulto al final de la pubertad⁷¹⁻⁷⁵, aunque parece ser que en la mujer adulta sólo se da un descenso de los marcadores de formación hasta alcanzar los 35 años de edad y que los marcadores de recambio óseo se mantienen estables entre los 35 y los 55 años para mujeres no menopáusicas⁷⁶. En el varón adulto el perfil de cambio observado en los marcadores es distinto y ha sido menos estudiado, aunque parece que los valores de la mayoría de los marcadores disminuyen hasta alrededor de los 60 años de edad para luego mantenerse estables hasta los 80 años. Así, con el envejecimiento, hay estudios que describen diferencias con la edad, tanto en hombres como en mujeres, otros que los encuentran sólo en mujeres, y otros en los que no se han observado cambios significativos⁷⁷⁻⁸⁰. Además, los marcadores de recambio óseo se alteran con el reposo, el ejercicio y la dieta^{54,81-84}.

Diversos estudios indican que el recambio óseo se encuentra elevado durante la menopausia^{2,14,85,86}. Varios trabajos demuestran que los marcadores ya se encuentran elevados durante la perimenopausia, cuando la menstruación es irregular, y que ya existe pérdida ósea asociada⁸⁷⁻⁹⁰. Incluso se ha descrito que el recambio óseo ya está elevado 4 años antes de la menopausia⁸⁶. Los telopéptidos del colágeno son los marcadores que mejor discriminan entre mujeres pre y posmenopáusicas^{85,86,91-93}.

Los marcadores también varían ligeramente según la fase del ciclo menstrual. Parece ser que durante la

fase lútea del ciclo menstrual los marcadores de formación ósea están más elevados y los de resorción están suprimidos^{94,95}, mientras que otros estudios indican un aumento significativo en los valores de OC y un descenso significativo en los valores de CTx y Dpy libre durante la fase folicular del ciclo⁹⁵. Durante el embarazo y la lactancia se observa un aumento generalizado de los marcadores de recambio óseo debido a la adaptación materna al elevado gasto de calcio a que se ve sometida^{96,97}.

Por otra parte, además de las enfermedades relacionadas con el metabolismo óseo como la enfermedad de Paget, las metástasis óseas, el hiperparatiroidismo y la osteodistrofia renal, existen otras enfermedades que cursan con cambios en los niveles de marcadores como la diabetes y las enfermedades del tiroides, la insuficiencia renal y hepática, la artrosis y la poliartritis reumatoide^{93,98-100}. Para complicar más este escenario, determinados tratamientos afectan a los valores de estos marcadores como los corticoides, los anticonvulsivos, los diuréticos tiazídicos, la heparina y la warfarina¹⁰¹⁻¹⁰⁵.

En resumen, para minimizar la variabilidad de los marcadores, se debe recoger las muestras de sangre y orina por la mañana. La muestra de sangre se debe extraer entre las 8:00 y 10:00 h en ayunas, y la de orina entre las 7:00 y las 9:00 h. Se puede reducir aún más la variabilidad mediante la obtención de dos valores para el marcador antes de instaurar el tratamiento, con el fin de establecer un valor basal y comparar los cambios frente a los valores obtenidos en las determinaciones de seguimiento a los 3 y 6 meses de iniciar el tratamiento. En general, un descenso de más del 40-60% en los valores de los marcadores en orina

o de más de un 20-30% en los de suero ya indica una respuesta positiva al tratamiento. La precisión puede mejorarse mediante distintas aproximaciones; la técnica empleada y fundamentalmente el anticuerpo usado en el ensayo son parámetros críticos^{12,14}.

CONCLUSIONES

En los últimos años se han desarrollado varios marcadores bioquímicos de remodelado óseo más específicos y sensibles que los convencionales, como el calcio, la hidroxiprolina o la fosfatasa alcalina total. Además, la introducción de métodos automáticos para su determinación está eliminando, en parte, numerosas fuentes de variación. Se están usando ampliamente en diferentes estudios clínicos y en la investigación clínica, aunque el mayor interés ha sido su aplicación en la osteoporosis posmenopáusica. En esta patología, se producen ligeros cambios en el metabolismo óseo si los comparamos con enfermedades como la de Paget, que no pueden ser detectados por los marcadores bioquímicos del metabolismo óseo convencionales. Aun así, estos nuevos marcadores de remodelado óseo presentan grandes fuentes de variación como los ritmos circadianos, la edad, el estatus hormonal etc., que hacen necesario su estandarización en el uso clínico. Si se controla una serie de factores, como el estado de ayuno, la hora de recogida, la conservación de la muestra, la técnica empleada para su determinación, etc., los marcadores se muestran como poderosas herramientas para el ginecólogo para abordar el estudio del estado óseo en las pacientes con riesgo de osteoporosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Johnell O. The socioeconomic burden of fractures: today and in the 21st century. *Am J Med* 1997;103(Suppl):20-5.
2. Riggs BL, Melton LJ III. Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 1986;314:1676-86.
3. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ III. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 1998;13:763-73.
4. Frost HM. Bone remodeling and its relationships to metabolic bone disease. Springfield: Charles C. Thomas, 1973.
5. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 1994;55:273-86.

6. Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev* 1996;17:333-68.
7. Christiansen C, Riis BJ, Rodbro P. Screening procedure for women at risk of developing postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 1990;1:35-40.
8. Garnero P, Delmas PD. Bone markers. *Baillieres Clin Rheumatol* 1997;11:517-37.
9. Slemenda C, Hui SL, Longcope C, Johnston CC. Sex steroids and bone mass. A study of changes about the time of menopause. *J Clin Invest* 1987;80:1261-9.
10. Johansen JS, Riis BJ, Delmas PD, Christiansen C. Plasma BGP: an indicator of spontaneous bone loss and of the effect of oestrogen treatment in postmenopausal women. *Eur J Clin Invest* 1998;18:191-5.
11. Hansen MA, Overgaard K, Riis BJ, Christiansen C. Role of peak bone mass and bone loss in postmenopausal osteoporosis: 12 year study. *BMJ* 1991;303:961-4.
12. Garnero P, Shih WJ, Gineyts E, Karpf DB, Delmas PD. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1693-700.
13. Chesnut CH III, McClung MR, Ensrud KE, Bell NH, Genant HK, Harris ST, et al. Alendronate treatment of the postmenopausal osteoporotic woman: effect of multiple dosages on bone mass and bone remodeling. *Am J Med* 1995;99:144-52.
14. Garnero P, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover: clinical usefulness in osteoporosis. *Ann Biol Clin (Paris)* 1999;57:137-48.
15. Brown JP, Delmas PD, Malaval L, Edouard C, Chapuy MC, Meunier PJ. Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1984;1:1091-3.
16. Pockwinse SM, Lawrence JB, Singer RH, Stein JL, Lian JB, Stein GS. Gene expression at single cell resolution associated with development of the bone cell phenotype: ultrastructural and in situ hybridization analysis. *Bone* 1993;14:347-52.
17. Charles P, Poser JW, Mosekilde L, Jensen FT. Estimation of bone turnover evaluated by ⁴⁷Ca-kinetics. Efficiency of serum bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein, serum alkaline phosphatase, and urinary hydroxyproline excretion. *J Clin Invest* 1985;76:2254-8.
18. Bollen AM, Eyre DR. Bone resorption rates in children monitored by the urinary assay of collagen type I cross-linked peptides. *Bone* 1994;15:31-4.
19. Cheung AK, Manolagas SC, Catherwood BD, Mosely CA Jr, Mitas JA, Blantz RC, et al. Determinants of serum 1,25 (OH)₂D levels in renal disease. *Kidney Int* 1983;24:104-9.
20. Tracy RP, Andrianorivo A, Riggs BL, Mann KG. Comparison of monoclonal and polyclonal antibody-based immunoassays for osteocalcin: a study of sources of variation in assay results. *J Bone Miner Res* 1990;5:451-61.
21. Garnero P, Grimaux M, Seguin P, Delmas PD. Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated *in vivo* and *in vitro*. *J Bone Miner Res* 1994;9:255-64.
22. Schiele F, Henny J, Hitz J, Petitclerc C, Gueguen R, Siest G. Total bone and liver alkaline phosphatases in plasma: biological variations and reference limits. *Clin Chem* 1983;29:634-41.
23. Minisola S, Pacitti MT, Ombriccolo E, Costa G, Scarda A, Palombo E, et al. Bone turnover and its relationship with bone mineral density in pre- and postmenopausal women with or without fractures. *Maturitas* 1998;29:265-70.
24. Weaver CM, Peacock M, Martin BR, McCabe GP, Zhao J, Smith DL, et al. Quantification of biochemical markers of bone turnover by kinetic measures of bone formation and resorption in young healthy females. *J Bone Miner Res* 1997;12:1714-20.
25. Takahashi M, Kushida K, Hoshino H, Miura M, Ohishi T, Inoue T. Comparison of bone and total alkaline phosphatase activity on bone turnover during menopause and in patients with established osteoporosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;47:177-83.
26. Garnero P, Delmas PD. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:46-1053.
27. Fleischmajer R, Perlsh JS, Olsen BR. Amino and carboxyl propeptides in bone collagen fibrils during embryogenesis. *Cell Tissue Res* 1987;247:105-9.
28. Sgherzi MR, Fabbri G, Bonati M, Maietta LA, Segre A, De Vita D, et al. Episodic changes of serum procollagen type I carboxy-terminal propeptide levels in fertile and postmenopausal women. *Gynecol Obstet Invest* 1994;38:60-4.
29. Ebeling PR, Peterson JM, Riggs BL. Utility of type I procollagen propeptide assays for assessing abnormalities in metabolic bone diseases. *J Bone Miner Res* 1992;7:1243-50.
30. Hassager C, Fabbri-Mabelli G, Christiansen C. The effect of the menopause and hormone replacement therapy on serum carboxyterminal propeptide of type I collagen. *Osteoporos Int* 1993;3:50-2.
31. Melkko J, Kauppila S, Niemi S, Risteli L, Haukipuro K, Jukkola A, et al. Immunoassay for intact amino-terminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem* 1996;42:947-54.
32. Domínguez CC, Sosa HM, Traba ML, Álvarez VE, de la Piedad C. Biochemical markers of bone formation in the study of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 1998;8:147-51.
33. Eyre DR, Paz MA, Gallop PM. Cross-linking in collagen and elastin. *Annu Rev Biochem* 1984;53:717-48.
34. Knott L, Bailey AJ. Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 1998;22:181-7.

35. Colwell A, Russell RG, Eastell R. Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxy pyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption. *Eur J Clin Invest* 1993;23:341-9.
36. Eyre DR, Koob TJ, Van Ness KP. Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1984;137:380-8.
37. Seyedin SM, Kung VT, Daniloff YN, Hesley RP, Gómez B, Nielsen LA, et al. Immunoassay for urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 1993;8:635-41.
38. Robins SP, Woitge H, Hesley R, Ju J, Seyedin S, Seibel MJ. Direct, enzyme-linked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption. *J Bone Miner Res* 1994;9:1643-9.
39. Hanson DA, Weis MA, Bollen AM, Maslan SL, Singer FR, Eyre DR. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res* 1992;7:1251-8.
40. Bonde M, Qvist P, Fledelius C, Riis BJ, Christiansen C. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin Chem* 1994;40:2022-5.
41. Rosenquist C, Fledelius C, Christgau S, Pedersen BJ, Bonde M, Qvist P, et al. Serum CrossLaps One Step ELISA. First application of monoclonal antibodies for measurement in serum of bone-related degradation products from C-terminal telopeptides of type I collagen. *Clin Chem* 1998;44:2281-9.
42. Clemens JD, Herrick MV, Singer FR, Eyre DR. Evidence that serum NTx (collagen-type I N-telopeptides) can act as an immunochemical marker of bone resorption. *Clin Chem* 1997;43:2058-63.
43. Okabe R, Nakatsuka K, Inaba M, Miki T, Naka H, Masaki H, et al. Clinical evaluation of the Elecsys beta-CrossLaps serum assay, a new assay for degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clin Chem* 2001;47:1410-14.
44. Craciun AM, Vermeer C, Eisenwiener HG, Drees N, Knapen MH. Evaluation of a bead-based enzyme immunoassay for the rapid detection of osteocalcin in human serum. *Clin Chem* 2000;46:252-7.
45. Halleen JM, Hentunen TA, Karp M, Kakonen SM, Pettersson K, Vaananen HK. Characterization of serum tartrate-resistant acid phosphatase and development of a direct two-site immunoassay. *J Bone Miner Res* 1998;13:683-7.
46. Halleen JM, Karp M, Viloma S, Laaksonen P, Hellman J, Kakonen SM, et al. Two-site immunoassays for osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase based on characterization of six monoclonal antibodies. *J Bone Miner Res* 1999;14:464-9.
47. Cleary J, Saunders RA. A simplified procedure for the measurement of total hydroxyproline in urine. *Clin Chim Acta* 1974;57:217-23.
48. Green GD, Reagan K. Determination of hydroxyproline by high pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* 1992;201:265-9.
49. Bettica P, Moro L, Robins SP, Taylor AK, Talbot J, Singer FR, et al. Bone-resorption markers galactosyl hydroxylysine, pyridinium crosslinks, and hydroxyproline compared. *Clin Chem* 1992;38:2313-8.
50. Krane SM, Kantrowitz FG, Byrne M, Pinnell SR, Singer FR. Urinary excretion of hydroxylysine and its glycosides as an index of collagen degradation. *J Clin Invest* 1977;59:819-27.
51. Leigh SD, Ju HS, Lundgard R, Daniloff GY, Liu V. Development of an immunoassay for urinary galactosylhydroxylysine. *J Immunol Methods* 1998;220:169-78.
52. Seibel MJ, Woitge HW, Pecherstorfer M, Karmatschek M, Horn E, Ludwig H, et al. Serum immunoreactive bone sialoprotein as a new marker of bone turnover in metabolic and malignant bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3289-94.
53. Delany AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R, Canalis E. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest* 2000;105:915-23.
54. Watts NB. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clin Chem* 1999;45:1359-68.
55. Ju HS, Leung S, Brown B, Stringer MA, Leigh S, Scherrer C, et al. Comparison of analytical performance and biological variability of three bone resorption assays. *Clin Chem* 1997;43:1570-6.
56. Eastell R, Mallinak N, Weiss S, Ettinger M, Pettinger M, Cain D, et al. Biological variability of serum and urinary N-telopeptides of type I collagen in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2000;15:594-8.
57. Rosen CJ, Tenenhouse A. Biochemical markers of bone turnover. A look at laboratory tests that reflect bone status. *Postgrad Med* 1998;104:101-2:107-10:113-4.
58. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int* 2000;11(Suppl 6):2-17.
59. Hannon R, Eastell R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos Int* 2000;11(Suppl 6):30-44.
60. Garnero P, Delmas PD. Variability and response of urinary resorption markers to hormone replacement therapy. *J Bone Miner Res* 1999;14:470-2.
61. Rosen HN, Moses AC, Garber J, Ross DS, Lee SL, Greenspan SL. Utility of biochemical markers of bone turnover in the follow-up of patients treated with bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 1998;63:363-8.
62. Chapurlat RD, Garnero P, Breart G, Meunier PJ, Delmas PD. Serum type I collagen breakdown product (serum CTX) predicts hip fracture risk in elderly women: the EPIDOS study. *Bone* 2000;27:283-6.
63. Bjarnason NH, Henriksen EE, Alexandersen P, Christgau S, Henriksen DB, Christiansen C. Mechanism of circadian variation in bone resorption (1). *Bone* 2002;30:307-13.

64. Kushida K, Takahashi M, Kawana K, Inoue T. Comparison of markers for bone formation and resorption in premenopausal and postmenopausal subjects, and osteoporosis patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2447-50.
65. Pedersen BJ, Schlemmer A, Hassager C, Christiansen C. Changes in the carboxyl-terminal propeptide of type I procollagen and other markers of bone formation upon five days of bed rest. *Bone* 1995;17:91-5.
66. Gertz BJ, Shao P, Hanson DA, Quan H, Harris ST, Genant HK, et al. Monitoring bone resorption in early postmenopausal women by an immunoassay for cross-linked collagen peptides in urine. *J Bone Miner Res* 1994;9:135-42.
67. Schlemmer A, Hassager C, Pedersen BJ, Christiansen C. Posture, age, menopause, and osteopenia do not influence the circadian variation in the urinary excretion of pyridinium crosslinks. *J Bone Miner Res* 1994;9:1883-8.
68. Aoshima H, Kushida K, Takahashi M, Ohishi T, Hoshino H, Suzuki M, et al. Circadian variation of urinary type I collagen crosslinked C-telopeptide and free and peptide-bound forms of pyridinium crosslinks. *Bone* 1998;22:73-8.
69. Woitge HW, Scheidt-Nave C, Kissling C, Leidig-Bruckner G, Meyer K, Grauer A, et al. Seasonal variation of biochemical indexes of bone turnover: results of a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:68-75.
70. Douglas AS, Miller MH, Reid DM, Hutchison JD, Porter RW, Robins SP. Seasonal differences in biochemical parameters of bone remodelling. *J Clin Pathol* 1996;49:284-9.
71. Mora S, Prinster C, Proverbio MC, Bellini A, De Poli SC, Weber G, et al. Urinary markers of bone turnover in healthy children and adolescents: age-related changes and effect of puberty. *Calcif Tissue Int* 1998;63:369-74.
72. Beardsworth IJ, Eyre DR, Dickson IR. Changes with age in the urinary excretion of lysyl- and hydroxylslypyridinoline, two new markers of bone collagen turnover. *J Bone Miner Res* 1990;5:671-6.
73. Mora S, Pitukcheewanont P, Kaufman FR, Nelson JC, Gilsanz V. Biochemical markers of bone turnover and the volume and the density of bone in children at different stages of sexual development. *J Bone Miner Res* 1999;14:1664-71.
74. Hoshino H, Takahashi M, Kushida K, Ohishi T, Inoue T. Urinary excretion of type I collagen degradation products in healthy women and osteoporotic patients with vertebral and hip fractures. *Calcif Tissue Int* 1998;62:36-9.
75. Orwoll ES, Bell NH, Nanes MB, Flessland KA, Pettinger MB, Mallinak NJ, et al. Collagen N-telopeptide excretion in men: the effects of age and intrasubject variability. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3930-5.
76. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996;11:337-49.
77. Gallagher JC, Kinyamu HK, Fowler SE, Dawson-Hughes B, Dalsky GP, Sherman SS. Calcitropic hormones and bone markers in the elderly. *J Bone Miner Res* 1998;13:475-82.
78. Fatayerji D, Eastell R. Age-related changes in bone turnover in men. *J Bone Miner Res* 1999;14:1203-10.
79. Szulc P, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover in men. *Calcif Tissue Int* 2001;69:229-34.
80. Midtby M, Magnu JH, Joakimsen RM. The Tromsø Study: a population-based study on the variation in bone formation markers with age, gender, anthropometry and season in both men and women. *Osteoporos Int* 2001;12:835-43.
81. Smith SM, Nillen JL, Leblanc A, Lipton A, Demers LM, Lane HW, et al. Collagen cross-link excretion during space flight and bed rest. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3584-91.
82. Zerwekh JE, Ruml LA, Gottschalk F, Pak CY. The effects of twelve weeks of bed rest on bone histology, biochemical markers of bone turnover, and calcium homeostasis in eleven normal subjects. *J Bone Miner Res* 1998;13:1594-601.
83. Eliakim A, Raisz LG, Brasel JA, Cooper DM. Evidence for increased bone formation following a brief endurance-type training intervention in adolescent males. *J Bone Miner Res* 1997;12:1708-13.
84. Crespo R, Revilla M, Villa LF, Usabiaga J, Leibar X, Rico H. Transient dissociation of bone metabolism induced by high performance exercise: a study in elite marathon runners. *Calcif Tissue Int* 1999;64:287-90.
85. Ebeling PR, Atley LM, Guthrie JR, Burger HG, Dennerstein L, Hopper JL, et al. Bone turnover markers and bone density across the menopausal transition. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3366-71.
86. Hoshino H, Kushida K, Takahashi M, Yamazaki K, Denda M, Atsumi K, et al. Changes in levels of biochemical markers and ultrasound indices of Os calcis across the menopausal transition. *Osteoporos Int* 2000;11:128-33.
87. Okano H, Mizunuma H, Soda M, Kagami I, Miyamoto S, Oh-sawa M, et al. The long-term effect of menopause on postmenopausal bone loss in Japanese women: results from a prospective study. *J Bone Miner Res* 1998;13:303-9.
88. Taga M, Shirashu K, Minaguchi H. Changes in urinary excretion of type-I collagen cross-linked C-telopeptide and N-telopeptide in perimenopausal women. *Horm Res* 1998;49:86-90.
89. Knapen MH, Nieuwenhuijzen Kruseman AC, Wouters RS, Vermeer C. Correlation of serum osteocalcin fractions with bone mineral density in women during the first 10 years after menopause. *Calcif Tissue Int* 1998;63:375-9.
90. De Leo V, Ditto A, La Marca A, Lanzetta D, Massafra C, Morgante G. Bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in peri- and postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2000;66:263-7.
91. Gorai I, Taguchi Y, Chaki O, Nakayama M, Minaguchi H. Specific changes of urinary excretion of cross-linked N-telo-

- peptides of type I collagen in pre- and postmenopausal women: correlation with other markers of bone turnover. *Calcif Tissue Int* 1997;60:317-22.
92. Bonde M, Qvist P, Fledelius C, Riis BJ, Christiansen C. Applications of an enzyme immunoassay for a new marker of bone resorption (CrossLaps): follow-up on hormone replacement therapy and osteoporosis risk assessment. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:864-8.
93. Fink E, Cormier C, Steinmetz P, Kindermans C, Le Bouc Y, Souberbielle JC. Differences in the capacity of several biochemical bone markers to assess high bone turnover in early menopause and response to alendronate therapy. *Osteoporos Int* 2000;11:295-03.
94. Nielsen HK, Brixen K, Bouillon R, Mosekilde L. Changes in biochemical markers of osteoblastic activity during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1431-7.
95. Gorai I, Chaki O, Nakayama M, Minaguchi H. Urinary biochemical markers for bone resorption during the menstrual cycle. *Calcif Tissue Int* 1995;57:100-4.
96. Naylor KE, Iqbal P, Fledelius C, Fraser RB, Eastell R. The effect of pregnancy on bone density and bone turnover. *J Bone Miner Res* 2000;15:129-37.
97. Yasumizu T, Nakamura Y, Hoshi K, Iijima S, Asaka A. Bone metabolism after human parturition and the effect of lactation: longitudinal analysis of serum bone-related proteins and bone mineral content of the lumbar spine. *Endocr J* 1998;45:679-86.
98. Engler H, Oettli RE, Riesen WF. Biochemical markers of bone turnover in patients with thyroid dysfunctions and in euthyroid controls: a cross-sectional study. *Clin Chim Acta* 1999;289:159-72.
99. Guañabens N, Pares A, Álvarez L, Martínez de Osaba MJ, Monegal A, Peris P, et al. Collagen-related markers of bone turnover reflect the severity of liver fibrosis in patients with primary biliary cirrhosis. *J Bone Miner Res* 1998;13:731-8.
100. Astbury C, Bird HA, McLaren AM, Robins SP. Urinary excretion of pyridinium crosslinks of collagen correlated with joint damage in arthritis. *Br J Rheumatol* 1994;33:11-5.
101. Oikarinen A, Autio P, Vuori J, Vaananen K, Risteli L, Kivistä U, et al. Systemic glucocorticoid treatment decreases serum concentrations of carboxyterminal propeptide of type I procollagen and aminoterminal propeptide of type III procollagen. *Br J Dermatol* 1992;126:172-8.
102. Ohishi T, Kushida K, Takahashi M, Kawana K, Inoue T, Yagi K. Analysis of urinary pyridinoline and deoxypyridinoline in patients undergoing long-term anticonvulsant drug therapy. *Eur Neurol* 1996;36:300-2.
103. Perry HM III, Jensen J, Kaiser FE, Horowitz M, Perry HM, Jr., Morley JE. The effects of thiazide diuretics on calcium metabolism in the aged. *J Am Geriatr Soc* 1993;41:818-22.
104. Cantini F, Niccoli L, Bellandi F, Di Munno O. Effects of short-term, high dose, heparin therapy on biochemical markers of bone metabolism. *Clin Rheumatol* 1995;14:663-6.
105. Menon RK, Gill DS, Thomas M, Kernoff PB, Dandona P. Impaired carboxylation of osteocalcin in warfarin-treated patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:59-61.