

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



Osteocalcina: evaluación de diferentes ensayos utilizados para su medida. Aplicación al estudio de las formas inmunorreactivas presentes en el medio de cultivo

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Eva María Díaz Diego

Directora

Concepción de la Piedra Gordo

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

**OSTEOCALCINA:
EVALUACION DE DIFERENTES ENSAYOS
UTILIZADOS PARA SU MEDIDA.
APLICACION AL ESTUDIO DE LAS
FORMAS INMUNORREACTIVAS PRESENTES
EN EL MEDIO DE CULTIVO DE OSTEOLASTOS
HUMANOS Y CIRCULANTES EN SUERO.**

TESIS DOCTORAL

EVA MARIA DIAZ DIEGO

DIRECTORA

CONCEPCION DE LA PIEDRA GORDO

JUNIO 1996

A todos los que me han apoyado incondicionalmente

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado en su mayor parte en el Laboratorio de la Unidad Metabólica de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Concepción de la Piedra Gordo, a quien quiero expresar mi más sincero agradecimiento por el esfuerzo y tiempo dedicado para la realización de esta Tesis Doctoral.

Agradezco también al Dr. Aurelio Rapado Errazti, por haberme permitido formar parte del grupo de investigación, y por su colaboración en este trabajo aportando su gran experiencia clínica.

Quiero agradecerle al Dr. Fernando Escrivá Pons haber aceptado amablemente ser mi Tutor y el interés demostrado.

Al grupo de la Unidad Metabólica del IMIM de Barcelona, y especialmente a la Dra. Montserrat Nácher, por su generosidad al aceptarme como uno más en su laboratorio.

A la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz, por concederme una Beca que me ha permitido desarrollar esta Tesis.

Un agradecimiento muy especial a todos mis compañeros del Laboratorio, por la ayuda recibida y los buenos ratos compartidos.

Estos trabajos han sido financiados en su mayor parte por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FIS 93/0009-01, Beca de Ampliación de Estudios BAE 95/5055), y por CIS bio international (Francia).

ABREVIATURAS

AcN: Acetonitrilo

BGP: Osteocalcina ("Bone Gla Protein")

C-terminal: Carboxi-terminal

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco.

EIA: Enzimoimmunoensayo

Gla: Acido γ -carboxiglutámico

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión

IGF-I/II: Factor de crecimiento similar a la insulina tipos I y II

IRMA: Ensayo inmunorradiométrico

N-terminal: Amino-terminal

PTH: Hormona paratiroidea

RIA: Radioimmunoensayo

TFA: Acido trifluoroacético

TGF- β : Factor transformante del crecimiento tipo β

Ve: Volumen de elución

Vo: Volumen de exclusión

Vt: Volumen total

1,25(OH) $_2$ D: 1,25 dihidroxivitamina D

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1 Remodelado óseo.	2
1.2 Algunas patologías óseas caracterizadas por una alteración del remodelado óseo.	5
1.2.1 Osteodistrofia renal.	5
1.2.2 Enfermedad ósea de Paget.	6
1.2.3 Osteoporosis postmenopáusica.	7
1.3 El osteoblasto.	8
1.3.1 Características histológicas y metabólicas.	8
1.3.2 Procesos por los que el osteoblasto forma hueso.	10
1.3.3 Proteínas de la matriz ósea sintetizadas por el osteoblasto.	10
1.3.3.1 Colágeno.	10
1.3.3.2 Proteínas no colágenas.	11
1.4 Osteocalcina.	13
1.4.1 Estructura de la osteocalcina.	14
1.4.2 Interacción de la osteocalcina con el calcio iónico y la fase mineral de fosfato cálcico.	17
1.4.3 Síntesis de la osteocalcina.	18
1.4.4 Regulación de la síntesis de la osteocalcina.	22
1.4.5 Metabolismo de la osteocalcina.	24
1.4.6 Papel fisiológico de la osteocalcina.	25
1.4.7 Utilidad clínica de la osteocalcina: Estado actual.	27
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIALES Y METODOS	39
3.1 Estudio comparativo de seis ensayos para la determinación de osteocalcina.	40
3.1.1 Ensayos para la determinación de osteocalcina.	40
3.1.2 Pacientes y controles.	43
3.1.3 Variables analíticas estudiadas en cada uno de los ensayos.	44

	3.1.3.1	Sensibilidad (Límite de detección).	44
	3.1.3.2	Linealidad de las diluciones.	44
	3.1.3.3	Recuperación analítica y estandarización.	44
	3.1.3.4	Precisión y reproducibilidad.	45
	3.1.3.5	Estabilidad de la muestra.	45
	3.1.3.6	Especificidad de los anticuerpos utilizados para la cuantificación de osteocalcina.	46
	3.1.3.7	Correlación de los niveles de osteocalcina sérica entre los distintos ensayos.	47
	3.1.4	Reactividad cruzada de los anticuerpos anti-osteocalcina utilizados en los ensayos ELSA-OST-NAT, ELSA-OSTEO y OSCAtest con respecto a diversos fragmentos de osteocalcina.	48
3.2		Estudio de las diferentes formas inmunorreactivas de osteocalcina presentes en el medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos y en el suero de sujetos controles y de pacientes con diversas patologías óseas.	49
	3.2.1	Protocolo experimental.	49
	3.2.2	Cultivo de osteoblastos humanos.	49
	3.2.3	Pacientes y controles.	52
	3.2.4	Ensayos de medida de la osteocalcina.	53
	3.2.5	Purificación de la osteocalcina del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos y del suero humano por filtración en gel Sephadex G-50 medium.	54
	3.2.5.1	Preparación del gel Sephadex G-50 medium y relleno de la columna.	54
	3.2.5.2	Calibración de la columna de Sephadex G-50 medium.	55

3.2.5.3	Determinación de la masa molecular aparente de osteocalcina intacta humana y del fragmento 38-49 de osteocalcina humana.	56
3.2.5.4	Purificación de la osteocalcina del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos a través de Sephadex G-50 medium.	57
3.2.5.5	Purificación de la osteocalcina del suero de sujetos controles y de pacientes con diversas patologías óseas a través de Sephadex G-50 medium.	58
3.2.6	Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina procedente de Sephadex G-50 medium.	59
3.2.6.1	Condiciones de la purificación por cromatografía líquida de alta presión.	59
3.2.6.2	Purificación por cromatografía líquida de alta presión de osteocalcina intacta procedente de hueso humano.	60
3.2.6.3	Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos y del suero de sujetos controles y pacientes con diversas patologías óseas, tras filtración a través de Sephadex G-50 medium.	61
4.	RESULTADOS	62
4.1	Estudio comparativo de seis ensayos para la determinación de osteocalcina.	63

4.1.1	Variables analíticas estudiadas en cada uno de los ensayos.	63
4.1.1.1	Sensibilidad (Límite de detección).	63
4.1.1.2	Linealidad de las diluciones.	64
4.1.1.3	Recuperación analítica y estandarización.	64
4.1.1.4	Precisión y reproducibilidad.	68
4.1.1.5	Estabilidad de la muestra.	68
4.1.1.6	Especificidad de los anticuerpos utilizados para la cuantificación de la osteocalcina.	71
4.1.1.7	Correlación de los niveles de osteocalcina sérica entre los distintos ensayos.	73
4.1.2	Reactividad cruzada de los anticuerpos anti-osteocalcina utilizados en los ensayos ELSA-OST-NAT, ELSA-OSTEO y OSCAtest con respecto a diversos fragmentos de osteocalcina.	77
4.2	Estudio de las diferentes formas inmunorreactivas de osteocalcina presentes en el medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos y en el suero de sujetos controles y de pacientes con diversas patologías óseas.	80
4.2.1	Purificación de la osteocalcina del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos y del suero humano por filtración en gel Sephadex G-50 medium.	80
4.2.1.1	Calibración de la columna de Sephadex G-50 medium.	80
4.2.1.2	Determinación de la masa molecular aparente de osteocalcina intacta humana y del fragmento 38-49 de osteocalcina humana.	82

4.2.1.3	Purificación de la osteocalcina del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos a través de Sephadex G-50 medium.	82
4.2.1.4	Purificación de la osteocalcina del suero de sujetos controles y de pacientes con diversas patologías óseas a través de Sephadex G-50 medium.	84
4.2.2	Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina procedente de Sephadex G-50 medium.	86
4.2.2.1	Purificación por cromatografía líquida de alta presión de osteocalcina intacta procedente de hueso humano.	86
4.2.2.2	Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos, tras filtración a través de Sephadex G-50 medium.	88
4.2.2.3	Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina del suero de sujetos controles, tras filtración a través de Sephadex G-50 medium.	91
4.2.2.4	Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina del suero de pacientes con insuficiencia renal crónica, tras filtración a través de Sephadex G-50 medium.	94

4.2.2.5	Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina del suero de pacientes con enfermedad ósea de Paget, tras filtración a través de Sephadex G-50 medium.	97
4.2.2.6	Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina del suero de pacientes con osteoporosis postmenopáusica, tras filtración a través de Sephadex G-50 medium.	100
5.	DISCUSION	103
5.1	Estudio comparativo de seis ensayos para la determinación de osteocalcina.	104
5.2	Estudio de las diferentes formas inmunorreactivas de osteocalcina presentes en el medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos y en el suero de sujetos controles y de pacientes con diversas patologías óseas.	115
6.	CONCLUSIONES	129
7.	BIBLIOGRAFIA	134

1. INTRODUCCION

1.1 Remodelado óseo.

El hueso es un tejido conectivo especializado que constituye, junto con el cartílago, el sistema esquelético. Estos tejidos tienen tres funciones: 1) mecánica, de apoyo y sitio de acoplamiento del músculo para el movimiento; 2) protectora, para los órganos vitales y la médula ósea; y 3) metabólica, como reserva de iones para el organismo, especialmente calcio y fosfato.

En el hueso, como en todos los tejidos conectivos, los constituyentes fundamentales son las células y la matriz extracelular. Esta última es particularmente abundante en este tejido, y está compuesta por un componente orgánico (35%) y otro inorgánico (65%). El componente orgánico incluye colágeno tipo I (90%), osteocalcina (BGP) (1-2%), osteonectina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos y lípidos, entre otros. El componente inorgánico está constituido fundamentalmente por calcio y fosfato en forma de cristales de hidroxapatito (1).

Las células óseas llevan a cabo los procesos activos de formación (osteoblastos) y resorción (osteoclastos), que se producen continuamente a lo largo de toda la vida. Estos procesos son más rápidos durante el crecimiento del esqueleto, y a esta etapa se la denomina modelado óseo. Esta etapa es responsable del tamaño y forma del hueso. El remodelado óseo, que continúa a lo largo de la vida adulta, es necesario para el mantenimiento de la estructura normal del hueso y requiere que ambos procesos estén acoplados, es decir, la resorción es seguida por igual cantidad de formación (2). La secuencia de eventos en el sitio de remodelado incluye las siguientes fases: *fase de activación*, que ocurre entre la aplicación del estímulo del remodelado y el comienzo de la resorción osteoclástica; *fase resortiva*, que incluye el tiempo en

que los osteoclastos están activamente resorbiendo la superficie del hueso; *fase reversa*, que se caracteriza por la ausencia de osteoclastos y de osteoblastos; *fase formativa*, en la que los osteoblastos ocupan la superficie resorbida y sintetizan matriz hasta que un nuevo paquete de hueso (osteón) es formado y mineralizado (figura 1).

En diversas situaciones patológicas, el remodelado óseo se altera, bien de modo global o por desequilibrio entre los dos procesos (formación y resorción). Estas alteraciones repercuten de forma importante sobre las características estructurales del hueso, y dan lugar a diversas patologías óseas, como son la osteoporosis, la osteopetrosis, etc. Por todo ello, resulta de gran interés poder detectar las alteraciones del remodelado óseo del modo más exacto y precoz posible. Con esta finalidad son utilizados los marcadores bioquímicos del remodelado óseo, que son productos específicos sintetizados por las células formadoras o por las resorbedoras, o componentes de la fase mineral y de la matriz ósea vertidos a la circulación durante la resorción del hueso (3).

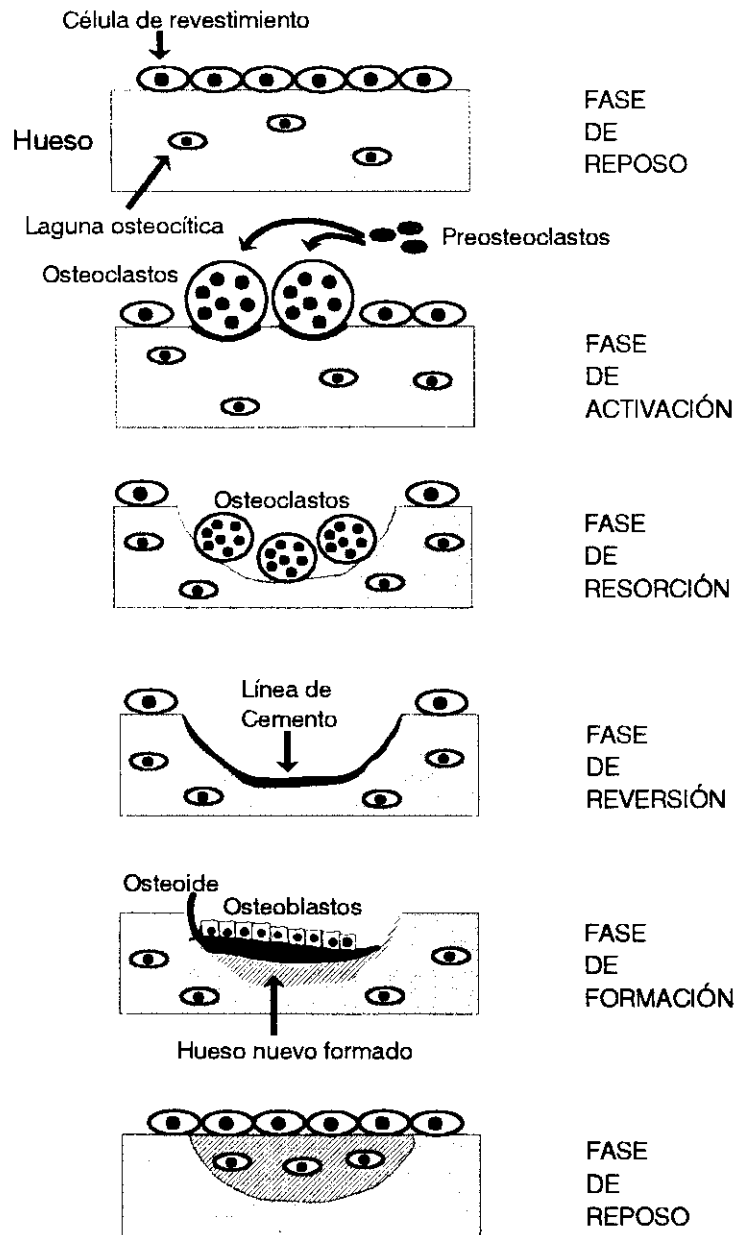


Figura 1: Etapas del remodelado óseo.

1.2 Algunas patologías óseas caracterizadas por una alteración del remodelado óseo.

1.2.1 Osteodistrofia renal.

La osteodistrofia renal, término utilizado para describir las complicaciones óseas de la enfermedad renal en estado final, es un desorden multifactorial del remodelado óseo. Prácticamente el 100% de los pacientes con insuficiencia renal crónica la han desarrollado desde antes del comienzo de la diálisis (4).

Teniendo en cuenta las características histológicas de la osteodistrofia renal se puede clasificar en: 1) Osteoitis fibrosa; 2) Osteomalacia; y 3) Enfermedad ósea adinámica.

1) *Osteitis fibrosa.*

Es la forma clásica de osteodistrofia renal y está causada por un hiperparatiroidismo secundario con contribuciones de citocinas producidas localmente y una deficiencia de 1,25 dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂D).

Se caracteriza por fibrosis medular y por una frecuencia aumentada del remodelado óseo, dando lugar a un aumento de la resorción y de la formación ósea. El aumento de la resorción está causado por un aumento tanto del número como de la actividad de los osteoclastos.

2) *Osteomalacia.*

La causa más común de la osteomalacia es la intoxicación con Al y otros metales pesados asociados con el tratamiento de la enfermedad renal en estado final. Esta intoxicación provoca mineralización defectuosa, y aumento de la matriz sintetizada por los osteoblastos existentes. A largo plazo se produce inhibición de la diferenciación de los osteoblastos e inhibición de la función de los osteoclastos, dando

lugar a una baja tasa de remodelado óseo. El resultado es un esqueleto frágil y los pacientes a menudo tienen deformidades esqueléticas, dolor óseo y fracturas.

3) *Enfermedad ósea adinámica.*

Esta enfermedad es más común en pacientes con enfermedad renal en estado final que no tienen hiperparatiroidismo secundario, que han sido tratados en exceso con Ca y $1,25(OH)_2D$ o que tienen diabetes mellitus o intoxicación con Al.

Al igual que la osteomalacia, se caracteriza por un bajo remodelado óseo, pero en este caso la cantidad de osteoide es normal o reducido. La presencia de enfermedad ósea adinámica en pacientes con enfermedad renal en estado final, que tienen función paratiroidea normal, sugiere que la producción de uno o más supresores de la formación ósea está aumentada o que otros promotores de la formación ósea no son producidos. La enfermedad ósea adinámica está asociada con un aumento del grado de fractura (5).

Además del efecto producido por un aumento o un descenso del remodelado óseo sobre los niveles séricos de los marcadores bioquímicos del mismo, es importante destacar en este punto que, debido a la insuficiencia de la función renal, en el suero de estos pacientes se produce una acumulación anormal de todos aquellos marcadores cuya principal vía catabólica sea la renal, como es el caso de la BGP.

1.2.2 Enfermedad ósea de Paget.

La enfermedad ósea de Paget es un desorden localizado del remodelado óseo. El proceso comienza con un aumento de la resorción ósea mediado por los osteoclastos, y continua con un aumento compensatorio en

la nueva formación ósea. El resultado final es un mosaico desorganizado de hueso en los sitios del esqueleto afectados. Este cambio estructural produce hueso que es expandido en tamaño, menos compacto, más vascular y más susceptible a deformidad o fractura que el hueso normal.

La etiología de esta enfermedad permanece desconocida. Sin embargo, existen datos que apoyan un componente genético significativo y además esta enfermedad parece estar asociada a determinadas zonas geográficas y razas. También ha sido propuesto que los cambios en el remodelado óseo ocurren como resultado de una infección viral del osteoclasto en el hueso pagético. Estos virus, que parecen ser de la familia de los paramixovirus, promueven la fusión de las células infectadas y la formación de células gigantes multinucleadas. La teoría más apoyada actualmente es que los osteoclastos grandes y funcionalmente hiperactivos, característicos del hueso pagético, son el producto de un aumento, mediado por el virus, de la fusión celular entre los osteoclastos y las células progenitoras de los osteoclastos que migran a los sitios afectados (6,7).

Desde el punto de vista del remodelado óseo, los pacientes afectados de enfermedad ósea de Paget presentan una tasa muy aumentada de formación y de resorción ósea.

1.2.3 Osteoporosis postmenopáusica.

La osteoporosis es una enfermedad caracterizada por una disminución de la masa ósea, con deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, que conduce a un aumento de la fragilidad ósea con el consiguiente incremento del riesgo de fracturas (8).

Entre sus formas clínicas la más frecuente e importante es

la osteoporosis postmenopáusica, un trastorno derivado del aumento de la velocidad con que se produce la pérdida ósea. Tiene su inicio durante el periodo perimenopáusico y continúa los 5 ó 10 años siguientes (9). La causa de este fenómeno es la carencia estrogénica, lo que ha quedado bien demostrado porque el síndrome osteoporótico es mucho más frecuente en el sexo femenino y por la posibilidad de reproducir experimentalmente la enfermedad induciendo la menopausia, así como el efecto protector de la terapéutica estrogénica sustitutiva (10).

La patogénia de la osteoporosis postmenopáusica se puede describir, en último término como el resultado de una anomalía del proceso conocido como remodelado óseo. La osteoporosis puede considerarse, por tanto, como una incapacidad de los osteoblastos para sintetizar una cantidad de hueso igual a la que es resorbida por los osteoclastos. La osteoporosis postmenopáusica es, en general, una osteoporosis de alto remodelado óseo, o sea un trastorno en el que numerosas unidades de remodelado trabajan simultáneamente y en cada una de ellas hay un aumento absoluto de la fase de resorción no compensado enteramente por un aumento de la formación. Al sumarse el déficit de cada una de las unidades conduce a un aumento de la velocidad de pérdida ósea.

1.3 El osteoblasto.

1.3.1 Características histológicas y metabólicas.

El osteoblasto es la célula de recubrimiento del hueso responsable de la producción de los constituyentes de la matriz (colágeno y otras sustancias). Se origina a partir de una célula progenitora mesenquimal local (célula progenitora estromal de médula ósea o célula progenitora mesenquimal de tejido conectivo). Estos precursores

proliferan y se diferencian a preosteoblastos y a continuación a osteoblastos maduros. Los osteoblastos nunca aparecen o funcionan individualmente, sino que siempre se encuentran en grupos de células cuboidales a lo largo de la superficie del hueso (\approx 100-400 células por sitio donde se está formando hueso).

A nivel microscópico, el osteoblasto se caracteriza por un núcleo redondo en la base de la célula (opuesto a la base del hueso), un citoplasma fuertemente basófilo y un prominente complejo de Golgi, localizado entre el núcleo y el extremo de la célula. Los osteoblastos siempre se encuentran recubriendo la capa de matriz ósea que están produciendo y que aún no está calcificada (tejido osteoide). La presencia del osteoide es debida a un retraso entre la formación de la matriz y su posterior calcificación (el periodo de maduración del osteoide abarca unos 10 días).

A nivel estructural, el osteoblasto se caracteriza por: 1) la presencia de un retículo endoplásmico bien desarrollado con cisternas dilatadas y un contenido granular denso, y 2) la presencia de un gran complejo de Golgi. La membrana plasmática del osteoblasto es rica en fosfatasa alcalina, y se ha descrito que tiene receptores para la hormona paratiroidea (PTH) pero no para calcitonina; además, los osteoblastos expresan receptores nucleares para estrógenos y $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Cuando los osteoblastos terminan su periodo de secreción pasan a ser células de recubrimiento o a osteocitos (11).

Los osteoblastos poseen una regulación autocrina. Pueden sintetizar y depositar factores de crecimiento en la matriz ósea que cuando son liberados durante el proceso de resorción ósea estimulan la actividad osteoblástica. Algunos de estos factores producidos por el

hueso o aislados de la matriz ósea son el factor transformante del crecimiento tipo B (TGF- β) (12), el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) y II (IGF-II) (13), etc. Los osteoblastos actúan también mediando las señales sistémicas (PTH y $1,25(OH)_2D$) para el reclutamiento y actividad de los osteoclastos (14).

1.3.2 Procesos por los que el osteoblasto forma hueso.

La formación del hueso implica varios pasos: 1) síntesis y procesamiento intracelular del colágeno tipo I; 2) secreción y procesamiento extracelular del colágeno; 3) formación de microfibrillas, fibrillas y por último, fibras de colágeno; y 4) maduración de la matriz del colágeno y posterior nucleación y crecimiento de los cristales de hidroxiapatito (15).

Todas estas funciones están bajo el control de los osteoblastos, dando como producto final un 35% de matriz orgánica y un 65% de material inorgánico cristalino.

1.3.3 Proteínas de la matriz ósea sintetizadas por el osteoblasto.

1.3.3.1 Colágeno.

Las fibras de colágeno tipo I constituyen del 85 al 90% de las proteínas totales óseas. Esta es la forma más abundante de colágeno encontrada en el cuerpo y está distribuida ampliamente en el tejido conectivo. Las fibras de colágeno son muy insolubles debido a sus puentes covalentes intra e intermoleculares, tipo del que difieren del colágeno de tejidos conectivos blandos (16).

La estructura básica de la malla de fibras de la matriz ósea

es la molécula de colágeno tipo I, que es una triple hélice, superenrollada, que contiene dos cadenas α_1 idénticas y una α_2 , estructuralmente similar pero genéticamente diferente.

1.3.3.2 Proteínas no colágenas

Las proteínas no colágenas constituyen entre el 10 y el 15% del contenido total de proteínas óseas. Aproximadamente una cuarta parte de estas proteínas tienen un origen exógeno y son adsorbidas o atrapadas en el espacio de la matriz ósea. Ejemplos de estas proteínas lo constituyen el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y la albúmina sérica (17).

En cuanto a las proteínas sintetizadas por el osteoblasto, aproximadamente la mitad de la actividad biosintética de esta célula está destinada a las proteínas no colágenas. Estas se pueden clasificar en cuatro grupos generales: 1) proteínas de adhesión a células; 2) proteoglicanos; 3) proteínas γ -carboxiladas; y 4) proteínas relativas al crecimiento.

1) *Proteínas de adhesión a células.*

La célula ósea sintetiza cuatro proteínas que afectan a la adhesión a células: fibronectina, trombospondina, osteopontina y sialoproteína ósea. De estas cuatro proteínas, únicamente la última es específica del esqueleto (18).

Tanto la osteopontina como la sialoproteína anclan el osteoclasto al espacio extracelular óseo y a través de su unión a receptores específicos de la matriz extracelular (integrinas) permiten que el osteoclasto forme el borde activo y resorba hueso (19).

2) *Proteoglicanos.*

Son macromoléculas que contienen cadenas de polisacáridos ácidos ancladas al núcleo central de una proteína. En el hueso se encuentran dos tipos: condroitín sulfato y heparina sulfato. Este último está asociado a la membrana y posiblemente facilita la interacción de los osteoblastos con las macromoléculas extracelulares y con factores de crecimiento de unión a la heparina. El condroitín sulfato en el hueso se ancla a tres núcleos de proteínas por separado. La forma de mayor peso molecular parece ser importante en el mantenimiento de la integridad del ambiente que rodea a la membrana celular. Las otras dos formas parecen estar implicadas en la integridad de la mayoría de las matrices de los tejidos conectivos (20).

3) *Proteínas γ -carboxiladas.*

La carboxilación dependiente de vitamina K se produce en tres proteínas óseas no colágenas: la BGP, la proteína Gla de la matriz, y la proteína S. La proteína Gla de la matriz se encuentra en cartílago y hueso (21) y su función fisiológica permanece desconocida. La proteína S, además de formar parte de la vía metabólica anticoagulante de la proteína C, se ha demostrado recientemente que forma parte de la matriz ósea y que es sintetizada por los osteoblastos (22). En cuanto a la BGP, objeto directo de este trabajo, posteriormente se expondrán con detalle sus características.

4) *Proteínas relacionadas con el crecimiento.*

Ciertas proteínas del hueso parecen estar asociadas con el ciclo celular y la función de los osteoblastos. Estas proteínas deben ser factores de crecimiento como el TGF- β 1-5 y el IGF-I e IGF-II, que pueden estimular el crecimiento celular del osteoblasto de una manera autocrina

o/y paracrina (23).

Otros productos de la célula ósea, asociados con el crecimiento y/o diferenciación del osteoblasto de una manera indirecta o todavía no definida, son la fosfatasa alcalina y la osteonectina. La fosfatasa alcalina es sintetizada en cantidades elevadas por el osteoblasto y es empleada como marcador de fenotipo osteoblástico (24). La función de la fosfatasa alcalina en la biología celular ósea ha sido materia de mucha especulación, y hasta el momento no está totalmente definida, aunque se conoce que desempeña un papel fundamental en el proceso de mineralización del hueso.

La osteonectina es una glicoproteína fosforilada no específica de tejido óseo, que constituye aproximadamente un 2% de las proteínas totales óseas. Tiene elevada afinidad en la unión a calcio iónico y a hidroxapatito, y sus funciones en el hueso deben ser múltiples, siendo asociada con el crecimiento y/o proliferación de osteoblastos, así como también con la mineralización de la matriz (25).

1.4 Osteocalcina.

Una de las proteínas del hueso más abundante y bien caracterizada es la BGP, ya que constituye aproximadamente hasta un 20% (dependiendo de las especies, edad, etc.) del componente proteico no colágeno en el hueso adulto. Se le denomina BGP (del inglés "Bone Gla Protein"), debido a que posee en su secuencia el ácido γ -carboxiglutámico (Gla).

Fue descubierta simultáneamente por dos grupos de investigadores hace 20 años. En 1975 el grupo de Hauschka y cols. la aislaron de hueso de pollo (26), y en 1976 Price y cols. caracterizaron

una proteína similar de hueso bovino (27). Posteriormente, en 1980 fue purificada y secuenciada de hueso humano (28) y de otras especies animales.

1.4.1 Estructura de la osteocalcina.

Esta proteína contiene entre 46 y 50 aminoácidos (Masa molecular = 5210 Da-5889 Da) dependiendo de las especies. La BGP procedente de hueso humano tiene 49 aminoácidos en una única cadena polipeptídica y una masa molecular de 5800 Da (28).

Comparando la secuencia aminoacídica de la BGP de distintas especies (figura 2) se observa gran homología, alrededor del 90% de la estructura primaria de la BGP humana, ovina y bovina, y 50% entre la BGP humana y la de pez espada, lo que indica que ha habido una gran conservación a lo largo de la evolución (29). Una característica común es la localización de tres residuos Gla en las posiciones 17, 21 y 24. Esto ocurre en la mayoría de las especies, pero en humanos recientemente se ha demostrado que existe una γ -carboxilación incompleta (30), siendo la posición 17 la que posee menor porcentaje de γ -carboxilación. Este trabajo ratifica el hallazgo encontrado en el momento de su aislamiento y secuenciación, y que era atribuido a que la muestra de hueso utilizada procedía de un individuo de 76 años. Otra característica es la existencia de un puente disulfuro entre los residuos de Cys de las posiciones 23 y 29. Es interesante destacar que la zona amino-terminal (N-terminal) de la BGP es la que muestra mayor variabilidad entre las distintas especies, en contraste con la gran homología de la zona central de la molécula, donde están situados los residuos Gla. La molécula de BGP humana a partir de su residuo 20 es completamente idéntica en la secuencia de su extremo

		1			5					10				15		
Humano		Tyr	Leu	Tyr	Gln	Trp	Leu	Gly	Ala	Pro	Val	Pro	Tyr	Pro	Asp	Pro
Tenera		---	---	Asp	His	---	---	---	---	Hyp	Ala	---	---	---	---	---
Oveja		---	---	Asp	Pro	Gly	---	---	---	Hyp	Ala	---	---	---	---	---
Pez espada						Ala	Thr	Arg	---	Gly	Asp	Leu	Thr	---	Leu	Gln
					20					25				30		
Humano		Leu	Gla	Pro	Arg	Arg	Gla	Val	Cys	Gla	Leu	Asn	Pro	Asp	Cys	Asp
Tenera		---	---	---	Lys	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Oveja		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Pez espada		---	---	Ser	Leu	---	---	---	---	---	---	---	Val	Ala	---	---
					35					40				45		
Humano		Glu	Leu	Ala	Asp	His	Ile	Gly	Phe	Gln	Glu	Ala	Tyr	Arg	Arg	Phe
Tenera		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Oveja		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Pez espada		---	Met	---	---	Thr	Ala	---	Ile	Val	Ala	---	---	Ile	Ala	Tyr
					49											
Humano		Tyr	Gly	Pro	Val											
Tenera		---	---	---	---											
Oveja		---	---	---	---											
Pez espada		---	---	---	Ile	Gln	Phe									

Figura 2: Secuencia de aminoácidos de la osteocalcina humana, bovina, ovina y de pez espada.

carboxi-terminal (C-terminal) a las moléculas de BGP bovina y ovina (28).

Debido a la homología de la secuencia entre las distintas especies, también hay características comunes en la estructura secundaria. Técnicas de dicroísmo circular y espectroscopia en el ultravioleta han verificado la existencia de una conformación en α -hélice en la BGP (31) y han mostrado que niveles milimolares de Ca^{2+} , u otros

cationes específicos, son necesarios para que la BGP adquiriera esta conformación aproximadamente en el 40% de la molécula. En la mayoría de las especies se han definido dos dominios: 1) "Hélice Gla", que contiene los residuos Gla y se extiende desde la posición 18 a la posición 25 para la BGP humana; y 2) "Hélice Asp-Glu", entre los residuos 30 y 41. En los extremos N-terminal (posición 1-8) y C-terminal (posición 42-47) de la BGP humana se sitúan dos láminas β , respectivamente.

La estructura terciaria de las proteínas globulares es producida en parte a través de giros β . La BGP humana presenta dos giros β , uno entre los residuos 12 y 15, y otro, con mayor probabilidad, entre los residuos 26 y 29, que es estabilizado por el puente disulfuro existente entre las residuos de Cys de las posiciones 23 y 29 (31).

La característica más notable de los dominios en α -hélice es la periodicidad de los aminoácidos, cargados e hidrofóbicos, a intervalos de tres o cuatro residuos (ej: Gla-17, Gla-21 y Gla-24). Esto junto con los 3.6 residuos por vuelta de la α -hélice, crea hélices anfipáticas con superficies aniónicas e hidrofóbicas distintas. La periodicidad de la α -hélice de 5.4 Å, es similar a la distancia interatómica de los iones de Ca^{2+} en el hidroxapatito del hueso (32). Esta característica estructural de la BGP es muy significativa, ya que debe determinar su interacción con iones metálicos, hidroxapatito y otras fases sólidas de fosfato cálcico (figura 3).

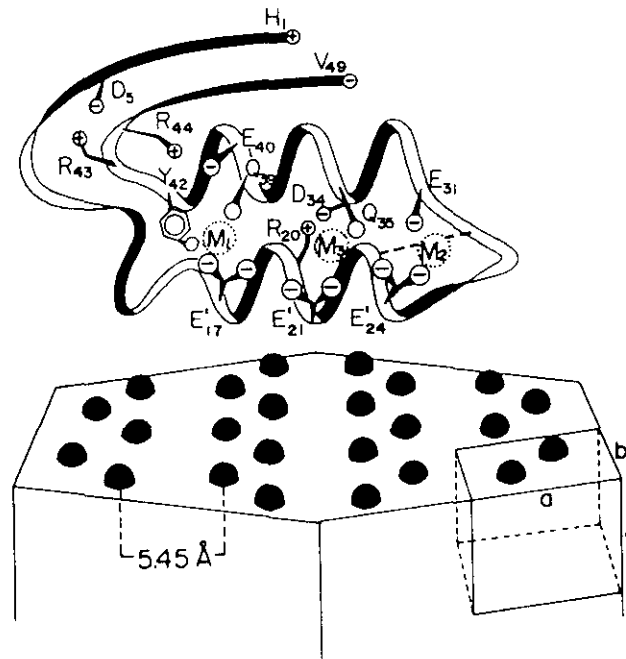


Figura 3: Estructura de la osteocalcina inducida por Ca^{2+} y su posible interacción con el Ca^{2+} del cristal de hidroxiapatito. La periodicidad de los tres residuos de ácido γ -carboxiglutámico (E') en la osteocalcina es similar a la distancia interatómica de los iones Ca^{2+} (5.45 Å) del hidroxiapatito del hueso.

1.4.2 Interacción de la osteocalcina con el calcio iónico y la fase mineral de fosfato cálcico.

Los residuos Gla de la BGP, son los determinantes de su afinidad al Ca^{2+} libre, a superficies del mineral que contienen Ca y a vesículas de fosfolípidos (33,34).

Aunque concentraciones milimolares de Ca^{2+} provocan que la BGP adopte la conformación α helicoidal, la molécula descarboxilada (< 0.5

residuos Gla/molécula), no es capaz de adoptar esta conformación en presencia de Ca^{2+} (31). La descarboxilación de la BGP también disminuye la afinidad de ésta por el hidroxiapatito (33,35). Cuando la BGP es adsorbida al hidroxiapatito, sus residuos Gla son protegidos de la descarboxilación térmica (33), lo que sugiere la interacción directa de los grupos carboxilo de Gla con la red de hidroxiapatito. En resumen, los residuos Gla deben tener una implicación intrínseca en la interacción de BGP con el Ca^{2+} , tanto en solución como en la fase mineral sólida (figura 3).

1.4.3 Síntesis de la osteocalcina.

La BGP se encuentra casi exclusivamente en la matriz ósea y es sintetizada por el osteoblasto, célula formadora de hueso (36,37) y por el odontoblasto (38), célula formadora de dentina. Además, se ha demostrado recientemente la presencia de ARN mensajero para BGP en megacariocitos y plaquetas de rata y de humano, no siendo detectables los niveles de BGP al ser medidos por un radioinmunoensayo (RIA) en el extracto de estas células (39). Aquí su papel fisiológico es desconocido. También se ha encontrado expresión basal baja de ARN mensajero para BGP, unas mil veces menos que en el tejido óseo, en diversos tejidos blandos (hígado, riñón, pulmón, cerebro, músculo) procedentes de rata, pudiendo estar implicada en las calcificaciones patológicas de estos tejidos. Además se ha encontrado mayor cantidad de ARN mensajero en aorta humana calcificada (40), hecho ya descrito anteriormente en el caso de calcificaciones ectópicas (41). A pesar de haber encontrado expresión de ARN mensajero para BGP en otros tejidos distintos al hueso, este órgano sigue siendo el principal productor de esta proteína, y por tanto puede

ser considerada específica de actividad osteoblástica.

La única copia del gen de la BGP en el genoma humano está localizada en el cromosoma 1 (42), el cual tiene el gen para fosfatasa alcalina, otro marcador bioquímico del metabolismo óseo. El gen de la BGP tiene 4 exones y 3 intrones (43) y codifica para una proteína de 11 KDa. Esta proteína, pre-pro-BGP incluye un péptido señal hidrofóbico de 23 residuos (exón 1), un propéptido de 26 residuos (exón 2) y la proteína madura de 49 aminoácidos (exones 3 y 4) (44). La región hidrofóbica dirige a la proteína para su procesamiento en el lumen del retículo endoplásmico y la región pro, que es homóloga a las regiones correspondientes en los factores de coagulación sanguínea dependientes de vitamina K, contiene los sitios de reconocimiento de la γ -carboxilación (45). Después de que la región hidrofóbica es eliminada por una peptidasa señal, la pro-BGP sufre la γ -carboxilación. Posteriormente el propéptido es eliminado y la proteína madura secretada al exterior de la célula. La mayor parte de esta proteína se une a la matriz ósea mineralizada y el resto pasa a la circulación, pudiendo ser detectada en el suero por RIA (figura 4) (46).

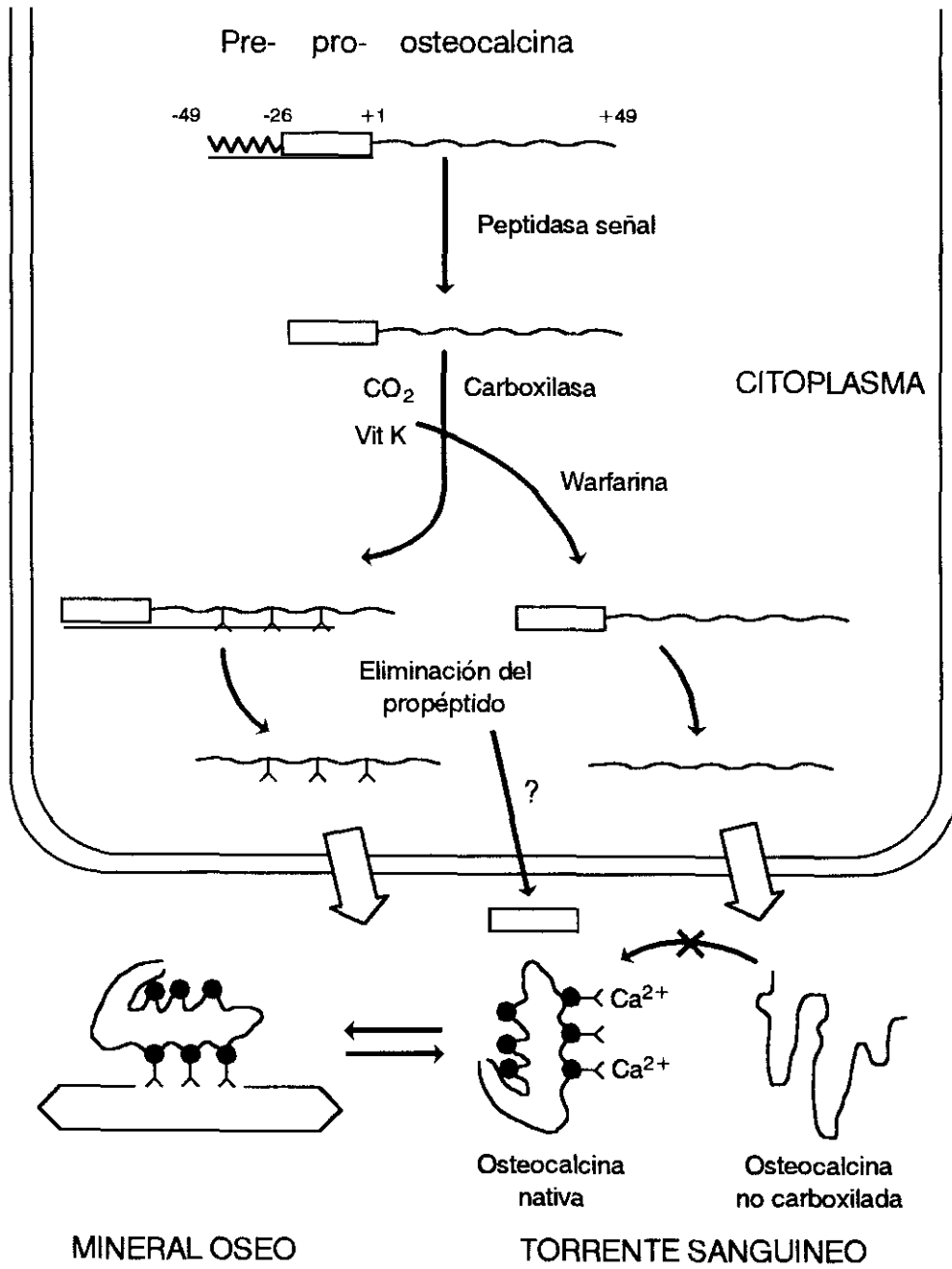


Figura 4: Biosíntesis de osteocalcina en el osteoblasto.

La formación de Gla, por γ -carboxilación de los residuos de Glu de la BGP, es un proceso postraducciona l llevado a cabo por una carboxilasa microsoma l que utiliza vitamina K como cofactor (47) (figura 5). Estos residuos Gla son responsables de la elevada afinidad de la BGP por el hidroxiapatito del hueso. Cuando la acción de la vitamina K es antagonizada por la administración de warfarina (anticoagula nte de tipo dicumarínico), la conversión de los restos Glu a Gla no puede ocurrir, por lo que no se produce el procesamiento del péptido maduro y su precursor se acumula intracelularmente (48,49), o la BGP sintetizada, al no poseer Gla, no se une al mineral y es liberada a la circulación (50,51). El resultado en ambos casos será unos huesos deficientes en BGP.

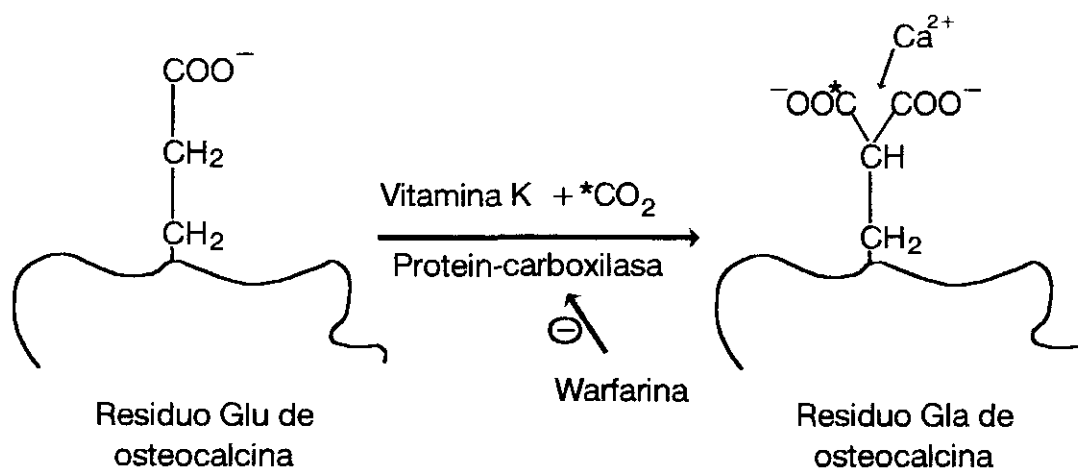


Figura 5: Gamma-carboxilación dependiente de vitamina K de la osteocalcina. La estructura del ácido γ -carboxiglutámico (Gla), resultante de la γ -carboxilación del ácido glutámico (Glu), es la de un ligando bidentado con gran capacidad de unión al Ca. Para la síntesis de Gla son requeridos vitamina K y CO_2 , siendo inhibida dicha síntesis por warfarina.

El destino que sigue el propéptido una vez desligado de la proteína madura es controvertido. Por una parte experiencias realizadas con cultivos de una línea celular humana de osteosarcoma, MG-63, y en suero humano de adultos controles e individuos con varias patologías, ponen de manifiesto que el propéptido no es secretado, ni in vivo ni in vitro (52). Por otra parte, Hosoda y cols. (53), al realizar experimentos con cultivos de células osteoblásticas humanas normales, demuestran que el propéptido, al igual que la BGP, es secretado al exterior de la célula. También encuentran niveles circulantes de este propéptido en adolescentes normales pero no en adultos sanos. La discrepancia en estos resultados parece ser debido a que la primera línea celular, MG-63, no mantiene tantas características de fenotipo osteoblástico como las células empleadas en el segundo estudio. El grupo de Kanzaki y cols. han desarrollado un enzoinmunoensayo (EIA) en fase sólida para la determinación del propéptido y ponen de manifiesto su utilidad como marcador de formación ósea del crecimiento óseo en adolescentes y en el seguimiento del tratamiento con hormona de crecimiento (54).

1.4.4 Regulación de la síntesis de la osteocalcina.

El principal factor que estimula la síntesis de BGP es la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, hecho demostrado tanto in vitro, en cultivo primario de células óseas humanas y células de fenotipo osteoblástico (55), como in vivo, al comprobarse importantes subidas de los niveles séricos de BGP en pacientes urémicos (56) y en pacientes con osteoporosis u osteoartritis (57) tras el tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

También se ha demostrado en experiencias realizadas en cultivos primarios de osteoblastos humanos que el ácido retinoico activa

la expresión del gen de la BGP (58).

En cultivos de células de calvaria de rata las hormonas tiroideas provocan un aumento tanto de los niveles de ARN mensajero de BGP como de su producción (59).

Experiencias realizadas en células de osteosarcoma humano muestran como el 17 β -estradiol regula la secreción de BGP inducida por la 1,25(OH)₂D provocando un aumento en ésta (60).

El factor de crecimiento de fibroblastos es otro modulador de la síntesis de BGP, activando la transcripción del gen de la BGP humana transfectado a células de osteosarcoma de rata (61).

Otros factores estimuladores de la síntesis de BGP son el IGF-I y el IGF-II, como lo demuestran experiencias tanto in vitro (62), como in vivo (63).

Por el contrario, en células de osteosarcoma humano y de rata el TGF- β 1 provoca una reducción de la síntesis estimulada por 1,25(OH)₂D de una manera dosis-dependiente, tanto a nivel de ARN mensajero de BGP como de su producción (64,65). En cultivos primarios de osteoblastos humanos también produce una reducción en la secreción estimulada por la 1,25(OH)₂D (66).

En una línea de osteosarcoma humano se ha observado cómo la PTH y la prostaglandina E₂ inhiben significativamente la secreción de BGP estimulada por la 1,25(OH)₂D (55).

Los glucocorticoides también disminuyen la síntesis de BGP tanto in vitro (67), como in vivo (68).

1.4.5 Metabolismo de la osteocalcina.

Aunque la BGP se une fuertemente al hidroxapatito del hueso, una fracción de la molécula recién sintetizada es liberada a la sangre, donde puede ser detectada por RIA (69). De la BGP total corporal, en circulación sólo se encuentra menos de un 0.01%, lo que indica el gran reservorio de BGP que constituye el esqueleto (70). Los niveles circulantes de BGP se elevan en enfermedades metabólicas óseas caracterizadas por aumento del remodelado óseo (71), y su medida es empleada como marcador de formación ósea. La vida media de la BGP en el suero es muy corta (15-70 min) (72) ya que es rápidamente metabolizada, principalmente por el riñón y en menor medida por el hígado y por el hueso (46,73,74). Las enzimas presentes en el riñón degradan rápidamente la BGP a componentes de peso molecular más pequeño que serán fácilmente eliminados en la orina. En el hígado la degradación es más lenta. En pacientes con insuficiencia renal crónica, los niveles elevados de BGP podrían indicar mayor producción de BGP, descenso en el aclaramiento renal o ambos (75,76).

Es interesante destacar que los posibles fragmentos circulantes de BGP, descritos en diversos trabajos (77,78,79), no sólo proceden del metabolismo extraóseo de la molécula, sino que también pueden proceder de la destrucción del hueso durante el proceso de remodelado óseo. Así lo describieron Gundberg y cols. (77) al estudiar las distintas formas inmunorreactivas de BGP en el suero de pacientes urémicos. Teniendo en cuenta la estructura primaria de la BGP (figura 2), existen dos puntos susceptibles de hidrólisis proteolítica (Arg 19-Arg 20 y Arg 43-Arg 44), por lo que los posibles péptidos resultantes de la rotura de BGP serían: 1-19, 20-43, 45-49, 1-43 y 20-49, no pudiendo

descartarse la presencia de otros (77,80).

1.4.6 Papel fisiológico de la osteocalcina.

La función precisa de la BGP como un componente de la matriz ósea ha sido motivo de gran especulación y aún en la actualidad no es del todo conocida.

Dos características estructurales van a determinar fundamentalmente sus funciones en la dinámica del hueso. Por una parte, su dominio denominado "hélice Gla", y por otra, un dominio con conformación en lámina B en el extremo C-terminal de la molécula. Por el dominio "hélice Gla" se adsorbe a la matriz ósea mineralizada con una orientación tal que el extremo C-terminal queda accesible para su interacción con células adyacentes. Además este extremo es muy lábil a la acción proteolítica, y es el primer epítipo hacia el cual se dirigen la mayoría de los anticuerpos policlonales, lo que da mayor evidencia de su situación in vivo (81).

Estudios realizados por Price y cols. (27) indican que la BGP inhibe in vitro el depósito de hidroxapatito de novo. De modo similar, extractos de hueso que contienen BGP inhiben in vitro tanto la transformación de brusita a hidroxapatito (82), como el crecimiento de hidroxapatito (83). Otro trabajo realizado por Romberg y cols. (84) pone de manifiesto que el Gla es el responsable de esta acción inhibitoria de la BGP ya que la molécula descarboxilada presenta menor poder de inhibición que la carboxilada. Es posible que esta inhibición de la cristalización por la BGP sea únicamente resultado de su capacidad de unión al hidroxapatito, más que su acción fisiológica fundamental. Además, al estudiar la localización de ésta y otras proteínas no

colágenas por inmunohistoquímica, durante la mineralización de novo (85), se observa que la BGP no está presente en áreas de formación del primer cristal, sino en la matriz completamente mineralizada, por lo que la BGP podría estar implicada en el control del tamaño y velocidad de formación de los cristales. Este papel de la BGP sobre el control de la mineralización está apoyado por otros experimentos realizados en ratas tratadas con warfarina, en las que se observa, en ausencia de la BGP, una fusión completa de la placa de crecimiento óseo con el cese asociado de todo crecimiento longitudinal, es decir, se produce un exceso de mineralización (86).

La resorción ósea es un componente esencial del crecimiento del hueso y su remodelado, que implica la activación de osteoclastos multinucleados adyacentes al punto de resorción, así como el reclutamiento de células precursoras mononucleares (monocitos o macrófagos), que se pueden fusionar en el ambiente adecuado para aumentar la población osteoclástica (87). A la BGP se le ha asignado un papel fisiológico en el proceso de resorción ósea. En un trabajo realizado por Mundy y cols. (88) se demuestra que, *in vitro*, la BGP tiene actividad quimiotáctica para diversas células que se encuentran adyacentes a las superficies óseas endosteales *in vivo* (monocitos). Además de la molécula intacta, también presenta actividad quimiotáctica el pentapéptido C-terminal procedente de la rotura de la BGP. Ya que la BGP es liberada del hueso durante situaciones caracterizadas por el incremento del remodelado óseo, es posible que este efecto quimiotáctico de la proteína sea un mecanismo para el reclutamiento de esas células a los lugares activos de remodelado óseo. En este sentido, Lian y cols. (89) han demostrado que cuando se implantan subcutáneamente a ratas normales partículas de hueso

de rata deficientes en BGP (procedentes de ratas tratadas con warfarina durante seis semanas), ese implante se resorbe un 40% menos que el de partículas óseas procedentes de ratas normales. Estos mismos autores, en trabajos posteriores, ponen de manifiesto que esta disminución de la resorción ósea es debida a que en ausencia de BGP se produce una alteración en el reclutamiento y diferenciación de los precursores de los osteoclastos, suponiendo que la BGP debe funcionar como una señal en la matriz para el reclutamiento y diferenciación de estas células resorbedoras de hueso (90,91).

Recientemente se han realizado experimentos en células osteoclásticas humanas, derivadas de células gigantes de tumores óseos, proporcionando más evidencias de que la BGP ejerce un papel en el proceso de resorción, induciendo una señal intracelular mediada por calcio, migración y adhesión, seguido por síntesis y secreción de proteínas endógenas tales como sialoproteína, osteopontina y fibronectina (92).

Todo lo expuesto anteriormente, junto con el hecho de que la síntesis de BGP es estimulada por la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (55), hormona que promueve la resorción ósea, implican a la BGP como un mediador fisiológico de la resorción ósea.

1.4.7 Utilidad clínica de la osteocalcina: Estado actual.

Un marcador bioquímico ideal de formación ósea sería un constituyente de la matriz del hueso sintetizado específicamente por los osteoblastos de una manera proporcional a la síntesis de colágeno, y con una fracción liberada a la circulación proporcional a la incorporada a la matriz. Ninguno de los marcadores de formación ósea disponibles reúnen todos estos criterios, pero la BGP es uno de los más satisfactorios. El

hecho de que la BGP sea sintetizada prácticamente en exclusiva por los osteoblastos, su característica estructural que le permite unirse al hidroxapatito, y su función posiblemente crucial para la resorción ósea, han hecho que la medida de la BGP circulante sea útil en la evaluación del remodelado óseo. Dado el interés de los investigadores clínicos en poseer nuevos y específicos marcadores óseos, han sido numerosos los estudios analizando la medida de la BGP sérica en diferentes enfermedades metabólicas óseas. Trabajos en los que se ha correlacionado la BGP sérica con la evaluación cinética e histomorfométrica de resorción y formación ósea, han mostrado que la BGP sérica es un índice específico de formación ósea siempre que la resorción y la formación no estén acopladas (93-96). Numerosos estudios han mostrado que la BGP sérica es un marcador sensible del metabolismo del hueso en varias enfermedades metabólicas óseas como osteoporosis (97), hiperparatiroidismo primario (98), hipertiroidismo (99) y osteodistrofia renal (100). Otras investigaciones clínicas realizadas en adolescentes han llevado a la conclusión de que la BGP circulante es un marcador de crecimiento esquelético en condiciones normales y anormales (101,102). También otros estudios han comprobado el valor de la medida de BGP para monitorizar los efectos del tratamiento de enfermedades metabólicas óseas (103,104).

Las primeras determinaciones de BGP se realizaron por RIA. La mayoría de los ensayos se establecieron con BGP bovina como trazador y estándar, y con antisueros policlonales de conejo anti-BGP bovina. A pesar de esas semejanzas metodológicas, se han publicado numerosas discrepancias en cuanto al rango de valores normales en adultos sanos y para los valores medios obtenidos en enfermedades óseas como osteoporosis, hiperparatiroidismo, enfermedad ósea de Paget e

hipercalcemia maligna (105). En pacientes con metástasis esqueléticas, las concentraciones de BGP séricas no están consistentemente elevadas (106), y en la enfermedad ósea de Paget a menudo no hay correlación entre la BGP sérica y la fosfatasa alcalina, otro marcador de formación ósea (107). También se han descrito resultados variables en pacientes con osteoporosis y en las variaciones de los niveles circulantes de BGP con la edad (108-111). Algunos investigadores han observado un ritmo circadiano para la BGP sérica, mientras que otros no (112-114). De manera similar, se han descrito datos poco coincidentes para la BGP a lo largo de la menopausia, del ciclo menstrual y durante el embarazo (115-116).

Aunque algunas de las discrepancias publicadas implican diferencias clínicas, otras representan diferencias técnicas entre los ensayos. Como ya se ha mencionado anteriormente, los primeros métodos empleados para la medida de la BGP circulante, estaban basados en el procedimiento de Price y Nishimoto, investigadores que desarrollaron el primer RIA para la BGP (69). Estos métodos empleaban BGP bovina como estándar e inmunógeno, preparaciones y antisueros que se realizaban en los laboratorios donde los ensayos eran llevados a cabo. Los determinantes antigénicos precisos de la molécula de BGP no han sido claramente identificados, pero la mayoría de esos antisueros reconocen la región C-terminal de la molécula, la cual es idéntica en la BGP humana y en la bovina (28) (figura 2). Cualquiera que sea el epítipo reconocido por esos antisueros, la mayoría de ellos no muestran una reactividad cruzada del 100% con la BGP humana (105). En 1988, Taylor y cols. (117) desarrollaron el primer RIA con un antisuero dirigido contra un epítipo de la zona media de la molécula de BGP humana, región que difiere entre la BGP humana y la bovina. Resultados preliminares sugirieron que este

ensayo era más sensible que los ensayos bovinos convencionales para valorar el remodelado óseo en enfermedades como la enfermedad ósea de Paget y el hiperparatiroidismo.

Con la finalidad de intentar clarificar las discrepancias interlaboratorio en los valores de BGP, en 1987 Delmas, Mann y Price diseñaron un estudio multicéntrico (105,118). El protocolo de investigación incluía 12 ensayos diferentes de BGP, sólo dos de ellos comerciales, y únicamente uno con BGP humana como inmunógeno y estándar. Estos ensayos se aplicaron a muestras de suero seleccionadas y se empleó como estándar, el propio de cada uno de los ensayos, y un estándar de BGP bovina proporcionado por el comité. Con la utilización de este estándar de referencia, se pretendía ver si las diferencias en las concentraciones de BGP en una muestra de suero dada, medida por distintos ensayos, podían ser artefactos, eran relativas al uso de diferentes estándares de calibración o podían reflejar diferencias entre los ensayos en cuanto al epítipo de reconocimiento por el antisuero. A este respecto, Delmas y cols. concluían de este estudio que las concentraciones absolutas de BGP no podían ser comparadas entre los laboratorios, incluso cuando la misma preparación de estándar era usada para la calibración. Otro aspecto muy importante de este protocolo era comprobar si los diferentes ensayos proporcionaban información similar con respecto a las distintas enfermedades metabólicas óseas. Como las diferencias interlaboratorios en los niveles de BGP sérica afectan también los estados de enfermedad, la BGP para cada muestra patológica analizada se expresó como porcentaje de aumento o descenso en relación a los valores controles de BGP determinados por el mismo ensayo. Los resultados indicaban claramente que para cada muestra de suero patológica la desviación de los valores

normales era similar con todos los ensayos, es decir, el perfil general de la BGP en términos de elevación o supresión era consistente de ensayo a ensayo. Con respecto al primer punto de este estudio, teniendo en cuenta que en 1986 Gundberg y cols. (77) describieron por primera vez que, además de la proteína intacta, en circulación existían diferentes fragmentos de BGP inmunorreactivos en pacientes con fallo renal crónico e hiperparatiroidismo secundario, era lógico pensar que esta variabilidad podía ser debida a la variabilidad en el epítipo de reconocimiento por los distintos antisueros. Además, en este mismo trabajo ponían de manifiesto que algunos de estos fragmentos procedían de la resorción del hueso y no sólo del metabolismo de la BGP en hígado y riñón, y su posterior acumulación en circulación debido a la insuficiencia renal. En el estudio de Delmas y cols. (105,118) no dan explicación a las diferencias entre los ensayos, pero sí ponen de manifiesto que esta evaluación requiere un amplio análisis del epítipo de reconocimiento de cada antisuero y un análisis químico del material inmunorreactivo presente en el suero.

Durante la realización del estudio multicéntrico diversos grupos de investigadores (119,120,121) desarrollaron nuevos ensayos, RIAs o EIAs, en los que introducían como novedad la utilización de anticuerpos monoclonales, pero seguían utilizando como inmunógeno la molécula de BGP bovina. En diversos trabajos se realizó la comparación de estos nuevos métodos con los RIAs ya establecidos, que empleaban anticuerpos policlonales. En general, se obtenía buena correlación entre los niveles de BGP en sueros normales y patológicos medidos por los métodos que se comparaban, pero en valor absoluto se obtenían niveles diferentes. En el caso del EIA desarrollado por Power y cols. (119), la naturaleza del

epítopo que reconoce el anticuerpo monoclonal empleado no fue bien determinada, pero los niveles medidos en una población de mujeres coincidían con otros anteriormente publicados. En otro trabajo publicado por los mismos autores (120), comparan dos RIAs con anticuerpos policlonales y un RIA con anticuerpo monoclonal, obteniendo diferentes resultados al medir muestras de suero y plasma. Estos autores justificaban esta variación en los resultados por la existencia de una serie de proteínas relacionadas con la BGP y con peso molecular cercano a ésta, en suero normal y no sólo en urémico, y porque los diferentes anticuerpos detectaban muchas o algunas de esas formas. Tracy y cols. (121) realizaron otro trabajo de comparación de dos RIAs con anticuerpos monoclonal y policlonal, respectivamente, e intentaron estudiar el origen de la variación de los resultados, ya que una vez más obtuvieron buena correlación entre los niveles de BGP en el suero de sujetos sanos medidos por los dos ensayos, pero los valores eran más altos cuando el RIA empleado era el del anticuerpo monoclonal. Estos investigadores recomendaron que, antes de estandarizar los ensayos de BGP, se tengan en cuenta una serie de aspectos: la cuantificación del estándar de BGP se debe realizar con el coeficiente de extinción molar adecuado; el efecto de varios ciclos de congelación y descongelación, ya que se produce una ligera pérdida en la inmunorreactividad; el efecto de la hemólisis, ya que un componente soluble de los eritrocitos puede dar lugar a proteólisis de la BGP; y por último, la presencia de múltiples formas de BGP inmunorreactivas en suero que se aprecian en una cromatografía de filtración en gel, además de la forma intacta de 49 aminoácidos.

La presencia de distintas formas inmunorreactivas de BGP en suero, no sólo de pacientes con insuficiencia renal crónica, sino también

en sujetos sanos y en pacientes con enfermedad ósea de Paget, se pone de manifiesto en un trabajo de Taylor y cols. (78) publicado en 1990. Estos autores, empleando un antisuero dirigido contra la zona media de la molécula de BGP humana, identificaron en muestras de suero mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), además de la molécula intacta, otros fragmentos inmunorreactivos de BGP, y curiosamente, en el suero de pacientes con enfermedad ósea de Paget, un fragmento de BGP que parecía ser característico de esta patología.

Hasta entonces, no se conocía la especificidad de los ensayos desarrollados para la medida de la BGP en cuanto al reconocimiento de la molécula γ -carboxilada o descarboxilada. A este respecto, en 1991 Koyama y cols. (122) publicaron un EIA tipo "sandwich" con un anticuerpo monoclonal de captura específico para la zona γ -carboxilada de la molécula de BGP bovina. Al medir los niveles de BGP en sujetos sanos y con diferentes patologías con este EIA y un RIA tradicional, se obtenía una buena correlación entre ambos, pero los valores en el EIA eran un 24% menores que los del RIA. Esta diferencia era debida a que el nuevo método detectaba sólo la BGP γ -carboxilada y el RIA la BGP total, es decir, la BGP γ -carboxilada más la parcialmente degradada y/o descarboxilada. Este EIA podría suponer un avance ya que la forma γ -carboxilada es posiblemente la forma activa y su medida podría suponer una mejor información clínica.

Teniendo en cuenta la heterogeneidad immunoquímica de la molécula de BGP, los siguientes ensayos desarrollados se encaminaron a la detección únicamente de la molécula de BGP intacta y además, en algunos casos, con especificidad para la BGP humana. En este sentido, Deftos y cols. (123) desarrollaron dos ensayos inmunorradiométricos

(IRMA) para la molécula de BGP humana intacta combinando cuatro anticuerpos monoclonales, dos dirigidos contra un péptido sintético N-terminal y otros dos contra un péptido C-terminal de la molécula de BGP humana. Curiosamente también había diferencias cuantitativas para la BGP sérica con anticuerpos dirigidos contra el mismo fragmento de BGP. Algunas de las diferencias observadas son posiblemente atribuibles a componentes de la matriz del ensayo y a un reconocimiento diferente entre el péptido sintético y el correspondiente péptido en la molécula intacta. Sin embargo, estos autores ponían de manifiesto que, con la interpretación adecuada, la medida de la BGP sérica sigue siendo una herramienta útil en el estudio del remodelado óseo, a pesar de la heterogeneidad de la molécula en suero. Además, la disponibilidad de anticuerpos específicos de determinadas regiones ayudaría a dilucidar las bases estructurales para la heterogeneidad inmunoquímica de esta proteína en suero.

En 1992, Hosoda y cols. (124) publicaron un trabajo en el que desarrollaron un nuevo EIA tipo "sandwich", específico para la molécula intacta, con BGP humana purificada como estándar y con antisueros de conejo dirigidos contra péptidos sintéticos de las zonas N- y C-terminales. Este EIA presentaba especificidad para la molécula intacta, como se demostraba al detectar un único pico correspondiente a la molécula de BGP 1-49, tras la purificación por HPLC de un suero de un paciente con insuficiencia renal. Garnerero y cols. (125), en otro estudio publicado también en 1992, describen un IRMA con dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra las zonas N-terminal y media, respectivamente, de la BGP humana. En este caso el IRMA detecta, además de la molécula intacta, un gran fragmento N-terminal, tanto en el suero

de sujetos normales como en el suero de pacientes con diversas patologías óseas. A pesar de ésto, este ensayo es más sensible que un RIA convencional para detectar los cambios en el remodelado óseo, como se puede observar por los niveles aumentados obtenidos en condiciones de elevado remodelado óseo (hiperparatiroidismo, enfermedad ósea de Paget y fallo renal) y descendidos en pacientes tratados con glucocorticoides, siendo la z-score media utilizando el IRMA más elevada significativamente que utilizando el RIA.

Como se puede deducir de todo lo expuesto anteriormente, se han desarrollado y se están utilizando actualmente en estudios clínicos, multitud de ensayos para la medida de la BGP circulante, tanto ensayos propios de los diferentes laboratorios como disponibles comercialmente. Masters y cols. (126) han publicado recientemente un estudio, similar al realizado por Delmas y cols. (105,118), en el que valoran el uso de diversos ensayos disponibles comercialmente en varios estados patológicos. Utilizan métodos parecidos a los de Delmas y cols., ya que comparan dichos ensayos en términos de múltiplos del valor medio para controles sanos. Dadas las diferencias en los tipos de ensayos (IRMA, RIA), estandarización (bovina, humana), tipo de anticuerpo (monoclonal, policlonal) y especificidad (humana, bovina, molécula intacta, C-terminal), es poco sorprendente que haya tan amplia variación en los valores absolutos de BGP determinados por los diferentes métodos. Como ocurría en el protocolo diseñado por Delmas y cols., los resultados no podían ser intercambiables entre los diferentes ensayos. Además, las diferencias sólo podían ser parcialmente normalizadas al ser expresadas como porcentaje de desviación del valor normal o como z-score.

Estos hallazgos sugieren una vez más que los diferentes ensayos miden diferentes especies moleculares, incluso en la ausencia de fallo renal. Es poco probable que este problema pueda ser resuelto con el uso de un estándar de BGP de referencia común, como ya ha sido demostrado por Delmas y cols. (105,118). Lo que sí parece claro es que los ensayos para la medida de la BGP no pueden ser estandarizados hasta que la naturaleza de los anticuerpos, en términos de especificidad del epítipo y reactividad con las múltiples formas de BGP en suero, esté establecida. Otra cuestión pendiente y fundamental es el conocimiento de las diferentes formas de BGP circulantes en el suero, tanto en condiciones fisiológicas normales como en diferentes patologías, para su posible utilidad diagnóstica.

2. OBJETIVOS

1. Estudio comparativo de las características técnicas de seis ensayos comerciales para la cuantificación de BGP: RIA OSTEOCALCINA, RIA OSTK-PR, RIA OSCAtest, IRMA ELSA-OST-NAT, IRMA ELSA-OSTEO e IRMA OSTEOCALCINA.
 - 1.1 Sensibilidad, linealidad, recuperación, estandarización, precisión y reproducibilidad.
 - 1.2 Estabilidad de la BGP contenida en muestras de suero.
 - 1.3 Reactividad cruzada del ensayo con respecto a la BGP intacta y a diferentes fragmentos de la misma.
 - 1.4 Correlación de los resultados obtenidos mediante los diferentes ensayos en sueros procedentes de sujetos sanos y pacientes con diversas patologías óseas.
2. Estudio de las diferentes formas inmunorreactivas de BGP presentes en el medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos.
3. Estudio de las diferentes formas inmunorreactivas de BGP presentes en el suero de sujetos adultos sanos y de pacientes con insuficiencia renal crónica, enfermedad ósea de Paget y osteoporosis postmenopáusica.
4. Comparación de las diferentes formas inmunorreactivas de BGP encontradas en el medio de cultivo de osteoblastos humanos y en el suero de sujetos adultos sanos y de pacientes con las patologías óseas anteriormente citadas.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Estudio comparativo de seis ensayos para la determinación de osteocalcina.

3.1.1 Ensayos para la determinación de osteocalcina.

En este trabajo se han estudiado seis técnicas comerciales para la cuantificación de BGP: tres RIAs y tres IRMAs. A continuación se describen las características principales de estos ensayos.

I. RIA OSTEOCALCINA (*Nichols Institute Diagnostics, EEUU*).

El trazador de este ensayo es BGP humana marcada con ^{125}I y el antisuero se obtiene de conejos inmunizados con BGP humana. Los epítomos a los que se une el antisuero no se describen. El estándar empleado en este RIA es la molécula de BGP humana 1-49, y el rango de concentración va desde 0.6 a 61 $\mu\text{g/L}$.

Las muestras de suero o los estándares (25 μL /tubo), junto con el anticuerpo y el trazador se incuban durante 3 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se adiciona el segundo anticuerpo (γ -globulinas de burro anti-conejo) y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Las fracciones libre y unida se separan mediante centrifugación a 1300-1500 g durante 20 min y a 2-8°C.

II. RIA OSTK-PR (*CIS bio international, Francia*).

En este RIA se emplean BGP bovina como estándar (rango de concentración 1.25-56 $\mu\text{g/L}$), y la misma molécula marcada con ^{125}I como trazador. El antisuero se obtiene de conejos inmunizados con BGP bovina, no siendo descrita su especificidad de unión al epítomo.

Las muestras o estándares (50 μL /tubo), anticuerpo y trazador se incuban durante 20-24 h a 2-8°C. Las fracciones unida y libre se separan mediante un complejo insoluble de γ -globulinas de oveja anti-

conejo y γ -globulinas de conejo no inmunizado. Después de una incubación durante 15 min a 2-8°C, las muestras se centrifugan a 1500-2000 g (15 min, 2-8°C).

III. *RIA OSCAtest Osteocalcin (BGP) (BRAHMS Diagnostica GMBH, Alemania).*

El trazador es el fragmento 38-49 de BGP humana marcado con ¹²⁵I. Un anticuerpo policlonal de oveja dirigido contra los aminoácidos 37-49 de BGP humana se encuentra recubriendo la parte interior de los tubos de reacción. El estándar empleado en este ensayo es BGP humana intacta, con un rango de concentración entre 2.0 y 78 μ g/L.

Cincuenta μ L de las muestras de suero o estándares se incuban con el trazador durante 20-24 h a 4-8°C, en los tubos que llevan fijado el anticuerpo. Pasado este tiempo, el trazador que no se ha unido al anticuerpo se elimina por aspiración, y los tubos se lavan dos veces con una disolución, cuya composición no especifica la casa comercial fabricante.

Recientemente, han sido comercializados para ser utilizados junto con el ensayo unos tubos que contienen un reactivo estabilizante (OSCAstabil). El suero debe ser colocado en estos tubos dentro de la primera hora desde la extracción. En este estudio, únicamente empleamos estos tubos en la evaluación de la estabilidad de la BGP en las muestras de suero (ver más adelante).

IV. *IRMA ELSA-OST-NAT (CIS bio international).*

En este IRMA se utilizan dos anticuerpos monoclonales anti-BGP diferentes. Uno dirigido contra los aminoácidos 5-13 de la molécula de BGP humana marcado con ¹²⁵I. El otro, dirigido contra los aminoácidos 43-49 de la BGP humana, va unido a una fase sólida situada en el fondo

de los tubos de reacción. El estándar de este IRMA es BGP humana intacta (rango de concentración 4.7-160 $\mu\text{g/L}$).

La muestra o estándar (50 μL) y el trazador (primer anticuerpo) se adicionan a los tubos que llevan fijado el segundo anticuerpo, y después de 2 h de incubación a 18-25°C, la radiactividad no unida se elimina mediante aspiración y varios lavados con una disolución de Tween 20.

V. *IRMA ELSA-OSTEO (CIS bio international)*.

El trazador de este IRMA es el mismo anticuerpo monoclonal que el utilizado en el ensayo IV. Los tubos de reacción llevan, fijado a una fase sólida situada en su interior, otro anticuerpo monoclonal dirigido contra la zona 25-37 de BGP humana. El estándar, con un rango de concentración entre 5.5 y 280 $\mu\text{g/L}$, es la molécula intacta de BGP humana.

Después de adicionar 50 μL de muestra o problema y trazador (primer anticuerpo) al tubo que lleva fijado el segundo anticuerpo, los tubos se incuban durante 2 h a 18-25°C. El exceso de trazador se elimina mediante aspiración y varios lavados, con una disolución de Tween 20.

VI. *IRMA OSTEOCALCINA (Nichols Institute Diagnostics)*.

En este IRMA se emplean dos anticuerpos diferentes de cabra anti-BGP humana purificados por cromatografía de afinidad. Los epítomos reconocidos por los anticuerpos no se describen en las especificaciones del IRMA. Uno de los anticuerpos se encuentra recubriendo una fase sólida en forma de bola de plástico y el otro es marcado con ^{125}I . El estándar es BGP humana intacta (rango de concentración 0.6-61 $\mu\text{g/L}$).

Después de adicionar 25 μL de suero o estándar a cada tubo, la muestra es incubada simultáneamente con el anticuerpo fijado a la fase

sólida y con el anticuerpo marcado con ^{125}I durante 18-24 h a temperatura ambiente. Después, la fase sólida (bola de plástico) es lavada con una disolución que contiene un detergente para eliminar el trazador no unido y otros componentes.

3.1.2 Pacientes y controles.

Para la obtención de las muestras se cumplieron los requerimientos del Comité de Ética de la Fundación Jiménez Díaz.

Para realizar el estudio comparativo sobre los ensayos de determinación de BGP, se incluyeron 32 sujetos adultos sanos (controles) y 49 pacientes con diversas enfermedades metabólicas óseas.

Ninguno de los sujetos controles (14 hombres y 18 mujeres, edad media \pm DE = 33.7 ± 8.5 años, rango 20-53) tenía antecedentes de alguna enfermedad o se encontraba tomando algún medicamento que afectara al metabolismo óseo.

También se incluyeron en el estudio, 20 pacientes con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis (13 hombres y 7 mujeres, edad 65.8 ± 7.6 años, rango 47-77) y 10 pacientes con enfermedad ósea de Paget (3 hombres y 7 mujeres, edad 70.6 ± 4.8 años, rango 65-76). Las pacientes con osteoporosis postmenopáusica (19 mujeres, edad 56.1 ± 5.7 años, rango 44-69) presentaban evidencia radiológica de una o más fracturas vertebrales no-traumáticas. El diagnóstico de los pacientes se confirmó por parámetros clínicos, bioquímicos y radiológicos.

En todos los pacientes y controles se determinó la BGP sérica. El suero se obtuvo por centrifugación de la sangre a 4°C dentro de la primera hora después de la extracción. Inmediatamente se hicieron alícuotas que se congelaron a -60°C hasta su utilización.

3.1.3 Variables analíticas estudiadas en cada uno de los ensayos.

3.1.3.1 Sensibilidad (Límite de detección).

Para calcular el límite de detección de cada técnica se determinaron en un mismo ensayo seis tubos correspondientes al estándar cero. La sensibilidad o límite de detección del método, con un límite de confianza del 95% viene definida por la concentración hallada al interpolar sobre la curva estándar el valor de la media de los contajes de los seis tubos correspondientes al estándar cero menos dos desviaciones estándar en el caso que sea descendente (RIA), o más dos desviaciones estándar si la curva es de tipo ascendente (IRMA) (127,128).

3.1.3.2 Linealidad de las diluciones.

La linealidad del método se evaluó haciendo diluciones seriadas de una mezcla de sueros de pacientes con insuficiencia renal crónica (sueros con elevada concentración de BGP). Se hicieron diluciones 1/2, 1/4 y 1/8 de la mezcla de sueros con el estándar cero de cada técnica (127,128). Cada muestra fue ensayada por triplicado.

3.1.3.3 Recuperación analítica y estandarización.

Con el fin de calcular la recuperación de cada método, se añadieron a muestras de suero humano, procedentes de sujetos controles, cantidades conocidas de BGP (concretamente, cada concentración estándar del ensayo correspondiente). La recuperación se calculó teniendo en cuenta la diferencia de concentración obtenida entre la muestra de suero y la muestra más el estándar (127,128). Cada muestra fue analizada por triplicado.

Por otra parte, se estudió comparativamente la estandarización de cada método. Para ello, se cuantificaron por todos los ensayos cantidades conocidas de BGP purificada de una muestra hueso humano, cedida amablemente por CIS bio international (Marcoule, Centre de Recherches, Francia). La BGP fue diluida con el estándar cero de cada ensayo, resultando unas concentraciones finales de 108, 54, 27, 13.5 y 6.75 $\mu\text{g/L}$, que fueron analizadas por triplicado por las seis ensayos.

3.1.3.4 Precisión y reproducibilidad.

Para evaluar la precisión de los distintos ensayos, se determinó el coeficiente de variación intraensayo, y para evaluar la reproducibilidad el coeficiente de variación interensayo (127,128).

Para determinar el coeficiente de variación intraensayo, una misma muestra de suero se procesó seis veces en el mismo ensayo. Se emplearon dos muestras diferentes, con concentración de BGP elevada y normal, procedentes de un paciente con insuficiencia renal crónica y de un sujeto control, respectivamente.

El coeficiente de variación interensayo se determinó mediante la medida de una misma muestra de suero, por triplicado, en tres ensayos diferentes. Se cuantificaron dos muestras, una de un paciente con insuficiencia renal crónica (niveles elevados de BGP) y otra de un sujeto control (niveles normales de BGP).

3.1.3.5 Estabilidad de la muestra.

Se realizó un estudio de la estabilidad de los niveles de BGP en el suero, en función del tiempo y de la temperatura de conservación de la muestra.

Para realizar este estudio se utilizaron tres mezclas de sueros procedentes de sujetos adultos sanos y dos procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica. El suero se obtuvo por centrifugación de la sangre a 4°C dentro de la primera hora después de la extracción. Se recogieron varias alícuotas que se congelaron a -60°C inmediatamente. Otras alícuotas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 h y 24 h, y a 4°C durante 24 h. Finalmente todas fueron congeladas a -60°C.

Cada muestra fue ensayada por triplicado en cada uno de los ensayos.

En el caso del RIA OSCAtest, alícuotas de 1 mL de suero de las mismas muestras se añadieron a unos tubos especiales del kit denominados OSCAstabil (ver apartado 3.1.1). El suero así tratado, se mantuvo en las mismas condiciones que las descritas anteriormente antes de su congelación a -60°C.

3.1.3.6 Especificidad de los anticuerpos utilizados para la cuantificación de osteocalcina.

Este estudio se llevó a cabo para determinar la especificidad de los anticuerpos empleados en cada ensayo frente a los distintos fragmentos de la molécula de BGP. Para ello, las muestras de suero fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal dirigido contra los aminoácidos 43-49 de la BGP humana. Dicho anticuerpo se encontraba recubriendo una fase sólida situada en el fondo de unos tubos especiales (ELSA-OST-NAT, CIS bio international).

Se emplearon para el estudio cuatro mezclas de sueros, dos

de sujetos controles y dos de pacientes con insuficiencia renal crónica. Doscientos μL de cada mezcla de suero fueron incubados en el tubo que contenía el anticuerpo durante 1 h a $18-25^{\circ}\text{C}$ con agitación. Pasado este tiempo, la muestra fue pasada a otro tubo con anticuerpo y se mantuvo durante otra hora en las mismas condiciones. Este paso se repitió una vez más. Una alícuota de 200 μL de cada una de las mezclas de sueros se incubó durante 3 h en las mismas condiciones en un tubo sin anticuerpo. Dicha muestra se empleó para determinar los niveles basales de BGP.

Tras el tratamiento de las muestras de suero con el anticuerpo anti-BGP, los niveles de BGP de las mismas se determinaron por los seis ensayos descritos. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.1.3.7 Correlación de los niveles de osteocalcina sérica entre los distintos ensayos.

Se realizó un estudio de correlación (coeficiente de Pearson) y regresión lineal (mínimos cuadrados) entre los valores de BGP determinados por los seis ensayos de BGP.

Se emplearon muestras de suero de sujetos controles, pacientes con insuficiencia renal crónica, pacientes con enfermedad ósea de Paget y mujeres con osteoporosis postmenopáusica, descritos anteriormente en el apartado de pacientes y controles (3.1.2).

Las correlaciones entre los distintos ensayos se realizaron dentro de un mismo grupo de sujetos (controles, osteoporosis postmenopáusica, etc.), con el fin de eliminar las posibles diferencias en los resultados, debido a la existencia de distintos fragmentos de BGP circulantes en el suero de pacientes con diferentes patologías.

3.1.4 Reactividad cruzada de los anticuerpos anti-osteocalcina utilizados en los ensayos ELSA-OST-NAT, ELSA-OSTEO y OSCAtest con respecto a diversos fragmentos de osteocalcina.

Como se explica en el capítulo de Discusión de este trabajo, las técnicas ELSA-OST-NAT, ELSA-OSTEO y OSCAtest fueron elegidas para realizar el estudio de las formas inmunorreactivas circulantes de BGP en el medio de cultivo de osteoblastos humanos y en suero. Por ello, se estudió de manera más detallada la reactividad cruzada de los anticuerpos de dichas técnicas con distintos fragmentos de BGP, así como con BGP humana o bovina intacta.

Los fragmentos sintéticos de BGP humana analizados fueron:

- * BGP (1-14) (Takara Biomedicals, Japón)
- * BGP (7-19) (Bachem Feinchemikalien AG, Suiza)
- * BGP (14-28) (Cedido amablemente por C. Gundberg, Yale University, School of Medicine, EEUU)
- * BGP (37-49) (Bachem Feinchemikalien AG)
- * BGP (45-49) (Peninsula Lab. Inc., EEUU)
- * BGP intacta (1-49) (Nichols Institute Diagnostics)

Sólo en el caso del IRMA ELSA-OST-NAT se ensayó BGP bovina intacta (Incstar, EEUU) y no se ensayó el fragmento 45-49 de BGP humana.

Se ensayaron por los tres métodos descritos distintas diluciones de BGP intacta o fragmentos de BGP. Para cada técnica, las diluciones se realizaron con su correspondiente estándar cero.

3.2 Estudio de las diferentes formas inmunorreactivas de osteocalcina presentes en el medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos y en el suero de sujetos controles y de pacientes con diversas patologías óseas.

3.2.1 Protocolo experimental.

En la figura 6 se muestra un esquema del protocolo experimental seguido en el desarrollo de esta parte del trabajo.

3.2.2 Cultivo de osteoblastos humanos.

Las muestras de hueso se obtuvieron de pacientes sin alteraciones metabólicas sometidos a operaciones quirúrgicas ortopédicas. Las edades de estos pacientes estaban comprendidas entre 55 y 60 años.

El protocolo utilizado está basado en una metodología aplicada por Marie y cols. (129), con algunas modificaciones (130). De las muestras se separó el hueso trabecular y se cortó en pequeños fragmentos (1-2 mm), que se depositaron sobre una malla de nylon de 80 μm de poro, sujeta entre dos anillas de vidrio y a su vez depositada en una placa de Petri, donde se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda. Se utilizó Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, EEUU), suplementado con 100 UI/mL y 100 $\mu\text{g/mL}$ de penicilina/estreptomicina, respectivamente (Biological Industries, Israel), así como con un 20% de suero de ternera fetal (Gibco), que se cambió dos veces a la semana. Las células osteoblásticas migraron de los explantes de hueso y crecieron adheridas a la malla de nylon. Cuando las células habían tapizado la superficie de la malla que queda alrededor del explante, los soportes de vidrio se eliminaron y la malla se situó sobre la placa de Petri directamente. Posteriormente, las células se trataron con tripsina

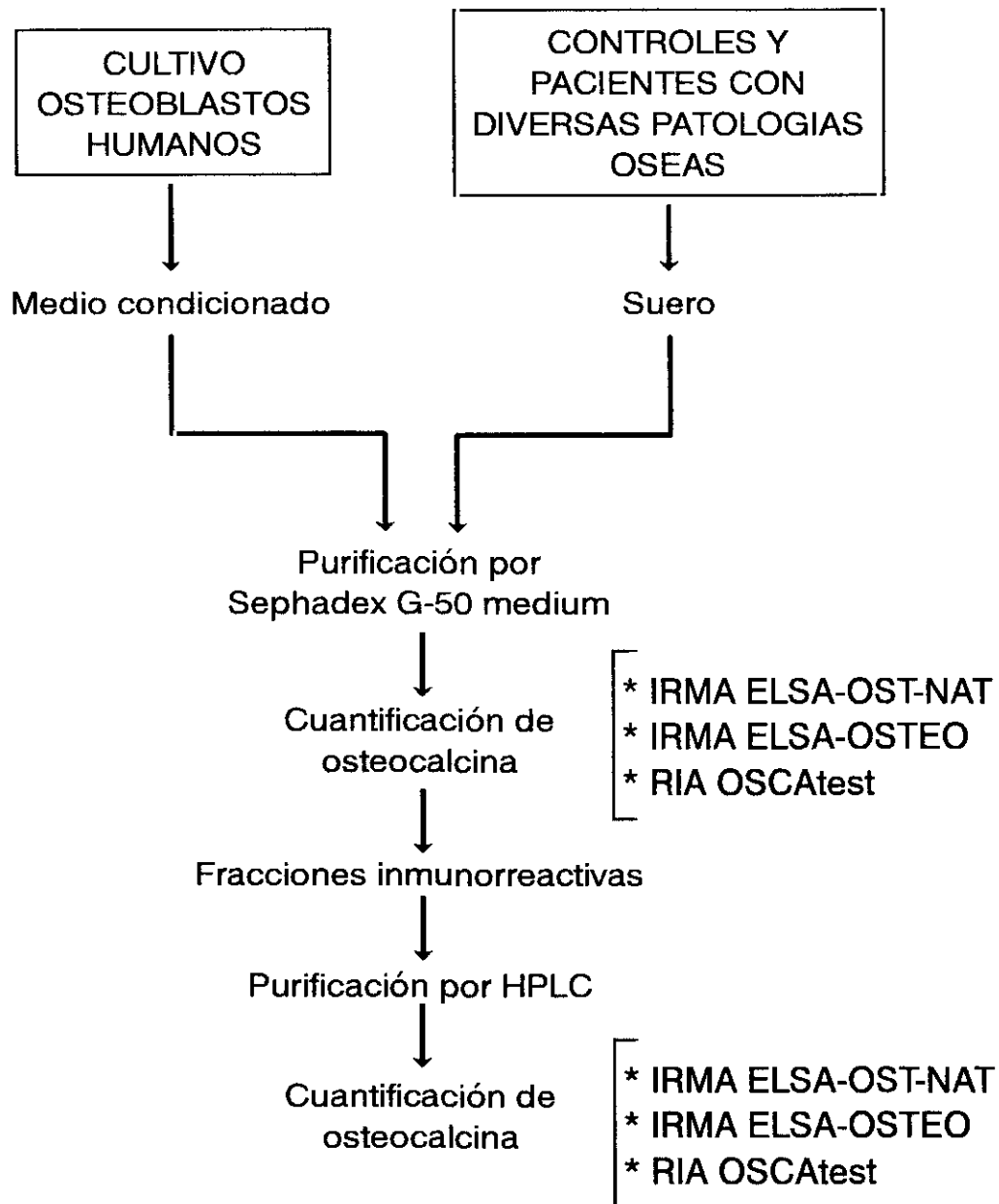


Figura 6: Protocolo experimental seguido en el estudio de las diferentes formas inmunorreactivas de osteocalcina presentes en el medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos y en el suero de sujetos controles y de pacientes con diversas patologías óseas.

al 0.25% (Biological Industries) durante unos minutos a 37°C, y se subcultivaron en frascos de 75 cm² con DMEM suplementado con antibióticos y suero de ternera fetal al 20%, hasta que el cultivo era confluyente.

Los subcultivos siguientes se realizaron en una proporción 1:3 cuando las células habían alcanzado la confluencia.

Los osteoblastos, cuando no están en confluencia, tienen un aspecto morfológico muy parecido al de los fibroblastos, pero en confluencia su aspecto difiere, adquiriendo una forma más redondeada característica de los osteoblastos, como puede observarse en la figura 7.

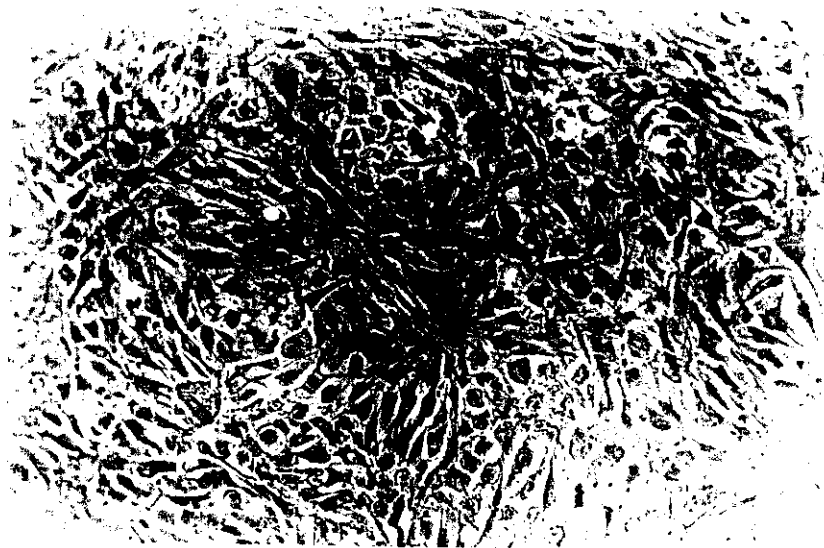


Figura 7: Cultivo de osteoblastos humanos en subconfluencia (x200). Las células van adoptando una forma cuboidal a medida que confluyen.

Las células fueron caracterizadas por su actividad fosfatasa alcalina tanto histológica como bioquímicamente, y por la estimulación de la síntesis de BGP en respuesta a la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (130).

Para realizar el estudio de las diferentes formas inmunorreactivas de BGP en el medio condicionado de los osteoblastos humanos, se emplearon los osteoblastos en confluencia del primer o segundo subcultivo. Los cultivos fueron lavados dos veces con solución salina tamponada con fosfato (pH = 7.4) e incubados con 10 mL de DMEM suplementado con 1% de suero de ternera fetal, 10^{-8} M de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Roche, Suiza), 10^{-8} M de vitamina K (Roche) y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido ascórbico (Sigma Chemical Co., EEUU). Después de 72 h, se recogió el medio condicionado de los osteoblastos humanos, del que se tomaron tres alícuotas para la cuantificación de la BGP por los tres ensayos empleados en esta parte del estudio. El volumen restante del medio condicionado se congeló inmediatamente a -60°C hasta su posterior utilización.

3.2.3 Pacientes y controles.

Para la obtención de las muestras se cumplieron los requerimientos del Comité de Ética de la Fundación Jiménez Díaz.

En este estudio se utilizaron sueros de individuos adultos sanos (controles), 16 mujeres y 16 hombres de edades comprendidas entre 24 y 53 años (38.3 ± 9.4), sin patología ósea aparente y sin tratamiento que pudiera afectar el metabolismo mineral.

El segundo grupo utilizado estaba formado por 20 enfermos con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis. El grupo estaba compuesto por 12 mujeres y 8 hombres con una media de edad de 63.1 ± 12.0 años (rango 34-79). Llevaban en programa de diálisis 68 ± 71 meses.

También se incluyeron 19 pacientes con enfermedad ósea de Paget activa, 12 mujeres y 7 hombres con un rango de edad entre 56 y 79 años (68.6 ± 6.5).

Por último, se estudiaron 16 mujeres diagnosticadas de osteoporosis postmenopáusica, con una media de edad de 56.6 ± 8.1 años y un rango entre 44 y 69 años. La densitometría mineral ósea de estas mujeres era inferior a dos desviaciones estándar del valor normal de un grupo de la misma edad y sexo.

En todos los grupos de pacientes, el diagnóstico fue confirmado por parámetros clínicos, bioquímicos y radiológicos. En ningún caso estaban recibiendo medicación que afectara el metabolismo mineral y en todos los grupos, a excepción de los pacientes con insuficiencia renal crónica, la función renal era normal.

A todos los sujetos (controles y pacientes) se les extrajo sangre a primera hora de la mañana tras un ayuno de 12 horas. El suero fue obtenido por centrifugación de la sangre a 4°C . Posteriormente se hicieron alícuotas, que se congelaron a -60°C , siempre dentro de la primera hora después de la extracción.

Una alícuota de suero fue utilizada para la determinación de los niveles de BGP por los tres ensayos descritos en el apartado 3.2.4. El resto se empleó para la purificación y separación de los distintos fragmentos de BGP circulantes.

3.2.4 Ensayos de medida de la osteocalcina.

Para realizar la caracterización de las formas inmunorreactivas de BGP presentes en el medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos y circulantes en suero, se seleccionaron los

siguientes métodos, entre los seis ensayos estudiados en la primera parte de esta tesis:

- 1) IRMA ELSA-OST-NAT
- 2) IRMA ELSA-OSTEO
- 3) RIA OSCAtest

Estas técnicas han sido descritas con detalle en el apartado 3.1.1.

El contenido de BGP de todas las muestras, medios condicionados del cultivo de osteoblastos o sueros humanos, utilizados en esta parte del trabajo, se analizaron mediante estos tres ensayos de cuantificación de BGP. Lo mismo sucedió con las muestras resultantes de la purificación de los medios condicionados o sueros a través de Sephadex G-50 medium o HPLC.

3.2.5 Purificación de la osteocalcina del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos y del suero humano por filtración en gel Sephadex G-50 medium.

3.2.5.1 Preparación del gel Sephadex G-50 medium y relleno de la columna.

Cincuenta gramos de Sephadex G-50 medium (Pharmacia LKB, Suecia), con un tamaño de partícula seca de 50-150 μm y un rango de separación para péptidos y proteínas globulares de 1500 a 30000 Da de masa molecular, se mantuvieron en agua ultrapura durante 3 días y a 4°C. Durante este tiempo, se decantó varias veces el agua para eliminar las partículas del gel de menor tamaño que quedaban flotando en la superficie. A continuación, la suspensión del gel en agua se calentó en baño de agua hirviente durante 4 h, con el fin de terminar de hinchar la

malla y eliminar las burbujas de aire del gel. Después se dejó enfriar y se desgasificó al vacío.

Una vez preparado y desgasificado, el gel se vertió cuidadosamente en una columna de vidrio (2.6 x 100 cm) (Pharmacia, Laboratory Separation Division, Suecia), sobre una varilla para evitar la rotura de la malla. Se dejó compactar durante 2 días a 4°C, y a continuación se aplicaron aproximadamente 2.5 L de HCO₃NH₄ 5 mM con azida sódica (0.01%), para evitar el crecimiento bacteriano, a un flujo de 0.5 mL/min (Bomba Tris) (Isco Inc., EEUU).

Una vez compactado, la altura final del gel fue de 94 cm. Para saturar los sitios de unión del gel y prepararlo para las eluciones sucesivas, se pasaron por la columna 5 mL de una mezcla de sueros humanos a un flujo de 0.5 mL/min, equilibrándola a continuación con HCO₃NH₄ 5 mM al mismo flujo.

3.2.5.2 Calibración de la columna de Sephadex G-50 medium.

Para la calibración de la columna se utilizaron: albúmina sérica bovina (Masa molecular = 66000 Da, Sigma Chemical Co.), inhibidor de tripsina (Masa molecular = 21500 Da, Sigma Chemical Co.), ribonucleasa A (Masa molecular = 13000 Da, Sigma Chemical Co.), insulina bovina (Masa molecular = 5700 Da, Sigma Chemical Co.) y rojo de fenol (Masa molecular = 350 Da, Sigma Chemical Co.).

Se aplicaron 5 mg de albúmina sérica bovina, 7 mg de inhibidor de tripsina, 9 mg de ribonucleasa A, 5 mg de insulina y una punta de espátula de rojo de fenol, disueltos en 9 mL de HCO₃NH₄ 5 mM. Las muestras se eluyeron con HCO₃NH₄ 5 mM a un flujo de 0.5 mL/min y a 4°C.

Se recogieron 110 fracciones de 6 mL cada una, empleando un colector Retriever II (Isco Inc.).

El método de detección empleado para la obtención de los correspondientes picos del cromatograma fue la absorbancia en el ultravioleta. Se empleó un detector de ultravioleta U-A 5 (Isco Inc.), a una sensibilidad de 0.1 AUFS y a una longitud de onda de 340 nm.

A partir del cromatograma obtenido se calculó el volumen de elución (V_e) de cada estándar. Este V_e se midió desde el comienzo de la aplicación de la muestra hasta el centro del pico de elución.

El volumen de exclusión (V_o) de la columna corresponde al V_e de la albúmina sérica bovina, ya que su masa molecular (66000 Da) es mayor que el rango superior de separación del gel (30000 Da). El volumen total (V_t) corresponde al V_e del rojo de fenol, ya que su masa molecular (550 Da) es menor que el rango inferior de separación del gel (1500 Da).

La curva de calibración de la columna se obtuvo representando el coeficiente de partición entre la fase líquida y la fase del gel (K_{av}) de las tres proteínas aplicadas (inhibidor de tripsina, ribonucleasa A e insulina) frente al logaritmo de su masa molecular.

El K_{av} para cada proteína se obtuvo aplicando la fórmula matemática: $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$.

3.2.5.3 Determinación de la masa molecular aparente de osteocalcina intacta humana y del fragmento 38-49 de osteocalcina humana.

Quinientos μL (aproximadamente 80000 cpm) de BGP humana marcada con ^{125}I (Nichols Institute Diagnostics), disueltos en 9 mL de una

mezcla de sueros humanos, se aplicaron a la columna de Sephadex G-50 medium y se eluyeron con HCO_3NH_4 5 mM a un flujo de 0.5 mL/min y a 4°C, recogiendo 110 fracciones de 6 mL. En una alícuota de 2 mL de cada fracción se midió la radiactividad en un contador γ Cobra (Packard, EEUU).

Una alícuota de 500 μL (aproximadamente 40000 cpm) del trazador del RIA OSCAtest, fragmento 38-49 de BGP humana marcado con ^{125}I , disuelta en 9 mL de suero humano se aplicó a la columna de Sephadex y se eluyó con HCO_3NH_4 5 mM a un flujo de 0.5 mL/min y a 4°C. Se recogieron 110 fracciones de 6 mL. De cada una de las fracciones se tomaron alícuotas de 2 mL en las que se determinó su radiactividad.

3.2.5.4 Purificación de la osteocalcina del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos a través de Sephadex G-50 medium.

Previamente a la purificación por Sephadex se midieron los niveles de BGP de las muestras del medio de osteoblastos humanos por los tres ensayos de BGP incluidos en este estudio.

Tres alícuotas consecutivas de 9 mL de una mezcla de medio condicionado de osteoblastos humanos, cultivados como se ha descrito anteriormente (apartado 3.2.2), se aplicaron a la columna de Sephadex G-50 medium, previamente equilibrada con HCO_3NH_4 5 mM. Se eluyeron con el mismo solvente a un flujo de 0.5 mL/min y a 4°C. Se recogieron 110 fracciones de 6 mL cada una, y una alícuota de 1.5 mL de cada fracción (agrupadas de dos en dos) se liofilizó y se empleó para la determinación de la BGP inmunorreactiva por los tres ensayos descritos en el apartado 3.2.4. Para ello, el liofilizado se resuspendió en 150 μL del estándar

cero del ensayo correspondiente. El volumen restante de cada fracción se congeló hasta su posterior utilización. Las fracciones que presentaban inmunorreactividad por alguno de los tres ensayos se agruparon y se liofilizaron para su posterior purificación por HPLC. No se incluyeron las fracciones inmunorreactivas correspondientes al Vo de la columna. Todo el proceso se repitió una vez más con otras tres mezclas de medios condicionados de osteoblastos humanos purificadas a través de Sephadex.

3.2.5.5 Purificación de la osteocalcina del suero de sujetos controles y de pacientes con diversas patologías óseas a través de Sephadex G-50 medium.

Previamente a la purificación por filtración en gel, se midieron los niveles de BGP de las muestras de suero, tanto de los sujetos controles como de los pacientes con diversas patologías óseas, por los tres ensayos de BGP descritos en el apartado 3.2.4.

Aproximadamente 9 mL de una mezcla de sueros, procedentes de cinco o seis sujetos diferentes, se aplicaron a la columna de Sephadex G-50 medium y se eluyeron con HCO_3NH_4 5 Mm a un flujo de 0.5 mL/min y a 4°C. Se recolectaron 110 fracciones de 6 mL cada una y se hicieron alícuotas de 1.5 mL de cada una de las fracciones, que se liofilizaron para su posterior determinación de los niveles de BGP por los tres ensayos de BGP empleados en este estudio. Cada alícuota liofilizada se reconstituyó en 150 μL del estándar cero del correspondiente ensayo.

Las fracciones inmunorreactivas por alguno de los tres ensayos, procedentes de tres cromatografías diferentes, se agruparon y se liofilizaron hasta su posterior purificación por HPLC. Las fracciones

inmunorreactivas correspondientes al V_0 de la columna no se incluyeron en el estudio.

De esta manera se procesaron seis mezclas de sueros de sujetos controles, seis de pacientes con insuficiencia renal crónica, seis de pacientes con enfermedad ósea de Paget y seis de pacientes con osteoporosis postmenopáusia.

El cálculo de la recuperación de BGP en el proceso de filtración en gel se realizó sumando la cantidad de BGP inmunorreactiva de todas las fracciones y obteniendo el porcentaje con respecto al total de la BGP aplicada en la columna.

3.2.6 Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina procedente de Sephadex G-50 medium.

3.2.6.1 Condiciones de la purificación por cromatografía líquida de alta presión.

Para la técnica del HPLC se empleó un equipo compuesto por: inyector modelo U6K, dos bombas modelos M-45 y 6000 A y un controlador de gradiente automático modelo 680 (Waters, EEUU).

Para la purificación por HPLC se empleó una columna de fase reversa C-4 (Hi-Pore RP-304, 250 x 4.6 mm, 5 μm de tamaño de partícula y 300 Å de tamaño de poro) (BIO-RAD, EEUU), utilizando un gradiente lineal del 25% al 40% de acetonitrilo (AcN) en H_2O con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en 150 min, a un flujo de 1 mL/min y a temperatura ambiente.

Las condiciones del gradiente empleado se especifican a continuación:

TIEMPO (min)	FLUJO (mL/min)	% H ₂ O (0.1% TFA)	% AcN (0.1% TFA)
Inicial	1	75	25
10	1	75	25
160	1	60	40
180	1	60	40

Se recogieron 90 fracciones de 2 mL cada una empleando un colector Retriever (Isco Inc.).

Todos los solventes empleados fueron de grado HPLC.

3.2.6.2 Purificación por cromatografía líquida de alta presión de osteocalcina intacta procedente de hueso humano.

Una alícuota liofilizada de BGP purificada de hueso humano (aproximadamente 70 ng) (cedida amablemente por CIS bio international) se resuspendió en 1.5 mL de la mezcla 25% AcN, 75% H₂O (0.1% TFA) y se inyectó en el cromatógrafo según las condiciones descritas anteriormente. Se recogieron 90 fracciones, una cada 2 minutos, que se liofilizaron para su posterior empleo en la determinación de BGP por el IRMA ELSA-OST-NAT, resuspendiéndose en 150 μ L del estándar cero del ensayo.

3.2.6.3 Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos y del suero de sujetos controles y pacientes con diversas patologías óseas, tras filtración a través de Sephadex G-50 medium.

El liofilizado de las fracciones agrupadas procedentes de la filtración en gel, que presentaban inmunorreactividad por alguno de los tres ensayos de BGP empleados, se resuspendió en aproximadamente 1.5 mL de la mezcla 25% AcN, 75% H₂O (0.1% TFA), y se filtró a través de un filtro durapore de 0.45 μ m (Millipore, EEUU). Tres alícuotas de 60 μ L de esta resuspensión se congelaron a -60°C para la determinación posterior de la concentración de BGP por los tres ensayos descritos en el apartado 3.2.4, y con el fin de realizar el correspondiente cálculo de la recuperación de la BGP a través del proceso de purificación por HPLC. El volumen restante se inyectó en el cromatógrafo en las condiciones reseñadas anteriormente.

También en este caso se recogieron 90 fracciones de 2 mL cada una, que se dividieron en tres alícuotas de 0.6 mL. Estas alícuotas se liofilizaron y se destinaron para la determinación de los niveles de BGP por los ensayos ELSA-OST-NAT, ELSA-OSTEO y OSCAtest, resuspendiendo cada alícuota en 150 μ L del estándar cero del ensayo correspondiente.

4. RESULTADOS

4.1 Estudio comparativo de seis ensayos para la determinación de osteocalcina.

4.1.1 Variables analíticas estudiadas en cada uno de los ensayos.

4.1.1.1 Sensibilidad (Límite de detección).

La tabla I muestra los valores de los límites de detección obtenidos para cada una de los ensayos estudiados.

Los límites de detección varían entre 0.04 $\mu\text{g/L}$ para el IRMA OSTEOCALCINA y 1.2 $\mu\text{g/L}$ para el IRMA ELSA-OSTEO.

Tabla I: Límite de detección.

Ensayo	Sensibilidad ^a ($\mu\text{g/L}$)
RIA OSTEOCALCINA	0.18
RIA OSTK-PR	0.38
RIA OSCAtest	0.50
IRMA ELSA-OST-NAT	1.00
IRMA ELSA-OSTEO	1.20
IRMA OSTEOCALCINA	0.04

^a Dos desviaciones estándar de seis determinaciones del estándar cero de cada ensayo.

4.1.1.2 Linealidad de las diluciones.

En la tabla II aparecen reflejados los tantos por ciento de recuperación obtenidos al ensayar diluciones seriadas de una mezcla de sueros de pacientes con insuficiencia renal crónica por cada una de las técnicas. Como puede observarse, las recuperaciones obtenidas en los IRMAs son más cercanas al 100% que en los RIAs.

En general, la proporcionalidad entre las diluciones (paralelismo con respecto a la curva de calibración) puede ser considerada aceptable para todas las técnicas estudiadas, a excepción del RIA OSTK-PR. En este caso, la recuperación en alguna de las diluciones es cercana al 150%.

4.1.1.3 Recuperación analítica y estandarización.

La tabla III muestra la recuperación obtenida en cada método. En todos los casos los valores de recuperación se encuentran en un rango aceptable, aunque las peores recuperaciones se obtienen en el RIA OSTEOCALCINA y en el RIA OSCAtest.

En cuanto al estudio de estandarización (tabla IV), los resultados indican importantes diferencias entre las diferentes técnicas. Sólo en el RIA OSCAtest y en los IRMAs ELSA-OST-NAT y ELSA-OSTEO, las recuperaciones obtenidas fueron cercanas a las esperadas. En los restantes métodos, las recuperaciones fueron más bajas en todo el rango de diluciones utilizado.

Tabla II: Linealidad de las diluciones.

Ensayo	Dilución	Osteocalcina medida ($\mu\text{g/L}$)	Osteocalcina corregida ($\mu\text{g/L}$)	Recuperación (%)
RIA OSTEOCALCINA	No diluida	18.4	18.4	
	1/2	11.2	22.4	121.7
	1/4	5.6	22.4	121.7
	1/8	2.7	21.6	117.4
RIA OSTK-PR	No diluida	13.8	13.8	
	1/2	8.2	16.4	118.8
	1/4	5.0	20.0	144.9
	1/8	2.5	20.0	144.9
RIA OSCatest	No diluida	18.3	18.3	
	1/2	9.2	18.4	100.5
	1/4	5.2	20.8	113.6
	1/8	3.1	24.8	135.5
IRMA ELSA-OST-NAT	No diluida	16.0	16.0	
	1/2	8.6	17.2	107.5
	1/4	4.2	16.8	105.0
	1/8	2.0	16.0	100.0
IRMA ELSA-OSTEO	No diluida	60.0	60.0	
	1/2	29.0	58.0	96.6
	1/4	14.6	58.4	97.3
	1/8	7.7	61.6	102.6
IRMA OSTEOCALCINA	No diluida	21.6	21.6	
	1/2	12.3	24.6	113.8
	1/4	6.3	25.2	116.6
	1/8	3.0	24.0	111.0

La linealidad de cada ensayo se evaluó mediante diluciones seriadas (con el estándar cero) de una mezcla de sueros procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica. Cada muestra fue ensayada por triplicado.

Tabla III: Recuperación analítica.

Ensayo	Osteocalcina sérica ($\mu\text{g/L}$)	Osteocalcina adicionada ($\mu\text{g/L}$)	Valor observado ($\mu\text{g/L}$)	Valor teórico ($\mu\text{g/L}$)	Recuperación (%)
RIA OSTEOCALCINA	2.3	0.75	3.3	3.1	106.5
	2.3	1.4	4.5	3.7	121.6
	2.3	3.0	6.1	5.3	115.1
	2.3	6.3	9.5	8.6	110.5
RIA OSTK-PR	3.1	1.25	4.8	4.4	109.1
	3.1	3.0	6.9	6.1	113.1
	3.1	11.0	14.9	14.1	105.5
	3.1	26.0	27.7	29.1	95.2
RIA OSCATest	6.3	2.0	10.4	8.3	125.3
	6.3	5.0	13.3	11.3	117.7
	6.3	12.5	20.5	18.8	109.0
	6.3	31.2	43.0	37.5	114.7
IRMA ELSA-OST-NAT	3.1	4.7	6.9	7.8	88.5
	3.1	30.0	31.0	33.1	93.7
	3.1	83.0	79.6	86.1	92.5
IRMA ELSA-OSTEO	14.7	5.5	20.3	20.2	100.5
	14.7	43.0	58.8	57.7	101.9
	14.7	119.0	147.3	133.7	110.2
IRMA OSTEOCALCINA	4.5	0.6	5.1	5.1	100.0
	4.5	1.9	6.2	6.4	96.9
	4.5	6.1	10.5	10.6	99.1
	4.5	18.3	17.0	22.8	74.6

Cantidades conocidas de osteocalcina (estándares de cada ensayo) se adicionaron a sueros de sujetos controles. Cada muestra fue ensayada por triplicado.

Tabla IV: Estudio de estandarización: Recuperación analítica de osteocalcina humana purificada de hueso.

Osteocalcina adicionada ($\mu\text{g/L}$)	Osteocalcina medida ($\mu\text{g/L}$)					
	RIA OSTEOCALCINA	RIA OSTK-PR	RIA OSCATest	IRMA ELSA-OST-NAT	IRMA ELSA-OSTEO	IRMA OSTEOCALCINA
108.0	*	*	*	82.9 (76.8)	104.3 (96.6)	*
54.0	19.7 (36.5)	21.6 (40.0)	44.6 (82.6)	42.6 (78.9)	54.4 (100.7)	22.9 (42.4)
27.0	10.7 (39.6)	13.5 (50.0)	23.6 (87.4)	21.8 (80.7)	28.0 (103.7)	17.6 (65.2)
13.5	5.8 (43.0)	7.7 (57.0)	11.6 (85.9)	11.4 (84.4)	15.5 (114.8)	12.6 (93.3)
6.75	2.7 (40.0)	3.6 (53.3)	6.0 (88.9)	5.2 (77.0)	9.6 (142.2)	7.6 (112.6)

* Valores fuera de la linealidad de la curva estándar.
Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de recuperación.

4.1.1.4 Precisión y reproducibilidad.

Los coeficientes de variación intraensayo oscilan entre 2.1% y 8.9%. En el caso de los coeficientes de variación interensayo, se encuentran en un rango entre 1.4% y 10.6% (tabla V). Dichos coeficientes se pueden considerar aceptables en todos los casos.

Tabla V: Precisión y reproducibilidad.

Ensayo	Intraensayo (n=6)		Interensayo (n=3)	
	Media ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	Media ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)
RIA OSTEOCALCINA	26.3 2.2	8.9 6.4	25.5 2.2	4.1 7.0
RIA OSTK-PR	70.2 3.2	7.2 3.4	64.4 3.1	8.5 3.6
RIA OSCAtest	84.1 7.9	3.1 4.5	77.9 8.0	6.9 3.3
IRMA ELSA-OST-NAT	34.5 10.0	4.8 3.9	102.8 7.9	2.1 8.9
IRMA ELSA-OSTEO	442.5 16.1	2.1 6.1	412.0 16.4	6.5 1.4
IRMA OSTEOCALCINA	56.3 6.8	3.4 4.6	42.2 6.1	5.7 10.6

CV = Coeficiente de variación.

4.1.1.5 Estabilidad de la muestra.

La tabla VI muestra la estabilidad de las muestras en todos los ensayos, después de su mantenimiento en diferentes condiciones (2 h y 24 h a temperatura ambiente, y 24 h a 4°C). Los resultados se han

expresado en forma de porcentaje con respecto al valor basal (alícuota congelada inmediatamente después de la separación del suero).

En la mayoría de los ensayos, los valores de BGP sérica para las muestras mantenidas 2 h y 24 h a temperatura ambiente fueron menores que cuando el suero se congeló inmediatamente después de la separación.

El descenso medio en los niveles de BGP medidos por los RIAs en los sueros procedentes de sujetos controles mantenidos durante 24 h a temperatura ambiente fue del 50%, mayor que el observado en los sueros de pacientes con insuficiencia renal crónica, que fue del 25%. En general, el mantenimiento de las muestras durante 24 h a 4°C no aportó mejoría significativa en la estabilidad de la medida sobre la conservación a temperatura ambiente. Después de 2 h a temperatura ambiente (tiempo normal antes de poder congelar la muestra en un laboratorio), las concentraciones de BGP descendieron entre un 10% y 15% con respecto a los valores iniciales, tanto en los sueros procedentes de sujetos controles como en los sueros procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica. Sin embargo, en el caso del RIA OSCAtest, la adición del suero a los tubos OSCAstabil (con estabilizante) mantuvo estables los valores de BGP incluso después de 24 h a temperatura ambiente.

La estabilidad de los valores de BGP en el caso del IRMA ELSA-OST-NAT fue parecida a la obtenida en el caso de los RIAs estudiados. Dicha estabilidad fue peor en las muestras de individuos controles que en las muestras de pacientes con insuficiencia renal crónica.

Tabla VI: Estabilidad de la osteocalcina en el suero después del mantenimiento de las muestras a temperatura ambiente, y a 4°C.

Ensayo	Muestras ^b	% de valores basales después de		
		2 h, TA	24 h, TA	24 h, 4°C
RIA OSTEOCALCINA	C	84	40	46
	IRC	98	72	92
RIA OSTK-PR	C	89	49	56
	IRC	86	70	74
RIA OSCAtest	C	90	48	54
	IRC	94	80	86
	C-stab	100	94	100
	IRC-stab	101	104	105
IRMA ELSA-OST-NAT	C	90	41	53
	IRC	88	62	75
IRMA ELSA-OSTEO	C	97	81	98
	IRC	97	96	100
IRMA OSTEOCALCINA	C	96	81	96
	IRC	96	93	99

^a 100% corresponde a sueros congelados inmediatamente tras su separación.

^b Los valores son media de tres sueros procedentes de sujetos controles (C) y de dos sueros procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC). C-stab e IRC-stab corresponden a muestras de suero mantenidas en tubos que contienen un estabilizador (ver Materiales y Métodos).

TA = Temperatura ambiente

La estabilidad de los valores de BGP medida por los IRMAs ELSA-OSTEO y OSTEOCALCINA fue muy buena. En las muestras mantenidas durante 24 h a temperatura ambiente se detectaban valores de BGP sólo un 20% más bajos que los valores basales; mientras que las muestras mantenidas a temperatura ambiente durante 2 h tenían valores similares a los basales (97%). Estos resultados fueron semejantes tanto en sueros

procedentes de sujetos controles como en sueros procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica.

4.1.1.6 Especificidad de los anticuerpos utilizados para la cuantificación de la osteocalcina.

La tabla VII muestra las concentraciones de BGP obtenidas por los diferentes ensayos en dos mezclas de sueros procedentes de sujetos controles y dos de pacientes con insuficiencia renal crónica, antes y después del tratamiento con un anticuerpo monoclonal dirigido contra los aminoácidos 43-49 de BGP humana.

Tras el tratamiento con el anticuerpo, en los sueros analizados por los RIAs se detectaron unas concentraciones de BGP medias residuales de 22.1% (RIA OSTEOCALCINA), 25.9% (RIA OSTK-PR) y 20.4% (RIA OSCAtest) con respecto a los valores de las muestras de suero no tratadas con el anticuerpo. En los RIAs OSTEOCALCINA y OSTK-PR el porcentaje de BGP residual fue mayor en las muestras procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica que en las procedentes de sujetos controles.

Unicamente el IRMA ELSA-OST-NAT no detectó BGP residual en el suero después del tratamiento con el anticuerpo. Los otros dos IRMAs, ELSA-OSTEO y OSTEOCALCINA detectaron unas concentraciones de BGP medias residuales del 67.5% y del 48.2% de los valores basales, respectivamente. En el caso del IRMA ELSA-OSTEO el porcentaje de BGP residual fue mayor en los pacientes con insuficiencia renal crónica que en los controles.

Tabla VII: Concentraciones de osteocalcina sérica medidas antes y después del tratamiento con un anticuerpo monoclonal contra los aminoácidos 43-49 de osteocalcina humana.

Ensayo	Muestras ^a	Osteocalcina ($\mu\text{g/L}$)		Osteocalcina residual (%)
		Muestra no tratada	Muestra tratada	
RIA OSTEOCALCINA	C ₁	3.3	0.6	18.0
	C ₂	1.7	0.3	17.6
	IRC ₁	15.2	3.4	22.4
	IRC ₂	25.1	7.7	30.5
RIA OSTK-PR	C ₁	5.0	0.8	16.0
	C ₂	2.2	0.5	23.0
	IRC ₁	12.9	4.2	32.5
	IRC ₂	22.6	7.3	32.3
RIA OSCAtest	C ₁	7.4	1.2	16.2
	C ₂	4.8	1.1	23.0
	IRC ₁	18.6	3.2	17.2
	IRC ₂	23.3	5.9	25.3
IRMA ELSA-OST-NAT	C ₁	5.8	ND	0
	C ₂	4.0	ND	0
	IRC ₁	10.0	ND	0
	IRC ₂	18.3	ND	0
IRMA ELSA-OSTEO	C ₁	15.0	8.3	55.3
	C ₂	11.7	7.5	64.1
	IRC ₁	61.0	45.7	74.9
	IRC ₂	110.2	83.5	75.8
IRMA OSTEOCALCINA	C ₁	5.6	2.3	41.1
	C ₂	3.6	2.0	55.6
	IRC ₁	12.1	5.6	46.3
	IRC ₂	17.3	8.6	49.7

^a Dos mezclas de sueros procedentes de sujetos controles (C) y dos procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC). (Ver Materiales y Métodos).
ND = No detectable.

4.1.1.7 Correlación de los niveles de osteocalcina sérica entre los distintos ensayos.

La tabla VIII muestra las concentraciones séricas de BGP medidas por las seis técnicas en los cuatro grupos de sujetos incluidos en el estudio. En todos los grupos, tanto controles como patológicos, el IRMA ELSA-OSTEO es el ensayo que mostró los valores más elevados.

Tabla VIII: Concentraciones de osteocalcina sérica determinadas por diferentes ensayos en sujetos controles y en pacientes con insuficiencia renal crónica, enfermedad ósea de Paget y osteoporosis postmenopáusica.

Ensayo	Osteocalcina ($\mu\text{g/L}$)			
	Control (n = 32)	IRC (n = 20)	Paget (n = 10)	OSP (n = 19)
RIA OSTEOCALCINA	5.4 \pm 2.5 (1.7-11.0)	25.6 \pm 15.6 (6.5-73.8)	20.5 \pm 7.7 (4.7-28.5)	5.4 \pm 2.7 (1.4-12.7)
RIA OSTK-PR	6.0 \pm 2.2 (2.2-10.0)	26.0 \pm 13.9 (8.4-64.4)	16.7 \pm 5.4 (5.4-24.0)	6.0 \pm 1.8 (3.3-10.4)
RIA OSCAtest	9.1 \pm 2.9 (4.4-15.0)	28.2 \pm 17.8 (8.4-77.9)	26.2 \pm 9.5 (7.0-38.8)	8.3 \pm 3.0 (4.1-15.0)
IRMA ELSA-OST-NAT	8.8 \pm 3.4 (4.0-17.4)	18.6 \pm 21.3 (2.6-93.5)	26.4 \pm 9.4 (7.8-38.4)	7.5 \pm 2.9 (4.4-14.7)
IRMA ELSA-OSTEO	16.9 \pm 7.4 (6.8-34.3)	102.7 \pm 97.6 (5.7-412.0)	65.5 \pm 28.2 (12.6-95.1)	17.1 \pm 6.7 (6.1-33.6)
IRMA OSTEOCALCINA	5.7 \pm 1.9 (3.0-11.0)	21.7 \pm 11.5 (4.5-46.9)	13.2 \pm 5.4 (4.8-23.5)	5.8 \pm 1.7 (3.0-9.5)

Los resultados expresan media \pm desviación estándar, y entre paréntesis el rango.

IRC = Insuficiencia renal crónica.

OSP = Osteoporosis postmenopáusica.

Como se ha mencionado en el capítulo de Materiales y Métodos, se ha realizado la correlación entre los valores de BGP obtenidos en los diferentes ensayos, dentro de cada grupo de pacientes (controles o con una determinada patología ósea). Debido a que en la mayoría de los casos la correlación entre los seis métodos fue muy significativa ($p < 0.001$), en la tabla IX sólo se muestran las correlaciones para las cuales p fue mayor de 0.001. En el caso de los pacientes con insuficiencia renal crónica, sólo los ensayos IRMA ELSA-OST-NAT y RIA OSTEOCALCINA no mostraron una correlación significativa. En el grupo de pacientes con enfermedad ósea de Paget no se encontró una correlación significativa entre el IRMA ELSA-OSTEO y el IRMA OSTEOCALCINA, y entre el IRMA OSTEOCALCINA y los RIAs.

Tabla IX: Correlación entre diferentes ensayos de osteocalcina.

Ensayos ^a comparados	Grupo	n	r	p
IV vs I	IRC	20	0.341	NS
IV vs VI	Paget	10	0.710	<0.05
V vs I	IRC	20	0.649	<0.01
V vs VI	Paget	10	0.567	NS
VI vs I	Paget	10	0.353	NS
VI vs II	Paget	10	0.597	NS
VI vs III	Paget	10	0.557	NS

^a Para el resto de las correlaciones no mostradas $p < 0.001$.
 I = RIA OSTEOCALCINA; II = RIA OSTK-PR; III = RIA OSCAtest;
 IV = IRMA ELSA-OST-NAT; V = IRMA ELSA-OSTEO; VI = IRMA OSTEOCALCINA.
 IRC = Insuficiencia renal crónica.
 NS = No significativo.

La figura 8 muestra un ejemplo en el que las técnicas se correlacionaron de modo muy significativo (RIA OSCAtest vs IRMA ELSA-OST-NAT en el suero de sujetos controles) (serían intercambiables desde el punto de vista diagnóstico). Sin embargo, la figura 9 muestra un caso en el que la correlación entre los valores de BGP obtenidos por dos técnicas diferentes no fue significativa (RIA OSTK-PR vs IRMA OSTEOCALCINA en el suero de pacientes con enfermedad ósea de Paget).

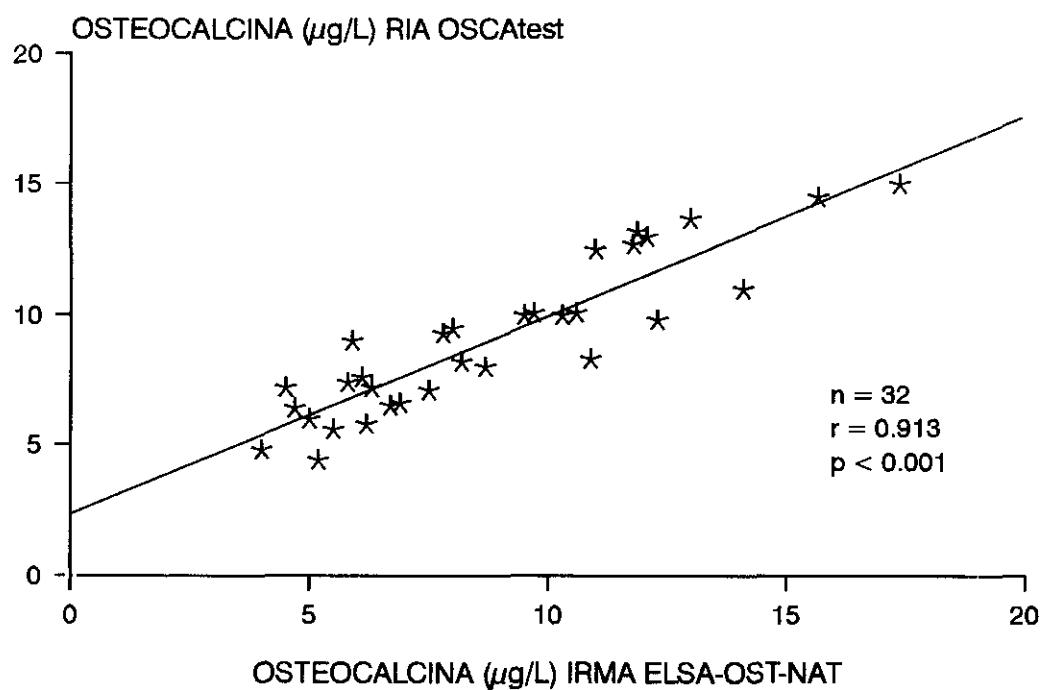


Figura 8: Correlación entre las concentraciones de osteocalcina medidas por el RIA OSCAtest y por el IRMA ELSA-OST-NAT en el suero de 32 sujetos adultos sanos.

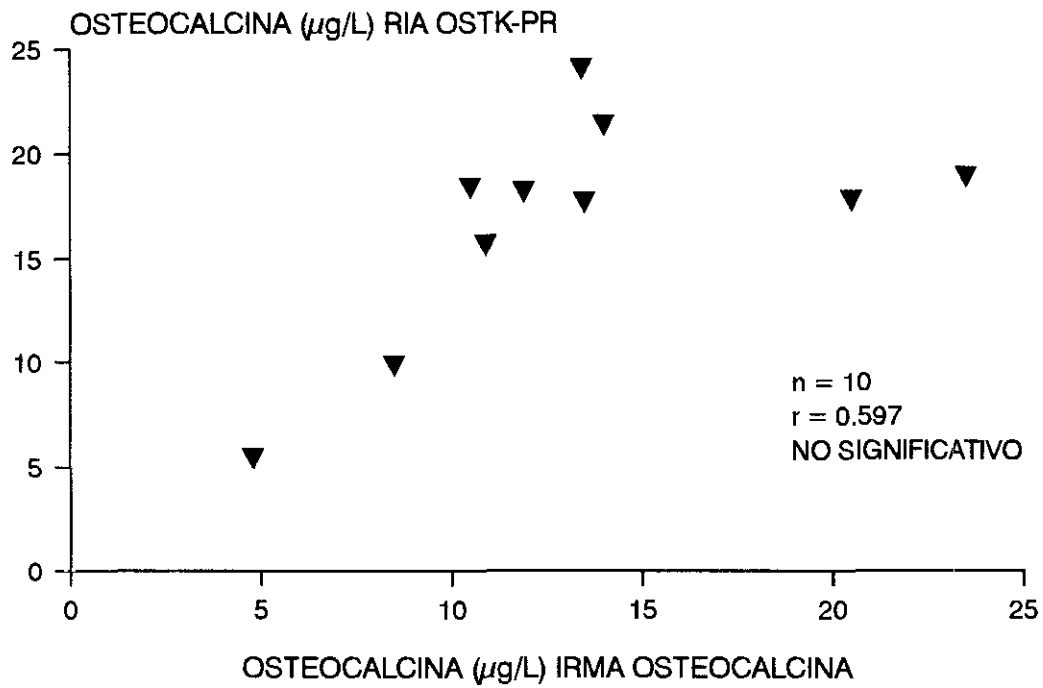


Figura 9: Correlación entre las concentraciones de osteocalcina medidas por el RIA OSTK-PR y por el IRMA OSTEOCALCINA en el suero de 10 pacientes con enfermedad ósea de Paget.

4.1.2 Reactividad cruzada de los anticuerpos anti-osteocalcina utilizados en los ensayos ELSA-OST-NAT, ELSA-OSTEO y OSCAtest con respecto a diversos fragmentos de osteocalcina.

Las figuras 10, 11 y 12 muestran la reactividad cruzada de los ensayos ELSA-OST-NAT, ELSA-OSTEO y OSCAtest, respectivamente, con respecto a diferentes fragmentos de BGP. Se ensayaron concentraciones crecientes de BGP intacta humana o fragmentos de BGP humana (descritos en el apartado 3.1.4 de Materiales y Métodos).

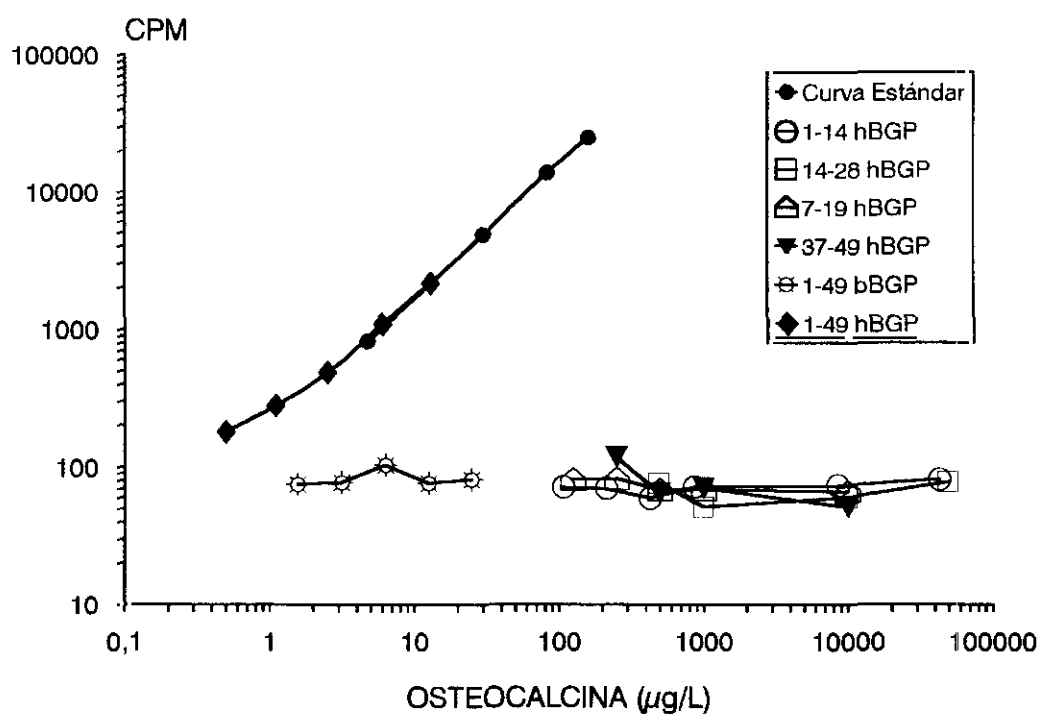


Figura 10: Reactividad cruzada del IRMA ELSA-OST-NAT con respecto a concentraciones crecientes de osteocalcina intacta humana (1-49 hBGP), osteocalcina intacta bovina (1-49 bBGP) y diferentes fragmentos sintéticos de osteocalcina humana (hBGP).

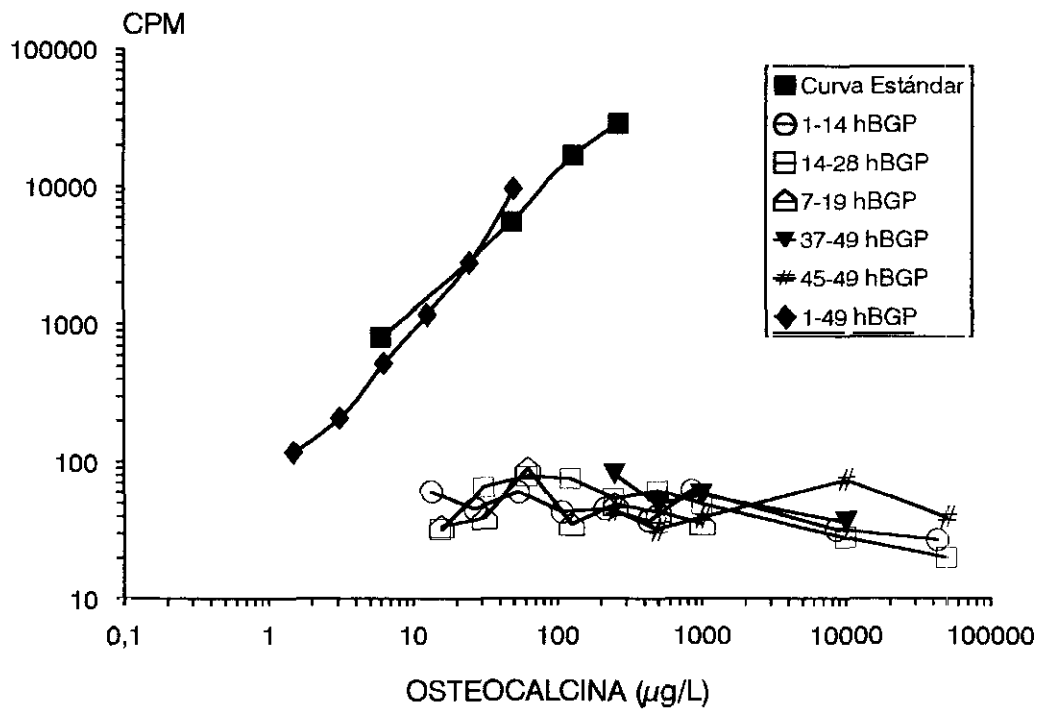


Figura 11: Reactividad cruzada del IRMA ELSA-OSTEO con respecto a concentraciones crecientes de osteocalcina intacta humana (1-49 hBGP) y diferentes fragmentos sintéticos de osteocalcina humana (hBGP).

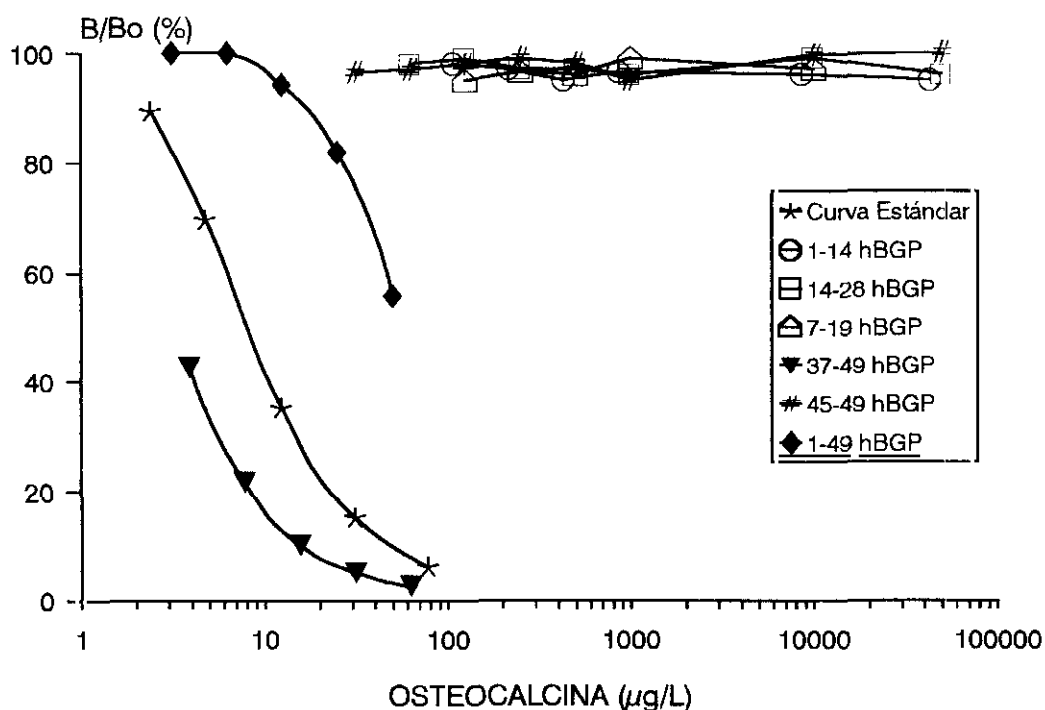


Figura 12: Reactividad cruzada del RIA OSCAtest con respecto a concentraciones crecientes de osteocalcina intacta humana (1-49 hBGP) y diferentes fragmentos sintéticos de osteocalcina humana (hBGP).

En los tres casos, la BGP intacta humana (1-49) presentó curvas paralelas a la curva estándar de cada ensayo. El único fragmento inmunorreactivo fue el 37-49 en el RIA OSCAtest (figura 12). Ninguno de los otros fragmentos estudiados presentó inmunorreactividad cruzada en los tres ensayos. Tampoco se obtuvo inmunorreactividad cruzada cuando la BGP bovina intacta se ensayó por el IRMA ELSA-OST-NAT.

4.2 Estudio de las diferentes formas inmunorreactivas de osteocalcina presentes en el medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos y en el suero de sujetos controles y de pacientes con diversas patologías óseas.

4.2.1 Purificación de la osteocalcina del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos y del suero humano por filtración en gel Sephadex G-50 medium.

4.2.1.1 Calibración de la columna de Sephadex G-50 medium.

A partir del cromatograma obtenido mediante la aplicación de estándares de distintas masas moleculares a la columna de Sephadex G-50 medium, se obtuvieron los V_e correspondientes.

El V_o de la columna, que corresponde al V_e de la albúmina sérica bovina, fue de 192 mL. El V_t , correspondiente al V_e del rojo de fenol, resultó ser de 630 mL. Los V_e de las proteínas aplicadas, inhibidor de tripsina, ribonucleasa A e insulina bovina fueron 222 mL, 300 mL y 468 mL, respectivamente. El K_{av} , calculado a partir de la ecuación $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$, para cada proteína fue de 0.07 para el inhibidor de tripsina, 0.25 para la ribonucleasa A y 0.63 para la insulina.

La figura 13 muestra la curva de calibración de la columna de Sephadex G-50 medium obtenida al representar el K_{av} de las tres proteínas aplicadas frente al logaritmo de su masa molecular.

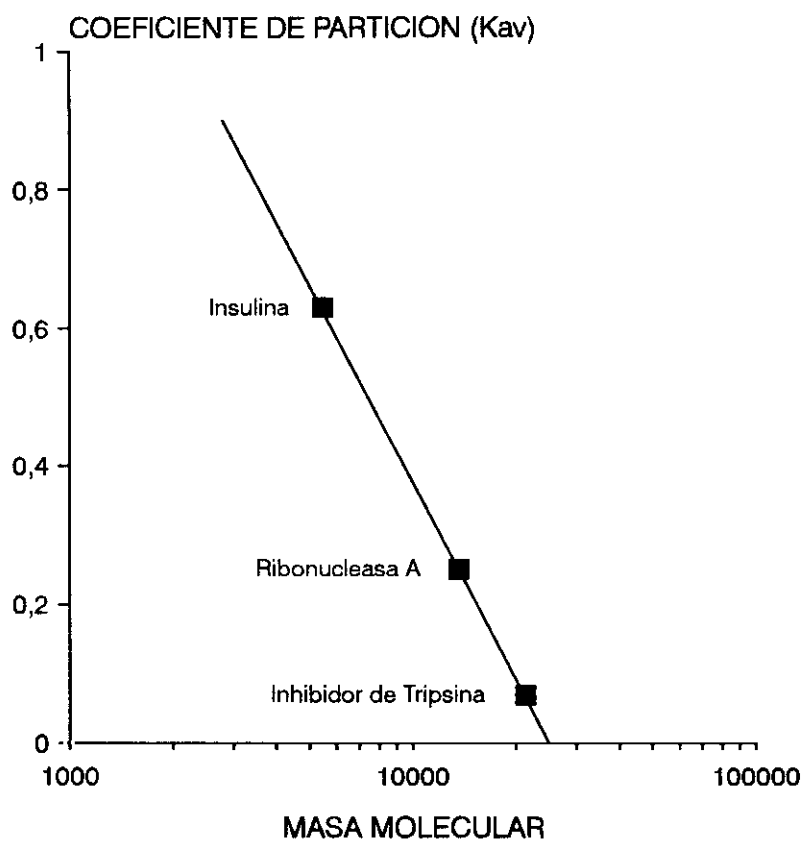


Figura 13: Curva de calibración de la columna de Sephadex G-50 medium.

4.2.1.2 Determinación de la masa molecular aparente de osteocalcina intacta humana y del fragmento 38-49 de osteocalcina humana.

Se midió la radiactividad de las 110 fracciones obtenidas tras la aplicación a la columna de Sephadex G-50 medium de 500 μ l (aproximadamente 80000 cpm) de BGP humana marcada con 125 I. El máximo de radiactividad se obtuvo en la fracción 50. Esta fracción corresponde a un V_e de 300 mL y a un K_{av} de 0.25, que extrapolado en la curva de calibración indicaría una masa molecular aparente para la BGP humana de 13800 Da.

El máximo de radiactividad en las fracciones obtenidas tras la purificación a través de Sephadex G-50 medium del fragmento 38-49 de BGP humana marcado con 125 I, se obtuvo en la fracción 90 ($V_e = 540$). Extrapolando el valor de su K_{av} (0.79) en la curva de calibración se calculó una masa molecular aparente para el fragmento 38-49 de BGP humana de 3700 Da.

4.2.1.3 Purificación de la osteocalcina del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos a través de Sephadex G-50 medium.

Previamente a la aplicación del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos a través de Sephadex G-50 medium se midieron los niveles de BGP por los tres ensayos seleccionados para esta parte del estudio. Los niveles de BGP en el medio de cultivo ($n = 10$) fueron: $17.9 \pm 8.1 \mu\text{g/L}$ (ELSA-OST-NAT), $25.4 \pm 9.1 \mu\text{g/L}$ (ELSA-OSTEO) y $8.2 \pm 3.0 \mu\text{g/L}$ (OSCAtest).

La figura 14 muestra los perfiles de elución a través de Sephadex G-50 medium de la BGP inmunorreactiva por los tres ensayos empleados, procedente del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos. Como puede observarse, la BGP eluye en dos picos, uno correspondiente al V_0 de la columna y otro situado entre las fracciones 38 y 60, con un máximo en las fracciones 48-50 por los tres ensayos.

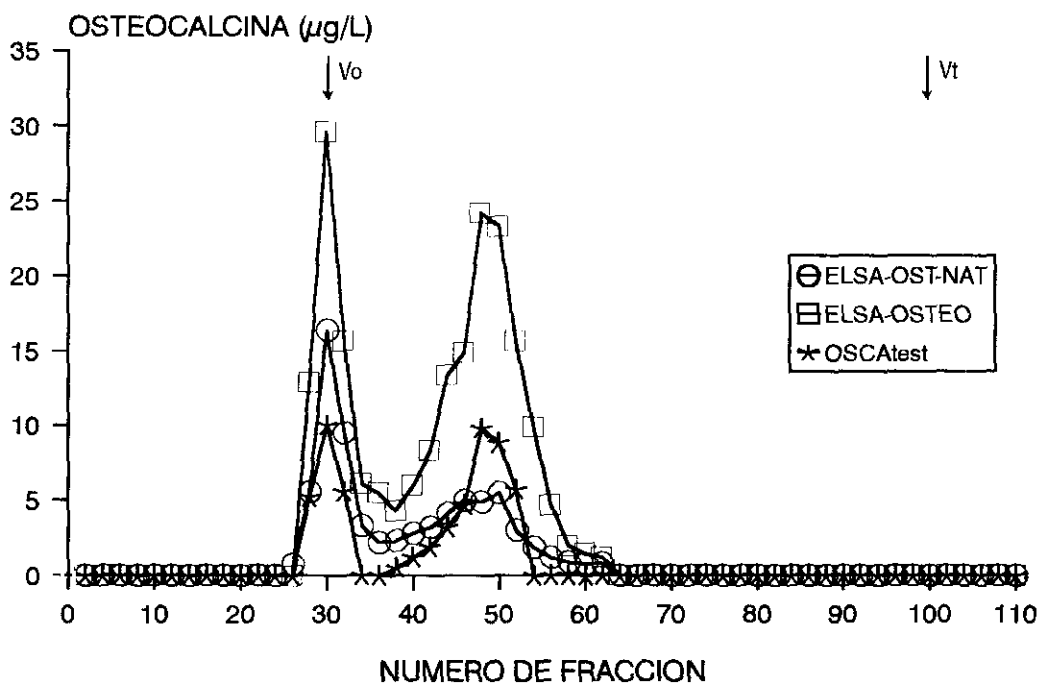


Figura 14: Perfiles de elución a través de Sephadex G-50 medium de la osteocalcina inmunorreactiva procedente de una mezcla de medios condicionados del cultivo de osteoblastos humanos. Se han utilizado los ensayos: IRMA ELSA-OST-NAT, IRMA ELSA-OSTEO y RIA OSCAtest. (Flujo = 0.5 mL/min; Volumen de cada fracción = 6 mL; V_0 = Volumen de exclusión; V_t = Volumen total).

4.2.1.4 Purificación de la osteocalcina del suero de sujetos controles y de pacientes con diversas patologías óseas a través de Sephadex G-50 medium.

La tabla X muestra los niveles de BGP de las muestras de suero utilizadas en esta parte del estudio, procedentes de sujetos controles y de pacientes con insuficiencia renal crónica, enfermedad ósea de Paget y osteoporosis postmenopáusica, por los tres ensayos de BGP descritos en el apartado 3.2.4 de Materiales y Métodos.

Tabla X: Concentraciones de osteocalcina sérica en los sujetos controles y en los pacientes con insuficiencia renal crónica, enfermedad ósea de Paget y osteoporosis postmenopáusica utilizados para el estudio de las formas circulantes inmunorreactivas de osteocalcina.

Ensayo	Osteocalcina ($\mu\text{g/L}$)			
	Control (n = 32)	IRC (n = 20)	Paget (n = 19)	OSP (n = 16)
IRMA ELSA-OST-NAT	9.4 \pm 3.2	20.2 \pm 10.3	33.7 \pm 12.2	10.5 \pm 3.0
IRMA ELSA-OSTEO	18.9 \pm 8.4	90.5 \pm 30.2	54.1 \pm 20.1	20.3 \pm 6.2
RIA OSCAtest	10.0 \pm 3.6	30.0 \pm 14.3	21.2 \pm 8.4	12.3 \pm 2.7

Los resultados expresan media \pm desviación estándar.

IRC = Insuficiencia renal crónica.

OSP = Osteoporosis postmenopáusica.

La figura 15 muestra los perfiles de elución a través de Sephadex G-50 medium de la BGP inmunorreactiva procedente de una mezcla de sueros de sujetos controles por los tres ensayos de BGP descritos en el apartado 3.2.4 de Materiales y Métodos. Los perfiles obtenidos al purificar sueros de pacientes con las patologías óseas estudiadas son similares. La BGP inmunorreactiva por los ensayos ELSA-OST-NAT y ELSA-OSTEO procedente de la purificación de los sueros de sujetos controles eluye en un único pico con un máximo situado en las fracciones 50-52.

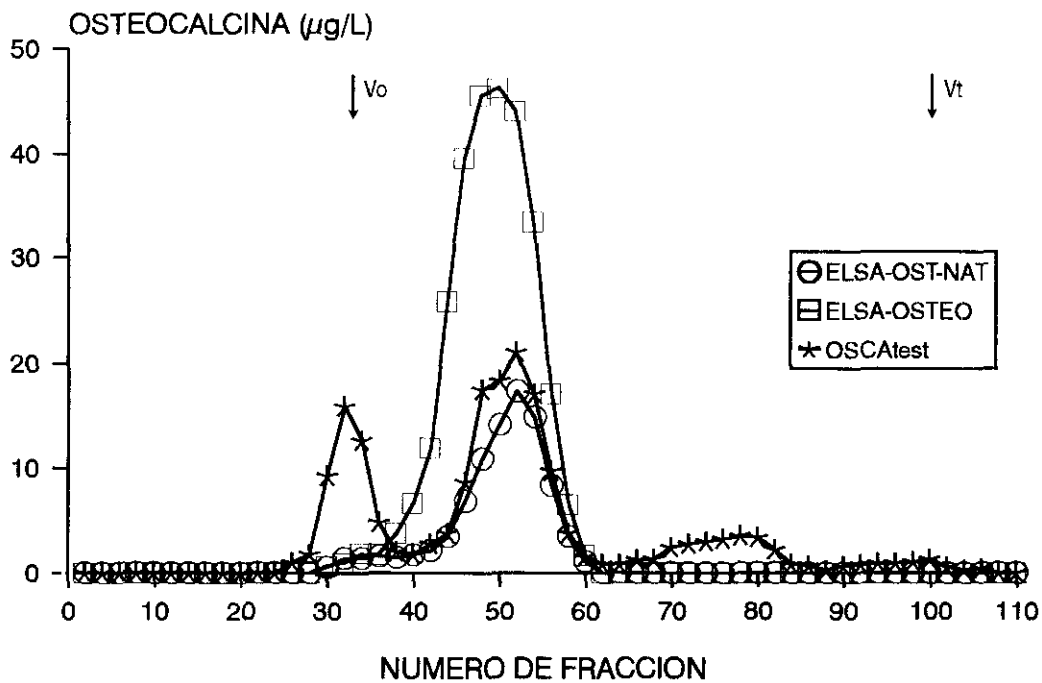


Figura 15: Perfiles de elución a través de Sephadex G-50 medium de la osteocalcina inmunorreactiva procedente de una mezcla de sueros de sujetos adultos sanos. Se han utilizado los ensayos: IRMA ELSA-OST-NAT, IRMA ELSA-OSTEO y RIA OSCAtest. (Flujo = 0.5 mL/min; Volumen de cada fracción = 6 mL; V_o = Volumen de exclusión; V_t = Volumen total).

En el caso de la BGP inmunorreactiva por el ensayo OSCAtest, en el perfil de elución se observan tres picos situados respectivamente, en el Vo de la columna, entre las fracciones 38 y 60 con un máximo en la fracción 52 y entre las fracciones 70 y 82 sin un máximo definido.

La recuperación de BGP en el proceso de purificación por Sephadex G-50 medium fue de $70 \pm 14\%$ ($n = 10$).

4.2.2 Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina procedente de Sephadex G-50 medium.

4.2.2.1 Purificación por cromatografía líquida de alta presión de osteocalcina intacta procedente de hueso humano.

La figura 16 muestra el perfil cromatográfico de la BGP inmunorreactiva por el IRMA ELSA-OST-NAT resultante de la inyección en HPLC de BGP purificada de hueso humano. El pico cuantitativamente más importante detectado corresponde a un 32.4% de AcN (pico designado como 42, por la posición de su máximo). Este ensayo también detecta otro pico, cuantitativamente menos importante, que corresponde a un 31.6% de AcN (pico 38).

La recuperación de BGP en el proceso de purificación por HPLC fue de $74 \pm 10\%$ ($n = 10$).

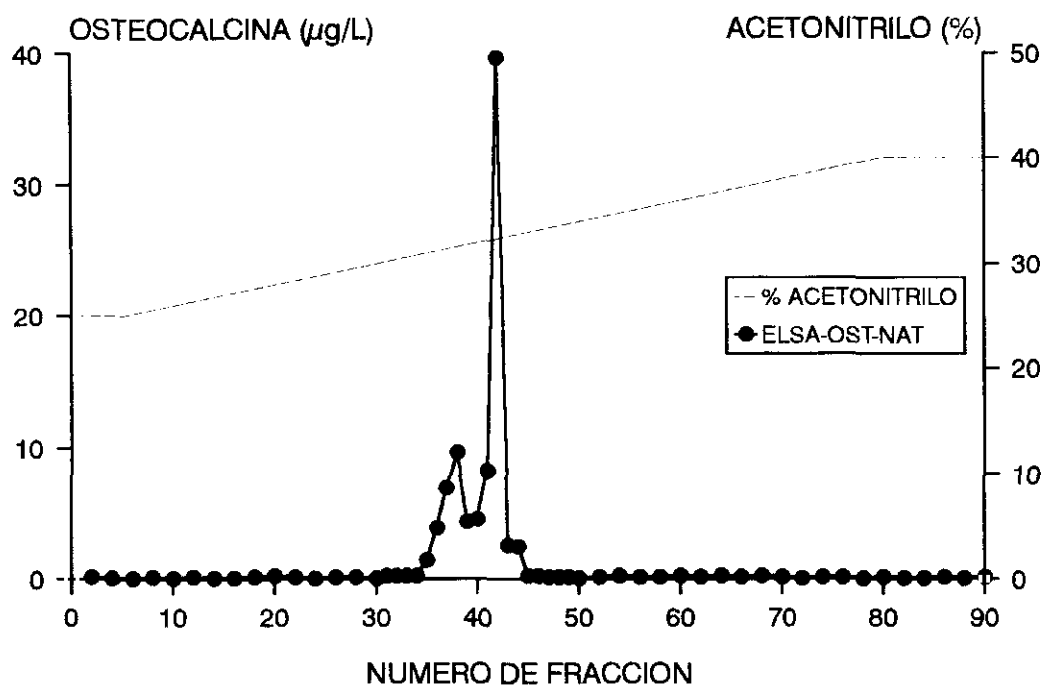


Figura 16: Perfil de elución de la osteocalcina inmunorreactiva procedente de hueso humano purificada a través de cromatografía líquida de alta presión en fase reversa. (Ver apartados 3.2.6.1 y 3.2.6.2 de Materiales y Métodos para las condiciones de purificación).

4.2.2.2 Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos, tras filtración a través de Sephadex G-50 medium.

La figura 17 presenta los perfiles cromatográficos de la BGP inmunorreactiva por los tres ensayos utilizados, obtenidos tras la purificación por HPLC del medio condicionado de osteoblastos humanos, purificado previamente por filtración en gel.

Los tres métodos empleados, detectan 5 picos que corresponden a 29.6% de AcN el pico 28, 30.2% de AcN el pico 31, 31.0% de AcN el pico 35, 31.6% de AcN el pico 38 y 32.4% de AcN el pico 42. Los picos son designados por la posición de sus máximos.

Sólo el RIA OSCAtest detecta además los picos 3 (fracción no retenida, que corresponde a un 25.0% de AcN), 19 (27.8% de AcN), 22 (28.4% de AcN) y 25 (29.0% de AcN).

En la figura 18 se muestran los porcentajes de cada uno de los picos inmunorreactivos observados en la figura 17, con respecto al total de la BGP de cada cromatograma. Cada porcentaje representa el valor medio de los resultados obtenidos en dos inyecciones distintas en el HPLC.

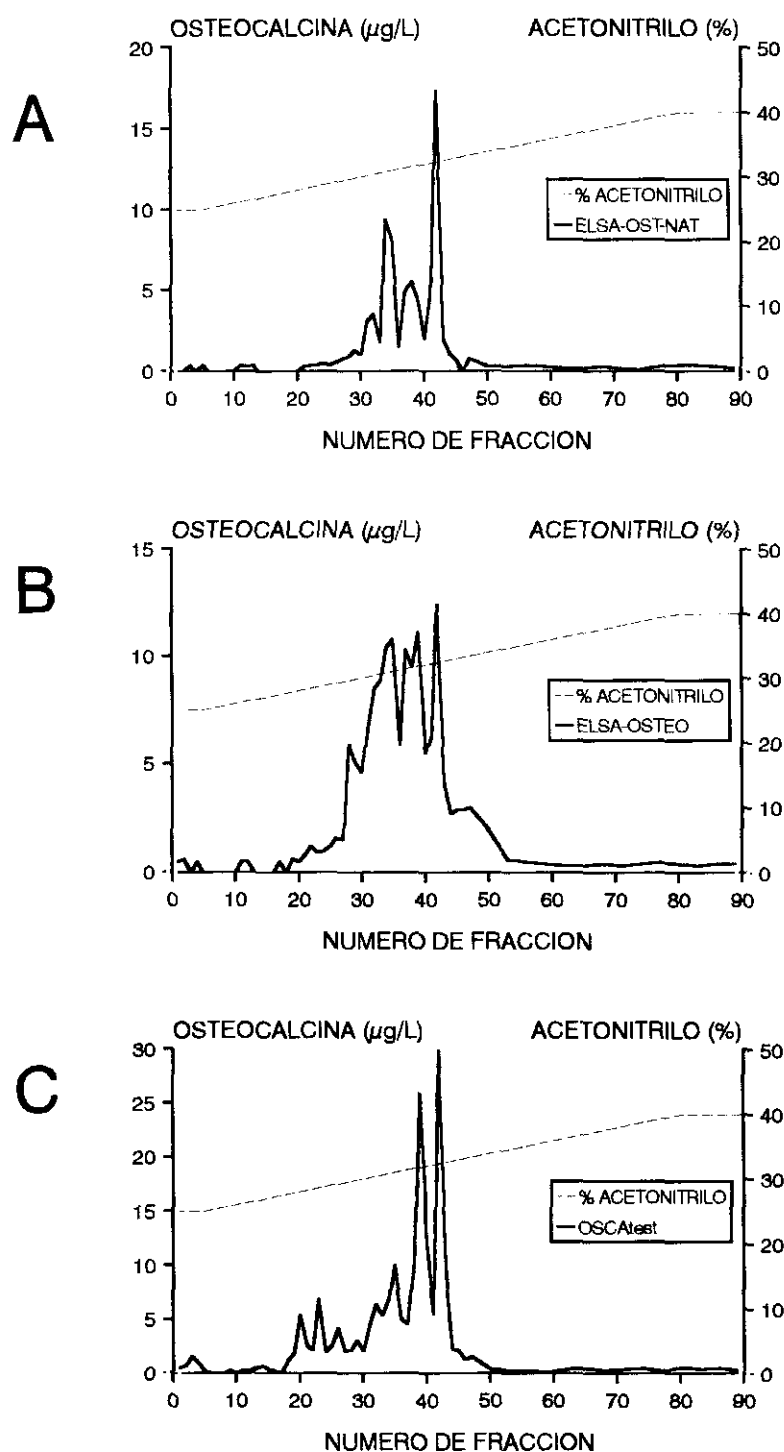


Figura 17: Perfiles de elución de la osteocalcina inmunorreactiva tras la purificación por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa de una mezcla de medios condicionados del cultivo de osteoblastos humanos, purificada previamente por filtración en gel. (A = IRMA ELSA-OST-NAT; B = IRMA ELSA-OSTEO; C = RIA OSCAtest). (Ver apartados 3.2.6.1 y 3.2.6.3 de Materiales y Métodos para las condiciones de purificación).

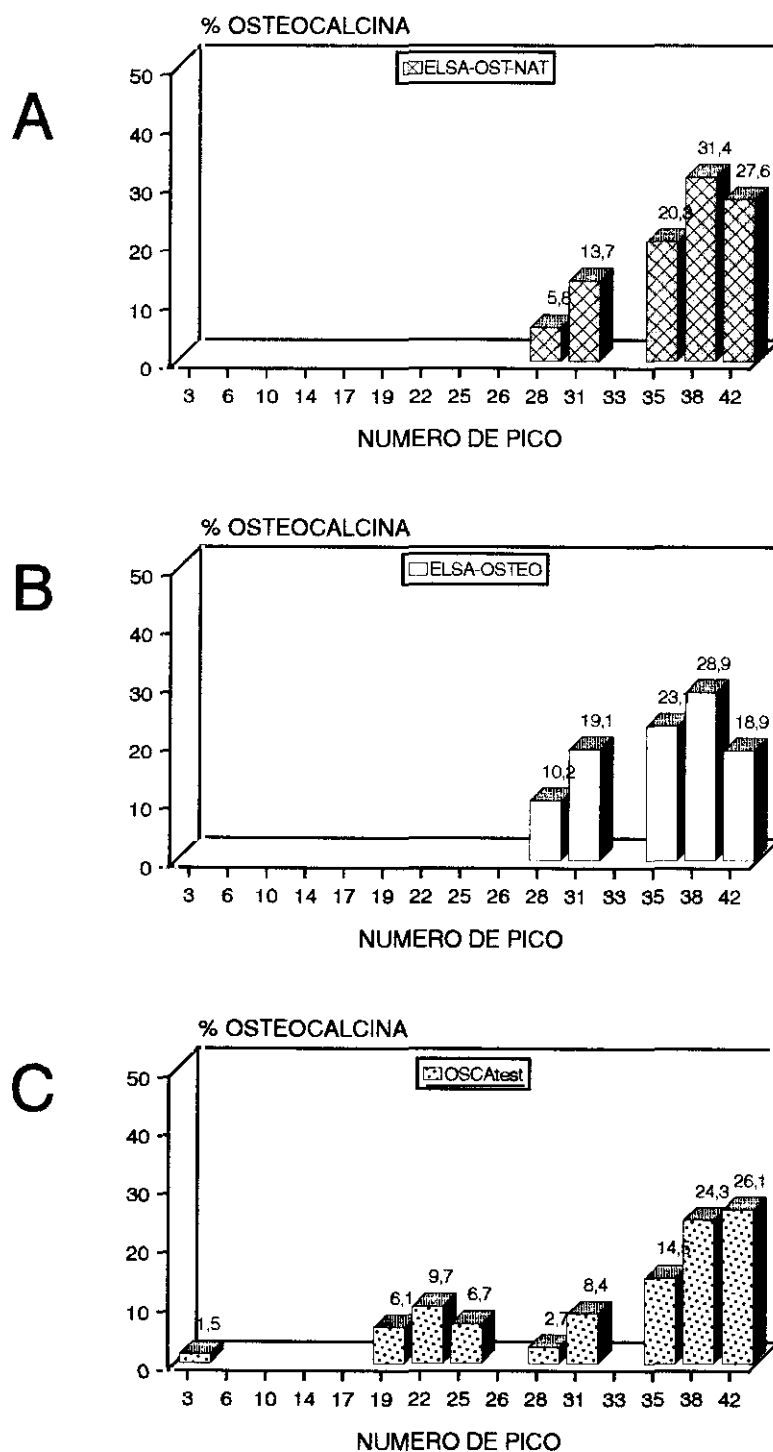


Figura 18: Porcentaje de osteocalcina inmunorreactiva, con respecto a la osteocalcina total determinada por cada uno de los ensayos, en los picos obtenidos de la purificación por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos (figura 17). Los picos se designan por la posición de sus máximos. (A = IRMA ELSA-OST-NAT; B = IRMA ELSA-OSTEO; C = RIA OSCAtest).

4.2.2.3 Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina del suero de sujetos controles, tras filtración a través de Sephadex G-50 medium.

La figura 19 muestra los perfiles cromatográficos de la BGP inmunorreactiva por los tres ensayos utilizados, tras la purificación por HPLC del suero de sujetos controles, purificado previamente por filtración en gel.

Por los tres ensayos se detectan los picos cuyos máximos se encuentran en las fracciones 6 (25.2% AcN), 28 (29.6% AcN), 31 (30.2% AcN), 35 (31.0% AcN), 38 (31.6% AcN) y 42 (32.4% AcN). Los picos 3 (25.0% AcN) y 22 (28.4% AcN) son detectados por los ensayos ELSA-OSTEO y OSCAtest. El pico cuyo máximo se encuentra en la fracción 33 (30.6% AcN) sólo se detecta por el método ELSA-OSTEO y el pico 19 (27.8% AcN) sólo por el método OSCAtest.

En la figura 20 se muestran los porcentajes de cada uno de los picos inmunorreactivos observados en la figura 19, con respecto al total de la BGP de cada cromatograma. Cada porcentaje representa el valor medio de los resultados obtenidos en dos inyecciones distintas de HPLC.

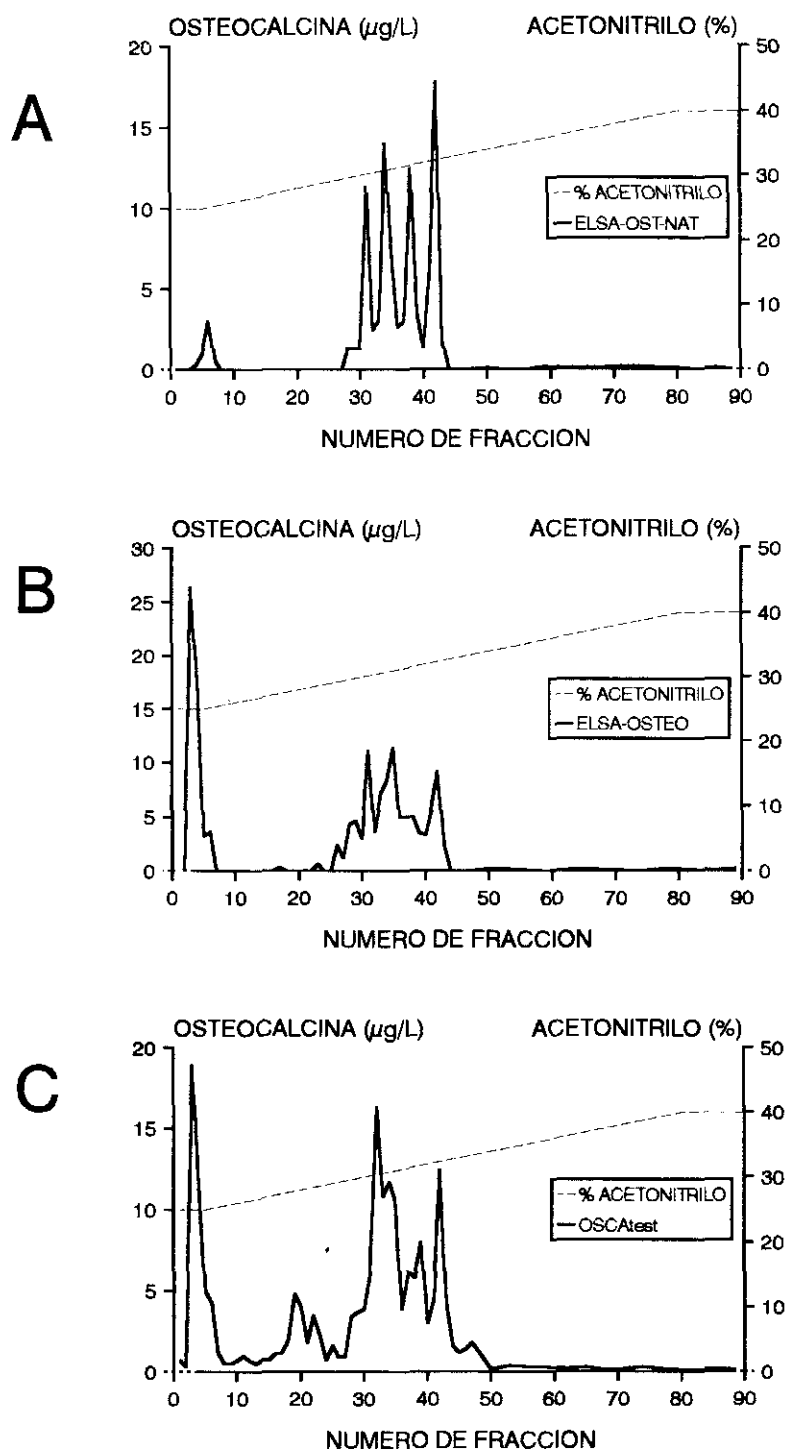


Figura 19: Perfiles de elución de la osteocalcina inmunorreactiva tras la purificación por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa de una mezcla de sueros procedentes de sujetos adultos sanos, purificada previamente por filtración en gel. (A = IRMA ELSA-OST-NAT; B = IRMA ELSA-OSTEO; C = RIA OSCAtest). (Ver apartados 3.2.6.1 y 3.2.6.3 de Materiales y Métodos para las condiciones de purificación).

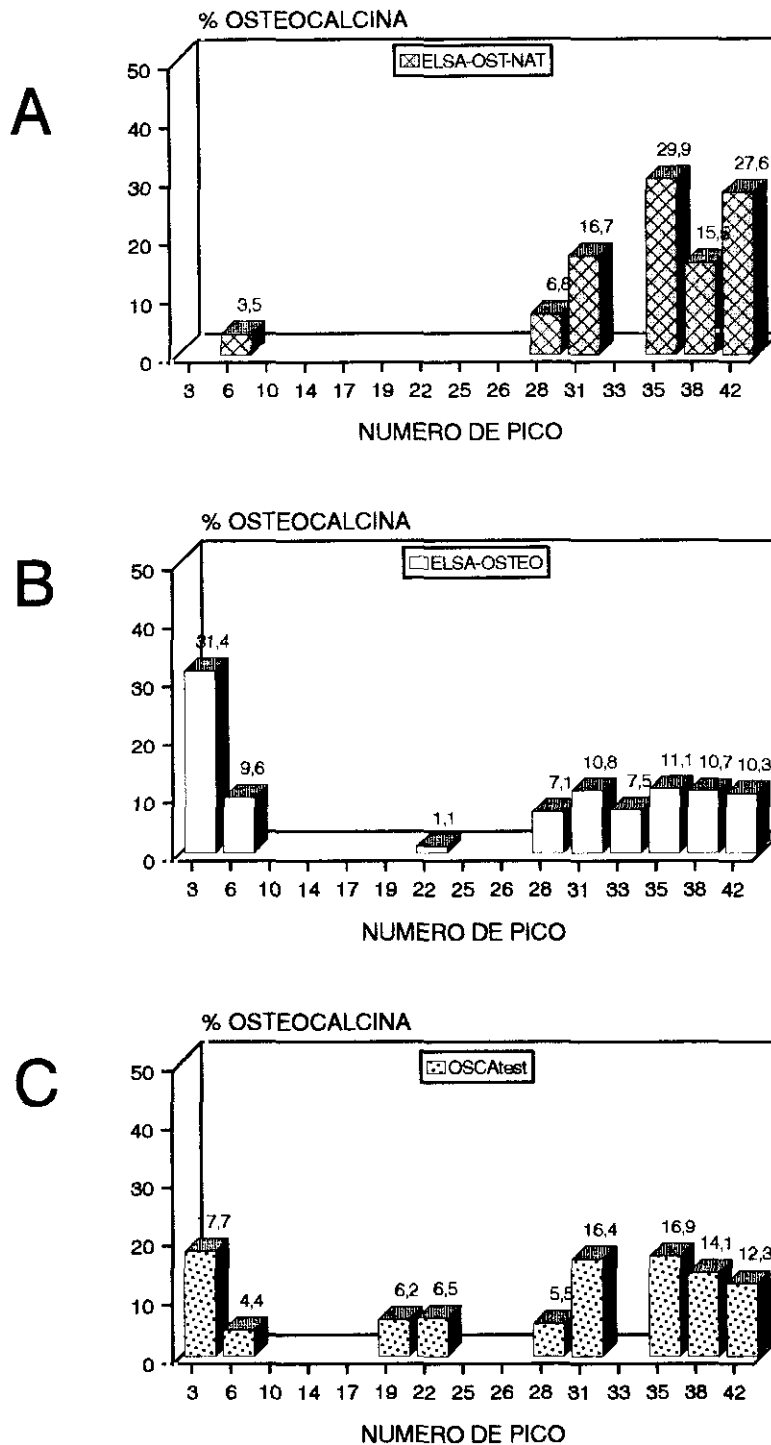


Figura 20: Porcentaje de osteocalcina inmunorreactiva, con respecto a la osteocalcina total determinada por cada uno de los ensayos, en los picos obtenidos de la purificación por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa de suero procedente de sujetos adultos sanos (figura 19). Los picos se designan por la posición de sus máximos. (A = IRMA ELSA-OST-NAT; B = IRMA ELSA-OSTEO; C = RIA OSCAtest).

4.2.2.4 Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina del suero de pacientes con insuficiencia renal crónica, tras filtración a través de Sephadex G-50 medium.

La figura 21 muestra los perfiles cromatográficos de la BGP inmunorreactiva por los tres métodos utilizados, tras la purificación por HPLC del suero de pacientes con insuficiencia renal crónica, purificado previamente por filtración en gel.

Por los tres ensayos se detectan los picos cuyos máximos se encuentran en las fracciones 28 (29.6% AcN), 31 (30.2% AcN), 35 (31.0% AcN) y 38 (31.6% AcN). Los picos 17 (27.4% AcN), 19 (27.8% AcN) y 22 (28.4% AcN) son detectados por los ensayos ELSA-OSTEO y OSCAtest. El ensayo ELSA-OSTEO detecta además los picos 14 (26.8% AcN) y 25 (29.0% AcN). Los picos 3 (25.0% AcN) y 10 (26.0% AcN) son detectados únicamente por el ensayo OSCAtest.

En la figura 22 se muestran los porcentajes de cada uno de los picos inmunorreactivos observados en la figura 21, con respecto al total de la BGP de cada cromatograma. Cada porcentaje representa el valor medio de los resultados obtenidos en dos inyecciones distintas de HPLC.

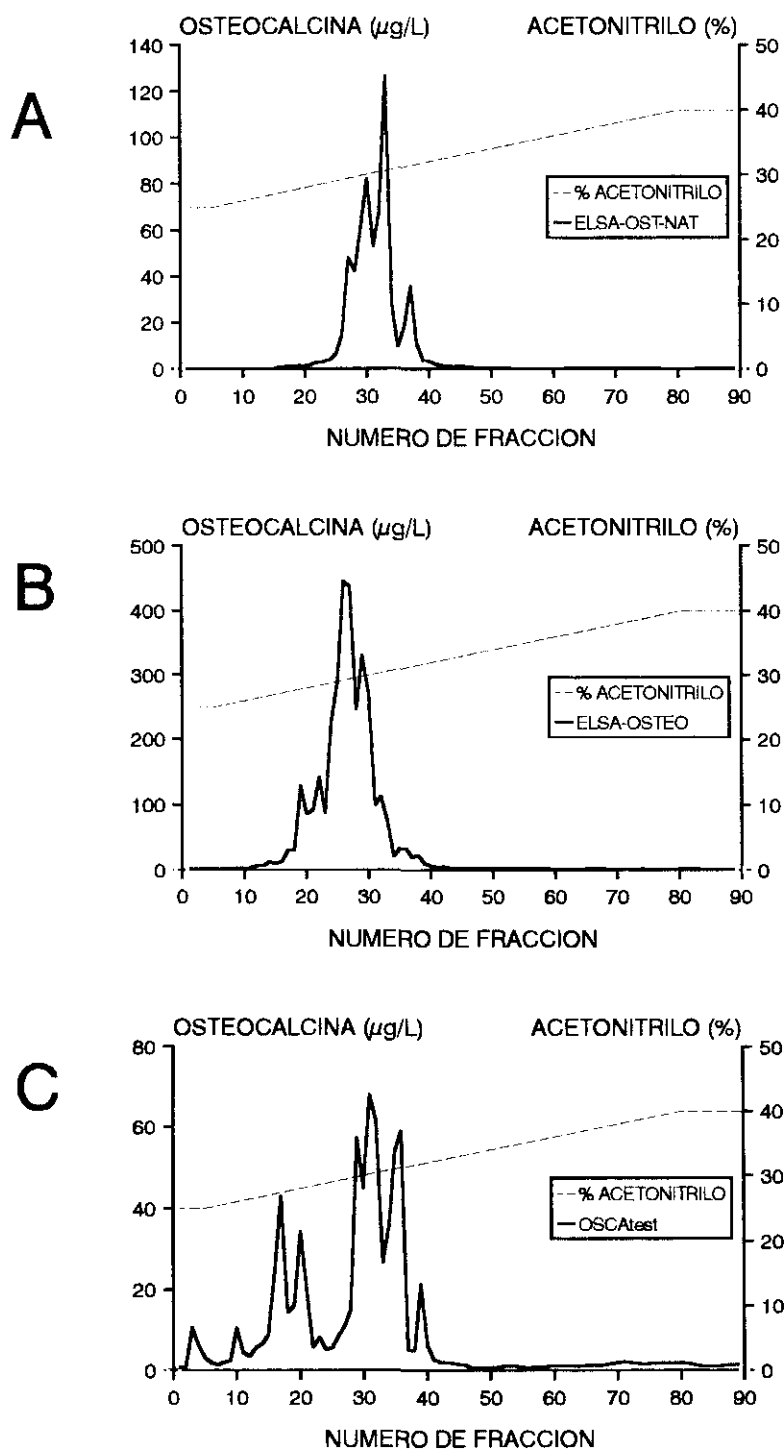


Figura 21: Perfiles de elución de la osteocalcina inmunorreactiva tras la purificación por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa de una mezcla de sueros procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica, purificada previamente por filtración en gel. (A = IRMA ELSA-OST-NAT; B = IRMA ELSA-OSTEO; C = RIA OSCAtest). (Ver apartados 3.2.6.1 y 3.2.6.3 de Materiales y Métodos para las condiciones de purificación).

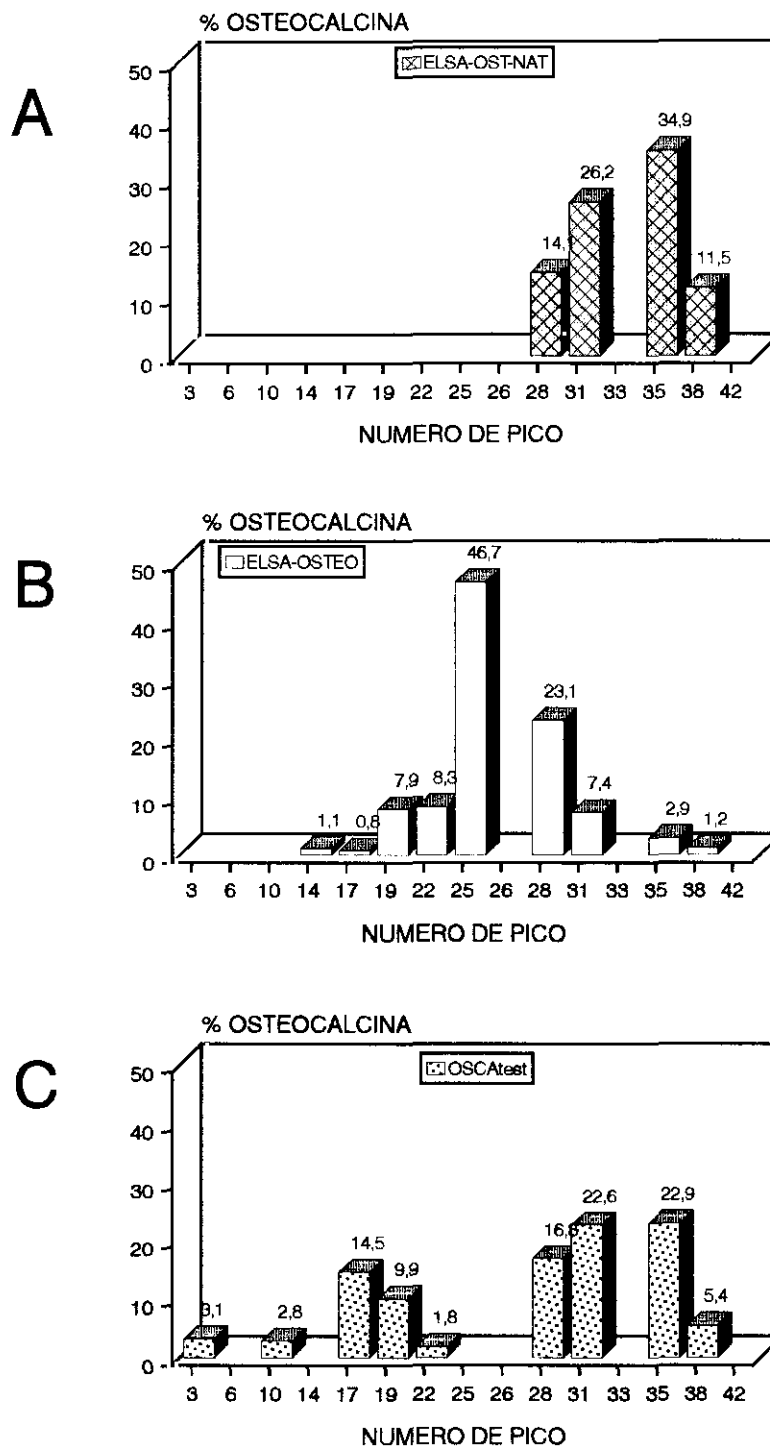


Figura 22: Porcentaje de osteocalcina inmunorreactiva, con respecto a la osteocalcina total determinada por cada uno de los ensayos, en los picos obtenidos de la purificación por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa de suero procedente de pacientes con insuficiencia renal crónica (figura 21). Los picos se designan por la posición de sus máximos. (A = IRMA ELSA-OST-NAT; B = IRMA ELSA-OSTEO; C = RIA OSCAtest).

4.2.2.5 Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina del suero de pacientes con enfermedad ósea de Paget, tras filtración a través de Sephadex G-50 medium.

La figura 23 muestra los perfiles cromatográficos de la BGP inmunorreactiva por los tres métodos utilizados, tras la purificación por HPLC del suero de pacientes con enfermedad ósea de Paget purificado previamente por filtración en gel.

Los tres métodos empleados detectan los picos cuyos máximos se encuentran en las fracciones 3 (25.0% AcN), 6 (25.2% AcN), 28 (29.6% AcN), 31 (30.2% AcN), 38 (31.6% AcN) y 42 (32.4% AcN). Por los ensayos ELSA-OSTEO y OSCAtest son detectados los picos 19 (27.8% AcN) y 22 (28.4% AcN). Los picos 14 (26.8% AcN), 17 (27.4% AcN), 25 (29.0% AcN) y 33 (30.6% AcN) son detectados por el ensayo ELSA-OSTEO y el pico 26 (29.2% AcN) por el ensayo OSCAtest.

En la figura 24 se muestran los porcentajes de cada uno de los picos inmunorreactivos observados en la figura 23, con respecto al total de la BGP de cada cromatograma. Cada porcentaje representa el valor medio de los resultados obtenidos en dos inyecciones distintas de HPLC.

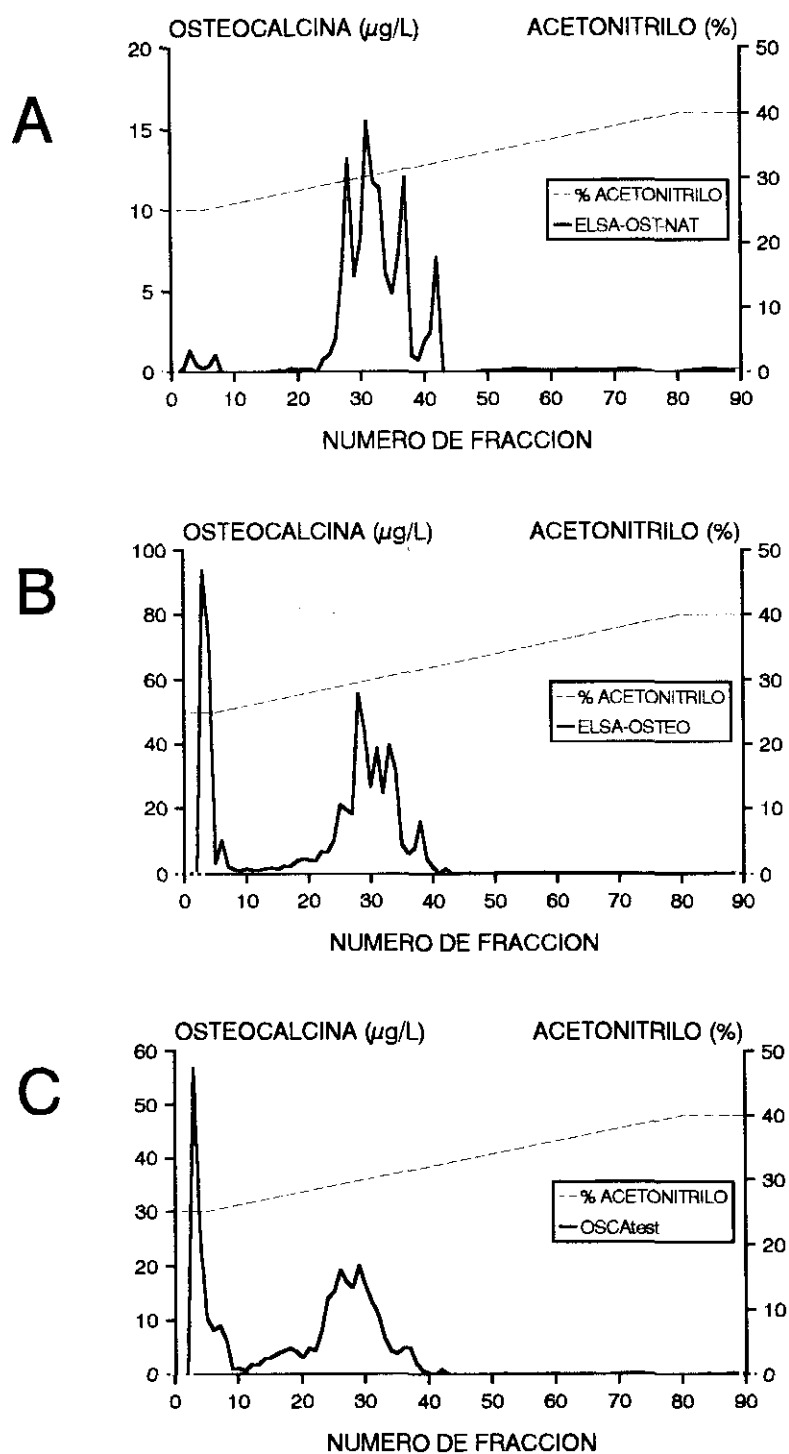


Figura 23: Perfiles de elución de la osteocalcina inmunorreactiva tras la purificación por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa de una mezcla de sueros procedentes de pacientes con enfermedad ósea de Paget, purificada previamente por filtración en gel. (A = IRMA ELSA-OST-NAT; B = IRMA ELSA-OSTEO; C = RIA OSCAtest). (Ver apartados 3.2.6.1 y 3.2.6.3 de Materiales y Métodos para las condiciones de purificación).

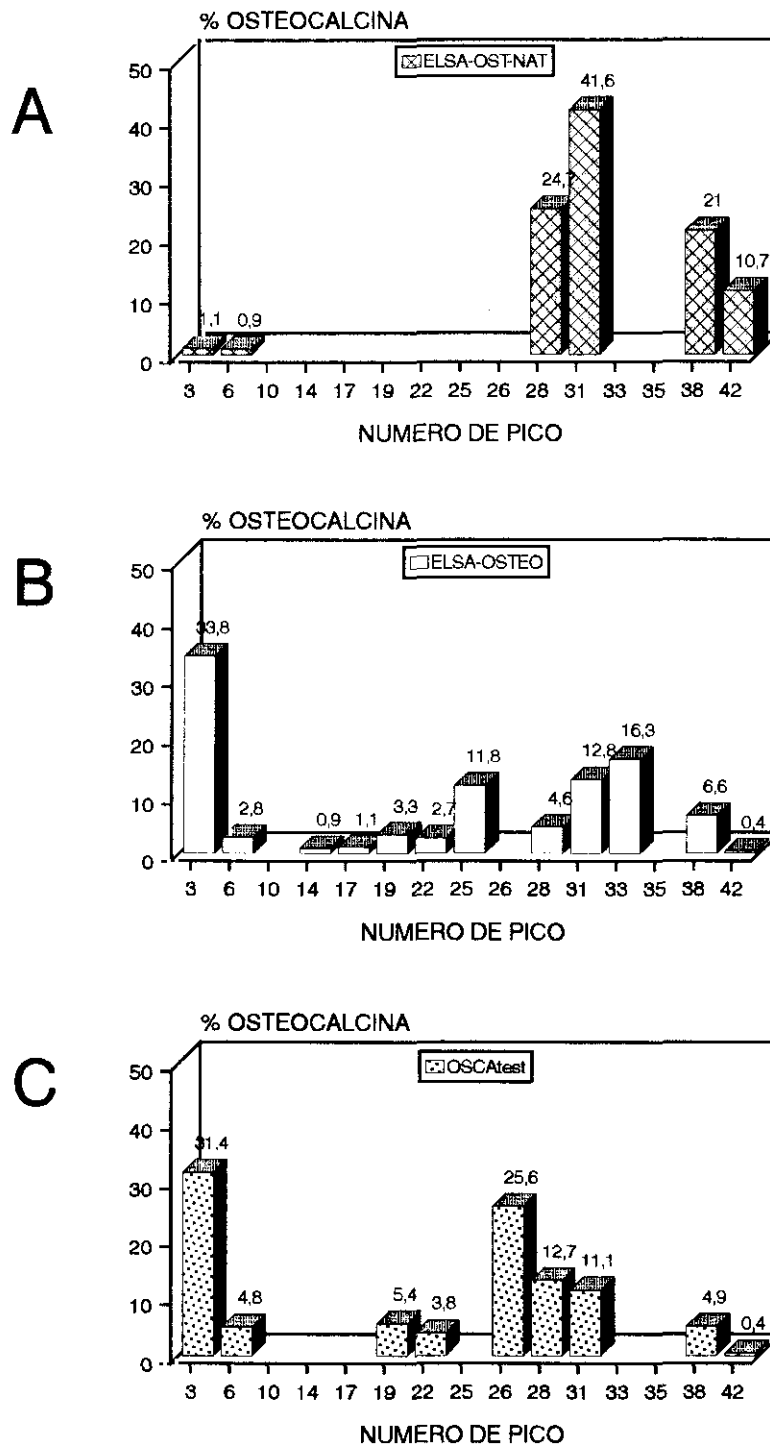


Figura 24: Porcentaje de osteocalcina inmunorreactiva, con respecto a la osteocalcina total determinada por cada uno de los ensayos, en los picos obtenidos de la purificación por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa de suero procedente de pacientes con enfermedad ósea de Paget (figura 23). Los picos se designan por la posición de sus máximos. (A = IRMA ELSA-OST-NAT; B = IRMA ELSA-OSTEO; C = RIA OSCAtest).

4.2.2.6 Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la osteocalcina del suero de pacientes con osteoporosis postmenopáusica, tras filtración a través de Sephadex G-50 medium.

La figura 25 muestra los perfiles cromatográficos de la BGP inmunorreactiva por los tres métodos utilizados, tras la purificación por HPLC del suero de pacientes con osteoporosis postmenopáusica, purificado previamente por filtración en gel.

Los picos 6 (25.2% AcN), 26 (29.2% AcN), 28 (29.6% AcN), 31 (30.2% AcN), 35 (31.0% AcN) y 38 (31.6% AcN) son detectados por los tres ensayos. Los ensayos ELSA-OSTEO y OSCAtest detectan además el pico 3 (25.0% AcN). El pico cuyo máximo se encuentra en la fracción 22 (28.4% AcN) es detectado únicamente por el ensayo ELSA-OSTEO.

En la figura 26 se muestran los porcentajes de cada uno de los picos inmunorreactivos observados en la figura 25, con respecto al total de la BGP de cada cromatograma. Cada porcentaje representa el valor medio de los resultados obtenidos en dos inyecciones distintas de HPLC.

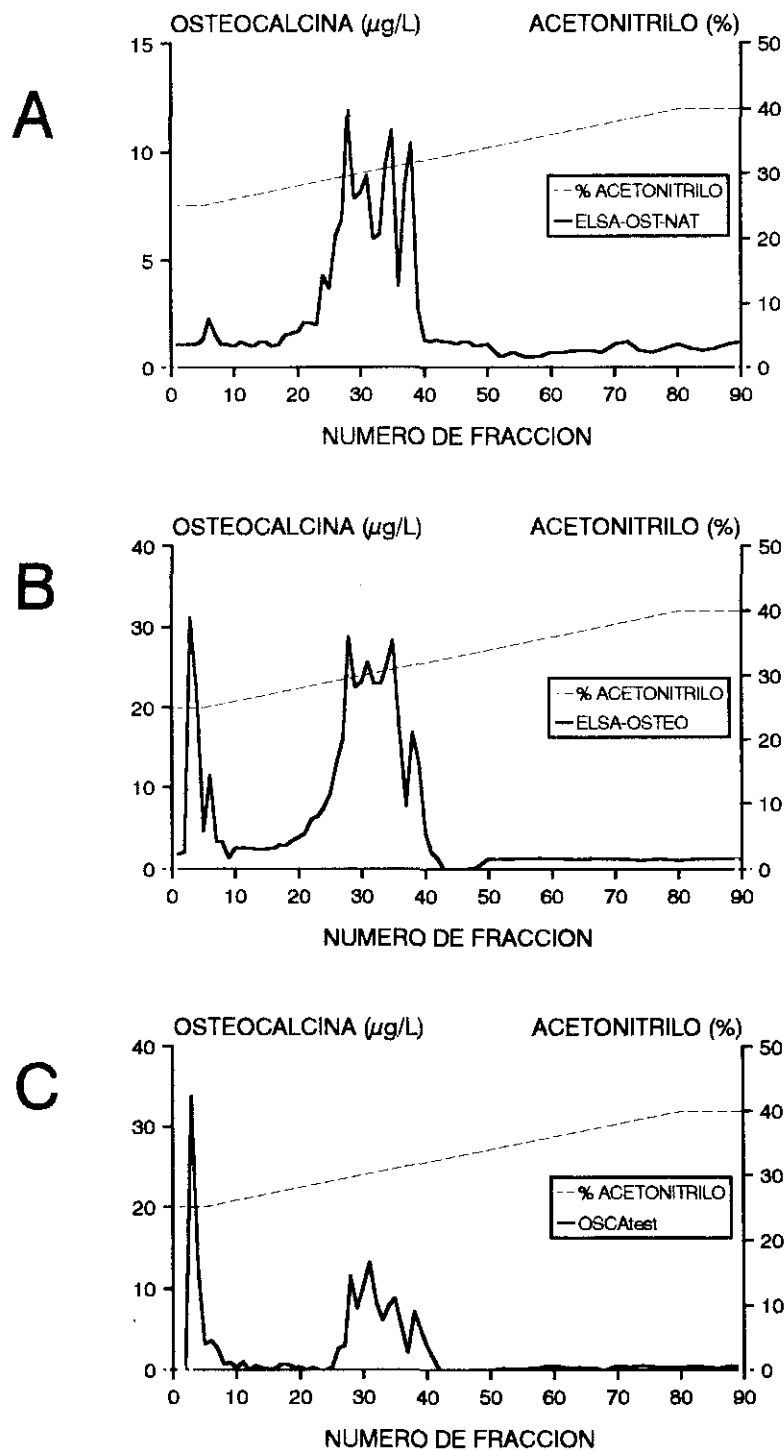


Figura 25: Perfiles de elución de la osteocalcina inmunorreactiva tras la purificación por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa de una mezcla de sueros procedentes de pacientes con osteoporosis postmenopáusia, purificada previamente por filtración en gel. (A = IRMA ELSA-OST-NAT; B = IRMA ELSA-OSTEO; C = RIA OSCAtest). (Ver apartados 3.2.6.1 y 3.2.6.3 de Materiales y Métodos para las condiciones de purificación).

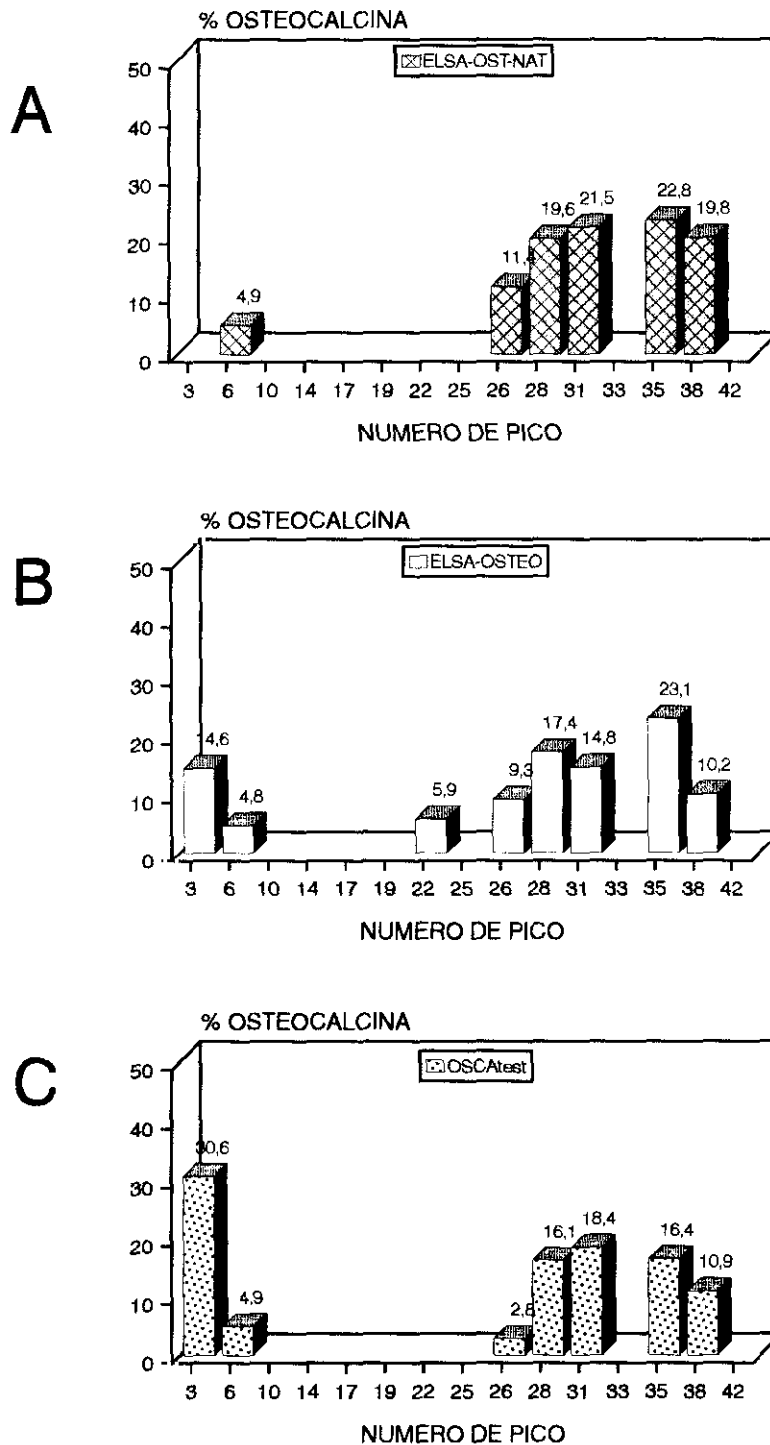


Figura 26: Porcentaje de osteocalcina inmunorreactiva, con respecto a la osteocalcina total determinada por cada uno de los ensayos, en los picos obtenidos de la purificación por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa de suero procedente de pacientes con osteoporosis postmenopáusia (figura 25). Los picos se designan por la posición de sus máximos. (A = IRMA ELSA-OST-NAT; B = IRMA ELSA-OSTEO; C = RIA OSCAtest).

5. DISCUSSION

5.1 Estudio comparativo de seis ensayos para la determinación de osteocalcina.

Como ya hemos mencionado en la Introducción, desde el descubrimiento de la BGP en 1975-1976, se han desarrollado multitud de ensayos para su determinación en suero o plasma, dado su gran potencial en la evaluación de la tasa de remodelado óseo en varios estados patológicos.

Los primeros ensayos desarrollados fueron RIAs, y posteriormente han aparecido otras técnicas (IRMAs y EIAs) que han supuesto una mejora debido a que utilizan en su mayoría anticuerpos monoclonales. A pesar de los avances en la tecnología empleada, se han obtenido resultados contradictorios en los niveles de BGP tanto en sujetos sanos como en pacientes con diversas patologías óseas. Por esta razón, nos planteamos como primera parte de este trabajo realizar el estudio comparativo de seis ensayos comerciales de BGP, y la búsqueda de las causas de estos resultados contradictorios. Además, esta primera parte nos ha servido para la selección de los ensayos que después hemos utilizado en la caracterización de las diferentes formas inmunorreactivas de BGP presentes en el suero y en el medio de cultivo de osteoblastos, estudio que constituye la segunda parte de esta tesis.

Como puede observarse en el capítulo de Resultados, todos los ensayos estudiados presentaban valores aceptables en sus coeficientes de variación intra e interensayo, ya que éstos eran iguales o inferiores al 10%.

El límite de detección es un dato muy interesante a la hora de valorar cualquier técnica, pero sobre todo en aquellas determinaciones en las que los valores bajos puedan tener una gran repercusión para el

diagnóstico clínico. Los resultados de nuestro estudio muestran que el límite de detección de los ensayos de BGP estudiados oscila entre 0.04 $\mu\text{g/L}$ para el IRMA OSTEOCALCINA y 1.2 $\mu\text{g/L}$ para el IRMA ELSA-OSTEO, considerándose todos aceptables. El valor del límite de detección de un ensayo de BGP podría tener mucha importancia en el caso, por ejemplo, del estudio de los pacientes tratados con glucocorticoides (131) o durante el embarazo (116), ya que en estas situaciones los niveles de BGP descienden, pudiendo incluso ser indetectables.

En cuanto a la linealidad de las diluciones, los resultados obtenidos muestran que es mejor en los IRMAs que en los RIAs estudiados. Dentro de los IRMAs, el porcentaje de recuperación oscila entre el 90% y el 110%. En el caso de los RIAs, se obtienen los porcentajes de recuperación más aceptables en el ensayo OSCAtest. Los peores resultados se obtienen en el RIA OSTK-PR.

El estudio de recuperación analítica muestra, en general, recuperaciones aceptables, entre 90% y 110%. Los IRMAs presentan mejores porcentajes de recuperación que los RIAs. En los RIAs OSTEOCALCINA y OSCAtest la recuperación media obtenida fue de $113.4 \pm 6.5 \%$ y $116.7 \pm 6.8 \%$, respectivamente, excediendo en ambos casos el rango anteriormente citado.

Como se muestra en el estudio de estandarización, hemos encontrado diferencias entre los ensayos. Estas diferencias deben ser tenidas en cuenta a la hora de evaluar los resultados absolutos. Estandarizaciones distintas dan lugar a resultados diferentes en la medida de una misma muestra de BGP. Una vez más se confirma la diferencia en la calibración del estándar de BGP, y esto no sólo ocurre en los ensayos propios de un determinado laboratorio, sino también en ensayos

disponibles comercialmente, como es nuestro caso. Delmas y cols. (105), en un protocolo realizado para estudiar la estandarización de 12 ensayos de BGP, la mayoría propios de laboratorios individuales, demostraron las diferencias en ésta. La obtención de diferentes valores absolutos de BGP en la misma muestra analizada por diferentes ensayos, no se corregía incluso después de la utilización de un estándar de BGP de referencia. En un trabajo más reciente de Masters y cols. (126), en el que comparan ocho métodos comerciales de BGP (cuatro comunes a los de nuestro estudio), ponen de manifiesto la diferente estandarización de los ensayos al analizar BGP humana sintética. Sólo con uno de los métodos (IRMA Mitsubishi) obtienen recuperaciones cercanas a las esperadas. En nuestro estudio, las mejores recuperaciones en el estudio de estandarización se obtienen en los IRMAs ELSA-OSTEO y ELSA-OST-NAT, y en el RIA OSCAtest, que son los ensayos que hemos elegido para realizar la segunda parte de este trabajo. Las diferencias observadas entre nuestro trabajo y el del grupo de Masters y cols., en el caso del IRMA ELSA-OSTEO y del RIA OSCAtest, podrían ser debidas a que en nuestro estudio empleamos BGP humana purificada de hueso, y Masters y cols. utilizan BGP humana sintética. Estos autores concluyen su estudio diciendo que los esfuerzos en mejorar la utilidad clínica de la BGP deberían estar encaminados hacia la estandarización de los ensayos más que al desarrollo de nuevos métodos.

Un aspecto fundamental a la hora de valorar los ensayos para la determinación de BGP, es la naturaleza de los fragmentos de esta molécula que un determinado ensayo puede detectar. Directamente relacionado con este hecho se encuentra la estabilidad de las muestras de suero en el laboratorio. Por ejemplo, si un ensayo detecta únicamente

la molécula de BGP intacta y ésta es degradada a fragmentos en el suero, a temperatura ambiente, la concentración de BGP medida será más baja si la conservación del suero en esas condiciones es prolongada. Sin embargo, si el ensayo detecta tanto la BGP intacta como otros fragmentos de la molécula, la cantidad total de BGP medida, después de la degradación en las muestras, será similar a los valores basales.

La naturaleza de los fragmentos de BGP circulantes en el suero de sujetos controles y en pacientes con diversas patologías es desconocida actualmente. En 1986, Farrugia y Melick (73) mostraron que el riñón e hígado de rata degradaban rápidamente BGP marcada radiactivamente. La BGP también se une al hidroxapatito y ésta debe ser la manera por la cual esta molécula se acumula en hueso; sin embargo, no se conoce mucho acerca de la absorción de BGP desde el hidroxapatito y la posible generación de fragmentos de BGP en estados metabólicos de elevada resorción ósea. Los fragmentos de BGP pueden ser producidos directamente por los osteoblastos; durante el catabolismo en hueso, hígado y riñón; o por degradación *in vitro* durante el almacenamiento de las muestras.

Se han detectado algunos fragmentos inmunorreactivos de BGP en pacientes con fallo renal crónico (77) y con enfermedad ósea de Paget (78). Otros autores también han demostrado la heterogeneidad inmunoquímica de la molécula de BGP intacta (123).

Las uniones Arg-Arg entre los residuos 19-20 y 43-44 en la BGP humana son susceptibles de rotura endoproteolítica (27), por tanto los principales productos del catabolismo de la BGP en hígado y riñón podrían ser los péptidos 1-19, 20-43, 45-49, 1-43 y 20-49, no pudiéndose descartar la presencia de otros.

Recientes hallazgos de Garnero y cols. (79) han mostrado que los fragmentos 1-19, 20-43 y 45-49, resultantes de la degradación endoproteolítica, representan juntos el 34% del total de BGP de los sujetos sanos, mientras que el fragmento N-terminal medio (1-43) y la BGP intacta constituyen el 30% y el 36%, respectivamente.

Con el fin de determinar la especificidad de los diferentes ensayos de BGP con respecto a los fragmentos de esta molécula detectados, hemos tratado las muestras de suero con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la región 43-49 de BGP humana. Desde un punto de vista teórico, el anticuerpo monoclonal utilizado debería unirse a los fragmentos de BGP 20-49 y 45-49, además de a la molécula intacta 1-49. Así, los fragmentos de BGP 1-19, 1-43 y 20-43 deberían permanecer en las muestras tratadas. Los resultados obtenidos sugieren que los ensayos RIA OSTEOCALCINA, RIA OSTK-PR, RIA OSCAtest, IRMA ELSA-OSTEO e IRMA OSTEOCALCINA detectan algunos o todos los fragmentos 1-19, 1-43 y 20-43, debido a la BGP residual en el suero después del tratamiento con el anticuerpo. Sin embargo, el ensayo ELSA-OST-NAT no detecta ninguno de los fragmentos de BGP que permanecen en el suero después del tratamiento con el anticuerpo.

A partir de los resultados obtenidos se podría concluir que el IRMA ELSA-OST-NAT detecta sólo la molécula de BGP intacta 1-49. De manera similar, el IRMA ELSA-OSTEO detecta la molécula de BGP intacta y fragmentos N-terminales medios, pudiendo ser uno de ellos el fragmento 1-43 caracterizado por Garnero y cols. (79). Por otra parte, el ensayo OSCAtest detecta fragmentos C-terminales de BGP (anticuerpo policlonal dirigido contra los aminoácidos 37-49 de BGP humana), y posiblemente algún fragmento tipo amino y/o de media molécula, además de la molécula intacta. En el caso de los otros ensayos estudiados, es difícil

determinar cuáles son los fragmentos detectados, y además se desconoce por completo la especificidad de los anticuerpos empleados.

En un trabajo publicado en 1992, Garneró y cols. (125) realizaron un estudio parecido al nuestro, en el que depleccionaron el suero de sujetos normales, pacientes con enfermedad ósea de Paget y pacientes con fallo renal, con el mismo anticuerpo monoclonal, dirigido contra la zona 43-49 de BGP, que hemos utilizado en este trabajo para estudiar la especificidad de los ensayos. Después de este tratamiento, los niveles residuales de BGP en las muestras fueron medidos por el IRMA ELSA-OSTEO y por el RIA OSTK-PR. Los resultados con el IRMA ELSA-OSTEO coinciden con los nuestros, pero en el caso del RIA difieren, ya que obtienen unos niveles residuales de BGP del 34% del total para los sujetos normales y del 28% para los pacientes con fallo renal crónico.

Nuestros resultados muestran que hay diferentes formas de BGP en las muestras de suero humano, y que los distintos anticuerpos utilizados en los diferentes ensayos de BGP no reconocen a todas por igual.

Un problema muy importante a la hora de la aplicabilidad clínica de la medida de la BGP, es la marcada inestabilidad de esta molécula en las muestras de suero. Un ensayo poco estable puede representar un serio problema a la hora de la recepción y almacenamiento de las muestras en un laboratorio clínico de tamaño medio o grande. Debido a este hecho, durante la realización de este trabajo se ha tenido especial cuidado en procesar todos los sueros y guardarlos a -60°C dentro de la primera hora después de la extracción de la sangre, con objeto de que la posible inestabilidad de la muestra no condujera a falsos resultados. En nuestro estudio, la estabilidad de los valores de BGP en

el suero a temperatura ambiente es muy buena en los IRMAs ELSA-OSTEO y OSTEOCALCINA, y si las muestras son recogidas en tubos especiales que tienen un estabilizador, en el RIA OSCAtest. Sin embargo, esta estabilidad es pobre en las muestras ensayadas por el IRMA ELSA-OST-NAT y en los otros RIAs, posiblemente debido a la degradación de las moléculas de BGP intacta en el suero a temperatura ambiente y a 4°C. En el caso del IRMA ELSA-OST-NAT, el cual probablemente detecta sólo la molécula intacta, esta degradación produce un descenso muy significativo en las concentraciones observadas de BGP.

Para los IRMAs ELSA-OSTEO y OSTEOCALCINA, la degradación de la molécula intacta debe producir otros fragmentos que pueden ser detectados por estos ensayos, no dando lugar a un descenso en las concentraciones de BGP.

En el caso de los RIAs estudiados, que emplean anticuerpos que detectan tanto la molécula intacta como los fragmentos, el descenso de las concentraciones de BGP podría ser debido a la transformación de los fragmentos iniciales y/o a la BGP intacta en otros fragmentos de BGP no detectables por estos ensayos.

Nuestros resultados están de acuerdo con los de Garnero y cols. (79,125), ya que estos autores encuentran que la concentración de BGP medida con un IRMA específico para la molécula intacta o con un RIA bovino convencional descendió rápidamente después de la incubación del suero a temperatura ambiente, mientras que la concentración total de BGP, intacta más fragmento N-terminal medio, no cambió.

Rosenquist y cols. (132) estudian la estabilidad de la BGP humana durante el almacenamiento de las muestras de suero a 4°C durante 7 días, y obtienen un descenso del 63% con respecto al nivel basal al

medir la BGP mediante un IRMA para BGP intacta, y un descenso del 10% cuando emplean un EIA que ellos denominan N-MID, y que probablemente detecta además de la forma intacta, el fragmento 1-43 de BGP.

También Banfi y cols. (133) realizan un estudio de la estabilidad in vitro de la BGP en muestras de sujetos sanos. Estos autores miden los niveles de BGP mediante un ensayo inmunoenzimático. En las muestras mantenidas a temperatura ambiente (1, 2, 3 y 5 h), la BGP descendió significativamente con respecto al valor basal. En las muestras mantenidas a 4°C, el descenso fue menor y sólo fue significativo a 3 y 5 h. Además, cuando adicionaron un inhibidor de proteasas a las muestras mantenidas a temperatura ambiente, observaron una estabilización de los niveles de BGP, aunque hubo mayores variaciones individuales.

En un trabajo publicado recientemente, Blumsohn y cols. (134) muestran también la inestabilidad de la BGP en el suero de sujetos adultos sanos al medir sus niveles mediante ocho ensayos disponibles comercialmente. En todos los casos, la conservación de las muestras a -20°C durante 4 semanas no tuvo efectos significativos en la concentración de BGP en comparación con las muestras conservadas a -75°C. Para muestras conservadas a 4°C durante 2 semanas y 4 semanas, la estabilidad difería entre los métodos. Tanto el IRMA ELSA-OSTEO como el IRMA OSTEOCALCINA mostraron poca degradación, confirmando nuestros resultados y los de Garner y cols. (79,125).

En nuestro estudio, en todos los casos, el porcentaje de pérdida observado en el suero de pacientes con fallo renal crónico fue más bajo que en el suero de sujetos controles, probablemente debido a la presencia de una elevada concentración basal de fragmentos de BGP en el suero de esos pacientes. Por lo tanto, una proporción más baja de

moléculas intactas, con respecto a la concentración total de BGP, sufrirán degradación.

Nuestros resultados, junto con todos los trabajos citados anteriormente, muestran que la inestabilidad de la BGP en el suero difiere cuando las medidas son realizadas con distintos ensayos de BGP.

Las patologías elegidas para este trabajo se seleccionaron por ser condiciones donde la BGP sérica presenta niveles diferentes de los normales. La enfermedad ósea de Paget (135), el fallo renal crónico (75) y algunos casos de osteoporosis (136), están asociados con aumento de las concentraciones de BGP. En este estudio hemos medido los niveles de BGP sérica en cuatro grupos: sujetos sanos, pacientes con insuficiencia renal crónica, pacientes con enfermedad ósea de Paget, y mujeres con osteoporosis postmenopáusica. Los resultados obtenidos muestran las diferencias existentes entre los valores absolutos de BGP en un mismo grupo cuando son medidos por los distintos ensayos, lo que estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, en el sentido de la diferente estandarización y especificidad de los métodos. El hecho de encontrar diferentes resultados con distintos ensayos de BGP, ha sido también descrito por otros autores (137). En todos los grupos, los niveles más altos de BGP se obtenían con el IRMA ELSA-OSTEO.

Debido a la diferencia de resultados obtenidos mediante las distintas técnicas de cuantificación de BGP, nos pareció interesante realizar un estudio sobre la posible correlación de los diferentes valores obtenidos. Hemos encontrado una correlación significativa entre los valores de BGP determinados por los diferentes ensayos, en el caso de los sujetos sanos y en el de las mujeres con osteoporosis postmenopáusica. Sin embargo, con el suero de pacientes con fallo renal

crónico no obtuvimos una correlación significativa en todos los casos. Esto también fue observado, y de una manera más acusada, con el suero de pacientes con enfermedad ósea de Paget. Estos hallazgos podrían ser debidos a los diferentes fragmentos de BGP, posiblemente acumulados en el suero de pacientes con fallo renal crónico, y a la diferente especificidad de los ensayos de BGP para su detección. Una situación similar se encontró con el suero de los pacientes con enfermedad ósea de Paget, en los cuales un proceso de elevada resorción ósea produciría la liberación de varios fragmentos de BGP en el suero.

Power y cols. (120), al revisar los valores descritos en la literatura para la BGP sérica y ordenar de manera creciente los valores correspondientes al grupo de mujeres normales, observaron que los valores de BGP en los pacientes con enfermedad ósea de Paget y en los pacientes con fallo renal crónico no seguían el mismo orden que en el caso de los sujetos normales. Según estos autores, la explicación más posible sería la presencia de diferentes formas inmunorreactivas de BGP en el suero de estos pacientes y que los distintos anticuerpos no reconocen a todas por igual.

También Hosoda y cols. (124), al correlacionar los niveles de BGP medidos en diferentes patologías por un nuevo EIA y por un RIA convencional, obtuvieron diferencias entre la pendiente de las rectas de los pacientes con fallo renal y el resto de las patologías. Hosoda y cols. atribuyeron estas diferencias a la acumulación de fragmentos circulantes de BGP en el suero de los pacientes con fallo renal.

Masters y cols. (126) estudiaron la concordancia entre ocho ensayos comerciales de BGP. Estos autores encontraron una importante divergencia clínica entre los resultados de los diferentes métodos,

especialmente en los pacientes con fallo renal, resultados que coinciden con los nuestros.

Aunque en general todos los métodos estudiados para la cuantificación de la BGP son de fácil realización, aceptables para su uso y los valores correlacionaron bien, habría que tener en cuenta las limitaciones y diferencias entre los diferentes ensayos. Una cuestión importante es que no sería apropiado emplearlos indistintamente en la realización de un estudio.

Como se ha expuesto a lo largo de esta Discusión, se ha realizado un estudio exhaustivo sobre las características de seis ensayos comerciales para la determinación de BGP, de amplia utilización en el mercado. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas de validación realizadas, y fundamentalmente en la estandarización y especificidad de los ensayos con respecto a los diferentes fragmentos de BGP, se han elegido los IRMAs ELSA-OST-NAT, ELSA-OSTEO y el RIA OSCAtest para la realización de la segunda parte de este trabajo: Estudio de las diferentes formas inmunorreactivas de BGP presentes en el medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos y en suero. Las razones para la elección de estos ensayos han sido las siguientes. En primer lugar, eran los ensayos que presentaban mejores resultados en las pruebas de estandarización, con lo cual los valores obtenidos se aproximaban más a los reales. Por otra parte, el ensayo ELSA-OST-NAT es el único que posiblemente sólo detecta la BGP intacta. El IRMA ELSA-OSTEO detecta, además de la molécula intacta, fragmentos de tipo N-terminal medio, y por último, el RIA OSCAtest es el único con un antisuero dirigido contra la zona C-terminal de la molécula de BGP. Por tanto, la utilización conjunta de los tres ensayos nos ha permitido una identificación más completa de

los fragmentos de BGP presentes en el suero y en el medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos.

Con objeto de corroborar los resultados obtenidos sobre la especificidad de los anticuerpos de estos tres métodos, se ensayó su reactividad cruzada con diferentes fragmentos sintéticos de BGP humana, así como con BGP intacta humana y bovina. Los tres ensayos presentaban reactividad cruzada con la BGP humana. El IRMA ELSA-OST-NAT no presentaba reactividad cruzada con la BGP bovina, ya que a pesar de la homología de secuencias en la zona C-terminal entre ambas especies, no es suficiente para que la BGP bovina sea detectada por este ensayo de tipo inmunorradiométrico, en el que está también implicada la zona N-terminal de la molécula. Por último, como era de esperar, el antisuero del RIA OSCAtest presentó inmunorreactividad cruzada con el fragmento 37-49 de BGP, y sin embargo, ninguno de los restantes fragmentos fue detectado por ninguno de los tres ensayos.

5.2 Estudio de las diferentes formas inmunorreactivas de osteocalcina presentes en el medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos y en el suero de sujetos controles y de pacientes con diversas patologías óseas.

En 1986 Gundberg y cols. (77) describieron la existencia de diferentes formas inmunorreactivas de BGP en el suero de pacientes con insuficiencia renal crónica, mientras que en el suero de sujetos adultos sanos sólo obtenían un único pico inmunorreactivo. En este estudio, el suero fue purificado a través de Sephadex G-100 y de Bio-Gel P-10, y posteriormente por HPLC utilizando una columna de fase reversa C-18 y un gradiente lineal de AcN-H₂O. El ensayo utilizado para la detección de las

formas inmunorreactivas de BGP era un RIA con un anticuerpo policlonal dirigido contra la zona C-terminal de la molécula de BGP. Posteriormente en 1990, Taylor y cols. (78) describieron también múltiples fragmentos de BGP en el suero de sujetos controles, pacientes con insuficiencia renal crónica y pacientes con enfermedad ósea de Paget. En este caso, los sueros también fueron purificados por filtración en gel, y el extracto inmunorreactivo inyectado en un cromatógrafo para HPLC equipado con una columna de fase reversa C-4 y sometido a un gradiente lineal de AcN-H₂O. La determinación de BGP en las fracciones de HPLC se realizó mediante un RIA con un antisuero dirigido contra la zona media de la molécula de BGP humana. En este estudio, en el suero de sujetos controles no aparece un único pico inmunorreactivo sino un gran número de ellos. En el suero de los enfermos con insuficiencia renal crónica se observa mayor número de fracciones inmunorreactivas. Los diferentes resultados encontrados por Gundberg y Taylor se deben fundamentalmente a la diferente especificidad de los ensayos de BGP utilizados.

Con respecto a la BGP sintetizada por el osteoblasto, no parecen existir dudas de que la única forma de BGP sintetizada por el osteoblasto sea la de 49 residuos, pero no se puede descartar que antes de su liberación al exterior de la célula esta molécula sufra un procesamiento intracelular que de lugar a otros fragmentos de la molécula. Una vez liberada la BGP al exterior, la molécula intacta de 49 aminoácidos y/o los posibles fragmentos originados en el interior del osteoblasto, se unen al hidroxipatito del hueso a través del Gla o pasan directamente a la circulación. En el suero, la BGP posee una vida media corta y es rápidamente metabolizada, principalmente en el riñón y en menor grado en el hígado (72-74). Por otra parte, durante el proceso de

resorción del hueso, la BGP unida puede sufrir roturas y los fragmentos resultantes pasar a circulación. Teniendo en cuenta la estructura primaria de la molécula de BGP, en la que existen dos enlaces Arg-Arg en las posiciones 19-20 y 43-44, podemos suponer que los principales productos resultantes de su metabolismo serán los fragmentos 1-19, 20-43, 45-49, 1-43 y 20-49, aunque no se puede descartar la existencia de otros fragmentos derivados de la rotura de la BGP intacta y/o de otros fragmentos.

La presencia de las diferentes formas inmunorreactivas de BGP ha dado lugar a un gran número de trabajos en los últimos años, en los que se pone de manifiesto la diversidad de resultados obtenidos cuando determinan los niveles de BGP tanto en sujetos controles como en pacientes con diversas patologías óseas, al utilizar diferentes anticuerpos.

En un trabajo reciente, Garnero y cols. (79), utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra las zonas 5-13, 25-37 y 43-49 de la secuencia de BGP humana, han caracterizado diversas formas inmunorreactivas de BGP en el suero de sujetos controles y de pacientes con diversas patologías óseas. Para realizar este estudio, los autores depleccionan el suero de determinadas formas moleculares de BGP utilizando distintos anticuerpos monoclonales unidos a un soporte sólido, y realizan la cuantificación posterior de la BGP remanente. Sin embargo, las distintas formas de BGP que contribuyen a estos niveles residuales no son separadas por un sistema cromatográfico como el HPLC.

En el presente trabajo utilizamos, por una parte, un sistema de purificación y separación por HPLC similar al empleado por Gundberg (77) y Taylor (78), y por otra parte, realizamos la detección de las

fracciones inmunorreactivas mediante tres ensayos con diferente especificidad. Los ensayos utilizados para realizar este estudio han sido elegidos teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis. El primero de los ensayos, ELSA-OST-NAT, es un IRMA que detecta posiblemente sólo la molécula intacta 1-49 de BGP. El segundo, ELSA-OSTEO (IRMA), detecta la molécula intacta 1-49 de BGP y fragmentos N-terminales medios. Los anticuerpos utilizados en estos dos IRMAS coinciden con los utilizados por Garnero y cols. (79) en su reciente trabajo. Con respecto al tercer ensayo, OSCAtest es un RIA que detectaría la molécula intacta y fragmentos C-terminales de BGP, no pudiendo descartarse reactividad cruzada con fragmentos medios y N-terminales medios.

Como se ha descrito en el capítulo de Materiales y Métodos, hemos empleado la filtración en gel como primer paso de purificación de la BGP procedente del medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos o del suero, y en particular, a través de Sephadex G-50 medium. La mayoría de los autores han utilizado la filtración en Sephadex como paso de purificación de esta proteína a partir de tejido óseo o suero. Así, Price y cols. (69,71) emplean Sephadex G-100 para la purificación de BGP tanto de hueso de diversas especies animales, como de suero fetal bovino y plasma humano. Otros autores también emplean este tipo de Sephadex cuando purifican BGP procedente de suero humano (120,122). Otros geles de filtración tales como Sephacryl S-200 (80,138) y Sephacryl S-300 (139) han sido también utilizados en esta primera fase de purificación. El eluyente utilizado generalmente suele ser HCO_3NH_4 5mM. En este trabajo hemos elegido Sephadex G-50 medium, con un rango de separación entre 1500 y 30000 Da de masa molecular, ya que como hemos descrito anteriormente,

la BGP humana tiene una masa molecular de 5800 Da. Entre las diferentes clases de Sephadex G-50, se ha escogido el tipo medium, con tamaño de partícula seca entre 50 y 150 μm , ya que el tipo superfine, que en principio ofrecería una mayor capacidad de resolución por su menor tamaño de partícula (10-40 μm), obliga a utilizar flujos de elución excesivamente lentos. La masa molecular aparente de la BGP humana marcada con ^{125}I y de suero humano, obtenida en este trabajo mediante interpolación en la curva de calibración de Sephadex, y a partir de su V_e , ha sido de 13800 Da. Esta masa molecular es mayor que la real de la BGP humana y coincide con los resultados obtenidos por Gundberg y cols. (140), ya que aunque la BGP es una proteína pequeña, su gran carga negativa hace que se comporte en los geles y columnas como si tuviera una masa molecular entre 10000 y 17000 Da. Como se puede observar en el capítulo de Resultados, cuando purificamos la BGP procedente del suero o del medio condicionado de osteoblastos humanos por Sephadex G-50 medium obtenemos, además del pico correspondiente a la masa molecular de BGP y otro de menor tamaño, un pico inmunorreactivo cuyo V_e corresponde al V_0 de la columna, es decir, su masa molecular es superior a 30000 Da. Este hecho ya ha sido descrito por otros autores (69,71,120), y podría corresponder a formas agregadas de BGP y/o a la BGP unida a otros componentes del suero.

El segundo paso utilizado, tras filtración en gel, para la separación de los distintos fragmentos inmunorreactivos de BGP procedentes del suero o del medio condicionado de osteoblastos humanos, como ya se ha mencionado, ha sido el HPLC, y en concreto la fase reversa. La cromatografía en fase reversa es una técnica de separación hidrofóbica que proporciona elevada resolución y alta recuperación de la actividad

biológica de las proteínas así purificadas. La columna C-4 y las condiciones del gradiente empleadas en este trabajo son similares a las utilizadas por otros autores para la purificación de BGP tanto de hueso humano (117), como de suero (78,80).

Utilizando la metodología de purificación en gel, separación posterior por HPLC, y cuantificación de la BGP mediante los tres métodos descritos, hemos encontrado, al igual que Taylor y Garnero, múltiples formas inmunorreactivas de BGP en el suero de individuos adultos sanos. Nos pareció de gran interés comparar estas formas con las encontradas en el medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos. Como puede observarse en nuestros resultados, en el medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos encontramos diferentes formas de BGP intacta correspondientes a los picos 28, 31, 35, 38 y 42. Suponemos que estos picos corresponden a la forma 1-49 de BGP ya que son detectados por el ensayo ELSA-OST-NAT, además de por el IRMA ELSA-OSTEO y por el RIA OSCAtest. Por otra parte, el ensayo OSCAtest detecta en el medio condicionado de osteoblastos otras fracciones inmunorreactivas de BGP, 19, 22 y 25, que corresponderían a formas de menor tamaño de tipo C-terminal y/o medio, dada la especificidad del ensayo. Garnero y cols. (79) miden BGP intacta y el fragmento N-terminal medio 1-43 en el sobrenadante de células de osteosarcoma MG-63 y en osteoblastos humanos, representando este fragmento 1-43 una proporción del 40% de la concentración de BGP humana intacta. Según estos autores, el fragmento 1-43 debe ser secretado después del procesamiento intracelular de la BGP intacta, ya que no hay evidencia de un ARN mensajero distinto al de la molécula intacta codificado por el gen de BGP humana, o ser generado por la degradación proteolítica de la proteína madura de 49 aminoácidos en

el medio de cultivo. Estos autores no miden otro tipo de fragmentos en los sobrenadantes de estas células.

En el suero de adultos normales encontramos, al igual que en el medio de cultivo de osteoblastos, las cinco fracciones correspondientes a BGP intacta. Además, en el suero encontramos una sexta fracción (pico 6) también detectada por los tres ensayos, cuantitativamente poco importante, y que no se detecta en el medio de los osteoblastos. Con respecto a las fracciones 19, 22 y 25, detectadas por el ensayo OSCAtest en el medio condicionado de los osteoblastos, en el suero de sujetos controles sólo son detectadas la 19 y la 22, no observándose la fracción 25, que podría haber experimentado un rápido metabolismo periférico. Por otra parte, en el suero de sujetos controles se observan dos picos por el ensayo ELSA-OSTEO (3 y 33), que corresponderían a fragmentos N-terminales medios y que no son detectados por el ensayo ELSA-OST-NAT, y un pico en posición 3, detectado por el RIA OSCAtest, que podría corresponder a fragmentos de tipo C-terminal, N-terminal medio y/o medio. Con respecto a los picos encontrados en posición 3, resulta curioso que no se retengan en la columna de HPLC. Una posible explicación de este hecho es que esta BGP se encuentre unida a otra sustancia circulante que no sea retenida en la columna y que arrastre a la molécula de BGP, impidiendo su interacción con la misma. En el caso del medio condicionado de osteoblastos, no se ha observado este fenómeno, y como ya se ha presentado en el capítulo de Resultados, vuelve a encontrarse una fracción de BGP que no se une a la columna, en proporción considerable, en el suero de los pacientes con osteoporosis postmenopáusica y enfermedad ósea de Paget. Sin embargo, este hecho no se observa en el suero de pacientes con insuficiencia renal crónica. De

estos resultados se deduce que no existen grandes diferencias cualitativas entre los perfiles observados en el medio de cultivo de los osteoblastos y en el suero de sujetos controles. La diferencia más importante entre los perfiles de las fracciones inmunorreactivas encontradas en el medio condicionado de los osteoblastos y en el suero de sujetos controles corresponde a las fracciones 3 y 33, que se observan por el ensayo ELSA-OSTEO en el suero, pero que no aparecen en el medio condicionado. Suponen un 31.4% y 7.5% respectivamente del total de BGP detectada por este ensayo. Dada la reactividad cruzada del mismo, y no pudiendo ser BGP intacta, ya que no aparece en el correspondiente perfil del ensayo ELSA-OST-NAT, tendrán que corresponder a fragmentos de BGP de tipo N-terminal medio. Gundberg y cols. (77), al realizar el estudio de las distintas formas inmunorreactivas de BGP en el suero de individuos controles, obtienen un único pico correspondiente a BGP intacta. En este caso, el único ensayo utilizado para la detección de BGP utiliza un antisuero dirigido contra la zona C-terminal de la molécula de BGP. Cuando Taylor y cols. (78) realizan un estudio parecido en sujetos sanos, pero empleando un antisuero dirigido contra la zona media de la molécula, encuentran, además del pico correspondiente a la BGP intacta (en la mayor proporción), tres picos anteriores y dos posteriores. Nuestros resultados son bastante coincidentes con los de Garner y cols. (79). Estos autores encuentran en el suero de sujetos controles: 36.4% de BGP intacta, 13.9% de fragmentos N-terminales, 14.6% de fragmento medio, 30% de fragmento N-terminal medio y 5.1% de fragmentos C-terminales medios. Si consideramos que sólo se pudiera detectar la BGP intacta y fragmentos N-terminales medios en el trabajo anterior, los porcentajes se convertirían en el 54.8% para la BGP intacta y el 45.2% de la BGP total para los

fragmentos N-terminales medios. Si observamos la figura 20B, nosotros encontramos un 61% de BGP intacta (picos 28, 31, 35, 38 y 42) y un 38.9% de fragmentos de BGP de tipo N-terminal medio (picos 3 y 33).

Resulta interesante el hecho, no descrito en trabajos anteriores, de haber obtenido varias fracciones que eluyen a distintos porcentajes de AcN en el HPLC, y por lo tanto diferentes formas moleculares, y que sin embargo poseen inmunorreactividad de BGP intacta, 1-49. Una posible explicación de este hecho podría ser, que dichas fracciones correspondieran a BGP con diferentes grados de γ -carboxilación. Ya en el año 1980, Poser (28) describió la existencia de moléculas de BGP parcialmente γ -carboxiladas, con respecto a las tres posiciones de Gla (17, 21 y 24) de la secuencia de BGP humana, al purificar BGP de hueso humano. Por otra parte, se ha detectado BGP con distintos grados de carboxilación o incluso totalmente descarboxilada en suero humano (122), al disponer de ensayos específicos con reactividad únicamente para BGP γ -carboxilada. Sin embargo, los ensayos de BGP a los que nos hemos estado refiriendo a lo largo de este trabajo no distinguen entre BGP descarboxilada y parcial o totalmente carboxilada. En un reciente trabajo de Cairns y Price (30), se demuestra que la BGP no está completamente γ -carboxilada en humanos. Según estos autores, esta γ -carboxilación incompleta reflejaría la γ -carboxilación parcial de la proteína durante su síntesis. Este hecho podría explicar los resultados obtenidos en este trabajo en el sentido de obtener varios picos correspondientes a BGP intacta en el propio medio de cultivo, y que coinciden con los obtenidos en el suero. Por otra parte, Delmas y cols. (141), al identificar proteínas no colágenas de hueso bovino por electroforesis, encuentran cuatro formas de BGP de idéntica masa

molecular y con diferente punto isoeléctrico. Los autores no pueden explicar la causa de esta "microheterogeneidad".

Otra posible explicación para la obtención de diferentes picos inmunorreactivos correspondientes todos ellos a la molécula intacta de 49 aminoácidos, podría ser el mayor o menor grado de glicosilación de la BGP, hecho ya descrito por Gundberg y cols. (142) en sujetos normales, en el caso de la BGP unida al hueso.

Al observar el patrón de formas inmunorreactivas de BGP del suero de pacientes con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis (figuras 21 y 22), llama la atención el hecho de que el pico 42, uno de los correspondientes a la BGP intacta, y cuantitativamente importante, que aparece en el suero de sujetos controles, no se observa en los pacientes con insuficiencia renal crónica, detectándose sin embargo los cuatro picos restantes, 28, 31, 35 y 38, también por los tres ensayos. La ausencia de esta forma de BGP (pico 42) podría deberse a diversas causas (77): 1ª Desaparición por su metabolismo periférico; 2ª Síntesis alterada de BGP durante el proceso acelerado de formación ósea en la osteodistrofia renal; 3ª Transformación de la molécula, en estados urémicos, en una forma carbamílada, por condensación del grupo CN derivado de la urea con grupos amino.

Una diferencia muy importante del perfil cromatográfico de la BGP encontrado en los pacientes con insuficiencia renal con respecto al perfil de los individuos controles, es la detección por el IRMA ELSA-OSTEO de un pico situado en posición 25, que representa el 47% de la BGP total detectada, y no aparece en el suero de sujetos controles, y que debe corresponder a un fragmento N-terminal medio por no ser detectado por el ensayo ELSA-OST-NAT (BGP intacta). A este respecto, Garnero y

cols. (79) describen la presencia, en un porcentaje del 50%, de un fragmento N-terminal medio de BGP en el suero de pacientes con fracaso renal crónico, lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados. La presencia de este fragmento N-terminal medio, cuantitativamente muy importante en los enfermos renales y que no aparece en los sujetos controles, podría explicarse por el metabolismo de la BGP intacta a fragmentos N-terminales medios y su acumulación en circulación debido a la insuficiencia renal, por síntesis alterada en el osteoblasto, o bien por aumento de la BGP circulante procedente de la resorción ósea que ocurre en la osteodistrofia renal.

Otros fragmentos que aparecen en el suero de pacientes con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis y no en sujetos controles son el 19, detectado por el ensayo ELSA-OSTEO, y el 17, detectado por el RIA OSCAtest. Este último corresponde posiblemente a un fragmento C-terminal y/o medio de BGP. Las causas posibles de la aparición de estos fragmentos son las mismas que las reseñadas anteriormente con respecto al fragmento 25.

Por último, merece la pena destacar que en el suero de los pacientes con insuficiencia renal crónica es prácticamente indetectable el pico que aparecía en el suero de sujetos controles en posición 3, y que correspondía a fragmentos que no se retienen en la columna de HPLC. Esta diferencia con el suero de adultos sanos podría deberse a la ausencia o alteración en la insuficiencia renal de una molécula hipotética que se uniría a la BGP e impediría su interacción con la columna de fase reversa.

Ya en trabajos anteriores, Gundberg y Taylor habían descrito la presencia de múltiples formas inmunorreactivas de BGP en el suero de

pacientes con insuficiencia renal crónica. Gundberg y cols. (77) encuentran en el suero de estos pacientes entre cuatro y seis fragmentos inmunorreactivos diferentes utilizando un antisuero dirigido contra la zona C-terminal. Taylor y cols. (78) observan múltiples fragmentos inmunorreactivos (más que en el caso anterior) en el suero de los pacientes con fallo renal, que no detectan en el suero procedente de adultos normales. Para realizar su estudio, Taylor y cols. emplean un antisuero dirigido contra la zona media de la molécula de BGP.

En el suero de los pacientes con enfermedad ósea de Paget tampoco encontramos las cinco formas correspondientes a BGP intacta (28, 31, 35, 38 y 42) descritas en el suero de los sujetos controles, sino solamente cuatro (28, 31, 38 y 42). Resulta interesante destacar que en el suero de pacientes con insuficiencia renal crónica sólo se observaban también cuatro formas de BGP intacta, pero no las mismas que en este caso (28, 31, 35 y 38). Las fracciones inmunorreactivas de BGP que aparecen en posición 3 por el ensayo ELSA-OSTEO y OSCAtest son cuantitativamente muy importantes, al igual que sucedía en el suero de los sujetos controles. Por el ensayo ELSA-OSTEO, en el suero de estos pacientes se detectan varias formas inmunorreactivas que no aparecen en el suero de individuos controles. Una de estas formas, que es cuantitativamente importante, es la fracción 25 (11.8%), que correspondería a un fragmento N-terminal medio, como se ha citado anteriormente. Esta forma también es detectada por este ensayo únicamente en el suero de los pacientes con insuficiencia renal. Otro fragmento N-terminal, presente en elevado porcentaje (16.3%), es el 33, forma que también es detectada en el suero de sujetos controles. El ensayo OSCAtest detecta en el suero de pacientes con enfermedad ósea de Paget un fragmento en posición 26 en un 25.6%, y

que no aparece en los sujetos controles. Este fragmento correspondería a una forma C-terminal y/o media.

Taylor y cols. (78), al estudiar las diferentes formas inmunorreactivas de BGP en el suero de pacientes con enfermedad ósea de Paget, encuentran varios fragmentos comunes a los hallados en sueros controles y otro fragmento específico de la enfermedad ósea de Paget. Estos autores explican sus hallazgos diciendo que se han podido generar fragmentos de BGP diferentes durante el anormal proceso de formación o resorción ósea de esta enfermedad. Otra explicación, según los mismos autores, sería la incapacidad del riñón para aclarar los fragmentos de BGP con la misma rapidez con que se producen, en esta patología caracterizada por un remodelado muy acelerado.

En el suero de los pacientes con osteoporosis postmenopáusica se encuentran también cinco formas moleculares de BGP intacta, pero no responden al mismo patrón de los sujetos controles (28, 31, 35, 38 y 42). En este caso, se obtienen en las posiciones 26, 28, 31, 35 y 38. Esta diferencia podría deberse a la propia naturaleza de la patología osteoporótica, en la que se han descrito anomalías importantes en la γ -carboxilación de la BGP (143-145). Estas anomalías impedirían una unión normal de esta proteína al hidroxapatito del hueso y podrían estar implicadas en el desacoplamiento de las actividades óseas de formación y resorción. En esta patología, al igual que en la enfermedad ósea de Paget y en los sujetos controles, vuelve a ser cuantitativamente importante la fracción detectada en la posición 3 por los métodos ELSA-OSTEO y OSCAtest. Una característica diferente del suero procedente de las pacientes con osteoporosis postmenopáusica con respecto a los sujetos controles y a las otras patologías estudiadas, es la ausencia de las

fracciones 19 y 22, detectadas por el ensayo OSCAtest. El único trabajo que hemos encontrado en la literatura en que estudian los posibles fragmentos de BGP existentes en pacientes con osteoporosis postmenopáusia es el de Garnero y cols. (79). Estos autores encuentran en el suero de estas pacientes un patrón de formas de BGP muy similar al de los sujetos normales, predominando la forma intacta y la N-terminal media. Sin embargo, en nuestro estudio el patrón de BGP en la osteoporosis es también diferente.

Los resultados del presente estudio constatan la presencia de diversas formas de BGP circulantes en el suero humano. Estas formas podrían proceder tanto de la propia síntesis osteoblástica, como del metabolismo periférico, o de los procesos de resorción ósea. Es muy importante tener en cuenta que las formas moleculares de BGP circulantes dependen del tipo de patología ósea de que se trate. Este hecho, unido a la diversidad de antisueros o anticuerpos disponibles para la cuantificación de la BGP, hacen indispensable una adecuada selección del método para realizar un determinado tipo de estudio clínico o para su utilización en el análisis clínico rutinario.

6. CONCLUSIONES

1. Todos los ensayos estudiados presentan valores aceptables de sensibilidad, coeficientes de variación y recuperación.
2. La linealidad de los IRMAs estudiados es mejor que la de los RIAs. Los peores resultados se obtienen con el RIA OSTK-PR.
3. Los métodos que presentan un mejor grado de estandarización son los IRMAs ELSA-OSTEO, ELSA-OST-NAT y el RIA OSCAtest.
4. Después de tratar las muestras de suero con un anticuerpo dirigido contra la zona 43-49 de la BGP humana, sólo el IRMA ELSA-OST-NAT no detecta BGP residual, sugiriendo que este ensayo detecta únicamente la molécula de BGP intacta. El resto de los ensayos estudiados son capaces de detectar otros fragmentos de BGP además de la molécula intacta.
5. Además de la molécula de BGP intacta, el IRMA ELSA-OSTEO es capaz de detectar fragmentos de tipo N-terminal medio de BGP y el RIA OSCAtest fragmentos C-terminales de la molécula.
6. La baja estabilidad de la BGP en el suero es un problema importante a la hora de su utilización clínica. Con los ensayos IRMA ELSA-OSTEO, IRMA OSTEOCALCINA y RIA OSCAtest (con el empleo de una disolución estabilizante) se obtienen los mejores resultados de estabilidad. Por tanto, las condiciones de almacenamiento de las muestras son muy importantes al realizar la cuantificación de la BGP.

7. Los valores absolutos de BGP obtenidos en una misma muestra por los diferentes ensayos son distintos. La correlación encontrada entre los mismos es mejor en el caso de los sueros de sujetos controles y de pacientes con osteoporosis, y peor en los pacientes con insuficiencia renal crónica y enfermedad ósea de Paget, debido a la existencia de mayor número de fragmentos de BGP circulantes.
8. Se han detectado diferentes formas inmunorreactivas de BGP en el medio condicionado del cultivo de osteoblastos humanos.
9. Se han detectado también diferentes formas inmunorreactivas de BGP en el suero de sujetos controles y de pacientes con insuficiencia renal crónica, enfermedad ósea de Paget y osteoporosis postmenopáusicas. Estas formas no son siempre las mismas, dependiendo de su origen (osteoblastos, controles o distintas patologías).
10. En todos los casos, es de destacar, la presencia de varias formas de BGP que corresponden a la molécula intacta 1-49, y que sin embargo eluyen a diferente porcentaje de AcN en el HPLC. Estas formas podrían corresponder a diferentes grados de γ -carboxilación, glicosilación y/o carbamilación, o a otras modificaciones de la molécula de naturaleza desconocida.
11. Aunque el patrón de las formas inmunorreactivas de BGP detectadas en el suero de sujetos controles y en el medio condicionado del cultivo de osteoblastos es muy similar, es de destacar la presencia

en el suero de sujetos controles y no en el medio condicionado de una forma de naturaleza N-terminal que eluye a 30.6% de AcN y de otras que no se retienen en la columna de HPLC y que no corresponden a BGP intacta.

12. La principal diferencia encontrada en el suero de pacientes con insuficiencia renal crónica con respecto al suero de sujetos controles, es la ausencia de la forma inmunorreactiva de BGP intacta que eluye a 32.4% de AcN y la presencia, en elevado porcentaje, de una forma N-terminal que eluye a 29.0% de AcN y de otra C-terminal o media que eluye a 27.4% de AcN.
13. La principal diferencia encontrada en el suero de pacientes con enfermedad ósea de Paget con respecto al suero de sujetos controles es la ausencia de la forma inmunorreactiva de BGP intacta que eluye a 31.0% de AcN y la presencia de múltiples formas inmunorreactivas de tipo N-terminal, entre las que destaca, desde un punto de vista cuantitativo, la fracción que eluye a 29.0% de AcN, y de otra forma C-terminal o media que eluye a 29.2% de AcN.
14. En el caso de la caracterización de las formas inmunorreactivas de BGP encontradas en el suero de las mujeres con osteoporosis postmenopáusica, es de destacar la presencia de una fracción correspondiente a BGP intacta que eluye a 29.2% de AcN y que no aparece en el suero de los sujetos controles y la ausencia, sin embargo, de otra fracción que si aparece en controles, correspondiente también a BGP intacta y que eluye a 32.4% de AcN

Por otra parte, es de destacar la ausencia de una forma de naturaleza N-terminal (30.6% de AcN) y de otras formas detectadas por el ensayo OSCAtest (27.8% y 28.4% de AcN) que sí aparecen en el suero de los sujetos controles.

15. De los resultados del presente trabajo podemos concluir que las diferentes patologías óseas estudiadas presentan diferentes patrones inmunorreactivos de BGP circulante en suero, y por tanto, es de gran importancia una rigurosa selección del ensayo a utilizar en la cuantificación de los niveles de BGP, en el estudio del remodelado óseo en dichas patologías.

7. BIBLIOGRAFIA

1. GEHRON ROBEY P. The biochemistry of bone. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; 18: 859-902.
2. MARTIN TJ, KONG WAH NG, SUDA T. Bone cell physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; 18: 833-858.
3. ERIKSEN EF, BRIXEN K, CHARLES P. New markers of bone metabolism: clinical use in metabolic bone disease. *Eur J Endocrinol* 1995; 132: 251-263.
4. LLACH F. Renal bone disease. *Trans Proc* 1991; 23: 1818-1822.
5. HRUSKA KA, TEITELBAUM SL. Renal osteodystrophy. *New Engl J Med* 1995; 333: 166-174.
6. BONE HG, KLEEREKOPER M. Paget's disease of bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1179-1182.
7. SIRIS ES. Paget's disease of bone. En: *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Second edition. Ed. Favus MJ. Raven Press, New York. 1993: 375-384.
8. Report. Consensus development conference: Prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1990; 90: 107-110.
9. RIGGS BL, MELTON LJ. Medical progress: Involutional osteoporosis. *New Engl J Med* 1986; 314: 1676-1684.
10. ETTINGER B, GENANT HK, CANN CE. Long-term estrogen replacement therapy prevents bone loss and fractures. *Ann Intern Med* 1985; 102: 319-324.
11. BARON R. Anatomy and ultrastructure of bone. En: *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Second edition. Ed. Favus MJ. Raven Press, New York. 1993: 3-9.
12. CENTRELLA M, MCCARTHY T, CANALIS E. Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 1987; 262: 2869-2874.

13. McCARTHY TL, CENTRELLA M, CANALIS E. Regulatory effects of insulin-like growth factor I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology* 1989; 124: 301-309.
14. McSHEEHY PMJ, CHAMBERS TJ. Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* 1986; 118: 824-828.
15. PUZAS JE. The osteoblast. En: *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Second edition. Ed. Favus MJ. Raven Press, New York. 1993: 15-21.
16. EYRE DR, DICKSON IR, VAN NESS K. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. *Biochem J* 1988; 252: 495-500.
17. TERMINE JD. Non-collagen proteins in bone. En: *Cell and molecular biology of vertebrate hard tissues*. Eds. Evered D, Harnett S. John Wiley and Sons, Chichester. 1988: 178-190.
18. GEHRON ROBEY P, BIANCO P, TERMINE JD. The cellular biology and molecular biochemistry of bone formation. En: *Disorders of bone and mineral metabolism*. Eds. Coe FL, Favus MJ. Raven Press, New York. 1992: 241-263.
19. ZAMBONIN-ZALLONE A, TETI A, GRANO M, RUBINACCI A, ABBADINI M, GABOLI M, MARCHISIO PC. Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts; a β_3 integrin is co-localized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Exp Cell Res* 1989; 182: 645-652.
20. BERESFORD JN, FEDARKO NS, FISHER LW, MIDURA RJ, YANAGISHITA M, TERMINE JD, GHERON ROBEY P. Analysis of the proteoglycans synthesized by human bone cells in vitro. *J Biol Chem* 1987; 262: 17164-17172.
21. PRICE PA. Vitamin K-dependent bone proteins. En: *Calcium regulation and bone metabolism: Basic and clinical aspects*. Vol 9. Eds. Cohn DV, Martin TJ, Meunier PJ. Elsevier Science, Amsterdam. 1987: 419-425.

22. MAILLARD C, BERRUYER M, SERRE CM, DECHAVANNE M, DELMAS PD. Protein S, a vitamin K-dependent protein, is a bone matrix component synthesized and secreted by the osteoblasts. *Endocrinology* 1992; 130: 1599-1604.
23. GEHRON ROBEY P, YOUNG MF, FLANDERS KC, ROCHE NS, KONDAIAH P, REDDI AH, TERMINE JD, SPORN MB, ROBERTS AB. Osteoblasts synthesize and respond to TGF-beta in vitro. *J Cell Biol* 1987; 105: 457-463.
24. MORRIS DC, MASUHARA K, TAKAOKA K, ONO K, ANDERSON HC. Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone. *Bone Miner* 1992; 19: 287-298.
25. TERMINE JD, KLEINMAN HK, WHITSON SW, CONN KM, MCGARVEY ML, MARTIN GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981; 26: 99-105.
26. HAUSCHKA PV, LIAN JB, GALLOP PM. Direct identification of the calcium-binding amino acid γ -carboxyglutamate in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3925-3929.
27. PRICE PA, OTSUKA AS, POSER JW, KRISTAPORIS J, RAMAN N. Characterization of a γ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 1447-1451.
28. POSER JW, ESCH FS, LING NC, PRICE PA. Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone: undercarboxylation of the first glutamic acid residue. *J Biol Chem* 1980; 255: 8685-8691.
29. PRICE PA. Osteocalcin. En: *Bone Mineral Reserch. Annual 1*. Ed. Peck WA. Elsevier, Amsterdam. 1983; 157-190.
30. CAIRNS JR, PRICE PA. Direct demonstration that the vitamin K-dependent Bone Gla Protein is incompletely γ -carboxylated in humans. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1989-1997.
31. HAUSCHKA PV, CARR SA. Calcium-dependent α -helical structure in osteocalcin. *Biochemistry* 1982; 21: 2538-2547.
32. KAY MI, YOUNG RA, POSNER AS. Crystal structure of hydroxyapatite.

- Nature Lond 1964; 204: 1050.
33. POSER JW, PRICE PA. A method for decarboxylation of gamma-carboxyglutamic acid in proteins: properties of the decarboxylated gamma-carboxyglutamic acid from calf bone. *J Biol Chem* 1979; 254: 431-436.
 34. GENDREAU MA, KRISHNASHWAMY S, MANN KG. The interaction of bone Gla protein (osteocalcin) with phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 1989; 264: 6972-6978.
 35. WIANS FH JR, KRECH K, HAUSCHKA PV. The effects of magnesium and calcium on osteocalcin adsorption to hydroxyapatite. *Magnesium* 1983; 2: 83-92.
 36. BERESFORD JN, GALLAGHER JA, POSER JW, RUSSELL RGG. Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. *Metab Bone Dis Report Res* 1984; 5: 229-234.
 37. JOHANSEN JS, WILLIAMSON MK, RICE JS, PRICE PA. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 501-512.
 38. BUTLER WT, D'SOUZA RN, BRONCKERS AL, HAPPONEN RP, SOMERMAN MJ. Recent investigations on dentin specific proteins. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88 (Suppl 1): 369-376.
 39. THIEDE MA, SMOCK SL, PETERSEN DN, GRASSER WA, THOMPSON DD, NISHIMOTO SK. Presence of messenger ribonucleic acid encoding osteocalcin, a marker of bone turnover, in bone marrow megakaryocytes and peripheral blood platelets. *Endocrinology* 1994; 135: 929-937.
 40. FLEET JC, HOCK JM. Identification of osteocalcin mRNA in nonosteoid tissue of rats and humans by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1565-1573.
 41. LEVY RJ, GUNDBERG C, SCHEINMAN R. The identification of the vitamin K-dependent bone protein osteocalcin as one of the gamma-

- carboxyglutamic acid containing proteins present in calcified atherosclerotic plaque and mineralized heart valves. *Atherosclerosis* 1983; 46: 49-56.
42. PUCHACZ E, LIAN JB, STEIN GS, WOZNEY J, HUEBNER K, CROCE C. Chromosomal localization of the human osteocalcin gene. *Endocrinology* 1989; 124: 2648-2650.
43. CELESTE AJ, ROSEN V, BUECKER JL, KRIZ R, WANG EA, WOZNEY JM. Isolation of the human gene for bone Gla protein utilizing mouse and rat cDNA clones. *EMBO J* 1986; 5: 1885-1890.
44. HAUSCHKA PV, LIAN JB, COLE DEC, GUNDBERG CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 1989; 69: 990-1047.
45. FURIE B, FURIE BC. Molecular basis of vitamin K-dependent γ -carboxylation. *Blood* 1990; 75: 1753-1762.
46. PRICE PA, WILLIAMSON MK, LOTHINGER JW. Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *J Biol Chem* 1981; 256: 12760-12766.
47. SHEARER MJ. Vitamin K. *Lancet* 1995; 345: 229-234.
48. NISHIMOTO SK, PRICE PA. The vitamin K-dependent bone protein is accumulated within cultured osteosarcoma cells in the presence of the vitamin K antagonist warfarin. *J Biol Chem* 1985; 260: 2832-2836.
49. PAN LC, WILLIAMSON MK, PRICE PA. Sequence of the precursor to rat bone gamma-carboxyglutamic acid protein that accumulates in warfarin-treated osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 1985; 260: 13398-13401.
50. PRICE PA, WILLIAMSON MK. Effects of warfarin on bone: studies on the vitamin K-dependent protein of rat bone. *J Biol Chem* 1981; 256: 12754-12759.
51. VAN HAARLEM LJ, KNAPEN MH, HAMULIAK K, VERMEER C. Circulating

- osteocalcin during oral anticoagulant therapy. *Tromb Haemostasis* 1988; 60: 79-82.
52. GUNDBERG CM, CLOUGH ME. The osteocalcin propeptide is not secreted in vivo or in vitro. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 73-79.
53. HOSODA K, KANZAKI S, EGUCHI H, KIYOKI M, YAMAJI T, KOSHIHARA Y, SHIRAKI M, SEINO Y. Secretion of osteocalcin and its propeptide from human osteoblastic cells: dissociation of the secretory patterns of osteocalcin and its propeptide. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 553-565.
54. KANZAKI S, HOSODA K, MORIWAKE T, TANAKA H, KUBO T, INOUE M, HIGUCHI J, YAMAJI T, SEINO Y. Serum propeptide and intact molecular osteocalcin in normal children and children with growth hormone (GH) deficiency: a potential marker of bone growth and response to GH therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1104-1109.
55. LAJEUNESSE D, KIEBICKI GM, FRONDOZA C, SACKTOR B. Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone Miner* 1991; 14: 237-250.
56. MARTINEZ ME, SELGAS R, MIGUEL JR, BALAGUER G, SANCHEZ CABEZUDO MJ, LLACH F. Osteocalcin levels in uremic patients: influence of calcitriol treatment through two different routes and type of dialysis. *Nephron* 1991; 59: 429-433.
57. GERSSENS P, VANDERSCHUEREN D, VERSTRAETEN A, DEQUEKER J, DEVOS P, BOVILLON R. Short-term course of 1,25 stimulates osteoblasts but not osteoclasts in osteoporosis and osteoarthritis. *Calcif Tissue Int* 1991; 49: 168-173.
58. OLIVA A, DELLA RAGIONE F, FRATTA M, MARRONE G, PALUMBO R, ZAPPALÀ V. Effect of retinoic acid on osteocalcin gene expression in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 908-914.
59. OHISHI K, ISHIDA H, NAGATA T, YAMAUCHI N, TSURUMI C, NISHIKAWA S, WAKANO Y. Thyroid hormone suppresses the differentiation of osteoprogenitor cells to osteoblasts, but enhances functional

- activities of mature osteoblasts in cultured rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 1994; 161: 544-552.
60. LAJEUNESSE D. Effect of 17 beta-estradiol on the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone Miner* 1994; 24: 1-16.
61. SCHEDLICH LJ, FLANAGAN JL, CROFTS LA, GILLIES SA, GOLDBERG D, MORRISON NA, EISMAN JA. Transcriptional activation of the human osteocalcin gene by basic fibroblast growth factor. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 143-152.
62. CHENU C, VALENTIN-OPRAN A, CHAVASSIEUX P, SAEZ S, MEUNIER PJ, DELMAS PD. Insulin-like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25-(OH)₂D₃ and activity on human osteoblast-like cells in short-term cultures. *Bone* 1990; 11: 81-86.
63. COXAM V, DAVICCO MJ, PASTOUREAU P, DELMAS PD, BARLET JP. Insulin-like growth factor-II increases plasma osteocalcin concentration in newborn lambs. *Bone Miner* 1992; 177: 177-186.
64. PIRSKANEN A, JÄÄSKELÄINEN T, MÄENPÄÄ PH. Effects of transforming growth factor β_1 on the regulation of osteocalcin synthesis in human MG-63 osteosarcoma cells. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1635-1642.
65. NODA M. Transcriptional regulation of osteocalcin production by transforming growth factor- β in rat osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1989; 124: 612-617.
66. INGRAM RT, BONDE SK, RIGGS BL, FITZPATRICK LA. Effects of transforming growth factor beta and 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on the function, cytochemistry and morphology of normal human osteoblast-like cells. *Differentiation* 1994; 55: 153-163.
67. KASPERK C, SCHNEIDER U, SOMMER U, NIETHARD F, ZIEGLER R. Differential effects of glucocorticoids on human osteoblastic cell metabolism in vitro. *Calcif Tissue Int* 1995; 57: 120-126.
68. MEERAN K, HATTERSLEY A, BURRIN J, SHINER R, IBBERTSON K. Oral and

- inhaled corticosteroids reduce bone formation as shown by plasma osteocalcin levels. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 333-336.
69. PRICE PA, NISHIMOTO SK. Radioimmunoassay for the vitamin K-dependent protein of bone and its discovery in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 2234-2238.
70. HAUSCHKA PV. Osteocalcin: the vitamin K-dependent Ca^{2+} -binding protein of bone matrix. *Haemostasis* 1986; 16: 258-272.
71. PRICE PA, PARTHMORE JG, DEFTOS LJ. New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone Gla-protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J Clin Invest* 1980; 66: 878-883.
72. MELICK RA, FARRUGIA W, HEATON CL, QUELCH KJ, SCOGGINS BA, WARK JD. The metabolic clearance rate of osteocalcin in sheep. *Calcif Tissue Int* 1988; 42: 185-190.
73. FARRUGIA W, MELICK RA. Metabolism of Osteocalcin. *Calcif Tissue Int* 1986; 39: 234-238.
74. FARRUGIA W, YATES NA, FORTUNE CL, McDOUGALL JG, SCOGGINS BA, WARK JD. Effect of uninephrectomy on osteocalcin metabolism in sheep: a direct evaluation of renal osteocalcin clearance. *J Endocrinol* 1991; 130: 213-221
75. DELMAS PD, WILSON DM, MANN KG, RIGGS BL. Effect of renal function on plasma levels of bone Gla-protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 1028-1030.
76. MALLUCHE HH, FAUGERE MC, FANTI P, PRICE PA. Plasma levels of bone Gla protein reflect bone formation in patients on chronic maintenance dialysis. *Kidney Int* 1984; 26: 869-874.
77. GUNDBERG CM, WEINSTEIN RS. Multiple immunoreactive forms of osteocalcin in uremic serum. *J Clin Invest* 1986; 77: 1762-1767.
78. TAYLOR AK, LINKHART S, MOHAN S, CHRISTENSON RA, SINGER FR, BAYLINK DJ. Multiple osteocalcin fragments in human urine and serum as

- detected by a midmolecule osteocalcin radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 467-472.
79. 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: 255-264.
80. HOSODA K, EGUCHI H, NAKAMOTO T, KUBOTA T, HONDA H, JINDAI S, HASEGAWA R, KIYOKI T, SHIRAKI M. Sandwich immunoassay for intact human osteocalcin. *Clin Chem* 1992; 38: 2233-2238.
81. HAUSCHKA PV. Osteocalcin and its functional domains. En: *The chemistry and biology of mineralized tissue*. Ed. Butler WT. Ebsco Media, Amsterdam. 1985: 149-158.
82. NEUMAN WF, NEUMAN MW, DIAMOND AG, MENANTEAU J, GIBBONS WS. Blood: Bone disequilibrium. Studies of the solubility characteristics of brushite: apatite mixtures and their stabilization by noncollagenous proteins of bone. *Calcif Tissue Int* 1982; 34: 149-157.
83. DIAMOND AG, NEUMAN WI. Macromolecular inhibitors of calcium phosphate precipitation in bone. En: *Vitamin K metabolism and vitamin K-dependent proteins*. Ed. Sutie J. University Park Press, Baltimore MD. 1979: 259-262.
84. ROMBERG RW, WERNESS PG, RIGGS BL, MANN KG. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* 1986; 25: 1176-1180.
85. ROACH HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. *Cell Biol Int* 1994; 18: 617-628.
86. PRICE PA, WILLIAMSON MK, HABA T, DELL RB, JEE WSS. Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7734-7738.

87. KAHN AJ, TEITELBAUM SL, MALONE JD, KRUKOWSKI M. The relationship of monocytic cells to the differentiation and resorption of bone. *Prog Clin Biol Res* 1982; 110: 239-248.
88. MUNDY GR, POSER JW. Chemotactic activity of the γ -carboxyglutamic acid containing protein in bone. *Calcif Tissue Int* 1983; 35: 164-168.
89. LIAN JB, TASSINARI M, GLOWACKI J. Resorption of implanted bone prepared from normal and warfarin-treated rats. *J Clin Invest* 1984; 73: 1223-1226.
90. GLOWACKI J, LIAN JB. Impaired recruitment and differentiation of osteoclast progenitors by osteocalcin-deplete bone implants. *Cell Differ* 1987; 21: 247-254.
91. GLOWACKI J, REY C, GLIMCHER MJ, COX KA, LIAN J. A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 1991; 45: 292-302.
92. CHENU C, COLUCCI S, GRANO M, ZIGRINO P, BARATTOLO R, ZAMBONIN G, BALDINI N, VERGNAUD P, DELMAS PD, ZALLONE AZ. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol* 1994; 127: 1149-1158.
93. CHARLES P, POSER JW, MOSEKILDE L, JENSEN FT. Estimation of bone turnover evaluated by ^{47}Ca -kinetics. Efficiency of serum bone gamma-carboxyglutamic acid containing protein, serum alkaline phosphatase, and urinary hydroxyproline excretion. *J Clin Invest* 1985; 76: 2254-2258.
94. DELMAS PD, MALAVAL L, ARLLOT ME, MEUNIER PJ. Serum bone gla-protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases. *Bone* 1985; 6: 339-341.
95. CHARHON SA, DELMAS PD, MALAVAL L, CHAVASSIEUX PM, ARLLOT M, CHAPUY MC, MEUNIER PJ. Serum bone gla protein in renal osteodystrophy: Comparison with bone histomorphometry. *J Clin Endocrinol Metab*

- 1986; 63: 892-897.
96. EASTELL R, DELMAS PD, HODGSON SF, ERIKSEN EF, MANN KG, RIGGS BL. Bone formation rate in older normal women: Concurrent assessment with bone histomorphometry, calcium kinetics, and biochemical marker. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 741-748.
 97. EASTELL R, ROBINS SP, COLWELL T, ASSIRI MA, RIGGS BL, RUSSELL RGG. Evaluation of bone turnover in type I Osteoporosis using biochemical markers specific for both bone formation and bone resorption. *Osteoporosis Int* 1993; 3: 255-260.
 98. KATAGIRI M, OHTAWA T, FUKUNAGA M, HARADA T. Evaluation of bone loss and the serum markers of bone metabolism in patients with hyperparathyroidism. *Surg Today* 1995; 25: 598-604.
 99. CHARLES P, HASLING C, RISTELI L, RISTELI J, MOSEKILDE L, ERIKSEN EF. Assessment of bone formation by biochemical markers in metabolic bone disease: separation between osteoblastic activity at the cell and tissue level. *Calcif Tissue Int* 1992; 51: 406-411.
 100. RUBINI G, ANELLI F, CORREALE M, LAURIERO F, RUBINI D, D'ADDABBO A. Renal osteodystrophy with hyperparathyroidism: the diagnostic value of intact parathormone, alkaline phosphatase, osteocalcin and procollagen. *J Nucl Biol Med* 1994; 38: 489-494.
 101. JOHANSEN JS, GIWERCMAN A, HARTWELL D, NIELSEN CT, PRICE PA, CHRISTIANSEN C, SKAKKEBAEK NE. Serum bone gla-protein as a marker of bone growth in children and adolescents: Correlation with age, height, serum insulin-like growth factor I, and serum testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 273-278.
 102. DELMAS PD, CHATELAIN P, MALAVAL L, BONNE G. Serum bone gla-protein in growth hormone deficient children. *J Bone Miner Res* 1986; 1: 333-338.
 103. PRUMMEL MF, WIERSINGA WM, LIPS P, SANDERS GTF, SAVERWEIN HP. The course of biochemical parameters of bone turnover during treatment with corticosteroids. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 382-386.

104. HASLING C, ERIKSEN EF, MELKKO J, RISTELI L, CHARLES P, MOSELKIDE L, RISTELI J. Effects of a combined estrogen-gestagen regimen on serum levels of the carboxy-terminal propeptide of human type I procollagen in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1991; 6: 1295-1300.
105. DELMAS PD, CHRISTIANSEN C, MANN KG, PRICE PA. Bone gla protein (osteocalcin) assay standardization report. *J Bone Miner Res* 1990; 5: 5-11.
106. ARAI Y, TAKEUCHI H, OISHI K, YOSHIDA O. Osteocalcin: is it a useful marker of bone metastasis and response to treatment in advanced prostate cancer?. *Prostate* 1992; 20: 169-177.
107. KADDAM IM, IQBAL SJ, HOLLAND S, WONG M, MANNING D. Comparison of serum osteocalcin with total and bone specific alkaline phosphatase and urinary hydroxyproline:creatinine ratio in patients with Paget's disease of bone. *Ann Clin Biochem* 1994; 31: 327-330.
108. LEON M, LARRODERA L, SOLIS JA, HAWKINS F. Osteocalcina sérica basal en enfermedades asociadas a alteraciones del metabolismo óseo. *Med Clin (Barc)* 1987; 88: 90-92.
109. RAPADO A, DE LA PIEDRA C, TORRES R. BGP (osteocalcin, bone-Gla-protein) in involutional osteoporosis. *Clin Rheumatol* 1989; 8 (Suppl 2): 30-34.
110. TORRES R, DE LA PIEDRA C, RAPADO A. Osteocalcin and bone remodeling in Paget's disease of bone, primary hyperparathyroidism, hypercalcemia of malignancy and involutional osteoporosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1989; 49: 279-285.
111. REACH H, PIETSCHMANN P, KUDLACEK S, WOLOSZCZUK W, KREXNER E, BERNECKER P, WILLVONSEDER R. Influence of sex and age on biochemical bone metabolism parameters. *Miner Electrolyte Metab* 1994; 20: 117-121.
112. MARKOWITZ ME, DIMARTINO-NARDI J, GASPARINI F, FISHMAN K, ROSEN JF, SEANGER P. Effects of growth hormone therapy on circadian osteocalcin rhythms in idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol*

- Metab 1989; 69: 420-425.
113. PIETSCHMANN P, RESCH H, WOLOSZCZUK W, WILLVONSEDER R. A circadian rhythm of serum osteocalcin levels in postmenopausal osteoporosis. Eur J Clin Invest 1990; 20: 310-312.
114. NIELSEN HK, BRIZEN K, MOSEKILDE L. Diurnal rhythm in serum activity of wheat-germ lectin-precipitable alkaline phosphatase temporal relationships with the diurnal rhythm of serum osteocalcin. Scand J Clin Lab Invest 1990; 50: 851-856.
115. RICO H, COSTALES C, CABRANES JA, ESCUDERO M. Lower serum osteocalcin levels in pregnant drug users and their newborns at the time of delivery. Obstet Gynecol 1990; 75: 998-1000.
116. RODIN A, DUNCAN A, QUARTERO HWP, PISTOFIDIS G, MASHITER G, WHITAKER K, CROOK D, STEVENSON JC, CHAPMAN MG, FOGELMAN I. Serum concentrations of alkaline phosphatase isoenzymes and osteocalcin in normal pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 1989; 68: 1123-1127.
117. TAYLOR AK, LINKHART SG, MOHON S, BAYLINK DJ. Development of a new radioimmunoassay for human osteocalcin: Evidence for a midmolecule epitope. Metabolism 1988; 37: 872-877.
118. DELMAS PD, PRICE PA, MANN KG. Validation of the bone gla protein (osteocalcin) assay. J Bone Miner Res 1990; 5: 3-4.
119. POWER MJ, FOTTRELL PF. Solid-phase enzymeimmunoassay for osteocalcin in human serum or plasma, with use of a monoclonal antibody. Clin Chem 1989; 35: 2087-2092.
120. POWER MJ, GOSLING JP, FOTTRELL PF. Radioimmunoassay of osteocalcin with polyclonal and monoclonal antibodies. Clin Chem 1989; 35: 1408-1415.
121. 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: 451-461.

122. KOYAMA N, OHARA K, YOKOTA H, KUROME T, KATAYAMA M, HINO F, KATO I, AKAI T. A one step sandwich enzyme immunoassay for γ -carboxylated osteocalcin using monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1991; 139: 17-23.
123. DEFTOS LJ, WOLFERT RL, HILL CS, BURTON DW. Two-site assays of bone Gla protein (osteocalcin) demonstrate immunochemical heterogeneity of the intact molecule. *Clin Chem* 1992; 38: 2318-2321.
124. HOSODA K, EGUCHI H, NAKAMOTO T, KUBOTA T, HONDA H, JINDAI S, HASEGAWA R, KIYOKI M, YAMAJI T, SHIRAKI M. Sandwich immunoassay for intact human osteocalcin. *Clin Chem* 1992; 38: 2233-2238.
125. GARNERO P, GRIMAUX M, DEMIAUX B, PREAUDAT C, SEGUIN P, DELMAS PD. Measurement of serum osteocalcin with a human-specific two-site immunoradiometric assay. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1389-1398.
126. MASTERS PW, JONES RG, PURVES DA, COOPER EH, COONEY JM. Commercial assays for serum osteocalcin give clinically discordant results. *Clin Chem* 1994; 40: 358-363.
127. International Federation on Clinical Chemistry. Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 1979; 98: 129F-162F.
128. MANDIOLA M, PINEDA J, ANIEL-QUIROGA MA, BUSTURIA MA. Pautas para la validación de radioinmunoensayos. *Rev Diag Biol* 1991; 40: 165-170.
129. MARIE PJ, LOMRI A, SABBAGH A, BASLE M. Culture and behaviour of osteoblastic cells isolated from normal trabecular bone surfaces. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989; 25: 373-380.
130. NACHER M, AUBIA J, BOSCH J, MARIÑOSO ML, HERNANDEZ J, SERRANO S. Caracterización de cultivos de osteoblastos humanos. *REEMO* 1993; 2: 3-8.
131. WEISMAN MH, ORTH RW, CATHERWOOD BD, MANOLAGAS SC, DEFTOS LJ. Measures of bone loss in rheumatoid arthritis. *Arch Intern Med*

- 1986; 146: 701-704.
132. ROSENQUIST C, QVIST P, BJARNASON N, CHRISTIANSEN C. Measurement of a more stable region of osteocalcin in serum by ELISA with two monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1995; 41: 1439-1445.
133. BANFI G, DAVERIO R. In vitro stability of osteocalcin. *Clin Chem* 1994; 40: 833-834.
134. BLUMSOHN A, HANNON RA, EASTELL R. Apparent instability of osteocalcin in serum as measured with different commercially available immunoassays. *Clin Chem* 1995; 41: 318-319.
135. WILKINSON MR, WAGSTAFFE C, DELBRIDGE L, WISEMAN J, POSEN S. Serum osteocalcin concentrations in Paget's disease of bone. *Arch Intern Med* 1986; 146: 268-271.
136. BROWN JP, DELMAS PD, EDOUARD C, CHAPUY MC, MEUNIER PJ. Serum bone Gla protein: a specific marker of bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1984; i: 1091-1093.
137. POWER MJ, FOTTRELL PF. Osteocalcin: Diagnostic methods and clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1991; 28: 287-335.
138. PASTOUREAU P, DELMAS PD. Measurement of serum bone Gla-protein (BGP) in humans with an ovine BGP-based radioimmunoassay. *Clin Chem* 1990; 36: 1620-1624.
139. KAO PC, RIGGS BL, SCHRYVER PG. Development and evaluation of an osteocalcin chemiluminoimmunoassay. *Clin Chem* 1993; 39: 1369-1374.
140. GUNDBERG CM, HAUSCHKA PV, LIAN JB, GALLOP PM. Osteocalcin: Isolation, characterization and detection. *Methods Enzymol* 1984; 107: 516-565.
141. DELMAS PD, TRACY RP, RIGGS BL, MANN KG. Identification of the noncollagenous proteins of bovine bone by two-dimensional gel electrophoresis. *Calcif Tissue Int* 1984; 36: 308-316.
142. GUNDBERG CM, ANDERSON M, DICKSON I, GALLOP PM. "Glycated"

- osteocalcin in human and bovine bone. *J Biol Chem* 1986; 261: 14557-14561.
143. PLANTALECH L, GUILLAUMONT M, VERGNAUD P, LECLERCQ M, DELMAS PD. Impairment of gamma carboxylation of circulating osteocalcin (Bone Gla Protein) in elderly women. *J Bone Miner Res* 1991; 6: 1211-1216.
144. SZULC P, CHAPUY MC, MEUNIER PJ, DELMAS PD. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Invest* 1993; 91: 1769-1774.
145. SZULC P, ARLOT M, CHAPUY MC, DUBOEUF F, MEUNIER PJ, DELMAS PD. Serum undercarboxylated osteocalcin correlates with hip bone mineral density in elderly women. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1591-1595.

Presidentes:
Dr. Ruiz Amil

Vocales:
1. Jose Traba Villamest
2. Alfonso Caramelo Diaz
3. Ricardo Saucedo

Secretario:
1. Rocio Gomez

Reunido, en el día de hoy, el Tribunal que al
marzo se declara, para juzgar esta tesis doctoral,
por unanimidad calificarla
Apto con laude
en el día de hoy de 19 96
El Secretario del Tribunal

