

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**



TESIS DOCTORAL

Marcadores bioquímicos de remodelado óseo: utilidad en el estudio de las patologías del hueso

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Azucena Díaz Martín

Directoras

**Concepción de la Piedra Gordo
María Luisa Traba Villameytide**

Madrid

© María Azucena Díaz Martín, 1998

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO:
UTILIDAD EN EL ESTUDIO DE PATOLOGÍAS DEL HUESO**

Memoria que para optar al grado de Doctora en Farmacia presenta:

M^a Azucena Díaz Martín

Directoras de Tesis:

Concepción de la Piedra Gordo

M^a Luisa Traba Villameytide

Madrid, Mayo de 1998

A Juan Luis y a mis padres

Este trabajo se ha realizado en la Fundación Jiménez Díaz, en el Laboratorio de la Unidad Metabólica, en su mayor parte, y en el Laboratorio de Bioquímica, Sección de Metabolismo Mineral y Óseo.

Quiero agradecer en primer lugar, a las Dras. Dña. Concepción de la Piedra Gordo y Dña. M^a Luisa Traba Villameytide el haber aceptado la dirección de este trabajo, así como el apoyo prestado para su realización.

Al Dr. D. Aurelio Rapado Errazti, creador del Laboratorio de la Unidad Metabólica de la Fundación Jiménez Díaz, quiero agradecer el haberme abierto las puertas de su laboratorio donde me inicié en el campo de la investigación y fruto del cuál ha sido, entre otros, la realización de este trabajo, que hoy presento como Tesis Doctoral.

Por otra parte, doy también las gracias al Dr. D. Juan Antonio Gómez Gerique, por permitirme finalizar este trabajo en el Departamento de Bioquímica, Sección de Metabolismo Mineral y Óseo de la Fundación Jiménez Díaz.

Agradezco al Dr. D. Angel Giménez Solves, la confianza en mí depositada al aceptar ser tutor de esta Tesis.

A los doctores D. Aurelio Rapado Errazti, D. Manuel Sosa Henríquez y D. Enrique García de la Peña, agradezco el haberme proporcionado los pacientes para la realización de este trabajo (Dr. Rapado Errazti: una parte de los pacientes con osteoporosis postmenopáusicas y pacientes con enfermedad ósea de Paget; Dr. Sosa Henríquez: otra parte de los pacientes con osteoporosis postmenopáusicas; Dr. García de la Peña: pacientes con metástasis óseas).

A la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz, doy las gracias por concederme una beca que me ha permitido realizar, entre otros trabajos, esta Tesis Doctoral.

Asimismo, quiero agradecer a los laboratorios Cis España, Merck y Ortho Clinical Diagnostics, el apoyo económico que me dieron en los últimos meses de realización de este trabajo y que me permitieron finalizar el mismo.

Un agradecimiento muy especial a mis padres, origen de lo que hoy he llegado a ser, por la educación recibida y por su esfuerzo y apoyo constantes. A Juan Luis, mi esposo, mi punto de apoyo y fiel colaborador, por la ilusión que ha puesto en ver terminado el presente trabajo dándome energías e infundiéndome ánimos en los momentos más difíciles.

Por último, hago extensivo mi agradecimiento a todos mis compañeros de laboratorio y amigos, y a todas aquellas personas que de un modo directo ó indirecto han hecho posible que este trabajo llegase a buen fin.

M^a Azucena Díaz Martín

AEU:	Asociación Española de Urología
BGP:	Osteocalcina (Bone-Gla-Protein)
Ca:	Calcio
Cr:	Creatinina
CTX:	Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I
Dpd:	Desoxipiridinolinas
ECO:	Equivalentes de Colágeno Óseo
EIA:	Enzimoimmunoensayo
ELISA:	Enzimoimmunoensayo competitivo
EOP:	Enfermedad Ósea de Paget
FAO:	Isoenzima Ósea de la Fosfatasa Alcalina
FAT:	Fosfatasa Alcalina total
HBP:	Hiperplasia Benigna de Próstata
Hp:	Hidroxiprolina
ICTP:	Telopéptidos Carboxiterminales del Colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina
IRMA:	Ensayo Inmunorradiométrico
NTx:	Telopéptidos Aminoterminales del Colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina
OSP:	Osteoporosis
OSPp:	Osteoporosis postmenopáusica
PICP:	Propéptido Carboxiterminal del Procolágeno I
PINP:	Propéptido Aminoterminal del Procolágeno I
PSA:	Antígeno Sérico Prostático
PYD:	Piridinolinas totales (Piridinolinas Y Desoxipiridinolinas)
Pyr:	Piridinolinas
RIA:	Radioimmunoensayo
UI:	Unidades Internacionales
UICC:	Unión Internacional Contra el Cáncer

Índice

- 1. Introducción**
- 2. Objetivos**
- 3. Materiales y Métodos**
- 4. Resultados**
- 5. Discusión**
- 6. Conclusiones**
- 7. Bibliografía**

1.	Introducción	1
1.1. El tejido óseo		2
1.2. Las células óseas		3
1.2.1. El osteoblasto		3
1.2.2. El osteoclasto		5
1.3. El remodelado óseo		7
1.3.1. Técnicas de estudio del remodelado óseo		7
1.4. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo		9
1.4.1. Marcadores bioquímicos de FORMACIÓN ÓSEA		12
1.4.1.1. Actividad enzimática osteoblástica: Mineralización de la matriz ósea		12
1.4.1.1.1. Fosfatasa alcalina total (FAt)		13
1.4.1.1.2. Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina (FAO)		14
1.4.1.2. Péptidos sintetizados por el osteoblasto		16
1.4.1.2.1. Proteínas no colágenas: Osteocalcina (BGP)		16
1.4.1.2.2. Proteínas colágenas: Propéptidos del procolágeno I		21
1.4.1.2.2.1. Introducción general sobre la síntesis del colágeno		21
1.4.1.2.2.2. Propéptido aminoterminal del procolágeno I (PINP) Propéptido carboxiterminal del procolágeno I (PICP)		23
1.4.2. Marcadores bioquímicos de RESORCIÓN ÓSEA		27
1.4.2.1. Derivados de la degradación de la fase mineral del hueso		27
1.4.2.1.1. Calcio (Ca)		27
1.4.2.2. Derivados de la degradación del colágeno óseo		27
1.4.2.2.1. Estructura del colágeno maduro y productos de su degradación		27
1.4.2.2.2. Hidroxiprolina (Hp)		28
1.4.2.2.3. Piridinolina y desoxipiridinolina (Pyr y Dpd)		29
1.4.2.2.4. Telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina (ICTP)		33
1.4.2.2.5. Telopéptidos aminoterminal del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina (NTx)		34
1.4.2.2.6. Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I (CTX) ...		36

1.5. Algunas patologías óseas	38
1.5.1. Osteoporosis postmenopáusicas	38
1.5.2. Enfermedad ósea de Paget	40
1.5.3. Metástasis óseas en el carcinoma de próstata	42
1.6. Consideraciones finales de la introducción	44
2.	Objetivos 46
<hr/>	
3.	Materiales y Métodos 49
<hr/>	
3.1. Pacientes y sujetos controles	50
3.1.1. Características y criterio diagnóstico	50
3.1.1.1. Estudio 1: Osteoporosis postmenopáusicas	50
3.1.1.2. Estudio 2: Enfermedad ósea de Paget	51
3.1.1.3. Estudio 3: Detección precoz de las metástasis óseas en el carcinoma de próstata	52
3.1.2. Determinaciones realizadas	53
3.1.2.1. Estudio 1: Osteoporosis postmenopáusicas	53
3.1.2.2. Estudio 2: Enfermedad ósea de Paget	53
3.1.2.3. Estudio 3: Detección precoz de las metástasis óseas en el carcinoma de próstata	53
3.2. Protocolo experimental	56
3.2.1. Muestras: Obtención y condiciones de almacenamiento	56
3.2.2. Métodos	56
3.2.2.1. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo	56
3.2.2.1.1. Marcadores bioquímicos de FORMACIÓN ÓSEA	56
3.2.2.1.1.1. Fosfatasa alcalina total (FAt) en suero	56
3.2.2.1.1.2. Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina (FAO) en suero	57
a) EIA ALKPHASE-B™	57

	b) IRMA TANDEM [®] -OSTASE [™]	58
3.2.2.1.1.3.	Osteocalcina (BGP) en suero	58
	a) ELISA NovoCalcin [™]	58
	b) IRMA ELSA-OST-NAT	59
	c) IRMA ELSA-OSTEO	60
3.2.2.1.1.4.	Propéptido aminoterminal del procolágeno I (PINP) en suero	60
	RIA PROCOLLAGEN INTACT PINP [¹²⁵ I]	60
3.2.2.1.1.5.	Propéptido carboxiterminal del procolágeno I (PICP) en suero	61
	RIA PROCOLLAGEN PICP [¹²⁵ I]	61
3.2.2.1.2.	Marcadores bioquímicos de RESORCIÓN ÓSEA	62
3.2.2.1.2.1.	Calcio (Ca) en orina	62
3.2.2.1.2.2.	Hidroxiprolina (Hp) en orina	62
3.2.2.1.2.3.	Piridinolinas totales (PYD) libres en orina	63
	ELISA PYRILINKS [®]	63
3.2.2.1.2.4.	Desoxipiridinolinas (Dpd) libres en orina	63
	ELISA PYRILINKS [™] -D	63
3.2.2.1.2.5.	Telopéptidos carboxiterminales del colágeno I unidos por puentes de piridinolina (ICTP) en suero	64
	RIA TELOPEPTIDE ICTP [¹²⁵ I]	64
3.2.2.1.2.6.	Telopéptidos aminoterminal del colágeno I unidos por puentes de piridinolina (NTx) en orina	65
	ELISA OSTEOMARK [®]	65
3.2.2.1.2.7.	Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno I (CTX) en orina	65
	ELISA CrossLapsEIA	65
3.2.2.2.	Otras determinaciones bioquímicas	66
3.2.2.2.1.	Creatinina (Cr) en orina	66
3.2.2.2.2.	Antígeno sérico prostático (PSA) en suero	66
3.2.2.3.	Densitometría ósea	67
3.2.2.4.	Rayos X	67

3.2.2.5. Gammagrafía ósea	67
3.2.2.6. Análisis estadístico	68
3.2.2.6.1. Prueba de la t de Student no emparejada	68
3.2.2.6.2. Curvas ROC (Receiver-Operating Characteristics)	68
3.2.2.6.3. Test de ANOVA para medidas repetidas	68
3.2.2.6.4. Test de ANOVA	68

4.	Resultados	69
-----------	-------------------	-----------

4.1. Estudio 1: Osteoporosis postmenopáusic	70
4.1.1. Marcadores bioquímicos de formación ósea	70
4.1.2. Marcadores bioquímicos de resorción ósea	73
4.2. Estudio 2: Enfermedad ósea de Paget	78
4.2.1. Marcadores bioquímicos de formación ósea	78
4.2.2. Marcadores bioquímicos de resorción ósea	82
4.3. Estudio 3: Detección precoz de las metástasis óseas	
en el carcinoma de próstata	86
4.3.1. Marcadores bioquímicos de formación ósea	86

5.	Discusión	93
-----------	------------------	-----------

6.	Conclusiones	120
-----------	---------------------	------------

7.	Bibliografía	123
-----------	---------------------	------------

1

Introducción

- 1.1. El tejido óseo**
- 1.2. Las células óseas**
- 1.3. El remodelado óseo**
- 1.4. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo**
- 1.5. Algunas patologías óseas**
- 1.6. Consideraciones finales de la introducción**

1.1. El tejido óseo

El hueso es un tejido conectivo que realiza tres funciones fundamentales en el organismo: a) permite la configuración y funciones locomotoras del cuerpo (*función mecánica*); b) protege a los órganos vitales y sirve de asiento de la médula ósea (*función protectora*) y c) actúa como reserva de iones (*función metabólica*) (1,2). A través de esta última, el hueso colabora en el mantenimiento de la homeostasis del calcio y fósforo en el líquido extracelular, hecho esencial para la vida.

A pesar de la importancia de estas funciones, el estudio del metabolismo y la fisiopatología del hueso no ha tenido un desarrollo histórico similar al de otros órganos o sistemas, correspondiendo a las últimas décadas el descubrimiento de la riqueza biológica de este tejido, su capacidad de respuesta frente a múltiples moduladores hormonales y estímulos físicos, y la interconexión con el sistema inmunológico (3-5).

El estudio del metabolismo óseo ha sido asociado, en parte, al interés suscitado por la osteoporosis, que es, sin duda, la afección ósea epidemiológicamente más importante.

El hueso está constituido por un componente mineral (65%), una matriz orgánica (33%) y un componente celular (2%). El *componente mineral* está formado, fundamentalmente, por hidroxapatito [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], que es la forma cristalizada del fosfato tricálcico amorfo. También existen, en menor proporción, CO_3^{2-} , Mg^{2+} , citratos, Na^+ , K^+ , sulfatos etc. La *matriz orgánica* se compone de colágeno tipo I (90%) y de una sustancia base rica en glicosaminoglicanos (glicoproteínas y proteoglicanos). También están presentes en la matriz orgánica numerosas proteínas no colágenas como la osteocalcina, osteonectina, $\alpha_2\text{SH}$ glicoproteína así como ciertos lípidos y líquido extracelular. La mayoría de las proteínas no colágenas son sintetizadas por las células formadoras del hueso, aunque también existe un número de proteínas plasmáticas que son absorbidas por la matriz orgánica, como la $\alpha_2\text{SH}$ glicoproteína, que es sintetizada en el hígado (6). Las *células* propias del tejido óseo son el osteoblasto y el osteoclasto (7). Los osteoblastos son las células formadoras del hueso, mientras que los osteoclastos llevan a

cabo el proceso inverso, la destrucción ósea, que es lo que se ha denominado resorción ósea.

1.2. Las células óseas

1.2.1. El osteoblasto

Como hemos dicho anteriormente, los osteoblastos son las células encargadas de la formación ósea, fenómeno consistente en la síntesis de matriz orgánica y su posterior mineralización. Sus precursores son las células del estroma de la médula ósea (8). Estas células proliferan y se diferencian en preosteoblastos y a continuación en osteoblastos maduros.

Estructuralmente, se caracterizan por ser células gruesas y alineadas. Poseen un gran retículo endoplásmico rugoso y un prominente aparato de Golgi, características típicas de las células que sintetizan proteínas que después liberan al exterior. La membrana plasmática es rica en fosfatasa alcalina, actividad enzimática que está íntimamente implicada en la mineralización de la matriz (9).

Los osteoblastos recubren la capa de matriz ósea que están produciendo y que aún no está mineralizada (tejido osteoide) (Fig. 1). La presencia del osteoide es debida a un retraso entre la formación de la matriz y su posterior mineralización (el periodo de maduración del osteoide abarca unos 10 días). Cuando terminan su periodo de secreción pasan a ser células de recubrimiento o a osteocitos (1).

Su principal producto es el *colágeno tipo I*. Además del colágeno, los osteoblastos sintetizan una serie de proteínas de la matriz ósea, como la *osteocalcina*, osteopontina y osteonectina. Asimismo, son responsables de la síntesis de proteoglicanos, macromoléculas en las que una porción de carbohidratos está unida covalentemente a polipéptidos, y de factores de crecimiento como el “transforming growth factor” (7).

Aunque las funciones atribuidas al osteoblasto son básicamente la formación de la matriz ósea y la mineralización de ésta, nos parece especialmente

importante destacar que, en la actualidad, se está considerando la posible participación de los osteoblastos en la regulación de la resorción. La idea está basada en la existencia de receptores en los osteoblastos para la hormona paratiroidea (PTH) y la 1,25 dihidroxivitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) (hormonas implicadas en la resorción ósea), y la falta de evidencia de que existan receptores de dichos factores en los osteoclastos (7).

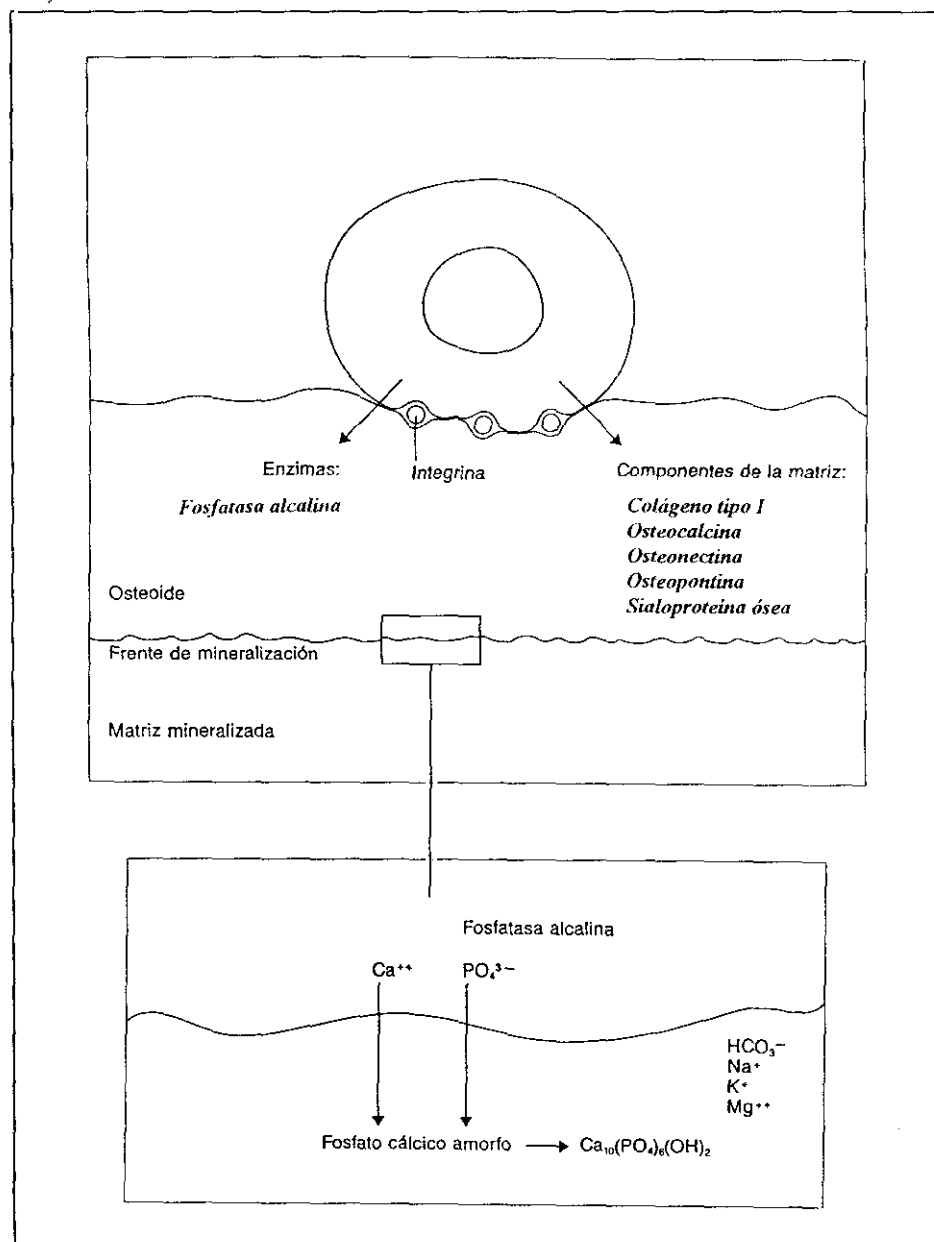


Fig. 1: Esquema de un osteoblasto. La célula sintetiza la matriz proteica (por ej. colágeno tipo I, osteocalcina, osteonectina, osteopontina y sialoproteína ósea) y diversos enzimas (por ej. fosfatasa alcalina). En el frente de mineralización (detalle), el calcio y el fosfato orgánico, a través de la participación de la fosfatasa alcalina forma fosfato cálcico amorfo, que posteriormente se transforma en hidroxipatito.

1.2.2. El osteoclasto

Los osteoclastos son las células encargadas de la resorción ósea, que consiste en la disolución del mineral óseo y la degradación posterior de la matriz (10).

Los osteoclastos son células gigantes (20-50µm de diámetro) que se forman a partir de precursores de la serie monocítica (11). Estructuralmente se caracterizan por ser células multinucleadas y poseer un borde rugoso adyacente a la zona en la que están resorbiendo hueso. En el hueso normal generalmente se observan entre uno y cinco núcleos con un nucleolo prominente, pero en las enfermedades que cursan con aumento del reclutamiento osteoclástico, el número de núcleos puede pasar de 20. Contienen bombas de protones, que crean un ambiente ácido por debajo del borde rugoso y producen fosfatasa ácida tartrato resistente (FATR) y otros enzimas lisosomales.

El osteoclasto es una auténtica factoría enzimática que funciona como un centro de reciclaje (Fig. 2). En la disolución del mineral óseo parece estar fundamentalmente implicada la producción de iones hidrógeno. En este sentido, la anhidrasa carbónica juega un papel importante (12). Como principal producto de la degradación del mineral óseo, se produce la salida del *calcio* hacia el líquido extracelular. Por otra parte, una serie de enzimas lisosomales (entre las que se encuentra la FATR) participan activamente en la degradación de los otros componentes de la matriz, entre los que el *colágeno tipo I* constituye el 90%. Entre los productos originados por la degradación del colágeno tipo I se encuentran aminoácidos libres como la *hidroxiprolina*, y otras estructuras más complejas como los *puentes de piridinolina* libres ó unidos a fragmentos del colágeno de la zona helicoidal ó telopeptídica, y *fragmentos específicos de la propia zona telopeptídica*, como veremos más adelante.

Los productos de la degradación del hueso son recogidos por un lisosoma secundario y vertidos hacia la circulación.

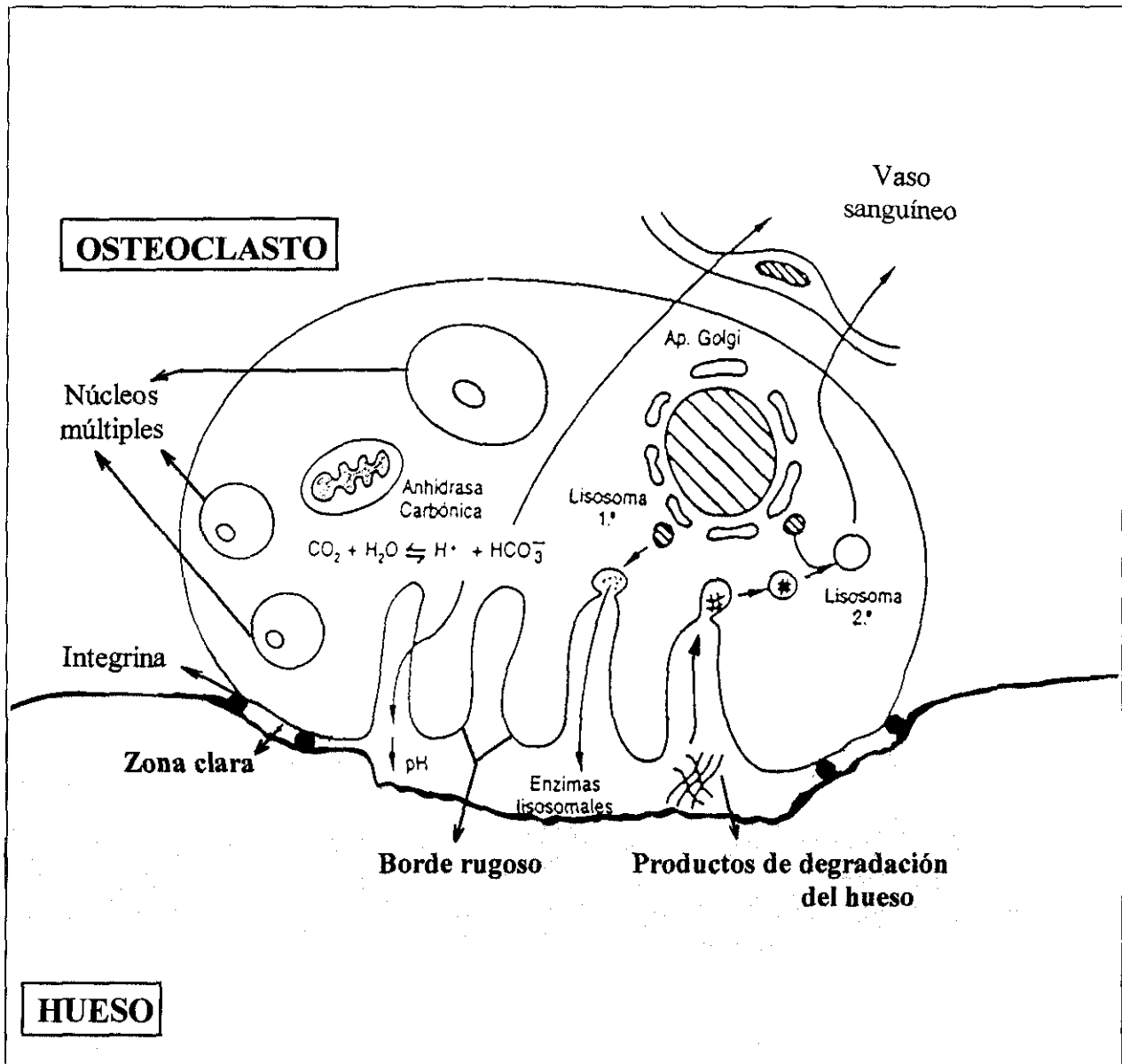


Fig. 2: Esquema de un osteoclasto. La célula está unida al hueso por medio de integrinas en la zona clara, que cierra un compartimento que contiene el borde rugoso. La resorción real de hueso se desarrolla por medio de la liberación de diversos enzimas lisosomales procedentes de la región perinuclear de Golgi (fosfatasa ácida tartrato resistente etc) que se desplazan hasta el borde activo de la célula, y son vertidas hacia el exterior en el ambiente de pH bajo creado por las bombas de protones (anhidrasa carbónica) de la membrana del borde rugoso. Los productos de la degradación del hueso son recogidos por un lisosoma secundario y vertidos hacia la circulación.

1.3. El remodelado óseo

El tejido óseo es un tejido dinámico, sometido a un proceso constante y equilibrado de formación y de resorción (Fig. 3). Esta dinámica continua de formación y destrucción del hueso se denomina remodelado óseo (13,14). En condiciones normales existe un equilibrio entre ambos procesos, fenómeno denominado acoplamiento óseo, hecho que hace que la misma cantidad de hueso que se ha destruido se deposite de nuevo durante la posterior formación.

El remodelado óseo es un proceso complejo en el que están involucrados un gran número de funciones celulares dirigidas hacia la coordinación entre el proceso de formación y de resorción del hueso. El balance entre resorción y formación determina el resultado del ciclo de remodelación dando lugar a un incremento de la masa ósea si es positivo (es lo que sucede durante el crecimiento corporal) o bien, a una pérdida patente de tejido esquelético si es negativo, como ocurre, por ejemplo, en la osteoporosis.

El remodelado óseo está regulado por hormonas sistémicas y por factores locales que afectan tanto a células de la línea osteoblástica como de la línea osteoclástica, ejerciendo sus acciones sobre la replicación de células indiferenciadas, sobre el reclutamiento de células y sobre la función de diferenciación celular (15).

El conocimiento del estado de remodelado del hueso es de extraordinaria importancia en el estudio de las enfermedades metabólicas óseas. Algunas de ellas, como la osteoporosis, comienzan a representar un grave problema socioeconómico en los países desarrollados. Por ello, es importante poder disponer de técnicas que nos permitan medir, del modo más exacto y precoz posible, los procesos de formación y de resorción óseos.

1.3.1. Técnicas de estudio del remodelado óseo

Existen diferentes formas de abordar este estudio. Las técnicas que se han utilizado a lo largo del tiempo han sido la radiología, la densitometría ósea, la histomorfometría ósea y los marcadores bioquímicos de remodelado óseo.

Las técnicas de imagen, radiología y densitometría ósea, son técnicas “estáticas”, nos dan idea de cómo está el hueso en un momento determinado, pero no revelan lo que está ocurriendo en ese mismo momento a nivel de los procesos de formación y resorción óseos. La histomorfometría ósea o biopsia ósea, y los marcadores bioquímicos de remodelado óseo, son técnicas “dinámicas”, reflejan lo que está sucediendo a nivel del remodelado del hueso (formación/resorción) en el momento de su realización.

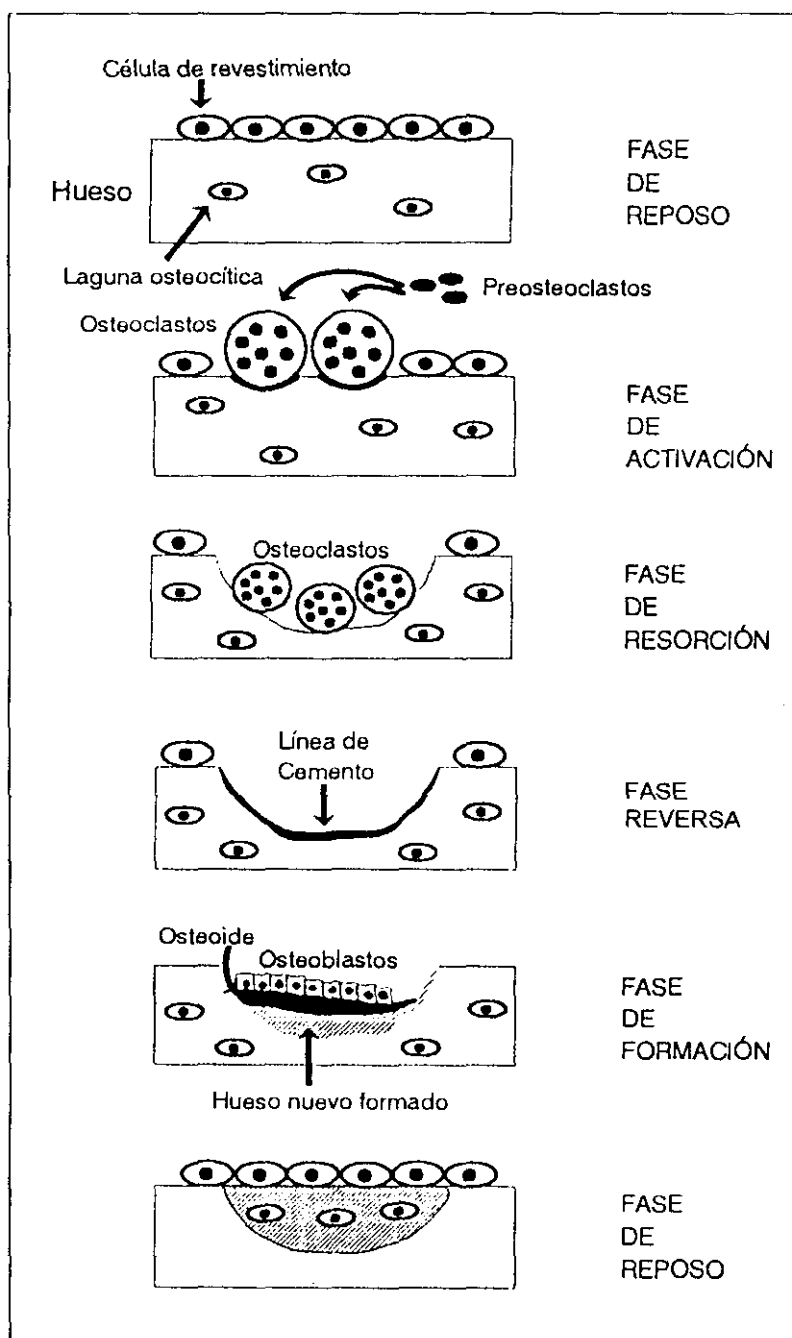


Fig. 3: Fases del remodelado óseo. Una vez que se ha producido la activación del proceso de remodelado en un lugar determinado del hueso, mediado por factores locales y/o sistémicos, comienza la fase de resorción. El osteoclasto destruye entonces el hueso mineralizado y a continuación algunas células monocíticas depositan una fina línea de matriz, que prepara la superficie de resorción para el comienzo de la nueva formación ósea que llevan a cabo los osteoblastos.

Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo presentan una serie de ventajas sobre las otras técnicas mencionadas. En primer lugar, son mucho más sensibles que las técnicas de imagen. Para observar cambios significativos con las técnicas de imagen es necesario que transcurra un tiempo mínimo de 6 meses ó de un año, cuando ya se han producido variaciones cuantitativamente importantes. Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo permiten evaluar variaciones en tiempos mucho más pequeños, como días e incluso horas. Por ello, pueden ser de gran utilidad cuando se quiere monitorizar la capacidad de respuesta a un determinado tratamiento (16). En segundo lugar, la histomorfometría ósea es una técnica invasiva y compleja, por lo que no puede repetirse con frecuencia en un mismo paciente (17). Además, esta técnica es muy costosa y sólo refleja el remodelado óseo en una determinada zona del esqueleto. Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo, sin embargo, reflejan el remodelado óseo en todo el esqueleto, permitiendo una evaluación continua del paciente, a través de una simple muestra de sangre y/o de orina.

En los apartados siguientes de la introducción de este trabajo, vamos a profundizar en el estudio de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo.

1.4. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo

Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo se utilizan para medir el grado de formación o resorción del hueso. Son sustancias (enzimas, minerales, péptidos) que pueden medirse en el suero y orina de los individuos, y que permiten el estudio del remodelado óseo de los mismos (18). Dicha medida se puede realizar desde dos puntos de vista: a) determinación de los productos específicos sintetizados por las células óseas (fosfatasa alcalina, osteocalcina, propéptidos, fosfatasa ácida tartrato resistente etc.); b) determinación de los componentes del hueso vertidos a la circulación durante la resorción ósea (calcio, hidroxiprolina, piridinolinas, telopéptidos etc.)

Estos marcadores se clasifican, en función de la fase del remodelado óseo en la que intervienen ó se forman, en marcadores bioquímicos de formación ósea y marcadores bioquímicos de resorción ósea.

En la Tabla I se representan los principales marcadores bioquímicos de remodelado óseo disponibles hoy en día para el estudio de la fisiopatología del hueso.

Tabla I: Marcadores Bioquímicos de Remodelado Óseo

I. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE FORMACIÓN ÓSEA
<p>Actividad enzimática osteoblástica</p> <ul style="list-style-type: none"> *Fosfatasa alcalina total en suero (FAt) *Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina en suero (FAO) <p>Péptidos sintetizados por el osteoblasto</p> <ul style="list-style-type: none"> *Osteocalcina en suero (BGP) *Propéptido aminoterminal del procolágeno I en suero (PINP) *Propéptido carboxiterminal del procolágeno I en suero (PICP)
II. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE RESORCIÓN ÓSEA
<p>Actividad enzimática osteoclástica</p> <ul style="list-style-type: none"> *Fosfatasa ácida tartrato resistente en suero (FATR) <p>Derivados de la degradación de la fase mineral del hueso</p> <ul style="list-style-type: none"> *Calcio en orina (Ca) <p>Derivados de la degradación del colágeno óseo</p> <ul style="list-style-type: none"> *Hidroxiprolina en orina (Hp) *Puentes de piridinolina en orina <ul style="list-style-type: none"> - Puentes de piridinolina (Pyr) - Puentes de desoxipiridinolina (Dpd) *Telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en suero (ICTP) *Telopéptidos aminoterminal del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en orina (NTx) *Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I en orina (CTX)

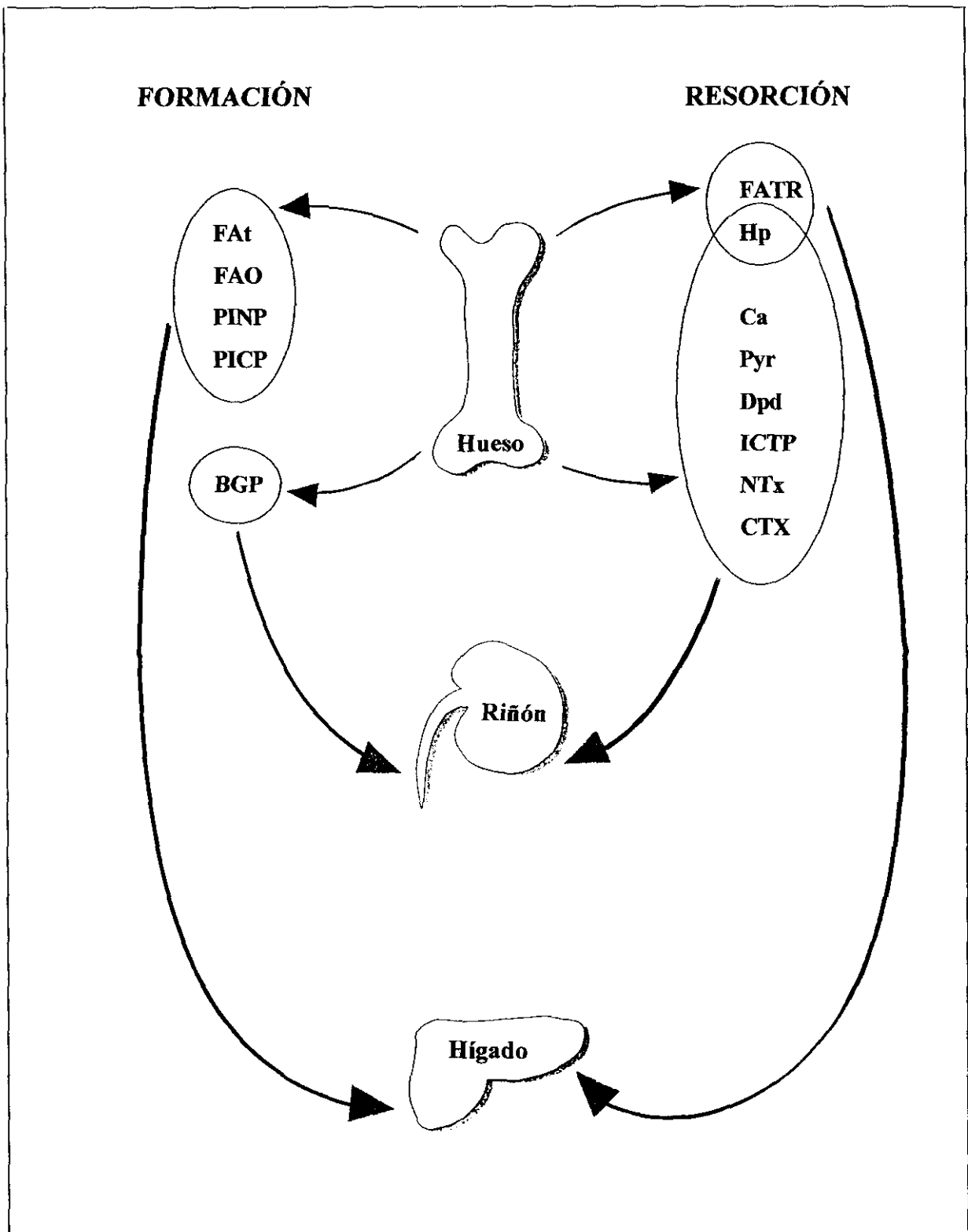


Fig. 4: Marcadores bioquímicos de remodelado óseo y su principal vía de eliminación. *FAT:* Fosfatasa alcalina total; *FAO:* Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina; *BGP:* Osteocalcina; *PINP* Y *PICP:* Propéptidos amino y carboxiterminales, respectivamente, del procolágeno I; *FATR:* fosfatasa ácida tartrato resistente, *Ca:* Calcio; *Hp:* Hidroxiprolina; *Pyr:* Piridinolinas; *Dpd:* Desoxipiridinolinas; *ICTP* y *NTx:* Telopéptidos carboxi y aminoterminales del colágeno tipo I, respectivamente, unidos por puentes de piridinolina; *CTX:* Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I.

1.4.1. Marcadores bioquímicos de FORMACIÓN ÓSEA

1.4.1.1. Actividad enzimática osteoblástica: Mineralización de la matriz ósea

La mineralización de la matriz orgánica del hueso tiene lugar a una cierta distancia de los osteoblastos y está mediada por unas vesículas derivadas de estas células (Figs. 1, 5).

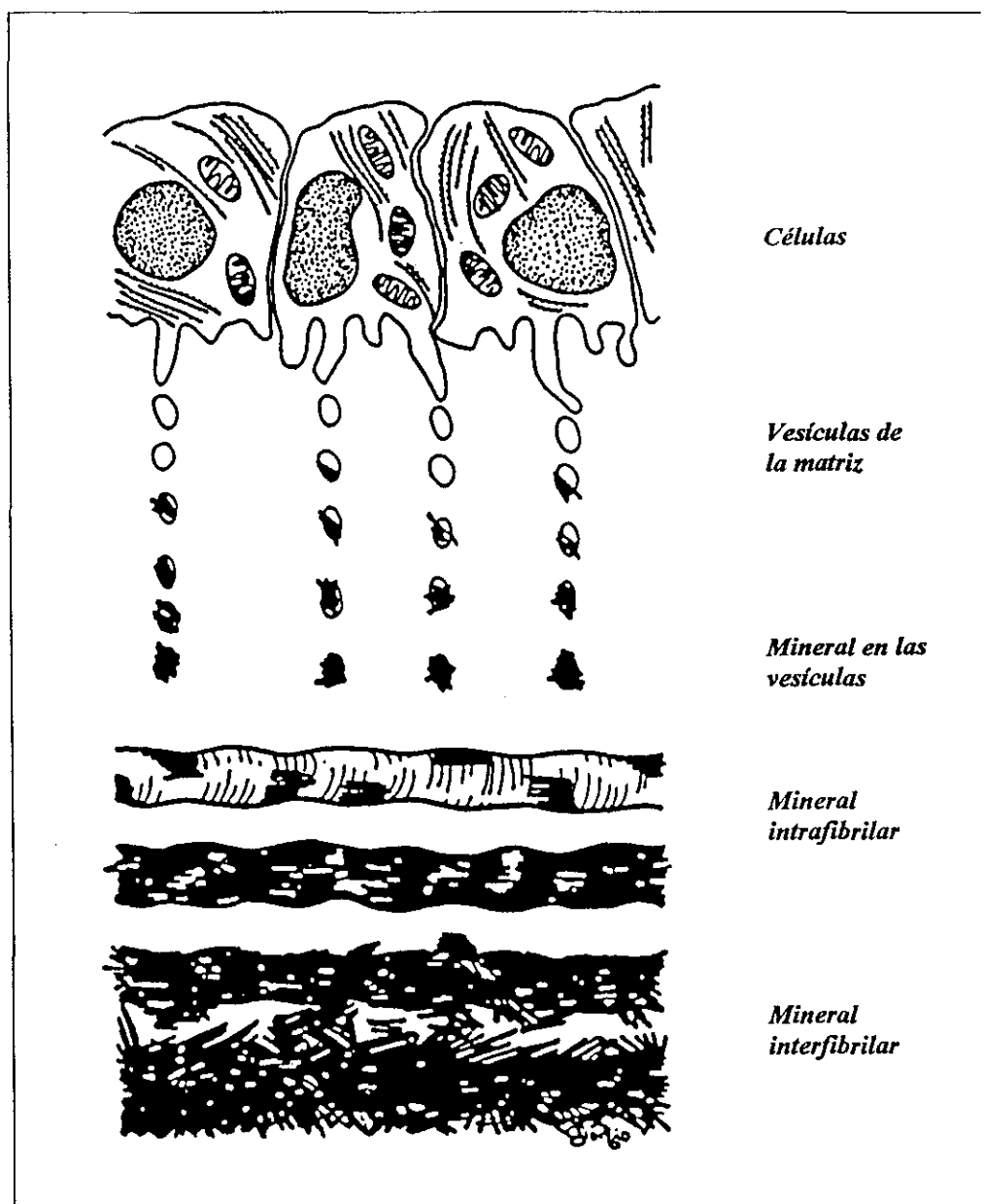


Fig. 5: Proceso de mineralización de la matriz ósea mediado por las vesículas derivadas de los osteoblastos. El primer mineral aparece dentro de estas vesículas que después se rompen y sirven como inicio y propagación de la mineralización.

Las vesículas contienen pirofosfatasa, ATP-asa alcalina y fosfatasa alcalina. Las pirofosfatasas inactivan los inhibidores locales de la mineralización (pirofosfatos) y la ATP-asa alcalina suministra la energía para llevar a cabo el proceso. Recientemente, se ha demostrado que la fosfatasa alcalina es una glicoproteína ligadora de calcio. Los fosfolípidos de la membrana y la fosfatasa alcalina secuestran calcio, que junto con el fosfato, que es también suministrado por la fosfatasa alcalina, forman el mineral óseo (hidroxiapatito). El primer mineral aparece así dentro de esas vesículas, que después se rompen y sirven como inicio y propagación de la mineralización (Fig. 5) (9).

Esta actividad del osteoblasto se ha utilizado clásicamente como marcador de formación ósea, tanto como tal isoenzima ósea o como fosfatasa alcalina total.

1.4.1.1.1. Fosfatasa alcalina total (FAt)

La fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1.) es un enzima de membrana de naturaleza glicoproteica, que es liberada al suero por diferentes órganos. Una vez liberada, es aclarada del organismo a través de receptores sialoglicoproteicos localizados en el hígado.

Existen cuatro grupos principales de fosfatasa alcalina (isoenzimas): intestinal, placentaria, “placentaria-like” y hepática/renal/ósea (19). Las tres últimas son producto de un mismo gen, y la pequeña diferencia estructural entre ellas es debida a modificaciones postraduccionales, tales como la glicosilación (20).

En el hombre, en condiciones normales, la actividad total de fosfatasa alcalina en el suero es debida, fundamentalmente, a las isoenzimas ósea (producto de la actividad osteoblástica) y hepática (21). La isoenzima intestinal contribuye a dicha actividad en un 10% y sólo en un 25% de los casos, y la isoenzima placentaria sólo se detecta en sangre a partir de la decimosexta ó vigésima semana de embarazo (22).

En cuanto a su utilidad clínica, y a pesar de la existencia en el suero humano de diferentes isoenzimas, lo que la convierte en un marcador no específico

de la actividad osteoblástica, la FAt en suero se lleva utilizando más de 50 años como marcador bioquímico de formación ósea (23) y generalmente se acepta que es un marcador válido, sobre todo en aquellas patologías que presentan un incremento significativo de dicha actividad metabólica, como la enfermedad ósea de Paget (EOP). Sin embargo, presenta poca sensibilidad para el estudio de la osteoporosis (OSP), patología caracterizada por cambios muy sutiles en el remodelado del hueso (24).

Su determinación en suero está basada en la capacidad que tiene este enzima de hidrolizar ésteres monofosfato a pH alcalino. Es una reacción colorimétrica (25).

Los problemas derivados de la falta de especificidad ósea de la determinación de la FAt sérica se resuelven mediante la determinación de la actividad de la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina, marcador específico de la actividad osteoblástica.

1.4.1.1.2. Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina (FAO)

Como ya mencionamos en el apartado 1.2.1. la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina es una actividad enzimática que contienen los osteoblastos en su membrana plasmática en gran proporción y que está implicada en el proceso de mineralización de la matriz ósea (9). Por ello, se ha utilizado desde hace tiempo como marcador de formación del hueso.

En el apartado anterior comentamos que las isoenzimas ósea y hepática de la fosfatasa alcalina son las que contribuyen en mayor proporción a la actividad FAt en suero. Si bien ambas isoenzimas presentan una estructura proteica similar (19,26) éstas se diferencian en un gran número de propiedades como su movilidad electroforética, su capacidad de respuesta a la inactivación química, a la reactividad con la lectina, así como en su termoestabilidad y susceptibilidad a neuraminidasa. Los métodos empleados para cuantificar la isoenzima ósea y diferenciarla de las demás isoenzimas se han basado en estas diferencias.

La dificultad de distinguir entre todas las isoenzimas, y especialmente entre las isoenzimas ósea y hepática, dada la similitud de sus estructuras químicas, ha llevado al desarrollo de diversas técnicas cada vez más específicas a lo largo de los años.

Los primeros intentos para diferenciar las isoenzimas de la fosfatasa alcalina utilizaron como técnica la electroforesis (27) en gel de almidón (28), gel de acrilamida (29), gel de agarosa (30), ó acetato de celulosa (31). Estos procedimientos aunque han sido ampliamente utilizados, presentan el inconveniente de ser técnicas tediosas y su resolución es limitada.

Otros procedimientos de laboratorio que han sido propuestos para la evaluación rutinaria de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina utilizan la inactivación por calor (32), la inactivación química con urea (33) y/o la inhibición química con fenilalanina y homoarginina (34).

Estudios más recientes (1984) realizados por Rosalki et al. (35) han utilizado la lectina de germen de trigo (*triticum vulgare*) para diferenciar las isoenzimas ósea y hepática de la fosfatasa alcalina. Las lectinas son proteínas ligadoras de carbohidratos de origen vegetal, que han sido objeto de estudio para la diferenciación de isoenzimas. Estos autores observaron que la FAO precipita en un 80% con lectina, mientras que no se observa precipitación significativa de la isoenzima hepática. Mediante medida de la actividad enzimática antes y después de la precipitación es posible cuantificar ambas isoenzimas.

En 1986 Schoenau et al. (36) describieron un nuevo método rápido y reproducible para la separación de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Desde entonces, varios autores han utilizado el HPLC para la separación de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina aunque con resultados diferentes (37,38). Si bien las técnicas que utilizan el HPLC son más específicas y sensibles que las utilizadas anteriormente, este método es complejo para ser utilizado de modo rutinario en el laboratorio.

Con objeto de conseguir técnicas cada vez más específicas para cuantificar las isoenzimas ósea y hepática de la fosfatasa alcalina, se hicieron estudios con anticuerpos policlonales específicos de estas isoenzimas pero sin éxito (39).

Los primeros intentos por parte de los laboratorios de producir anticuerpos específicos para la FAO y no para la isoenzima hepática, dieron como resultado reacciones cruzadas con ambas isoenzimas (40).

En 1985 Lawson et al. (41) y Baileys et al. (42) lograron la obtención de anticuerpos monoclonales que distinguían parcialmente entre estas isoenzimas. Sin embargo, los anticuerpos obtenidos eran sólo 2-5 veces más específicos de una isoenzima que de la otra.

En estudios más recientes, en 1989, Hill et al. (43) consiguieron aislar cinco anticuerpos monoclonales diferentes que reaccionaban preferentemente con la isoenzima ósea. A partir del desarrollo de estos anticuerpos para la FAO se han desarrollado nuevos métodos de inmunoensayo para la determinación de dicha isoenzima que han supuesto la aparición de nuevos métodos comerciales en los últimos años y que, en cierto modo, han revolucionado el campo de la medida osteoblástica de la actividad fosfatasa alcalina (43-45).

1.4.1.2. **Péptidos sintetizados por el osteoblasto**

1.4.1.2.1. **Proteínas no colágenas: Osteocalcina (BGP)**

La osteocalcina (Bone-Gla-Protein, BGP) es una proteína no colágena, de 49 aminoácidos (Peso molecular=5.800 Da) que está presente en la matriz ósea, en la dentina y en los tejidos mineralizados, pero su función exacta aún permanece desconocida (46). A pesar de que se ha encontrado expresión de ARN mensajero para BGP en otros tejidos diferentes al hueso, este último sigue siendo el principal productor de esta proteína, y por tanto puede ser considerada específica de actividad osteoblástica.

La BGP es sintetizada en el hueso por los osteoblastos (47). En experiencias tanto "in vitro" como "in vivo" se ha demostrado que el metabolito activo de la vitamina D, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, estimula dicha síntesis (47,48). Después

del colágeno, constituye el mayor componente de la matriz ósea, representando el 10-20% de las proteínas no colágenas y aproximadamente un 2% de las proteínas totales del hueso.

Esta proteína fué descubierta y aisladas sus estructuras primaria, secundaria y terciaria por dos equipos de investigadores en 1975-1976 (49,50). La principal característica estructural de la BGP es la presencia del aminoácido gammacarboxiglutámico (Gla). El Gla se forma, una vez que se ha sintetizado la molécula de BGP, por gammacarboxilación vitamina K dependiente de los residuos de ácido glutámico de la proteína (Fig. 6).

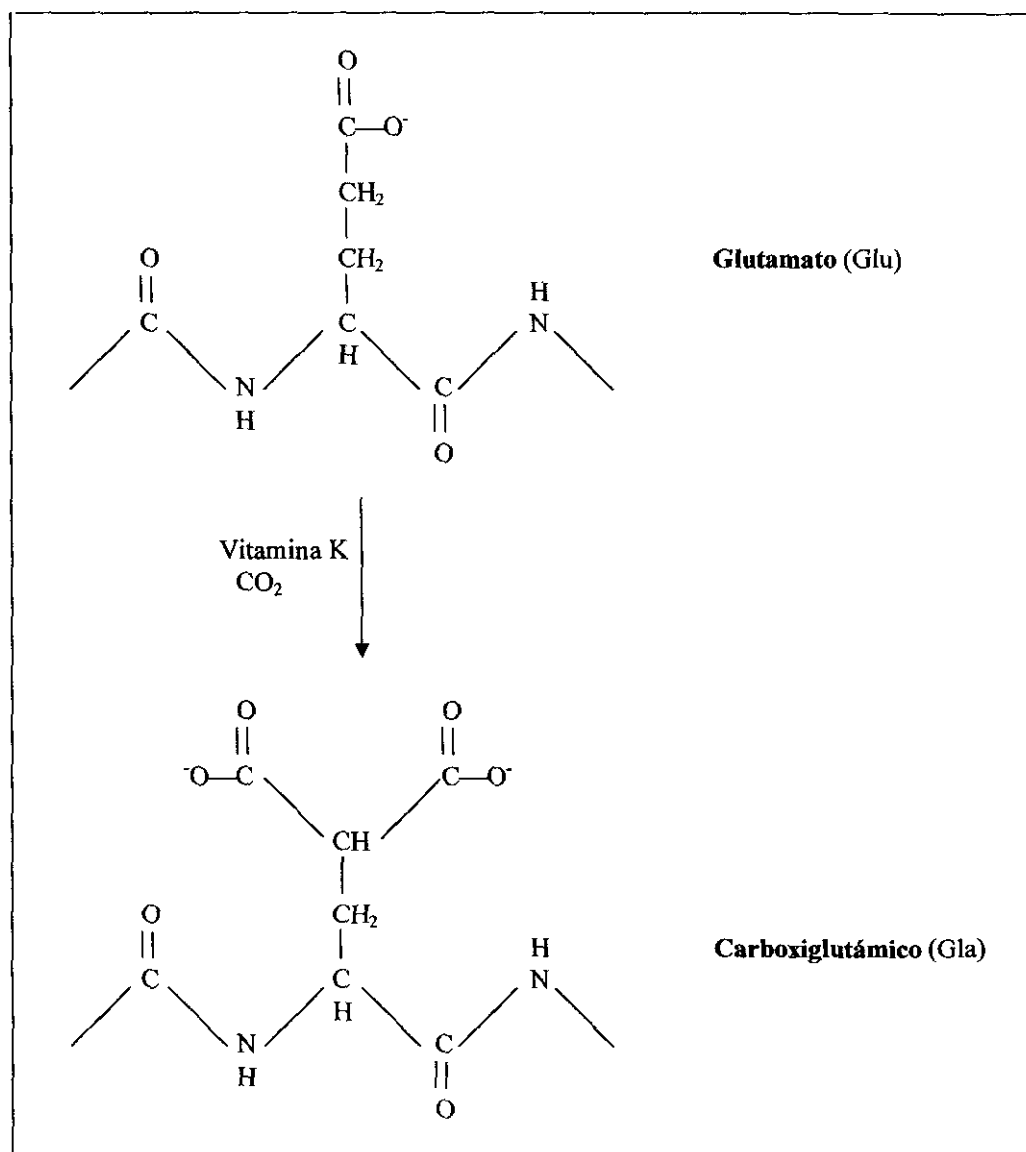


Fig. 6: Gammacarboxilación vitamina K dependiente de la osteocalcina.

El aminoácido Gla se encuentra en las posiciones 17, 21 y 24. Estos residuos confieren a la proteína la capacidad de unirse al Ca (51) y de modo aún más específico al hidroxapatito, principal componente mineral del hueso (52).

Una parte de la BGP sintetizada se une al hidroxapatito del hueso y otra parte es liberada a circulación (53). De la BGP total corporal, en circulación se encuentra menos de un 0.01%, lo que indica el gran reservorio de BGP que constituye el esqueleto. La osteocalcina circulante tiene una vida media muy corta (54) debido a que es rápidamente metabolizada (principalmente por el riñón y en menor medida por el hígado y por el hueso) (55-57) y aclarada por el riñón (58). La BGP también es aclarada por la placenta (22).

Como consecuencia de su metabolismo, y debido a que la molécula intacta de osteocalcina presenta dos puntos susceptibles de proteólisis entre los aminoácidos Arg¹⁹-Arg²⁰ y Arg⁴³-Arg⁴⁴, pueden encontrarse en circulación diferentes fragmentos de BGP además de la molécula intacta (fragmentos: 1-19, 20-43, 44-49, 1-43 y 20-49) (Fig. 7). Estos fragmentos circulantes, 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 (59). Garnero et al (60) utilizando una batería de anticuerpos monoclonales dirigidos contra varios epítomos de la molécula de BGP humana, encontraron que la molécula intacta representa aproximadamente en el suero de adultos un tercio de inmunoreactividad. De los dos tercios restantes, un tercio lo constituyen pequeños fragmentos, y el otro tercio un fragmento de gran tamaño perteneciente al extremo aminoterminal medio de la molécula de osteocalcina. Este hecho está directamente relacionado con la estabilidad de las muestras de laboratorio, un problema importante a la hora de determinar BGP. Se ha observado, que una fracción importante de la BGP intacta en suero se transforma rápidamente en el fragmento N-terminal-medio si el suero permanece a temperatura ambiente, dando lugar a una pérdida significativa de inmunoreactividad con la mayoría de los ensayos.

Debido a que es una proteína sintetizada por las células formadoras del hueso, su determinación en suero se ha venido utilizando como marcador de

formación ósea. Sin embargo, y debido a que los niveles séricos de BGP también pueden proceder de la BGP unida al hidroxapatito del hueso que es liberada a circulación durante la resorción ósea, hoy en día es considerada, más que como un marcador de formación ósea, como un marcador del remodelado óseo en general (61).

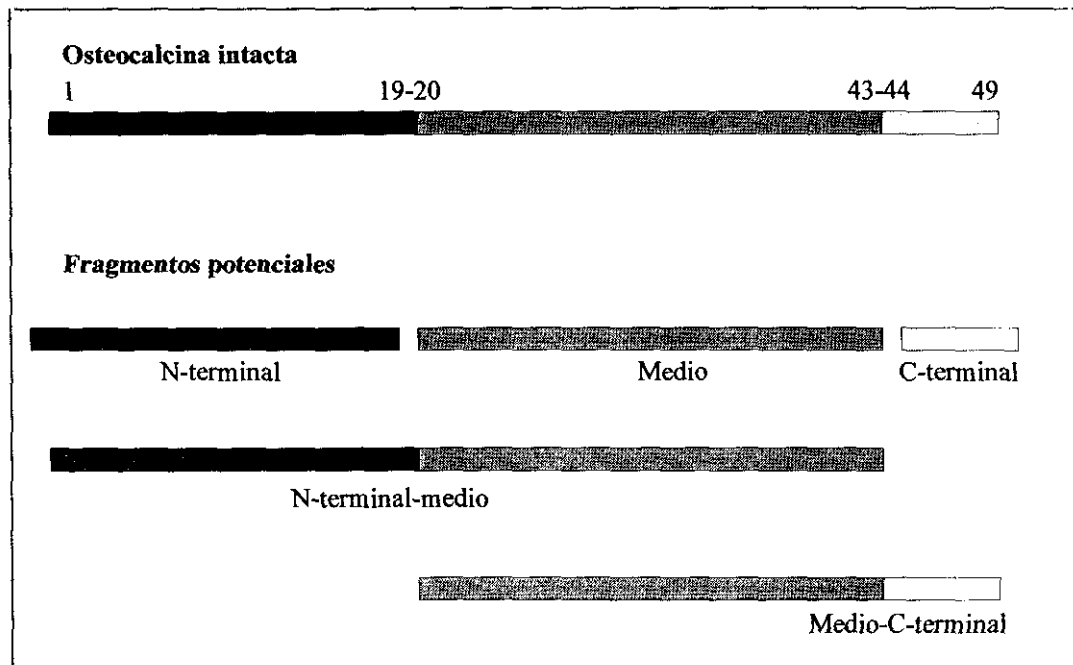


Fig. 7: Fragmentos de osteocalcina

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 radioinmunoensayo (RIA) para la medida de BGP (62). Estos métodos empleaban BGP bovina como estándar e inmunógeno. Los determinantes antigénicos de la molécula de BGP no han sido claramente identificados, pero la mayoría de estos antisueros reconocen la región C-terminal de la molécula, la cuál es idéntica en la BGP humana y en la bovina (63). Cualquiera que sea el epítipo reconocido por estos antisueros, la mayoría de ellos no muestran una reactividad cruzada del 100% con la BGP humana (64).

En 1988, Taylor et al. (65) 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 1991 diversos grupos de investigadores desarrollaron nuevos ensayos, radioinmunoensayos (RIAs) ó enzimoimmunoensayos (EIAs), en los que se introducían como novedad la utilización de anticuerpos monoclonales, pero seguían utilizando como inmunógeno la molécula de BGP bovina. 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 ó descarboxilada. A este respecto, en 1991 Koyama et al. (66) publicaron un EIA tipo “sandwich” con un anticuerpo monoclonal de captura específico para la zona γ -carboxilada de la molécula de BGP bovina.

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 Defetos et al. (67) desarrollaron dos ensayos inmunnoradiométricos (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.

En 1992, Hosoda et al. (68) 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 de BGP intacta. En otro estudio realizado en el mismo año Garnero et al. (69) 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.

Como se puede deducir de todo lo expuesto anteriormente, se han desarrollado y se están desarrollando actualmente multitud de ensayos para la

medida de la BGP circulante, tanto ensayos propios de los diferentes laboratorios como disponibles comercialmente (70,71). Por otra parte, no todos los antisueros de los inmunoensayos utilizados para la determinación de la BGP detectan los diferentes fragmentos con la misma especificidad, por lo que los resultados obtenidos dependerán del inmunoensayo utilizado (71,72). Más aún, se ha demostrado que los fragmentos de osteocalcina que circulan en el suero de pacientes con determinadas patologías, como la insuficiencia renal, la EOP ó la OSP no son los mismos que en el suero de sujetos sanos (45,71,73). Por ello, resulta de extraordinaria importancia la selección de la técnica de osteocalcina más adecuada para la realización de un estudio en una determinada patología.

1.4.1.2.2. Proteínas colágenas: Propéptidos del procolágeno I

1.4.1.2.2.1. Introducción general sobre la síntesis del colágeno

El colágeno tipo I es la proteína más abundante en el cuerpo humano, representa aproximadamente un 70 % del colágeno total del organismo (aprox. 2-3 kg. en el adulto) y el 90% de la matriz orgánica del hueso mineralizado. Es también un importante constituyente de los tejidos conectivos blandos, en donde, sin embargo, siempre está junto con otros tipos de colágeno, en particular con el colágeno fibrilar tipo III.

La molécula de colágeno óseo es un trímero que contiene dos cadenas polipeptídicas iguales denominadas $\alpha_1(I)$ y una cadena polipeptídica genéticamente diferente, pero estructuralmente homóloga denominada $\alpha_2(I)$. Estas tres cadenas peptídicas se encuentran unidas a lo largo de su extensión formando una estructura de triple hélice, excepto en los extremos amino y carboxiterminales donde presentan estructura lineal. Estos extremos lineales reciben el nombre de regiones telopeptídicas (Fig. 8).

La estructura primaria de estas tres cadenas es la que dictamina la formación de la estructura terciaria en triple hélice típica del colágeno. La secuencia básica es $(\text{Gly-X-Y})_n$, donde Gly es la glicina y "X" e "Y" son

cualquier otro aminoácido. La modificación funcionalmente más importante que tiene lugar para que la molécula de colágeno pueda adoptar la estructura de triple hélice es la hidroxilación de los residuos de 4-hidroxiprolina (comúnmente conocida como hidroxiprolina) y de lisina, y la subsiguiente glicosilación de algunos residuos de hidroxilisina (74). La hidroxilación específica de la molécula de colágeno y las reacciones de glicosilación terminan cuando la molécula adopta la conformación de triple hélice.

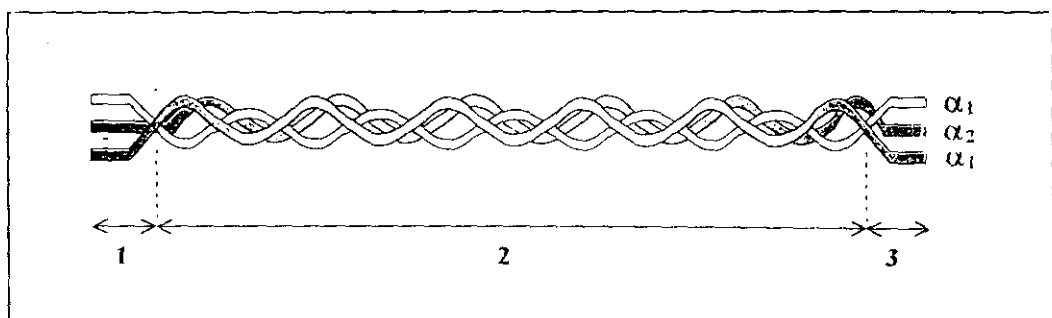


Fig. 8: Molécula de colágeno óseo. Dicha molécula es un trímero que contiene dos cadenas peptídicas $\alpha_1(I)$ y una cadena peptídica $\alpha_2(I)$. En la mayor parte de su extensión presenta estructura de triple hélice (2). Los dominios no helicoidales reciben el nombre de telopeptido N-terminal (1) y telopeptido C-terminal (3).

El colágeno tipo I del hueso se sintetiza en el interior de los osteoblastos como un precursor, el procolágeno tipo I, que contiene en ambos extremos de la molécula extensiones adicionales proteicas, denominadas propéptidos amino y carboxiterminales del procolágeno tipo I (PINP y PICP respectivamente) (Fig. 9) (75). Una vez sintetizada la molécula de procolágeno y ya en el espacio extracelular, los propéptidos son separados de la molécula de procolágeno por la acción de peptidasas específicas (procolágeno N proteinasa y procolágeno C proteinasa), liberándose tres proteínas. Una de ellas es la molécula de colágeno propiamente dicha que llega a incorporarse dentro de las fibrillas de colágeno que van a formar parte de la matriz ósea. Las otras dos, son los propéptidos amino y carboxiterminales del colágeno tipo I (PINP y PICP) que van a pasar a circulación sanguínea (Fig. 9). De ambos propéptidos vamos a hablar más extensamente en la sección siguiente.

1.4.1.2.2.2. Propéptido aminoterminal del procolágeno I (PINP)

Propéptido carboxiterminal del procolágeno I (PICP)

A medida que el procolágeno tipo I es procesado, se liberan cantidades estequiométricas de ambos propéptidos (PINP y PICP) en proporción 1:1 con el colágeno formado, lo cual significa que, teóricamente, la concentración de cualquiera de los propéptidos podrá reflejar la síntesis del colágeno tipo I. Por tanto, cuanto más colágeno se haya sintetizado, más cantidad de propéptidos de procolágeno habrán pasado a circulación. Si tenemos en cuenta que el 90% del colágeno corporal tipo I constituye la matriz orgánica del hueso, se puede considerar que los niveles circulantes de ambos propéptidos (PINP y PICP) son fiel reflejo del proceso de formación ósea y que como tales, se pueden utilizar como marcadores bioquímicos de formación del hueso. De hecho, las concentraciones circulantes de PINP y de PICP están relacionadas generalmente con la tasa de formación del hueso en los adultos y con la tasa de crecimiento somático en los niños. Por otra parte, existen varios trabajos que refuerzan la idea de que las concentraciones séricas de PICP proceden en mayor proporción del colágeno tipo I del esqueleto que del de los tejidos blandos, y que por ello, la medida de PICP sérico puede considerarse como un marcador válido de formación ósea: 1) en enfermedades que generalmente cursan con un incremento ó una disminución del remodelado óseo, tales como el hipertiroidismo, hiperparatiroidismo ó hipotiroidismo, la concentración sérica de PICP correlaciona bien con otros parámetros de formación ósea, como la histomorfometría ósea (76) y estudios cinéticos del Ca (77); 2) en niños y adolescentes, la concentración de PICP correlaciona bien con la velocidad de crecimiento (78); 3) parece ser que no existe gradiente entre la concentración de PICP de la linfa y de la sangre. Teniendo en cuenta que los tejidos blandos drenan al tejido linfático, las concentraciones de PICP de estos tejidos no afectarían normalmente al nivel de PICP circulante en sangre (79). Aún en situaciones dramáticas, caracterizadas por un elevado incremento de la expresión de colágeno tipo I extraóseo, como se ha visto en tumores de malignidad de la cavidad peritoneal, la concentración de PICP

procedente de estos tejidos tiene poco efecto sobre la concentración total de PICP sérico (80).

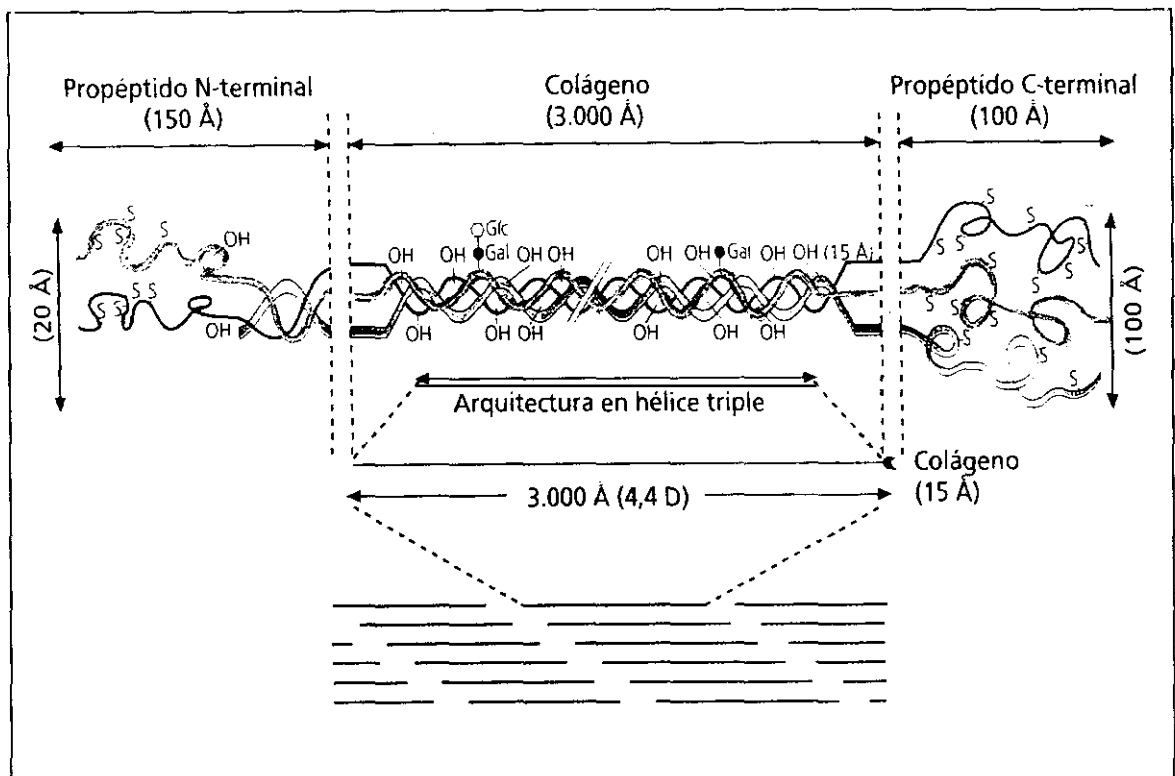


Fig. 9: Formación de los propéptidos amino y carboxiterminales del procólgeno I. En el espacio extracelular, y antes de que las moléculas de colágeno se agreguen formando fibras, los propéptidos aminoterminal (N-terminal) y carboxiterminal (C-terminal) son separados de la molécula de procólgeno por acción de peptidasas específicas, pasando al líquido extracelular.

Ni el PINP ni el PICP son realmente péptidos, sino proteínas y, al igual que la molécula de procólgeno tipo I de la que derivan, ambos están formados también por tres cadenas polipeptídicas, siendo dos de ellas parte de las cadenas originales pro- $\alpha_1(I)$, y la tercera procedente de la cadena pro- $\alpha_2(I)$ (Fig. 9).

Aunque la síntesis molar de ambos propéptidos es idéntica, éstos difieren en su estructura química (Tabla II) y en sus propiedades metabólicas (Tabla III).

El PICP es una proteína globular, de gran volumen, con una estructura primaria que no se corresponde con las unidades de repetición (Gly-X-Y)_n características de la molécula de colágeno. Contiene cadenas colaterales de oligosacáridos ricos en manosa, concentraciones que pueden ser aún mayores en

las cadenas pro $\alpha_2(I)$ que en las cadenas pro $\alpha_1(I)$ (81). La separación del PICP de la molécula de procolágeno, (dado su gran volumen) parece ser un requisito indispensable para que las moléculas de colágeno puedan ensamblarse formando fibras. Sin embargo, el PINP al tener una estructura más alargada, (menos voluminosa) puede permanecer unido temporalmente a parte de las moléculas de colágeno tipo I formando especies moleculares conocidas como colágeno pN tipo I (Col1), e incorporarse a la superficie de las fibrillas de colágeno, de modo que la parte del PINP rellenaría el espacio entre dos moléculas consecutivas de colágeno (82). Parece ser, que este PINP (Col1) debe escindirse posteriormente para permitir el crecimiento en grosor de la fibra y para que se produzca la mineralización de la matriz orgánica del hueso. En la mayoría de los tejidos adultos, la separación del PINP en este tipo de fibras es completa. Sin embargo, en los tejidos blandos, el dominio Col1 puede permanecer unido a las fibras como ocurre, por ejemplo, en la médula ósea, en la piel y en el tejido ovárico (83,84).

Debido a sus tamaños, formas y cargas eléctricas, estas proteínas no se eliminan a través del filtrado glomerular. Tanto el PINP como el PICP son eliminados de la sangre por endocitosis, mediada por un receptor, que tiene lugar en las células endoteliales del hígado. Los receptores involucrados se indican en la Tabla III (85,86).

Se han detectado concentraciones de PICP en circulación sanguínea y en otros fluidos biológicos, como la linfa, el fluido intersticial de la piel y el fluido cerebroespinal, entre otros. En la mayoría de estos fluidos sólo se observa una especie antigénica de PICP con una masa molecular idéntica a la de la proteína libre, PICP intacta (100.000). Por otra parte, con respecto al PINP se han detectado en suero dos especies antigénicas, una mayor, correspondiente a la molécula de PINP intacta y otra menor correspondiente al dominio Col1 del PINP. Por analogía con el correspondiente propéptido del procolágeno tipo III, se puede asumir que el antígeno más pequeño relacionado con el PINP en la sangre podría derivarse de la ruptura de la forma tisular Col1 y no de la degradación del PINP intacto circulante (87).

Los ensayos de los propéptidos del colágeno tipo I están basados en la detección inmunológica. Las técnicas que existen hoy en día para su determinación son técnicas de radioinmunoensayo (88-94).

Tabla II: Propiedades Bioquímicas de los Propéptidos del Procolágeno Tipo I

	PINP	PICP
Masa molecular	35.000	100.00
Forma	Alargada	Globular
Naturaleza química	Parcialmente colagenosa Fosforilada	Glucoproteína (manosa)
Uniones disulfuro intercadena	No	Sí

Tabla III: Antígenos circulantes de PICP y PINP en el hombre

	PINP	PICP
Homogeneidad	Dos formas	Una forma
Tamaño	Uno mayor (PINP intacto) Otro menor (domino Col1 del PINP)	PICP intacto
Aclaramiento por	Receptor tipo <i>scavenger</i> del hígado Células endoteliales*	Receptor <i>manosa</i> del hígado Células endoteliales**
Aclaramiento bloqueado por	Albúmina tratada con formaldehído LDL acetilado	Ovoalbúmina
Aaclaramiento modulado por	?	Hormonas (tiroideas, ¿otras?)

*Melkko et. al. (86). **Smedsrod et al. (85).

1.4.2. Marcadores bioquímicos de RESORCIÓN ÓSEA

1.4.2.1. Derivados de la degradación de la fase mineral del hueso

1.4.2.1.1. Calcio (Ca)

Los niveles de calcio en orina, corregidos por el valor de creatinina (cociente Ca/Cr), realizado tras un ayuno de doce horas, se ha utilizado clásicamente en los laboratorios como medida indirecta de resorción ósea, ya que durante la etapa de destrucción del hueso, el calcio presente en el mineral pasa al fluido extracelular y de aquí al riñón. Al realizarse la medida tras un periodo de ayuno, el factor absorbivo intestinal queda eliminado, pero al realizarse la interpretación clínica del resultado obtenido hay que tener en cuenta que el hallazgo de niveles elevados de calcio en orina pueden tener dos orígenes: óseo o renal y es necesario descartar una anomalía renal para que este parámetro evalúe correctamente el índice de resorción del hueso. Su determinación se realiza de forma automatizada, basada en técnicas colorimétricas ó de absorción atómica.

1.4.2.2. Derivados de la degradación del colágeno óseo

1.4.2.2.1. Estructura del colágeno maduro y productos de su degradación

Las moléculas de colágeno una vez sintetizadas no permanecen libres en el líquido extracelular, sino que se unen unas con otras formando fibras más insolubles y resistentes a la acción de los enzimas proteolíticos (fase de maduración).

La unión entre estas moléculas tiene lugar mediante la formación de enlaces de diferente tipo: puentes de hidrógeno, uniones de tipo electrostático, enlaces covalentes, etc. De todas ellas, las uniones covalentes son las más importantes. En primer lugar se producen uniones bivalentes (conectando dos cadenas polipeptídicas) que maduran rápidamente dando lugar a estructuras multivalentes (trivalentes o tetravalentes) (95). Entre las uniones trivalentes, han atraído recientemente gran atención la hidroxilisil-piridinolina y la lisil-piridinolina, también conocidas como *piridinolina* y *desoxipiridinolina* (Pyr y Dpd

respectivamente). Estos compuestos piridinolínicos son cíclicos y exhiben una fluorescencia típica.

Durante el proceso de resorción ósea, se solubiliza el mineral óseo y posteriormente se digieren las fibras de colágeno (96,97) vertiéndose a circulación sanguínea diversas estructuras de mayor o menor complejidad (10). Entre las más sencillas, destacan aminoácidos libres, como la *hidroxiprolina* (Hp) y los derivados glicosilados de hidroxilisina; y péptidos de bajo peso molecular, como el *telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I* (CTX). Las más complejas están formadas por *anillos piridinolínicos* (Pyr y Dpd) *libres ó unidos a péptidos*, como el ICTP y el NTx (*telopéptidos carboxi y aminoterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina* respectivamente) (95). No se conoce en qué fase del proceso de degradación del colágeno se generan los anillos de piridinolina libres; si éstos se liberan directamente por degradación de las moléculas intactas de colágeno óseo o por degradación proteolítica de los péptidos unidos a estos anillos, aunque la última hipótesis es la más aceptada.

Muchos de estos productos pueden determinarse en suero u orina de los individuos por lo que se utilizan como marcadores de degradación del colágeno óseo. A continuación vamos a hablar más extensamente de los productos más utilizados hoy en día como marcadores de resorción del hueso.

1.4.2.2.2. Hidroxiprolina (Hp)

La hidroxiprolina es un aminoácido que deriva de la hidroxilación de la prolina. Esta reacción solamente tiene lugar cuando la prolina se encuentra formando parte de un péptido (no cuando está como aminoácido libre).

La hidroxiprolina se encuentra en las fibras colágenas, en las que constituye el aminoácido más importante, representando el 13% del contenido total de aminoácidos de la molécula. También está presente en otras proteínas de secuencia similar a la del colágeno, como la proteína del sistema de complemento C1q (98).

Prácticamente toda la Hp presente en los fluidos biológicos deriva del metabolismo de los diversos tipos de colágeno, por lo que los cambios en la

excrección de este aminoácido reflejan modificaciones en la síntesis y en la degradación del colágeno total del organismo (no sólo del colágeno óseo) (99). Si además tenemos en cuenta que el 60% del colágeno corporal está localizado en el hueso y que su metabolismo es más rápido que el del colágeno de los tejidos blandos, la medida de Hp en orina puede considerarse como un marcador válido de resorción ósea (100).

La Hp se libera en forma libre (90%) y unida a péptidos (10%). La fracción libre no puede ser reutilizada para la síntesis de colágeno, y es reabsorbida por el riñón y degradada en el hígado, originándose CO₂ y urea. La fracción unida a péptidos es rápidamente excretada en orina (101). Esta última fracción eliminada en orina (minoritaria) es, por tanto, proporcional a la degradación del colágeno corporal, y es la que se utiliza como marcador de resorción del hueso. Para una correcta interpretación de los resultados, es importante considerar que la Hp de la dieta es absorbida por el intestino (102), por lo que los pacientes deben consumir una dieta pobre en colágeno desde tres días antes al de recogida de la orina. Su determinación se realiza por colorimetría (103).

La Hp ha mostrado ser un buen marcador de resorción ósea en la EOP (104,105), sin embargo, existen muchas discrepancias acerca de la sensibilidad de la Hp para detectar el incremento de resorción ósea que se produce en la OSP postmenopáusicas. Por otra parte, y como una consecuencia de su origen y tipo de metabolismo, la Hp urinaria se correlaciona débilmente con la resorción ósea medida por índices cinéticos de Ca y por histomorfometría ósea (106), por lo que ha sido necesario buscar marcadores más sensibles y adecuados para evaluar la actividad resorptiva. Los mayores avances que se han producido en este campo, han sido el desarrollo de ensayos para detectar los puentes del colágeno y sus péptidos relacionados.

1.4.2.2.3. Piridinolina y desoxipiridinolina (Pyr y Dpd)

Como ya hemos mencionado en la sección 1.4.2.2.1. la Pyr y Dpd son anillos que se forman para estabilizar las cadenas de colágeno dentro de la matriz

extracelular (107,108) y que durante el proceso de degradación del colágeno, son vertidos a circulación y excretados en orina (109). Por ello, la medida de estos productos en orina ha sido propuesta clínicamente como marcador válido de degradación del colágeno (110-112). Debido a que el colágeno tipo I es predominantemente óseo y su coeficiente de recambio es mayor que en otros tejidos conectivos, como el cartílago, la concentración de Pyr y Dpd en los fluidos biológicos se considera procedente en su mayor parte del hueso, por lo que, estos compuestos se utilizan como marcadores de resorción ósea (113).

La Pyr y Dpd se forman por reacción entre los residuos de lisina ó hidroxilisina localizados en las regiones telopeptídicas de una molécula de colágeno y los localizados en la región helicoidal de otra molécula de colágeno. La lisil oxidasa es capaz de actuar sobre estos residuos de lisina ó de hidroxilisina transformando los grupos ϵ -amino en grupos aldehído (Fig. 10). Estos aldehídos pueden reaccionar espontáneamente entre sí ó pueden unirse a otro grupo ϵ -amino. A través de ambos mecanismos se producen anillos de Pyr ó Dpd que conectan las cadenas polipeptídicas (Fig. 11).

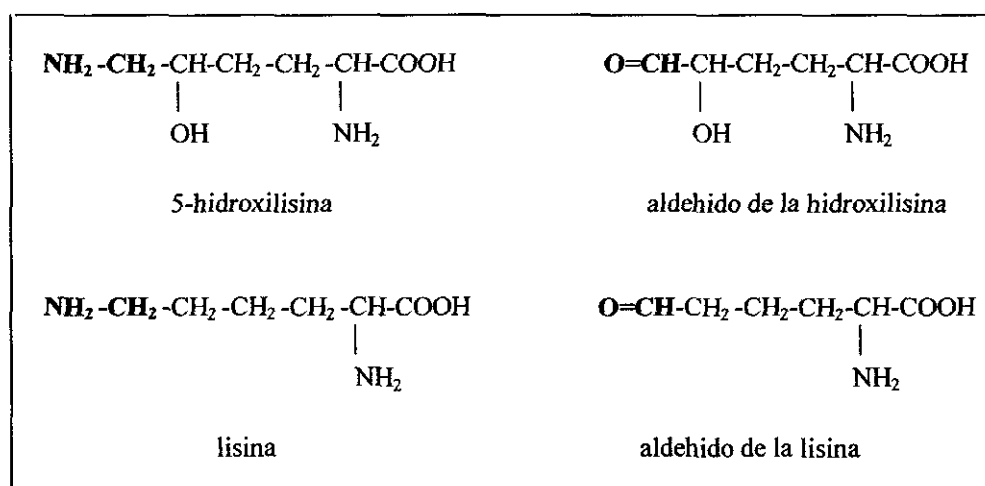


Fig. 10: La lisil oxidasa actúa sobre los residuos de lisina o de hidroxilisina en los dominios no helicoidales de los extremos de las moléculas de colágeno, convirtiendo los grupos amino en aldehído y haciendo así posible la posterior formación de puentes piridinólicos.

El anillo de piridinolina se forma a partir de tres residuos de hidroxilisina: dos aldehídos de hidroxilisina (cada una de ellas correspondiente a dos cadenas

polipeptídicas diferentes) y un residuo de hidroxilisina (sin oxidar) de la tercera cadena polipeptídica que interviene. Los anillos de desoxipiridinolina se forman a partir de dos residuos de hidroxilisina y uno de lisina: un aldehído de hidroxilisina, un aldehído de lisina y un residuo de hidroxilisina sin oxidar (Fig. 11). Estructuras similares también se forman en otros tipos de colágeno, particularmente en el colágeno tipo II del cartílago, que es rico en piridinolina (114).

La Dpd está localizada casi exclusivamente en el colágeno óseo, aunque también se han detectado pequeñas cantidades en la dentina, la aorta y los ligamentos, mientras que la Pyr está localizada también en el colágeno del cartílago (115) y en el colágeno de la mayoría de los tejidos conectivos blandos (107,116-119).

A pesar de que la Pyr no es específica del colágeno óseo, se ha demostrado que la mayor fuente de Pyr en orina procede del colágeno del hueso, debido a que el cociente molar Pyr/Dpd en orina de sujetos sanos es similar al del tejido óseo (108,120). Por otra parte, se ha observado también muy buena correlación entre la eliminación urinaria de piridinolinas y el grado de resorción ósea (116,121,122), la histomorfometría ósea (17) y parámetros cinéticos de resorción del hueso (123).

Por todo ello, se puede considerar que los anillos de Pyr en orina, excepto en casos de activo catabolismo del cartílago, son esencialmente derivados del hueso, y existen varios trabajos que apoyan su utilización como marcador específico de resorción ósea (112,124,125).

Durante el proceso de resorción ósea, las piridinolinas son liberadas a circulación en forma libre (40%) y unidas a péptidos (60%) (109,126,127). Como estos anillos no pueden ser reutilizados para la síntesis de nuevas fibras de colágeno, son eliminados en orina sin catabolizar. Su cuantificación en orina se ha realizado a lo largo del tiempo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) método por el que es posible medir las formas de piridinolina libres ó unidas a péptidos (dependiendo de si la muestra es previamente hidrolizada o no respectivamente) (110,116,117,128). De más reciente desarrollo, son técnicas de

inmunoensayo que permiten la cuantificación en orina de piridinolinas libres (129,130) y de piridinolinas unidas a péptidos (131,132).

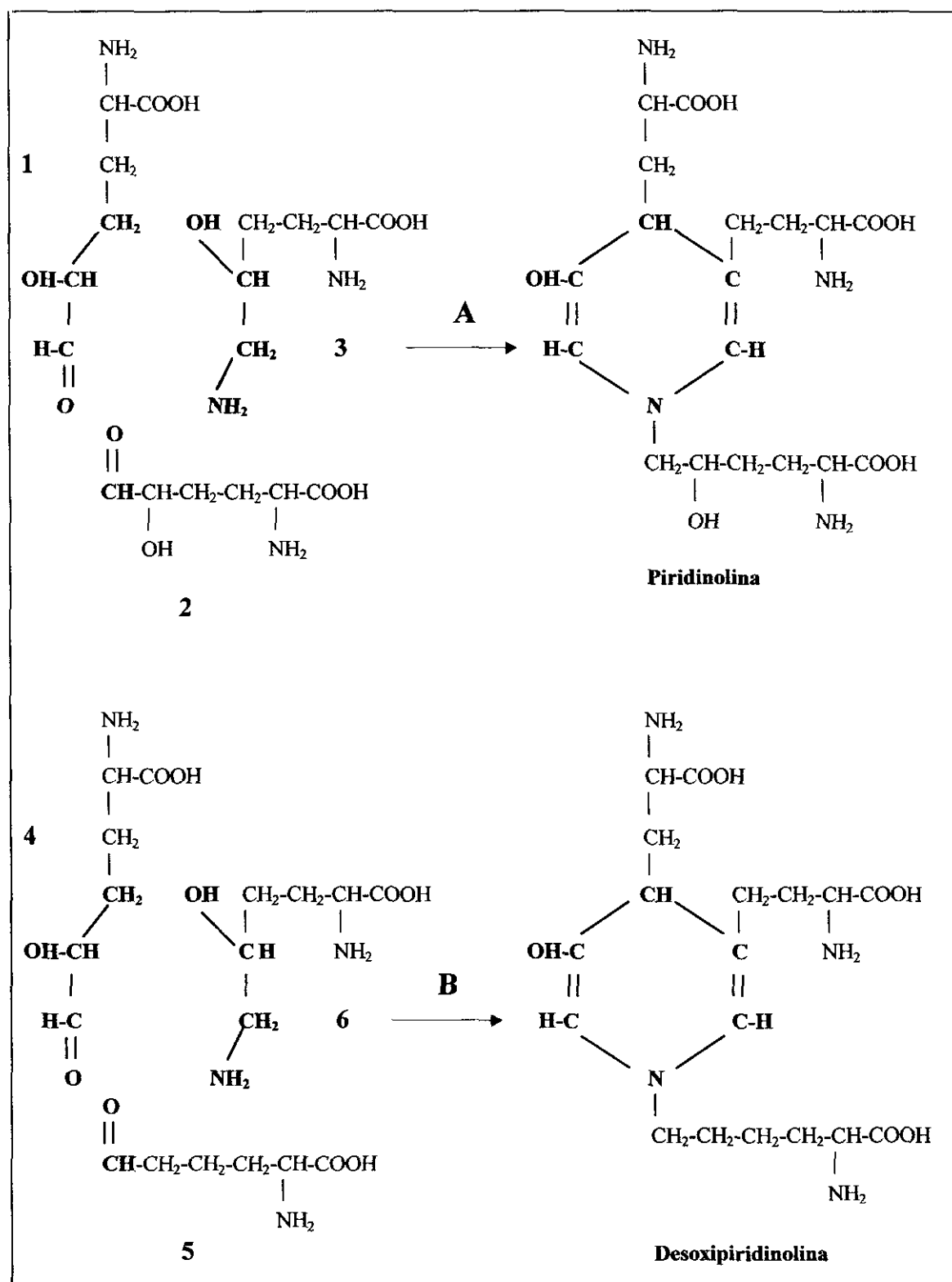


Fig. 11: Formación de puentes piridinólicos. **A:** Piridinolina a partir de dos moléculas de aldehído de la hidroxilisina (1 y 2) y una molécula de hidroxilisina (3). **B:** Desoxipiridinolina a partir de una molécula de aldehído de la hidroxilisina (4), una molécula de aldehído de la lisina (5) y una molécula de hidroxilisina (6).

1.4.2.2.4. Telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina (ICTP)

Los telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina (ICTP) son una estructura compleja formada por un anillo piridinolínico (Pyr ó Dpd) y un material peptídico adyacente procedente de cada una de las tres cadenas polipeptídicas que intervienen en la formación del anillo (Fig. 12).

Este compuesto fué aislado por vez primera en 1993, por el grupo de Risteli et al. (131) a partir de hueso de fémur. Se denominan telopéptidos carboxiterminales porque el puente piridinolínico se forma entre las regiones telopeptídicas carboxiterminales de cada una de las cadenas $\alpha_1(I)$ de una molécula de colágeno y la región helicoidal de la cadena $\alpha_1(I)$ ó $\alpha_2(I)$ de una segunda molécula de colágeno (véase sección 1.4.2.2.3.) (131). La unión con la cadena helicoidal tiene lugar a través del aminoácido situado en posición 87. Las uniones que se forman en el ICTP son fundamentalmente $\alpha_1(I)$ - $\alpha_1(I)$ y $\alpha_1(I)$ - $\alpha_2(I)$. La unión $\alpha_2(I)$ - $\alpha_2(I)$ no se da porque la cadena telopeptídica $\alpha_2(I)$ carece del residuo de lisina, que forma parte de la unión.

El ICTP solamente puede derivar de la degradación de fibras de colágeno maduras (moléculas de colágeno tipo I unidas por puentes de piridinolina). El antígeno endógeno circulante de ICTP (Fig. 12) puede proceder, en principio, de cualquier tejido en donde las fibras del colágeno tipo I maduren para contener puentes intermoleculares trivalentes de piridinolina, por lo que, podría haber una relación estequiométrica 1:1 entre las cantidades molares de las moléculas de colágeno tipo I degradadas y la cantidad de ICTP libre.

A pesar de que el ICTP sérico no es específico del colágeno del hueso, (el colágeno tipo I del hueso es producto de los mismos genes que el de los tejidos blandos), existen varios hechos que apoyan su utilización como marcador de resorción ósea: 1) en pacientes con un incremento de resorción del hueso, se ha observado buena correlación entre los niveles de ICTP y otros parámetros de

remodelado óseo, como la histomorfometría ósea (76) y parámetros cinéticos del calcio (77); 2) se han observado niveles significativamente elevados de ICTP en patologías que cursan con una destrucción ósea localizada, como el mieloma múltiple (133,134), las metástasis óseas osteolíticas (135,136) y la artritis reumatoide (131); 3) la administración de hormona paratiroidea provoca un incremento en los niveles de ICTP con una curva dosis respuesta similar a la de la liberación de calcio del esqueleto; 4) se ha encontrado también un ritmo circadiano en los niveles séricos de ICTP de manera que existe un pico máximo nocturno coincidiendo con el máximo de actividad resortiva (137).

El ICTP es detectable, además de en el suero, en el líquido cerebroespinal y en el líquido sinovial, observándose concentraciones significativamente elevadas en pacientes con artritis reumatoide (138). Su tamaño relativamente pequeño hace que la cantidad endógena de ICTP sea aclarada de la sangre por el riñón, por lo que un fallo renal podría provocar un incremento en la concentración sérica de ICTP. Este efecto se hace significativo cuando la filtración glomerular es aproximadamente 2/3 el límite inferior del intervalo de normalidad (131).

Durante el proceso de degradación del colágeno tipo I, el ICTP es vertido a circulación donde puede determinarse por radioinmunoensayo (131).

1.4.2.2.5. Telopéptidos aminoterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina (NTx)

El NTx es, al igual que su homólogo carboxiterminal, el ICTP, una estructura compleja, formada por un anillo piridinolínico y un material peptídico adyacente procedente de cada una de las cadenas polipeptídicas que intervienen en la formación del anillo (Fig. 12). Se denominan telopéptidos aminoterminales porque, en este caso, el anillo piridinolínico se forma por unión de las regiones telopeptídicas aminoterminales ($\alpha_1(I)$ ó $\alpha_2(I)$) de una molécula de colágeno, con la región helicoidal ($\alpha_1(I)$ ó $\alpha_2(I)$) de otra molécula de colágeno, a través de su residuo Hyl (Pyr) ó Lys (Dpd) localizado en posición 930.

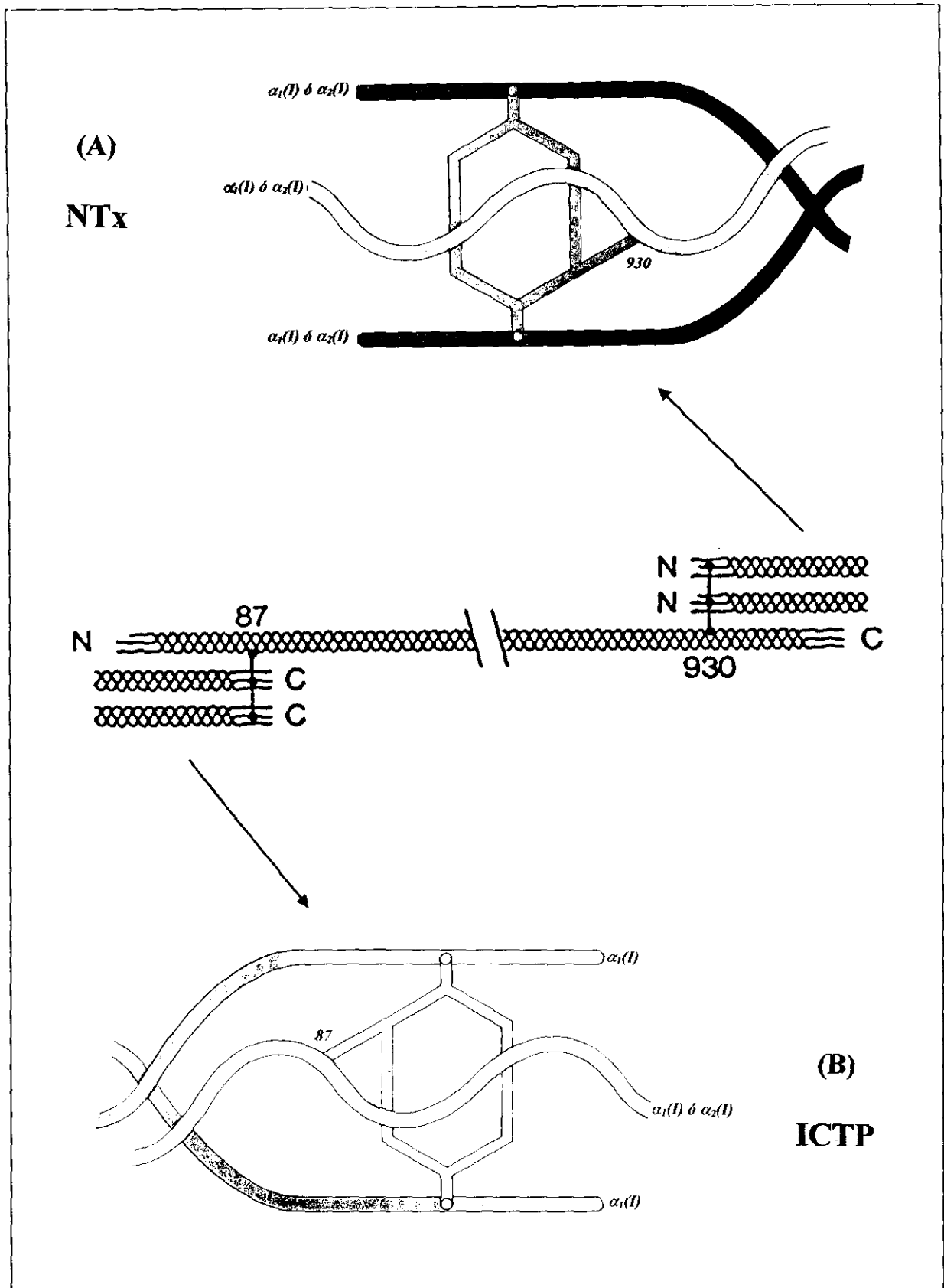


Fig. 12: Telopéptidos amino (A) y carboxiterminales (B) del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina.

Existen dos aspectos que caracterizan al NTx como marcador específico de degradación del colágeno óseo. Primero, las uniones que se producen son fundamentalmente $\alpha_1(I)$ - $\alpha_2(I)$ y $\alpha_2(I)$ - $\alpha_2(I)$, característica que distingue al colágeno tipo I del hueso del colágeno tipo I de otros tejidos (132). La unión $\alpha_1(I)$ - $\alpha_1(I)$ en esta estructura es menos abundante. Segundo, el extremo aminoterminal de la molécula de colágeno es la fuente del 60% de lisilpiridinolina (desoxipiridinolina) del colágeno óseo humano (139). Además, este péptido unido a piridinolina presenta una estructura muy compacta que le protege de la acción de enzimas proteolíticas a nivel de hígado, riñón y hueso por lo que se libera en orina intacto sin degradar. Por ello, los niveles urinarios de NTx se consideran como un marcador muy específico de resorción del hueso.

El método utilizado para su determinación es una técnica de enzimoimmunoensayo de reciente desarrollo (132).

1.4.2.2.6. Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I (CTX)

De todos los productos de naturaleza peptídica (derivados de la degradación del colágeno tipo I) que hemos visto hasta ahora, el CTX es la estructura más sencilla, caracterizada por la ausencia de anillo piridinolínico. Es un péptido lineal de 8 aminoácidos (Glu^{17C}-Lys^{18C}-Ala^{19C}-His^{20C}-Asp^{21C}-Gly^{22C}-Gly^{23C}-Arg^{24C}) (Fig. 13) que tiene su origen en la región telopeptídica carboxiterminal de una cadena α_1 de la molécula de colágeno tipo I.

Si bien la estructura del CTX corresponde solamente a esta secuencia peptídica lineal de 8 aminoácidos, el segundo aminoácido de esta secuencia peptídica (Lys^{18C}, que es análogo de la Hyl^{18C} encontrada en la cadena α_1 de la secuencia C-telopeptídica) está implicado en la formación de un anillo piridinolínico (140) y la proximidad de estas estructuras compactas pueden protegerlo de la degradación renal. Durante el proceso de degradación del colágeno tipo I, este péptido de 8 aminoácidos, pasa a circulación y es excretado en orina.

Debido a que más del 90% de la matriz orgánica del hueso está formada por colágeno tipo I, la secuencia peptídica de 8 a.a. correspondiente al CTX, está considerada como un potencial marcador de resorción ósea.

Recientemente se han desarrollado anticuerpos dirigidos contra esta secuencia peptídica que reaccionan en un ELISA permitiendo así su cuantificación en orina (141).

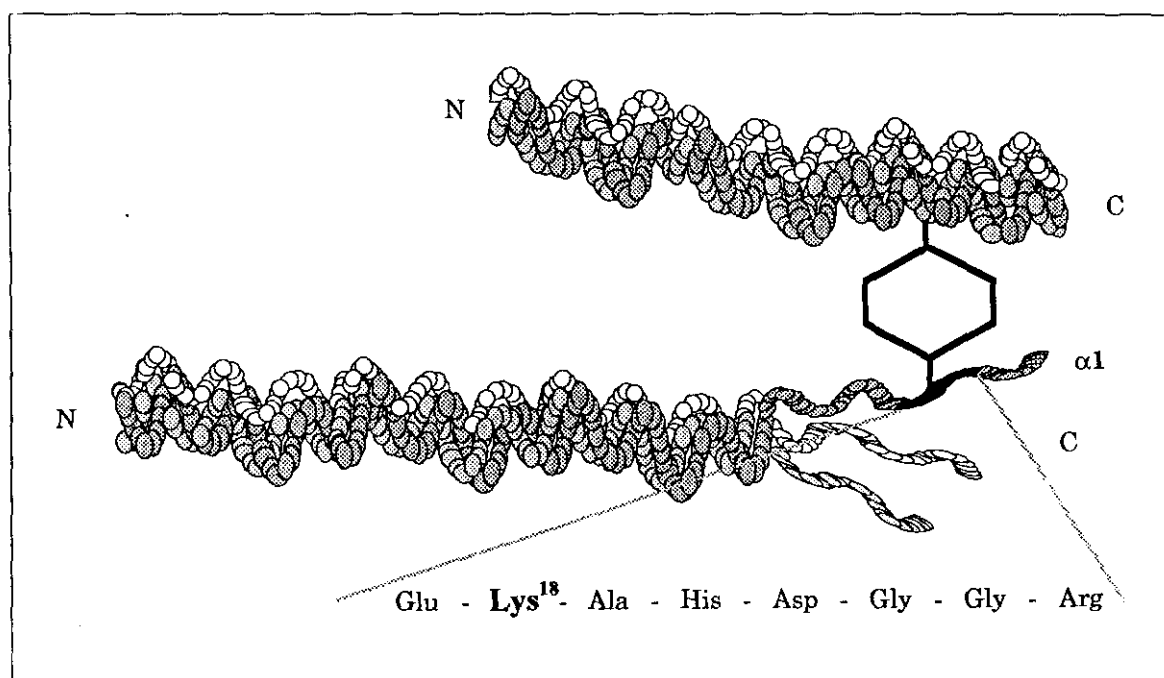


Fig. 13: Péptido CTX localizado en la región telopeptídica carboxiterminal de la cadena $\alpha 1$ de una molécula de colágeno tipo I. El segundo aminoácido Lys¹⁸ de este péptido está implicado en la formación de un anillo piridinólico.

Aunque ninguno de los marcadores bioquímicos que se han sugerido como medida de la degradación del colágeno del hueso es específico del tejido óseo, esto no significa que no puedan ser utilizados como indicadores de la resorción del hueso. Como hemos dicho en la sección 1.4.1.2.2.1., el colágeno tipo I característico del hueso, está también presente en otros tejidos conectivos blandos, pero la actividad metabólica del colágeno tipo I del esqueleto está muy por encima de la actividad metabólica del mismo tipo de colágeno en los tejidos blandos. Esto, junto con un acceso más directo a la circulación

sistémica de los metabolitos del colágeno procedentes del tejido óseo, hace que las concentraciones circulantes de los metabolitos del colágeno tipo I reflejen con más probabilidad los cambios del metabolismo del colágeno tipo I del hueso, que los del metabolismo del mismo tipo de colágeno en otros tejidos. Sin embargo, debido a que el colágeno tipo I está también presente en otros tejidos, ningún metabolito del colágeno tipo I puede ser considerado como completamente específico del hueso.

Como cualquier otro parámetro de laboratorio, tanto las mediciones séricas de los marcadores de remodelado del hueso, como las de orina, deben ser interpretadas en conjunto con toda la información adicional disponible sobre el paciente en cuestión. Más aún, aunque la mayoría de estos parámetros tienden a reflejar el metabolismo de los colágenos del tejido blando cuando la tasa de metabolismo óseo es baja, su “especificidad ósea” parece aumentar cuando se eleva la tasa de degradación del hueso, permitiendo mostrar conclusiones clínicamente significativas cuando la osteolisis se acelera de forma patológica (142,143).

1.5. Algunas patologías óseas

1.5.1. Osteoporosis postmenopáusica

La osteoporosis (OSP) es la enfermedad metabólica ósea más frecuente y se define como un trastorno caracterizado por una pérdida progresiva de tejido óseo, con un deterioro de la microarquitectura del hueso, que conduce a un aumento de la fragilidad ósea con el consiguiente incremento del riesgo de fracturas espontáneas (144).

La patogenia de la osteoporosis se puede describir, como el resultado de una anomalía del proceso de remodelado óseo, caracterizado por una incapacidad de los osteoblastos para sintetizar una cantidad de tejido óseo igual a la que es resorbida por los osteoclastos. Como consecuencia de ello se produce un importante descenso en la densidad mineral ósea (145-148).

Entre sus formas clínicas, la más frecuente e importante es la osteoporosis postmenopáusicas (OSPp), asociada a la disminución en los niveles de estrógenos que se producen en la menopausia (149) y que se ha observado que tienen un efecto protector del hueso (150, 151). La OSPp es, en general, una osteoporosis de alto recambio metabólico. Hay un aumento absoluto de la fase de resorción, no compensado enteramente por un aumento de la formación, lo que conduce a un aumento de la velocidad de pérdida ósea.

Desde un punto de vista bioquímico, se ha observado que los marcadores de remodelado óseo (formación y resorción) aumentan marcadamente durante los primeros años después de la menopausia y que incluso se mantienen elevados en mujeres de edad avanzada hasta 40 años después de la menopausia (152). Este acelerado remodelado del hueso es el desencadenante de la pérdida de masa ósea que se produce en las mujeres en la etapa postmenopáusicas. Esto ha quedado bien demostrado porque el síndrome osteoporótico es mucho más frecuente en el sexo femenino y también por la posibilidad de reproducir experimentalmente la enfermedad induciendo la menopausia (153-155) así como por el efecto protector de la terapéutica estrogénica sustitutiva (156).

La OSPp representa en la actualidad un grave problema socioeconómico en los países desarrollados. La prevención y el diagnóstico precoz son, a largo plazo, las mejores inversiones para reducir los costes en atención sanitaria. De ahí, la necesidad de diagnosticar esta patología en sus primeras fases para poder prevenirla. Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo representan hoy en día una buena herramienta para el estudio de esta patología.

Estudios recientes, algunos de ellos todavía en desarrollo, permiten definir la utilidad clínica de estos marcadores para evaluar el riesgo de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas (157) así como para evaluar el riesgo de fracturas en mujeres de edad avanzada (158) y para monitorizar la eficacia de las drogas antirresortivas (159-162).

1.5.2. Enfermedad ósea de Paget

La enfermedad ósea de Paget (EOP) (osteitis deformans) es un desorden localizado del remodelado óseo. El proceso comienza inicialmente con una resorción excesiva de hueso y continúa posteriormente con un aumento compensatorio de formación ósea (1). 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 de deformidad o fractura que el hueso normal.

Bioquímicamente, los pacientes afectados con EOP se caracterizan por presentar niveles enormemente elevados de todos los marcadores bioquímicos de remodelado óseo, tanto de los de formación como de los de resorción.

Probablemente, el rasgo principal en la enfermedad ósea de Paget es una resorción ósea focal (fase osteolítica), que da lugar a la formación de lagunas de resorción típicas rellenas de osteoclastos. Los osteoclastos pueden adquirir formas extrañas y contener hasta 100 núcleos, un rasgo no observado normalmente en otros estados patológicos.

En algunos pacientes, disminuye el grado de resorción, mientras que la formación de hueso continúa, lo que da lugar a un aumento de la masa ósea por volumen de unidad (fase osteoblástica o esclerótica). No obstante, en general, en esta enfermedad se observa un equilibrio entre la formación y la resorción, aunque la formación pueda parecer excesiva y los huesos afectados puedan ser más grandes de lo normal.

El riesgo de complicaciones durante la vida de los pacientes depende de la localización y del índice de actividad de la enfermedad. Las complicaciones que se producen pueden afectar a los huesos, a los músculos y al sistema nervioso central.

El tratamiento de la EOP puede realizarse desde dos puntos de vista: tratamiento a corto plazo, orientado a aliviar ó a suprimir el dolor en los pacientes y tratamiento a largo plazo, orientado a prevenir las complicaciones causadas por la lenta progresión de la enfermedad en los huesos afectados (163). La calcitonina

y los bifosfonatos se consideran actualmente los principales agentes terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad. Una de las ventajas que tiene la utilización de bifosfonatos con respecto a la calcitonina, es que con los bifosfonatos la supresión de la actividad de la enfermedad puede persistir incluso durante años después de cesar la medicación.

Los bifosfonatos son análogos sintéticos (de vida media larga) de una sustancia endógena, el pirofosfato (de vida media corta), que es un inhibidor natural de la resorción del hueso. Las dosis orales de bifosfonatos muestran cualidades similares a las de los pirofosfatos, inhiben la resorción ósea, su absorción es baja y son potentes irritantes gastrointestinales, pero cada uno tiene un único espectro de potencia y un probable mecanismo de acción (164).

El bifosfonato de primera generación es el etidronato, potente agente antirresortivo que se ha utilizado ampliamente para el tratamiento de las enfermedades metabólicas óseas observándose un sucesivo incremento de la densidad mineral ósea en los pacientes. Sin embargo, su utilización presenta algunos inconvenientes: a la dosis recomendada, en algunos pacientes, no se observa inhibición de la resorción (165), sin embargo, a dosis más altas, se observan mejores resultados pero hay una estrecha ventana terapéutica entre la actividad antirresortiva y el efecto inhibidor de la mineralización (166). Esto ha conducido al desarrollo de una nueva generación de bifosfonatos, más potentes y seguros (tiludronato, pamidronato, alendronato, risedronato y otros) que representan un avance importante en el tratamiento de la EOP. Estos compuestos permiten la normalización de los índices de remodelado y las dosis clínicas tienen efectos duraderos en el tiempo sin alterarse la mineralización ósea (167,168). Mediante técnicas de histomorfometría ósea se ha observado que los bifosfonatos pueden restaurar la normal estructura del hueso por lo que es interesante definir una estrategia terapéutica óptima.

El tiludronato (4-clorofenil-tiometilen bifosfonato) es un bifosfonato de tercera generación. Estudios realizados para comparar la actividad antirresortiva del etidronato y tiludronato, muestran que la dosis de 400 mg/día durante 3 ó 6

meses de tiludronato es más efectiva que el tratamiento con etidronato durante 6 meses para el tratamiento de la EOP (169). Otros estudios previos han mostrado la eficacia y seguridad del tiludronato vía oral en la EOP y su actividad residual después de cesar su administración (170,171). Esto es debido a su retención en el hueso, un hecho común a los bifosfonatos.

1.5.3. Metástasis óseas en el carcinoma de próstata

Las metástasis son el mecanismo celular por el cual se produce el traslado de células desprendidas de un tumor maligno, desde su lugar de origen hasta otros lugares con los que no existe conexión anatómica directa, donde se implantan. Los tumores malignos más comunes que afectan al hombre, metastatizan frecuentemente en el esqueleto. En los Estados Unidos se producen aproximadamente 500.000 muertes cada año a causa de las enfermedades tumorales y probablemente 2/3 ó 3/4 de estos pacientes presentan metástasis óseas en el momento de morir. La enfermedad ósea metastásica afecta a más del 25% de los pacientes con cáncer en su fase terminal (172).

Los tumores causan dos tipos de lesiones cuando éstos se propagan al esqueleto, las lesiones osteolíticas y las lesiones osteoblásticas. En las *metástasis osteolíticas* los tumores producen una alteración del remodelado óseo incrementándose en primer lugar la actividad osteoclástica. Posteriormente se activan los osteoblastos, activación que no está acoplada con la resorción, por lo que la lesión es predominantemente lítica. Las *metástasis osteoblásticas* se caracterizan por la formación de depósitos de hueso nuevo alrededor de células tumorales. Esto se produce antes de producirse la resorción osteoclástica y el nuevo hueso sintetizado es depositado directamente sobre fuentes óseas trabeculares sin un episodio resortivo previo. El cáncer de próstata es el tumor más común que causa este tipo de respuesta.

Aunque las metástasis óseas se producen asociadas a casi todos los tipos de tumores, hay determinados tipos de cáncer que tienen especial predilección por el

esqueleto. En el caso concreto del cáncer de próstata, el hueso es uno de los principales receptores de las células cancerosas metastásicas. Recientemente se han clarificado las causas de este hecho. Las células prostáticas contienen en su superficie receptores de unión a la matriz ósea. La expresión de estos receptores es mayor en las células prostáticas cancerosas que en las células prostáticas normales; por ello, cuando las células prostáticas cancerosas pasan a la circulación sanguínea se van a unir al hueso con gran afinidad (173). El mecanismo por el cuál se desarrollan las lesiones óseas puede estar relacionado con una sustancia que es producida por las células tumorales y que estimula la actividad osteoblástica (173).

Un problema muy directamente relacionado con la existencia de metástasis óseas en la patología cancerosa y que tiene una gran importancia clínica, es la detección precoz de dichas metástasis en el transcurso de la enfermedad. A este respecto, es importante destacar que, la detección de las metástasis óseas va a depender, en cierto modo, de la sensibilidad de la técnica utilizada para diagnosticarla. Con respecto a las metástasis óseas derivadas del cáncer de próstata, las técnicas que se han utilizado hasta este momento para su detección, han sido la radiología, la gammagrafía ósea, los niveles séricos de antígeno sérico prostático (PSA) y del marcador de formación ósea, fosfatasa alcalina total (FAt).

Como ya mencionamos en la sección 1.3.1., la radiología es una técnica poco sensible, las alteraciones radiológicas se observan cuando ya se ha producido una anomalía ósea importante. Por otra parte, la gammagrafía ósea, tiene el inconveniente de ser una técnica que utiliza isótopos radiactivos, por lo que no se puede utilizar con frecuencia en un mismo paciente, y la FAt es un marcador poco específico de hueso (está constituida por diversos isoenzimas).

El antígeno sérico prostático (PSA) es una proteína monomérica con actividad proteasa, que está localizada en el citoplasma del epitelio prostático. Los niveles séricos de PSA aumentan en pacientes con patología prostática (hiperplasia benigna de próstata y carcinoma de próstata) así como en otros procesos inflamatorios de los tejidos genitourinarios. Debido a que también se han observado concentraciones elevadas de PSA en pacientes con hiperplasia benigna

de próstata (HBP), los niveles séricos de este antígeno no son un valor suficiente como para diagnosticar el cáncer de próstata. La combinación de la medida sérica de PSA con el tacto rectal, puede resultar un mejor método en la práctica habitual para la detección de este tipo de cáncer.

Sin embargo, y a pesar de la falta de especificidad para la detección del carcinoma de próstata, la PSA es, en la actualidad, el marcador más ampliamente utilizado, no sólo para el diagnóstico y seguimiento de este tipo de cáncer, sino también para detectar la evidencia de metástasis óseas derivadas del mismo (174). En urología se ha llegado al consenso de que un nivel de PSA de más de 100 ng/mL indica que hay una alta probabilidad de metástasis óseas. Sin embargo, hay trabajos previos que muestran que la sensibilidad y especificidad de este marcador no es muy buena para la detección precoz de las metástasis óseas en el carcinoma de próstata (175). Teniendo en cuenta que las metástasis óseas derivadas del cáncer de próstata son fundamentalmente de naturaleza osteoblástica, y que las células prostáticas cancerosas producen una sustancia que estimula la actividad de las células formadoras del hueso (osteoblastos) (173), los marcadores bioquímicos de formación ósea (actividad osteoblástica), podrían, teóricamente, ser eficaces para detectar precozmente la presencia de metástasis óseas en estos pacientes. Por ello, es importante, hacer estudios comparativos sobre la sensibilidad y especificidad de los marcadores bioquímicos de formación ósea, para el diagnóstico precoz de las metástasis óseas en este tipo de cáncer.

1.6. Consideraciones finales de la introducción

Como hemos visto en los apartados precedentes de la introducción, son muchos los marcadores bioquímicos de remodelado óseo que existen en la actualidad para el estudio de la fisiopatología del hueso. Desde los más clásicos, como la FAt y la Hp, hasta los más novedosos, de reciente desarrollo, como son los marcadores bioquímicos derivados de la

degradación del colágeno óseo (Pyr, Dpd, ICTP, NTx y CTX). Incluso, en algunas ocasiones, existen diversas técnicas para la cuantificación de un mismo marcador (por ejemplo, la FAO, BGP, Pyr y Dpd...).

Ante la existencia de tantos marcadores y tantas técnicas para su determinación, son muchas las preguntas que se nos plantean a la hora de realizar un determinado estudio clínico. Por ejemplo: ¿hay que determinar todos los marcadores en un individuo para llegar a conclusiones definitivas?; ¿son mejores los nuevos marcadores bioquímicos de remodelado del hueso y por tanto, éstos reemplazan a los clásicos marcadores en el estudio de las patologías óseas? ó ¿existe el marcador ideal?. Teniendo en cuenta que los marcadores bioquímicos de remodelado óseo nos permiten evaluar los procesos de formación y resorción óseos, y que no todas las patologías óseas cursan con igual alteración del remodelado, es lógico pensar que un marcador que es muy sensible ó específico para detectar la alteración del remodelado óseo en una patología, puede no serlo tanto para el estudio de otra. Por ello, es necesario realizar estudios comparativos entre la determinación de los distintos marcadores de remodelado óseo en las diferentes patologías óseas y tras los diferentes tratamientos, para poder llegar a conclusiones definitivas.

Por todo lo expuesto anteriormente, y debido al hecho de que en muchas ocasiones se observan resultados contradictorios en la literatura acerca de la sensibilidad/especificidad de estos marcadores para el estudio de la formación y resorción ósea en las diversas patologías que cursan con alteración del remodelado óseo, nosotros nos propusimos realizar en este trabajo, estudios comparativos sobre la sensibilidad y especificidad de los marcadores bioquímicos de remodelado del hueso en varias patologías óseas: **Osteoporosis postmenopaúsica, seguimiento del tratamiento de la Enfermedad ósea de Paget con tiludronato y detección precoz de las metástasis óseas en el carcinoma de próstata.**

2

Objetivos

2.1. Estudio comparativo de la sensibilidad y especificidad para la detección de los desórdenes del remodelado óseo asociados a la **OSTEOPOROSIS POSTMENOPAÚSICA**, de los siguientes marcadores bioquímicos de remodelado óseo:

FORMACIÓN ÓSEA:

- * Fosfatasa alcalina total en suero
- * Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina en suero
- * Osteocalcina en suero
- * Propéptido aminoterminal del procolágeno I en suero
- * Propéptido carboxiterminal del procolágeno I en suero

RESORCIÓN ÓSEA:

- * Calcio en orina
- * Hidroxiprolina en orina
- * Piridinolinas totales libres en orina
- * Desoxipiridinolinas libres en orina
- * Telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en suero
- * Telopéptidos aminoterminal del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en orina
- * Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 colágeno tipo I en orina

2.2. Estudio comparativo de la sensibilidad y especificidad para la detección de las variaciones del remodelado óseo en el seguimiento del tratamiento de la **ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET** con tiludronato, de los siguientes marcadores bioquímicos de remodelado óseo:

FORMACIÓN ÓSEA:

- * Fosfatasa alcalina total en suero
- * Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina en suero
- * Osteocalcina en suero
- * Propéptido carboxiterminal del procolágeno I en suero

RESORCIÓN ÓSEA:

- * Calcio en orina
- * Hidroxiprolina en orina
- * Piridinolinas totales libres en orina
- * Telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en suero
- * Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 colágeno tipo I en orina

- 2.3.** Estudio comparativo de la sensibilidad y especificidad, para la **detección precoz de las METÁSTASIS ÓSEAS asociadas al carcinoma de próstata**, de los marcadores bioquímicos de formación ósea, fosfatasa alcalina total, isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina, osteocalcina y propéptidos amino y carboxiterminales del procolágeno I en suero.

3 **Materiales y Métodos**

3.1. Pacientes y sujetos controles

3.2. Protocolo experimental

3.1. Pacientes y sujetos controles

3.1.1. Características y criterio diagnóstico

Los pacientes y controles se clasificaron en tres grupos según el objetivo del estudio. Todos los pacientes se diagnosticaron utilizando datos clínicos, bioquímicos y/o radiológicos.

* Estudio 1: Osteoporosis postmenopáutica.

* Estudio 2: Enfermedad ósea de Paget.

* Estudio 3: Detección precoz de las metástasis óseas en el carcinoma de próstata.

3.1.1.1. Estudio 1: Osteoporosis postmenopáutica

Este estudio se llevó a cabo en 92 mujeres procedentes de los Servicios de Medicina Interna-Unidad Metabólica (Fundación Jiménez Díaz, Madrid) y Unidad Metabólica (Hospital Insular de Las Palmas de Gran Canaria).

Las mujeres se clasificaron en dos grupos: Grupo I: 46 mujeres con osteoporosis postmenopáutica (edad media 60 ± 6 años, rango 46-69 años); Grupo II: 46 mujeres postmenopáuticas controles de edad media 56 ± 7 años, rango 41-70 años. Todas ellas, pacientes y controles, tenían función renal normal (aclaramiento de creatinina urinaria normal) y en ningún caso la edad fue superior a 70 años para evitar la inclusión en este estudio de pacientes con osteoporosis senil.

El criterio utilizado para diagnosticar a las pacientes fue la medida de la densidad mineral ósea (DMO) en columna lumbar y/o cabeza de fémur. Se incluyeron en el Grupo I (osteoporosis) aquellas mujeres que tenían unos niveles de DMO de dos o más desviaciones estándar por debajo del valor medio de un grupo control de su mismo sexo y edad, de acuerdo con los valores estandarizados según un estudio realizado en la población española en 1992 (176) y en el Grupo II (controles) aquellas mujeres cuya DMO estaba comprendida dentro del intervalo de ± 1 desviación estándar de la media de su grupo control de normalidad. Todas

las mujeres (pacientes y controles) carecían de factores de riesgo que pudieran interferir con el metabolismo óseo, tales como alcoholismo, diabetes mellitus, hiperparatiroidismo y administración de esteroides o antiepilépticos, desde al menos seis meses antes de comenzar el estudio. Tampoco habían sufrido fracturas recientes que pudieran influir en los niveles de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo.

3.1.1.2. Estudio 2: **Enfermedad ósea de Paget**

Los pacientes con enfermedad ósea de Paget (EOP) procedían del Servicio de Medicina Interna-Unidad Metabólica de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid.

El estudio se realizó en 10 sujetos con EOP (5 hombres y 5 mujeres) de edad media 67 ± 5 años, rango 56-77 años. Se escogió un grupo de pacientes con una actividad fosfatasa alcalina total en suero de al menos dos veces el límite superior de normalidad, con el fin de que fueran enfermos de elevada actividad.

En condiciones basales estos pacientes no estaban tratados con ninguna medicación que pudiera afectar al metabolismo óseo desde al menos 6 meses antes de comenzar el tratamiento con tiludronato. El tratamiento con tiludronato se mantuvo durante un periodo de 3 meses. La dosis administrada fué de 400 mg/día y la forma farmacéutica empleada fué la de tabletas. Los pacientes estaban incluidos en un protocolo experimental promovido por Laboratorios Sanofi, cuyo objetivo era estudiar las acciones que el tiludronato tiene sobre el remodelado óseo en la enfermedad ósea de Paget. Todos los pacientes dieron su consentimiento para ser incluidos en este protocolo.

Por otra parte, se estudiaron 20 sujetos controles de la misma edad y sexo que los pacientes (10 hombres y 10 mujeres) con el fin de realizar un estudio comparativo con los pacientes con EOP en condiciones basales. Estos sujetos controles no tenían antecedentes clínicos de patologías óseas ni estaban tomando drogas que pudieran afectar al metabolismo del hueso.

Todos los sujetos de este estudio (pacientes y controles) tenían función renal normal (aclaramiento de creatinina normal).

3.1.1.3. Estudio 3: **Detección precoz de las metástasis óseas en el carcinoma de próstata**

Los pacientes de este grupo procedían del Servicio de Urología de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid.

Se estudiaron 55 hombres, de edad media 75 ± 8.6 años, rango 40-90 años. Nueve de ellos presentaban Hiperplasia Benigna de Próstata (HBP) y el resto ($n=46$) carcinoma de próstata en los estadios I, II, III y IV de acuerdo con la clasificación de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) de 1992, y adoptada en los protocolos del grupo Uro-Oncológico de la Asociación Española de Urología (AEU) (estadios I y II: tumor localizado dentro de la cápsula prostática; estadio III: el tumor se extiende más allá de la cápsula prostática; estadio IV: presencia de metástasis) (177).

En el presente trabajo, todos los enfermos del estadio IV presentaban metástasis óseas según diagnóstico realizado con serie metastásica radiológica y gammagrafía ósea. Los pacientes del grupo HBP y los pacientes con carcinoma de próstata en los estadios I y II, se englobaron dentro de un mismo grupo (HBP+I+II) y los pacientes del grupo III se clasificaron en III-a y III-b de acuerdo con los niveles de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo. Se incluyeron en el grupo III-b, aquellos pacientes que presentaban, al menos, niveles de dos marcadores por encima del límite superior de normalidad.

El diagnóstico se realizó mediante estudio histopatológico. El tiempo de evolución de los pacientes osciló entre 1 y 25 años. Todos los pacientes se encontraban bajo tratamiento. Los pacientes de los estadios HBP, I y II se trataron con conducta expectante, prostatectomía radical o telecobaltoterapia. Los estadios III y IV se trataron con bloqueo androgénico farmacológico.

3.1.2. Determinaciones realizadas

3.1.2.1. Estudio 1: **Osteoporosis postmenopáusic**

En los sujetos de este estudio se determinaron los marcadores bioquímicos de remodelado óseo que se indican en las Tablas IV y V. También se realizó en todos ellos la densitometría ósea en columna lumbar y/o cabeza de fémur.

3.1.2.2. Estudio 2: **Enfermedad ósea de Paget**

En estos pacientes se estudiaron los marcadores bioquímicos de remodelado óseo que se indican en las Tablas VI y VII. Las determinaciones se realizaron en condiciones basales y tras uno, dos y tres meses de tratamiento con tiludronato.

3.1.2.3. Estudio 3: **Detección precoz de las metástasis óseas en el carcinoma de próstata**

En este grupo de pacientes se han estudiado los niveles séricos de PSA y de los marcadores bioquímicos de formación ósea que se detallan en la Tabla VIII. También se realizó en todos ellos la gammagrafía ósea.

Tabla IV: Marcadores Bioquímicos de Formación Ósea determinados en pacientes con Osteoporosis Postmenopáusic

Marcador	Técnica
FAt	Autoanalizador
FAO	EIA ALKPHASE-B™
BGP	ELISA NovoCalcin™
PINP	RIA PROCOLLAGEN INTACT PINP [¹²⁵ I]
PICP	RIA PROCOLLAGEN PICP [¹²⁵ I]

Todos los marcadores se determinaron en suero. FAt: Fosfatasa alcalina total. FAO: Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina. BGP: Osteocalcina. PINP: Propéptido aminoterminal del procolágeno I. PICP: Propéptido carboxiterminal del procolágeno I. EIA: Enzimoimmunoensayo. ELISA: Enzimoimmunoensayo competitivo. RIA: Radioimmunoensayo.

Tabla V: Marcadores Bioquímicos de Resorción Ósea determinados en pacientes con Osteoporosis Postmenopáusia

Marcador	Técnica
Ca/Cr	Absorción Atómica/Jaffé
Hp/Cr	Kivirikko/Jaffé
PYD/Cr	ELISA PYRILINKS®/Jaffé
Dpd/Cr	ELISA PYRILINKS™-D/Jaffé
ICTP	RIA TELOPEPTIDE ICTP [¹²⁵ I]
NTx/Cr	ELISA OSTEOMARK®/Jaffé
CTX/Cr	ELISA CrossLapsEIA/Jaffé

Todos los marcadores se determinaron en orina, excepto el ICTP que se determinó en suero. Ca: Calcio. Cr: Creatinina en orina. Hp: Hidroxiprolina. PYD: Piridinolinas totales libres. Dpd: Desoxipiridinolinas libres. ICTP: Telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina. NTx: Telopéptidos aminoterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina. CTX: Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I. ELISA: Enzimoimmunoensayo competitivo. RIA: Radioimmunoensayo.

Tabla VI: Marcadores Bioquímicos de Formación Ósea determinados en pacientes con Enfermedad Ósea de Paget

Marcador	Técnica
FAt	Autoanalizador
FAO	IRMA TANDEM®-OSTASE™
BGP	IRMA ELSA-OST-NAT
PICP	RIA PROCOLLAGEN PICP [¹²⁵ I]

Todos los marcadores se determinaron en suero. FAt: Fosfatasa alcalina total. FAO: Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina. BGP: Osteocalcina. PICP: Propéptido carboxiterminal del procolágeno I. IRMA: Ensayo inmunoradiométrico. RIA: Radioimmunoensayo.

Tabla VII: Marcadores Bioquímicos de Resorción Ósea determinados en pacientes con Enfermedad ósea de Paget

Marcador	Técnica
Ca/Cr	Absorción Atómica/Jaffé
Hp/Cr	Kivirikko/ Jaffé
PYD/Cr	ELISA PYRILINKS®/Jaffé
ICTP	RIA TELOPEPTIDE ICTP [¹²⁵ I]
CTX/Cr	ELISA CrossLapsEIA/Jaffé

Todos los marcadores se determinaron en orina, excepto el ICTP que se determinó en suero. **Ca**: Calcio. **Cr**: Creatinina en orina. **Hp**: Hidroxiprolina. **PYD**: Piridinolinas totales libres. **ICTP**: Telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina. **CTX**: Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I. **ELISA**: Enzimoimmunoensayo competitivo. **RIA**: Radioimmunoensayo.

Tabla VIII: Marcadores Bioquímicos de Formación Ósea determinados en pacientes con Hiperplasia Benigna de Próstata y en pacientes con Carcinoma de Próstata

Marcador	Técnica
FAt	Autoanalizador
FAO	IRMA TANDEM®-OSTASE™
BGP	IRMA ELSA-OSTEO
PINP	RIA PROCOLLAGEN INTACT PINP [¹²⁵ I]
PICP	RIA PROCOLLAGEN PICP [¹²⁵ I]

Todos los marcadores se determinaron en suero. **FAt**: Fosfatasa alcalina total. **FAO**: Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina. **BGP**: Osteocalcina. **PINP**: Propéptido aminoterminal del procolágeno I. **PICP**: Propéptido carboxiterminal del procolágeno I. **IRMA**: Ensayo inmunorradiométrico. **RIA**: Radioimmunoensayo.

3.2. Protocolo experimental

3.2.1. Muestras: Obtención y condiciones de almacenamiento

En la obtención de las muestras se cumplieron las normas establecidas por el Comité Ético del hospital de procedencia (Fundación Jiménez Díaz y Hospital Insular de las Palmas de Gran Canaria). Las muestras utilizadas para las determinaciones bioquímicas fueron el suero y la orina de la segunda micción de la mañana (tras un periodo de ayuno de 12 horas). La extracción de la sangre se realizó a primera hora de la mañana. Se extrajeron 10 ml de sangre coagulada en tubos VENOJET II (con gel de separación). El suero se separó por centrifugación de la sangre a 2500 r.p.m., 4°C durante 15 minutos. Se hicieron alícuotas de suero y de orina que se almacenaron congeladas a -60°C hasta el momento de su uso.

En suero se determinaron los marcadores bioquímicos de formación ósea (FAt, FAO, BGP, PICP y PINP), el ICTP (marcador de resorción ósea) y el antígeno sérico prostático (PSA).

En orina se determinaron la creatinina y el resto de los marcadores de resorción ósea (Ca, Hp, PYD, Dpd, NTx y CTX). Todos los marcadores determinados en orina se expresaron corregidos por el valor de creatinina.

Los sujetos en los que se iba a determinar la hidroxiprolina en orina mantuvieron una dieta pobre en colágeno desde tres días antes hasta el momento de recoger la orina, para evitar la influencia del colágeno de la dieta sobre la determinación de Hp.

3.2.2. Métodos

3.2.2.1. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo

3.2.2.1.1. Marcadores bioquímicos de FORMACIÓN ÓSEA

3.2.2.1.1.1. Fosfatasa alcalina total (FAt) en suero

La actividad fosfatasa alcalina total en suero se determinó mediante autoanalizador modelo TECHNICON DAXTM-72. Esta técnica se basa en la

medida colorimétrica del p-nitrofenol liberado (color amarillo) por la acción de la fosfatasa alcalina sobre el sustrato p-nitrofenilfosfato a pH alcalino (pH=10.5).

Los valores de FAt se obtienen por interpolación en una curva estándar expresados en UI/L (UI= μ moles de p-nitrofenol liberados/minuto de reacción (25).

La sensibilidad del método es de 5 UI/L.

Los coeficientes de variación intra e interensayo del método son del 3% y 5% respectivamente.

3.2.2.1.1.2. Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina (FAO) en suero

Se han utilizado dos ensayos para su determinación: a) EIA ALKPHASE-B™ para el estudio 1 y b) IRMA TANDEM®-OSTASE™ para los estudios 2 y 3.

a) EIA ALKPHASE-B™ (Metra Biosystems, USA)

ALKPHASE-B™ es un enzimoimmunoensayo en microplaca con formato de tiras divisibles recubiertas de un anticuerpo monoclonal anti-FAO (IgG de ratón) para la captura de FAO de la muestra (44).

Al poner la muestra que contiene la FAO problema en contacto con el pocillo de la placa, ésta se une al anticuerpo monoclonal. Posteriormente se añade p-nitrofenilfosfato que es hidrolizado por acción de la FAO liberándose paranitrofenol de color amarillo. La densidad óptica del color producido se mide a 405 nm, siendo la intensidad de color directamente proporcional a la cantidad de FAO presente en la muestra.

Los valores se expresan como UI/L de FAO, obtenidos por interpolación en una curva estándar que contiene concentraciones conocidas de FAO humana (rango 0-140 UI/L). En este ensayo una unidad internacional (UI) representa un μ mol de p-nitrofenilfosfato hidrolizado en un minuto a 25°C en buffer 2-amino-2-metil-1-propanol.

La sensibilidad del método es de 0.7 UI/L.

Los coeficientes de variación intra e interensayo son del 5% y 6% respectivamente.

b) IRMA TANDEM[®]-OSTASE[™] (Hybritech Europa, Bélgica)

TANDEM[®]-OSTASE[™] es un ensayo inmunoradiométrico que utiliza dos anticuerpos monoclonales que se unen a la FAO por dos epítomos diferentes (43,45).

Las muestras de suero que contienen FAO problema se hacen reaccionar con un primer anticuerpo monoclonal (IgG1, de ratón) marcado con [¹²⁵I] (trazador). Se agita durante 20 segundos para facilitar la unión IgG1-FAO y posteriormente se adiciona el segundo anticuerpo monoclonal (IgG2, de ratón que se encuentra recubriendo una fase sólida en forma de bolas de plástico) formándose el complejo IgG1-FAO-IgG2. Seguidamente se hace un lavado para eliminar el resto de trazador no ligado.

La radiactividad de la fase sólida se mide en un contador gamma, siendo la cantidad de radiactividad medida directamente proporcional a la concentración de FAO presente en la muestra, la cuál es determinada mediante una curva estándar. La curva estándar contiene concentraciones conocidas de FAO desde 0 a 120 µg/L.

La sensibilidad del método es de 2.3 µg/L de FAO.

Los coeficientes de variación intra e interensayo son del 4% y 6.7% respectivamente.

3.2.2.1.1.3. Osteocalcina (BGP) en suero

Se han utilizado tres ensayos para su determinación: a) ELISA NovoCalcin[™] para el estudio 1, b) IRMA ELSA-OST-NAT para el estudio 2, y c) IRMA ELSA-OSTEO para el estudio 3.

a) ELISA NovoCalcin[™] (Metra Biosystems, USA)

NovoCalcin[™] es un enzimoimmunoensayo competitivo en microplaca para la determinación de BGP intacta en suero (70). Utiliza tiras divisibles recubiertas de osteocalcina, un primer anticuerpo monoclonal anti-BGP, un segundo anticuerpo anti-antiBGP conjugado con fosfatasa alcalina y sustrato paranitrofenilfosfato.

Sobre la microplaca que tiene adherida en su superficie BGP intacta, se añaden la muestras problemas (que contienen cantidades desconocidas de BGP) y el primer anticuerpo monoclonal anti-BGP. Se produce así una competición entre la BGP adherida a la placa y la de la muestra por unirse al anticuerpo. Tras una serie de lavados se añade el segundo anticuerpo monoclonal anti-anti-BGP, conjugado con fosfatasa alcalina que en presencia de p-nitrofenilfosfato da color amarillo, cuya densidad óptica se puede medir a 405 nm. La concentración de BGP intacta presente en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de color obtenido. La curva estándar presenta concentraciones de BGP intacta en el rango 0-32 ng/mL.

La sensibilidad del método es de 0.45 ng/mL y los coeficientes de variación intra e interensayo son del 7.6% y 7.4% respectivamente.

b) IRMA ELSA-OST-NAT (Cis Bio International, Francia)

El ensayo ELSA-OST-NAT es un ensayo inmunorradiométrico utilizado para la determinación de BGP intacta en suero.

Este método utiliza dos anticuerpos monoclonales anti-BGP. El primero, dirigido contra los aminoácidos 5-13 (extremo aminoterminal) está marcado con [¹²⁵I]. El segundo, dirigido contra los aminoácidos 43-39 (extremo carboxiterminal) 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 ng/mL) (71).

Las muestras, que contienen BGP problema, y el primer anticuerpo (trazador) se adicionan a los tubos que llevan fijado el segundo anticuerpo. Tras dos horas de incubación a 18-25°C, la BGP intacta queda unida por una parte a la fase sólida y por el otro extremo al primer anticuerpo. Posteriormente, se elimina el exceso de radiactividad unido mediante aspiración y varios lavados con una disolución de Tween 20. La radiactividad remanente en los tubos, se mide en un contador gamma, siendo la cantidad de radiactividad medida directamente proporcional a la concentración de BGP presente en la muestra.

La sensibilidad del método es de 1 ng/mL y los coeficientes de variación intra e interensayo son del 4.35% y del 5.5% respectivamente.

c) IRMA ELSA-OSTEO (Cis Bio International, Francia)

El ensayo ELSA-OSTEO es un ensayo inmunoradiométrico utilizado para la determinación en suero de osteocalcina intacta y del fragmento aminoterminal-medio, 1-43 (71).

Este ensayo utiliza dos anticuerpos monoclonales frente a osteocalcina humana. El primer anticuerpo marcado con [¹²⁵I] (trazador) está dirigido contra la parte N-terminal de la molécula (aminoácidos 5-13). El segundo que recubre la fase sólida, está dirigido contra la parte media de la molécula (aminoácidos 25-39). La curva estándar contiene concentraciones de BGP humana intacta en el rango 5.5-280 ng/mL.

Se añaden las muestras que contienen BGP problema y el trazador a los tubos que tienen el segundo anticuerpo. Tras un periodo de incubación la BGP intacta y el fragmento aminoterminal de BGP quedan unidos, por una parte a la fase sólida y por el otro extremo al primer anticuerpo marcado con [¹²⁵I]. Posteriormente se hace una serie de lavados para eliminar el exceso de radiactividad y se mide la radiactividad remanente en el tubo en un contador gamma. La cantidad de radiactividad medida es directamente proporcional a la cantidad de BGP presente en la muestra.

La sensibilidad del método es de 1.2 ng/mL y los coeficientes de variación intra e interensayo son del 4.1% y del 3.95% respectivamente (71).

3.2.2.1.1.4. Propéptido aminoterminal del procolágeno I (PINP) en suero

RIA PROCOLLAGEN INTACT PINP [¹²⁵I] (Orion Diagnostica, Finlandia)

El método PROCOLLAGEN INTACT PINP [¹²⁵I] es un radioinmunoensayo competitivo para la medida de la concentración del propéptido aminoterminal del procolágeno I en suero y otros fluidos biológicos (93). El PINP

contenido en las muestras problemas se pone en contacto con el trazador (PINP marcado con [^{125}I]). Ambas sustancias compiten por los puntos de unión a un anticuerpo anti-PINP de conejo. La cantidad de PINP marcado con [^{125}I] presente en el complejo antígeno-anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de PINP sin marcar presente en la muestra. Después de unos lavados para eliminar el PINP libre y la radiactividad sobrante, se mide la radiactividad ligada en un contador gamma. La concentración de PINP se calcula refiriéndola a una curva estándar (rango concentración 0-250 $\mu\text{g/L}$).

La sensibilidad del método es de 2 $\mu\text{g/L}$ y los coeficientes de variación intra e interensayo son del 8.75% y 5% respectivamente.

3.2.2.1.1.5. Propéptido carboxiterminal del procolágeno I (PICP) en suero

RIA PROCOLLAGEN PICP [^{125}I] (Orion Diagnostica, Finlandia)

El PROCOLLAGEN PICP [^{125}I] es un radioinmunoensayo competitivo para la medida de la concentración del propéptido carboxiterminal del colágeno tipo I en suero humano y otros fluidos biológicos (94).

La muestra problema, que contiene cantidades desconocidas de PICP, se mezcla con PICP- ^{125}I (trazador) y ambas sustancias compiten por la unión a un anticuerpo anti-PICP obtenido en conejo. La cantidad de PICP presente en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de trazador ligado al anticuerpo. Después de eliminar la radiactividad sobrante, se mide la radiactividad ligada (precipitado) en un contador gamma. La concentración de PICP problema se calcula refiriéndola a una curva estándar (rango de concentración 0-500 $\mu\text{g/L}$).

La sensibilidad del método es de 1.2 $\mu\text{g/L}$.

Los coeficientes de variación intra e interensayo son del 2.8% y 5.12% respectivamente.

3.2.2.1.2. Marcadores bioquímicos de RESORCIÓN ÓSEA

3.2.2.1.2.1. Calcio (Ca) en orina

El calcio se determinó por absorción atómica utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Modelo 305B.

Las muestras de orina fueron diluidas previamente en óxido de lantano (La_2O_3) con el fin de evitar la interferencia del fósforo en las determinaciones.

Las concentraciones de Ca de las muestras problemas se obtienen por interpolación en una curva estándar (rango 2.5-20 mg/dL) y los niveles se expresan como el cociente Ca/Cr.

La sensibilidad del método es de 1 mg/dL.

Los coeficientes de variación intra e interensayo son del 2% y 3% respectivamente.

3.2.2.1.2.2. Hidroxiprolina (Hp) en orina

La hidroxiprolina urinaria se determinó por la técnica de Kivirikko (103). El método consiste en una hidrólisis inicial de la orina con HCl 6N, con el fin de liberar al medio como aminoácido libre la Hp que pudiera estar unida a péptidos. Posteriormente, se produce una oxidación de la Hp liberada con tiosulfato sódico y una extracción con tolueno.

El derivado de Hp extraído se hace reaccionar con el reactivo de Erlich (p-dimetilaminobenzaldehído) dando lugar a un compuesto coloreado. La absorbancia (560 nm) del color producido es proporcional a la concentración de Hp que hay en la muestra.

La curva estándar contiene concentraciones de Hp en el rango 1-76 mg/dL y los resultados se expresan como el cociente Hp/Cr.

La sensibilidad del método es de 0.5 mg/dL.

Los coeficientes de variación intra e interensayo son del 5% y 8% respectivamente.

3.2.2.1.2.3. Piridinolinas totales (PYD) libres en orina

ELISA PYRILINKS[®] (Metra Biosystems, USA)

El equipo diagnóstico PYRILINKS[®] mide simultáneamente piridinolinas y desoxipiridinolinas libres en orina. Utiliza un anticuerpo monoclonal purificado de oveja, que reconoce exclusivamente la molécula libre, sin reactividad cruzada con la molécula unida a péptidos (129).

El método es un enzimoimmunoensayo competitivo en microplaca. Las muestras problema que contienen cantidades desconocidas de PYD se añaden sobre pocillos que también contienen PYD. Posteriormente, se añade un anticuerpo monoclonal conjugado con fosfatasa alcalina por el que van a competir ambas PYD, la de los pocillos y la de la muestra. La reacción se detecta con p-nitrofenilfosfato como sustrato. Se obtiene un complejo coloreado cuya intensidad de color (405 nm) es inversamente proporcional a la cantidad de PYD libres que había en la muestra.

La curva estándar contiene concentraciones de PYD purificada de orina humana (rango 0-750 nM) y los resultados se expresan como el cociente PYD/Cr.

La sensibilidad del método es de 7.5 nM.

Los coeficientes de variación intra e interensayo del método son del 7.8% y 7% respectivamente.

3.2.2.1.2.4. Desoxipiridinolinas (Dpd) libres en orina

ELISA PYRILINKS[™]-D (Metra Biosystems, USA)

El equipo diagnóstico PYRILINKS[™]-D mide desoxipiridinolinas libres en orina. El anticuerpo antiDpd en el que se basa esta técnica reconoce exclusivamente la molécula libre, sin reactividad cruzada con la molécula de Dpd unida a péptidos, ni con la PYD libre ó unida a péptidos (130).

PYRILINKS[™]-D es un enzimoimmunoensayo competitivo (ELISA) en microplaca. Los pocillos de la placa de ELISA van recubiertos de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Dpd. La Dpd de la muestra compite, por la unión al

anticuerpo, con la Dpd conjugada con fosfatasa alcalina que se añade a continuación y la reacción se detecta con p-nitrofenilfosfato como sustrato. Se obtiene un complejo coloreado cuya intensidad (405 nm) es inversamente proporcional a la cantidad de Dpd libre que hay en la muestra.

La curva estándar contiene concentraciones de Dpd en un rango 0-300 nM y los niveles de Dpd en orina se expresan como el cociente Dpd/Cr.

La sensibilidad del método es de 1.1 nM y los coeficientes de variación intra e interensayo son del 6% y 8% respectivamente.

3.2.2.1.2.5. Telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina (ICTP) en suero

RIA TELOPEPTIDE ICTP [¹²⁵I] (Orion Diagnostica, Finlandia).

El método RIA TELOPEPTIDE ICTP [¹²⁵I] es un radioinmunoensayo competitivo para la cuantificación de los telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en suero humano y en otros fluidos biológicos (131).

El fundamento de la técnica es el siguiente: las muestras problema que contienen niveles de ICTP desconocidas se ponen en contacto con ICTP marcado con [¹²⁵I]. Posteriormente se añade un anticuerpo específico de ICTP obtenido de conejo, produciéndose así la competición de ambos antígenos (ICTP problema e ICTP [¹²⁵I]) por su unión al anticuerpo. Tras un tiempo de incubación se adiciona un complejo precipitante (agente de separación), precipitando el ICTP unido al anticuerpo específico. Se procede a la medida de la radiactividad del precipitado en un contador gamma, siendo la cantidad de radiactividad medida inversamente proporcional a la cantidad de ICTP problema presente en la muestra.

La curva estándar tiene concentraciones conocidas de ICTP humano (rango 0-50 µg/L).

La sensibilidad del método es de 0.5 µg/L y los coeficientes de variación intra e interensayo son del 4.8% y 5.7% respectivamente.

3.2.2.1.2.6. Telopéptidos aminoterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina (NTx) en orina

ELISA OSTEOMARK[®] (Ostex International, USA)

OSTEOMARK[®] es una técnica de ensayo que proporciona una medida cuantitativa de la excreción urinaria de los telopéptidos aminoterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina (132).

El método es un enzimoimmunoensayo competitivo que utiliza una fase sólida (microplaca) en la que se ha ligado NTx purificado. El NTx problema que contiene la muestra compite con el NTx ligado a los pocillos por los puntos de unión de un anticuerpo monoclonal (purificado de ratón) marcado con peroxidasa. La reacción se revela con un agente cromógeno y se detiene con ácido sulfúrico 1N. El producto de la reacción se mide espectrofotométricamente a 405 nm y se calcula en base a una curva de calibración estándar, rango 1-3000 nM ECO (ECO=equivalentes de colágeno óseo), siendo la cantidad de NTx que hay en la muestra inversamente proporcional a la intensidad del color obtenido. Los valores obtenidos (nM ECO/L) se expresan como cociente NTx/Cr.

El límite de detección del método es de 20 nM ECO/L.

Los coeficientes de variación intra e interensayo son del 7.6% y 4% respectivamente.

3.2.2.1.2.7. Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I (CTX) en orina

ELISA CrossLapsEIA (Cis Bio International, Francia)

El CrossLapsEIA es una técnica para la cuantificación in vitro de CTX en orina (141).

El método es un enzimoimmunoensayo competitivo que utiliza una fase sólida (microplaca) en cuyos pocillos se ha fijado CTX, y sobre los que se añade la muestra problema que contiene una concentración desconocida de CTX. Posteriormente se añade un anticuerpo anti-CTX de conejo por cuyos puntos de

unión compiten el CTX ligado a la placa y el CTX problema. El anticuerpo está dirigido contra la secuencia específica de aminoácidos del CTX, siendo nula la reactividad cruzada con otras estructuras derivadas de la rotura del colágeno.

La reacción se revela con otro anticuerpo conjugado con peroxidasa, anti-anti-CTX, y el color desarrollado se mide espectrofotométricamente a 450 nm. La intensidad de color medida es inversamente proporcional a la cantidad de CTX presente en la muestra problema.

Los valores de CTX se obtienen por interpolación en una curva estándar (rango 0-5 µg/mL) y se expresan como el cociente CTX/Cr.

La sensibilidad del método es de 0.05 µg/mL y los coeficientes de variación intra e interensayo son del 4.4% y 7% respectivamente.

3.2.2.2. **Otras determinaciones bioquímicas**

3.2.2.2.1. **Creatinina (Cr) en orina**

La creatinina en orina se midió mediante la reacción de Jaffé (178) basada en la medida cuantitativa del pigmento rojo picrato de creatinina alcalino.

La sensibilidad del método es de 5 mg/dL.

Los coeficientes de variación intra e interensayo son del 2% y 3% respectivamente.

3.2.2.2.2. **Antígeno sérico prostático (PSA) en suero**

INMULITE® PSA es un enzimoimmunoensayo quimioluminiscente para la medida sérica de PSA (179).

La muestra problema que contiene cantidades desconocidas de PSA se pone en contacto con un primer anticuerpo policlonal antiPSA (Ac1) obtenido de cabra, formándose el complejo Ac1-PSA. Posteriormente, se añade un segundo anticuerpo monoclonal antiPSA que está conjugado con fosfatasa alcalina (Ac2FA) obtenido de oveja. Se forma así el complejo Ac1-PSA-Ac2FA. A continuación se añade un complejo luminiscente que es hidrolizado por la

actividad fosfatasa alcalina del Ac2FA. Como consecuencia de la reacción, se genera un compuesto intermedio cuya luminiscencia es directamente proporcional a la cantidad de PSA que hay en la muestra.

La curva estándar contiene concentraciones conocidas de PSA (rango 0.04-150 ng/mL).

La sensibilidad del método es de 0.03 ng/mL y los coeficientes de variación intra e interensayo son del 3.9% y 6.1% respectivamente.

3.2.2.3. **Densitometría ósea**

Esta medida se realizó en las Unidades de Mineralometría de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid y del Hospital Insular de Canarias.

Se determinó en columna lumbar y en cabeza de fémur en todos los sujetos del Estudio 1 como medida del diagnóstico de osteoporosis. La estimación se realizó mediante absorciometría dual de rayos X (DEXA) para lo cual se utilizó un densitómetro HOLOGIC, modelo QDRTM-1000.

3.2.2.4. **Rayos X**

Es medida se realizó en los Departamentos de Radiología de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid y del Hospital Insular de Canarias. Se utilizó como medida complementaria para el diagnóstico de los sujetos de los Estudios 2 y 3.

3.2.2.5. **Gammagrafía ósea**

Esta medida se realizó en el Departamento de Medicina Nuclear de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid.

Se realizó en todos los sujetos del Estudio 3, para determinar la posible existencia de metástasis óseas.

La técnica está basada en la capacidad que tienen los cristales de hidroxiapatito del hueso de fijar bifosfonatos. Consiste en la administración, por vía intravenosa, de 20 mCi (740 MBq) de ^{99m}Tc HDP (hidroximetilendifosfonato)

ó ^{99m}Tc MDP (metilendifosfonato) y posterior medida, en una gammacámara, de la cantidad de isótopo ligado (180).

3.2.2.6. **Análisis estadístico**

Se realizó mediante programa informático de estadística clínica MedCalc[®] para Windows, Copyright © 1993-1996 Frank Schoonjans.

3.2.2.6.1. Prueba de la t de Student no emparejada

Utilizada en los Estudios 1 y 2, para estudiar las diferencias existentes entre los niveles de un marcador en dos grupos diferentes (control y patológico).

Se consideraron diferencias significativas si $p \leq 0.05$.

3.2.2.6.2. Curvas ROC (Receiver-Operating Characteristics) (181)

Utilizadas en el Estudio 1, para comparar la sensibilidad y especificidad diagnóstica de los marcadores estudiados.

Se consideraron diferencias significativas entre las áreas bajo las curvas ROC de dos marcadores distintos si $p \leq 0.05$.

3.2.2.6.3. Test de ANOVA para medidas repetidas

Utilizado en el Estudio 2 para hacer una comparación múltiple entre los niveles de los marcadores a diferentes tiempos de tratamiento con tiludronato (al primer, segundo y tercer mes de tratamiento).

Se consideraron diferencias significativas si $p \leq 0.05$.

3.2.2.6.4. Test de ANOVA

Utilizado en el Estudio 3, para hacer una comparación múltiple entre los diferentes grupos (HBP+I+II, III-a, III-b y IV). Posteriormente se realizó una prueba post hoc, que fué la Student-Newman-Keuls test.

Se consideraron diferencias significativas si $p \leq 0.05$.

4

Resultados

- 4.1. Estudio 1: Osteoporosis postmenopáusicas**
- 4.2. Estudio 2: Enfermedad ósea de Paget**
- 4.3. Estudio 3: Detección precoz de las metástasis óseas en el carcinoma de próstata**

4.1. Estudio 1: Osteoporosis postmenopáutica

4.1.1. Marcadores bioquímicos de formación ósea

En la Tabla IX se muestran los valores (expresados como media±desviación estándar) de los niveles séricos de FAt, FAO, BGP, PINP y PICP determinados en un grupo control y en un grupo de pacientes con osteoporosis postmenopáutica (OSPp). Todos los marcadores estudiados, a excepción de la FAt, estaban significativamente elevados en el grupo de pacientes con OSPp con respecto al grupo control.

Tabla IX: Marcadores Bioquímicos de Formación Ósea en pacientes con Osteoporosis Postmenopáutica

	C	OSPp	Sig. Est.*
FAt (UI/L)	70.7±14.7 (44-95) n=17	83.4±32.5 (45-168) n=26	p=0.1364
FAO (UI/L)	20.8±5.4 (12.5-31.3) n=16	33.2±13.6 (14.7-65.6) n=26	p=0.0013
BGP (ng/mL)	7.3±3.6 (3.4-15.2) n=17	10.6±5.1 (3.4-22.8) n=20	p=0.0278
PINP (µg/L)	28.8±10.3 (7.4-53.3) n=43	53.1±19 (20.5-101) n=46	p=0.0000
PICP (µg/L)	104.1±16.5 (72-128) n=17	143±67.2 (75-382) n=26	p=0.0250

C: Mujeres controles. **OSPp**: Pacientes con osteoporosis postmenopáutica. **FAt**: Fosfatasa alcalina total en suero. **FAO**: Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina en suero. **BGP**: Osteocalcina en suero. **PINP**: Propéptido aminoterminal del procolágeno I en suero. **PICP**: Propéptido carboxiterminal del procolágeno I en suero. UI: Unidades internacionales. Los valores se expresan como media±desviación estándar. El rango de valores se indica entre paréntesis y en cursiva; n=n° de sujetos en los que se ha determinado cada marcador. *Significación estadística realizada frente al grupo control (t de Student no emparejada). Se consideraron diferencias significativas si $p < 0.05$ (las "p" significativas se representan en negrita)

En el grupo de mujeres con OSP postmenopáusica, el valor medio de la FAt estaba elevado en un 18% con respecto al valor medio de normalidad, la FAO el 60%, la BGP el 45%, el PINP el 84.4% y el PICP el 37.4%. En las Figuras 14, 15 y 16 se representan los valores individuales de FAt, FAO, PINP, PICP y BGP en el grupo control y en el grupo de pacientes con osteoporosis postmenopáusica.

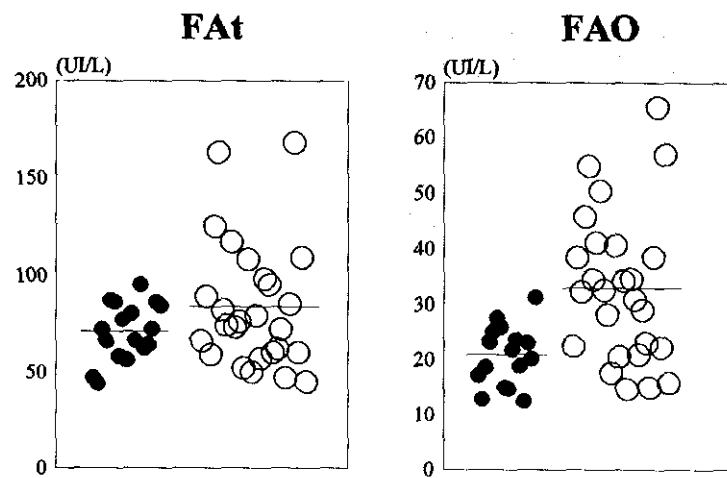


Fig. 14: Niveles individuales de fosfatasa alcalina total (FAt) e isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina (FAO) en suero de mujeres controles (●) y de pacientes con osteoporosis postmenopáusica (○). Las líneas horizontales representan el valor medio de cada grupo.

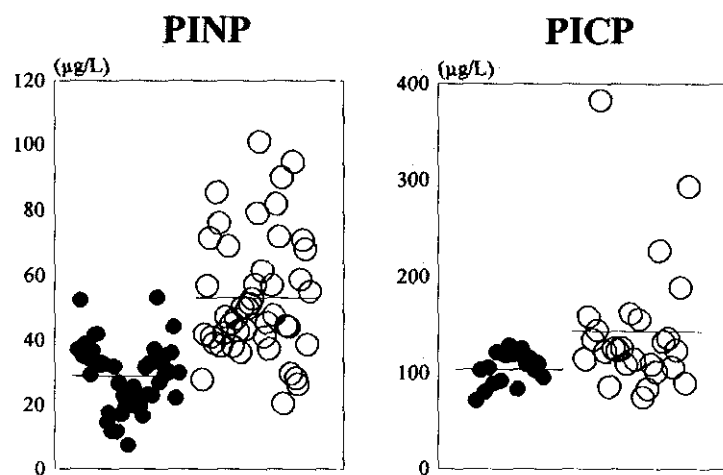


Fig.15: Niveles individuales de los propéptidos amino y carboxiterminales del procolágeno I (PINP y PICP respectivamente) en suero de mujeres controles (●) y de pacientes con osteoporosis postmenopáusica (○). Las líneas horizontales representan el valor medio de cada grupo.

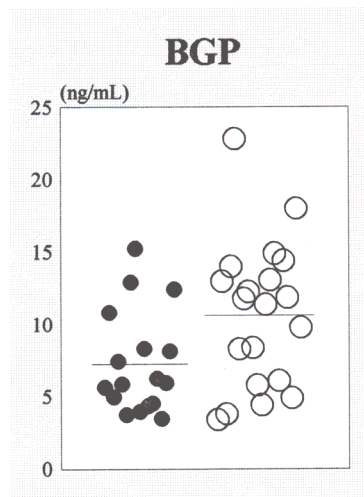


Fig. 16: Niveles individuales de osteocalcina (BGP) en suero de mujeres controles (●) y de pacientes con osteoporosis postmenopáusicas (○). Las líneas horizontales representan el valor medio de cada grupo.

En la Figura 17 se representan las curvas ROC de los marcadores de formación ósea estudiados. Las áreas bajo las curvas ROC fueron: 90% (PINP), 80% (FAO), 75% (PICP), 71% (BGP) y 61% (FAt) respectivamente. Para una especificidad del 100%, las sensibilidades fueron: 39% (PINP), 54% (FAO), 42% (PICP), 10% (BGP) y 27% (FAt) respectivamente.

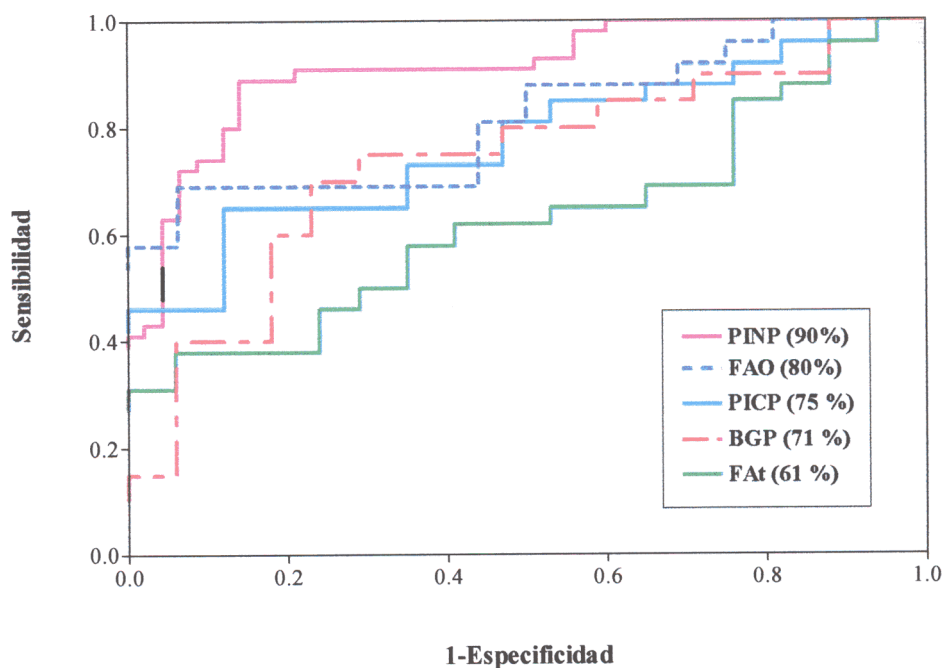


Fig. 17: Curvas ROC de los marcadores bioquímicos de formación ósea determinados en el estudio de la osteoporosis postmenopáusicas. **PINP:** Propéptido aminoterminal del procolágeno I en suero. **FAO:** Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina en suero. **PICP:** Propéptido carboxiterminal del procolágeno I en suero. **BGP:** Osteocalcina en suero. **FAt:** Fosfatasa alcalina total en suero. Entre paréntesis se indica el área bajo la curva. El número de sujetos que se ha utilizado para realizar las diferentes curvas ROC son los indicados en la Tabla IX (pag. 70). En el eje X se representan los verdaderos negativos (1-especificidad) y en el eje Y los verdaderos positivos (sensibilidad).

Los marcadores que presentaban mayor área bajo la curva ROC fueron el PINP (90%) y la FAO (80%).

La diferencia entre las áreas bajo las curvas ROC de todos los marcadores se representan en la Tabla X. Sólo se observaron diferencias significativas entre las áreas de las curvas FAt-FAO y FAt-PINP.

Tabla X: Diferencia entre las áreas bajo las curvas ROC de los marcadores bioquímicos de formación ósea determinados en pacientes con Osteoporosis Postmenopáusia

	FAt	FAO	BGP	PINP	PICP
FAt		p=0.006	p=0.414	p=0.001	p=0.151
FAO			p=0.299	p=0.160	p=0.647
BGP				p=0.160	p=0.704
PINP					p=0.075
PICP					

FAt: Fosfatasa alcalina total en suero. FAO: Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina en suero. BGP: Osteocalcina en suero. PINP: Propéptido aminoterminal del procolágeno I en suero. PICP: Propéptido carboxiterminal de procolágeno I en suero. Diferencia entre áreas calculada mediante programa informático de estadística clínica MedCalc. Las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0.05$ (representadas en negrita).

4.1.2. Marcadores bioquímicos de resorción ósea

La Tabla XI muestra los valores de los niveles de Ca/Cr, Hp/Cr, PYD/Cr, Dpd/Cr, ICTP, NTx/Cr y CTX/Cr, expresados como media±desviación estándar, en un grupo control y en un grupo de pacientes con osteoporosis postmenopáusia (OSPp). Todos los marcadores de resorción estudiados, a excepción del ICTP, estaban significativamente elevados en el grupo de pacientes con OSPp con respecto al grupo control.

En las Figuras 18, 19 y 20 se representan los niveles individuales de los marcadores bioquímicos de resorción ósea determinados en este estudio.

Tabla XI: Marcadores Bioquímicos de Resorción Ósea en pacientes con Osteoporosis Postmenopáusicas

	C	OSPp	Sig. Est.***
Ca/Cr*	0.086±0.052 (0.033-0.2) n=15	0.199±0.159 (0.01-0.554) n=17	p=0.0135
Hp/Cr**	0.026±0.007 (0.014-0.039) n=29	0.0338±0.01 (0.017-0.06) n=20	p=0.0049
PYD/Cr (nM/mM)	21.4±7.3 (6.4-37.5) n=46	31.5±11.8 (14.06-65.9) n=39	p=0.0000
Dpd/Cr (nM/mM)	6.5±2.2 (4-10.7) n=16	15.2±6.6 (5.9-37.3) n=19	p=0.0000
ICTP (µg/L)	3.5±0.9 (1.7-4.8) n=29	3.5±0.5 (2.4-4.5) n=20	p=0.7955
NTx/Cr (nM ECO/mM)	45.4±23.9 (16-99) n=16	113.2±57.4 (59-267) n=17	p=0.0000
CTX/Cr (µg/mmol)	140.2±66.7 (34-334) n=43	330.2±154.7 (132-692) n=39	p=0.0000

C: Mujeres controles. OSPp: Pacientes con osteoporosis postmenopáusicas. Ca: Calcio en orina. Cr: Creatinina en orina. Hp: Hidroxiprolina en orina. PYD: Piridinolinas totales libres en orina. Dpd: Desoxipiridinolinas libres en orina. ICTP: Telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en suero. NTx: Telopéptidos aminoterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en orina. CTX: Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I en orina. ECO: Equivalentes de colágeno óseo. *ambos en mg/dL. **ambos en mmol/L. Los valores se expresan como media±desviación estándar. El rango de valores se indica entre paréntesis y en cursiva; n=n° de sujetos en los que se ha determinado cada marcador. ***Significación estadística realizada frente al grupo control (t de Student no emparejada). Se consideraron diferencias significativas si $p < 0.05$ (las "p" significativas se representan en negrita).

La medida de los niveles de Ca/Cr estaba elevada un 131.4% en el grupo de pacientes con OSPp con respecto al valor medio del grupo control, la Hp/Cr un 30%, la PYD/Cr un 47.2%, la Dpd/Cr un 133.8%, el NTx/Cr un 149% y el

CTX/Cr un 135.5%. Sin embargo, ninguna paciente presentaba niveles de ICTP (único marcador de resorción determinado en suero) por encima del límite superior de normalidad.

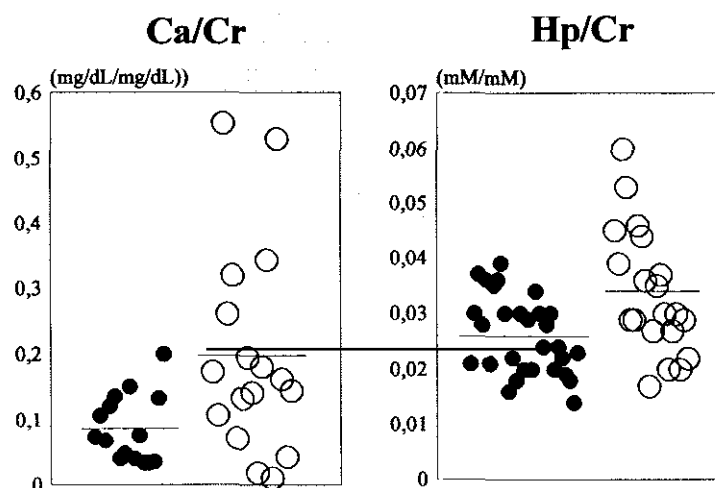


Fig. 18: Niveles individuales de calcio/creatinina (Ca/Cr) e hidroxiprolina/creatinina (Hp/Cr) en orina de mujeres controles (●) y de pacientes con osteoporosis postmenopáusicas (○). Las líneas horizontales representan el valor medio de cada grupo.

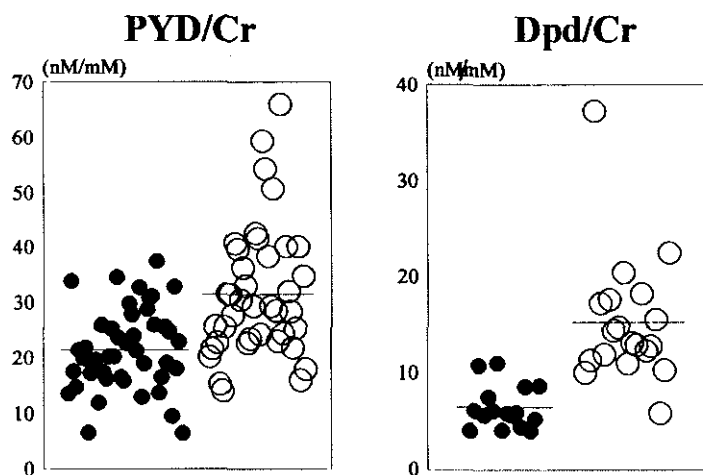


Fig. 19 : Niveles individuales de piridinolinas totales libres (PYD) y desoxipiridinolinas libres (Dpd) en orina de mujeres controles (●) y de pacientes con osteoporosis postmenopáusicas (○). Cr: Creatinina. Las líneas horizontales representan el valor medio de cada grupo.

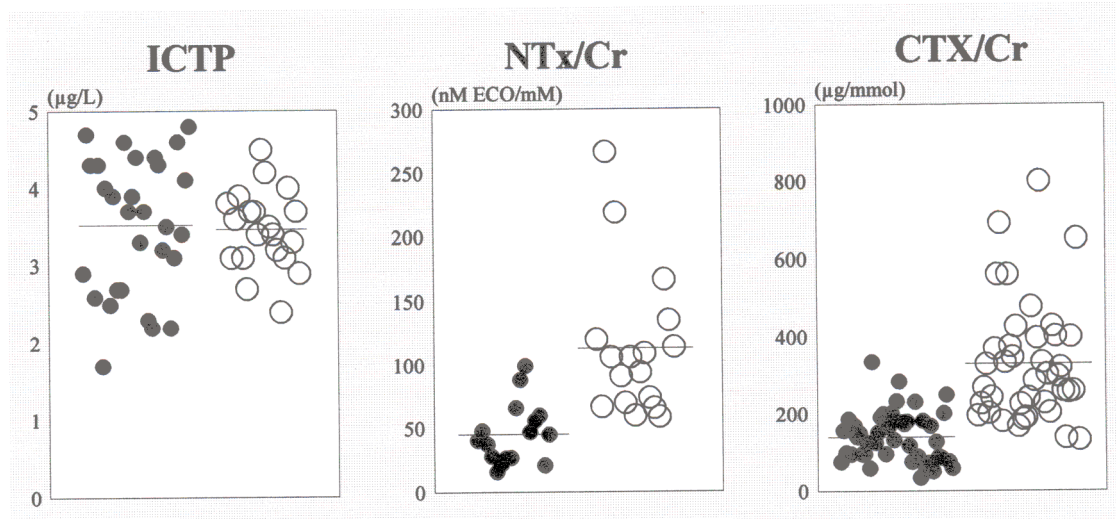


Fig. 20: Niveles individuales de los telopéptidos carboxi y aminoterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina (ICTP y NTx respectivamente) y del telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I (CTX) determinados en suero (ICTP) y orina (NTx y CTX) de mujeres controles (●) y de pacientes con osteoporosis postmenopáusicas (○). ECO: Equivalentes de colágeno óseo. Cr: Creatinina. Las líneas horizontales representan el valor medio de cada grupo.

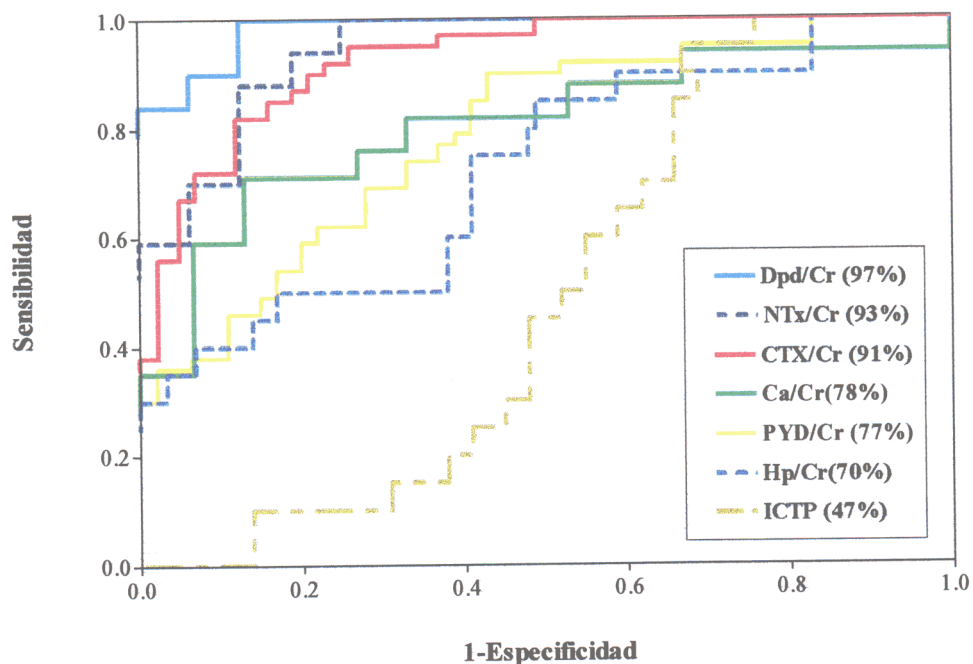


Fig. 21: Curvas ROC de los marcadores bioquímicos de resorción ósea determinados en el estudio de la osteoporosis postmenopáusicas. Dpd: Desoxipiridinolinas libres en orina. Cr: Creatinina en orina. NTx: Telopéptidos aminoterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en orina. CTX: Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I en orina. Ca: Calcio en orina. PYD: Piridinolinas totales libres en orina. Hp: Hidroxiprolina en orina. ICTP: Telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en suero. Entre paréntesis se indica el área bajo la curva. El número de sujetos que se ha utilizado para realizar las diferentes curvas ROC son los indicados en la Tabla XI (pag. 74). En el eje X se representan los verdaderos negativos (1-especificidad) y en el eje Y los verdaderos positivos (sensibilidad).

En la Figura 21 se representan las curvas ROC de los marcadores de resorción determinados en este estudio. Las áreas bajo la curva de cada uno de ellos fueron: 97% (Dpd/Cr), 93% (NTx/Cr), 91% (CTX/Cr), 78% (Ca/Cr), 77% (PYD/Cr), 70% (Hp/Cr) y 47% (ICTP) respectivamente.

Para una especificidad del 100% las sensibilidades fueron: 80% (Dpd/Cr), 53% (NTx/Cr), 36% (CTX/Cr), 29% (Ca/Cr), 28% (PYD/Cr), 25% (Hp/Cr) y 0% (ICTP), respectivamente.

Las diferencias entre las áreas bajo las curvas ROC se representan en la Tabla XII. Se observaron diferencias significativas entre las áreas bajo las curvas ROC de: Ca/Cr-Dpd/Cr, Ca/Cr-NTx/Cr, Ca/Cr-CTX/Cr; Hp/Cr-Dpd/Cr, Hp/Cr-NTx/Cr, Hp/Cr-CTX/Cr; PYD/Cr-ICTP, PYD/Cr-CTX/Cr; Dpd/Cr-ICTP; y por último entre las áreas de ICTP-NTX/Cr e ICTP-CTX/Cr.

Tabla XII: Diferencia entre áreas bajo las curvas ROC de los marcadores bioquímicos de resorción ósea determinados en pacientes con Osteoporosis Postmenopáusia

	Ca/Cr	Hp/Cr	PYD/Cr	Dpd/Cr	ICTP	NTx/Cr	CTX/Cr
Ca/Cr		p=0.519	p=0.474	p=0.016	p=0.143	p=0.036	p=0.025
Hp/Cr			p=0.477	p=0.001	p=0.171	p=0.012	p=0.015
PYD/Cr				p=0.099	p=0.033	p=0.170	p=0.007
Dpd/Cr					p=0.000	p=0.596	p=0.609
ICTP						p=0.000	p=0.000
NTx/Cr							p=0.818
CTX/Cr							

Ca: Calcio en orina. Cr: Creatinina en orina. Hp: Hidroxiprolina en orina. PYD: Piridinolinas totales libres en orina. Dpd: Desoxipiridinolinas libres en orina. ICTP: Telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en suero. NTx: Telopéptidos aminoterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en orina. CTX: Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I en orina. Diferencia entre áreas calculada mediante programa informático de estadística clínica MedCalc. Las diferencias fueron significativas si $p \leq 0.05$ (las "p" significativas se representan en negrita).

4.2. Estudio 2: Enfermedad ósea de Paget

4.2.1. Marcadores bioquímicos de formación ósea

La Tabla XIII muestra los valores (expresados como media±desviación estándar) de los marcadores de formación ósea (FAt, FAO, BGP y PICP) determinados en un grupo control y en un grupo de pacientes con enfermedad ósea de Paget (EOP). Todos los marcadores estudiados estaban significativamente elevados en el grupo de pacientes con EOP con respecto al grupo control. En condiciones basales, el 100% de los pacientes presentaban niveles de FAt y FAO por encima del límite superior de normalidad, y el 90% y 70% de ellos presentaban niveles de BGP y PICP respectivamente, por encima de dicho límite.

Tabla XIII: Marcadores Bioquímicos de Formación Ósea en pacientes con Enfermedad Ósea de Paget

	C	EOP	Sig. Est.*
FAt (UI/L)	70±14.7 (44-95) n=17	620±194 (278±887) n=10	p=0.0000
FAO (µg/L)	11.4±3.7 (3.4-18.4) n=22	261±99 (144-431) n=10	p=0.0000
BGP (ng/mL)	8.8±3.4 (4-17.4) n=32	29.4±8.8 (15.2-39.5) n=10	p=0.0000
PICP (µg/L)	104.12±16.5 (95-220) n=17	319±129 (150-510) n=10	p=0.0000

C: Grupo control. EOP: Grupo de pacientes con enfermedad ósea de Paget. FAt: Fosfatasa alcalina total en suero. FAO: Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina en suero. BGP: Osteocalcina en suero. PICP: Propéptido carboxiterminal del procolágeno I en suero. UI: Unidades internacionales. Los valores se expresan como media±desviación estándar. El rango de valores se indica entre paréntesis y en cursiva; n=n° de sujetos en los que se ha determinado cada marcador. *Significación estadística realizada frente al grupo control (t de Student no emparejada). Se consideraron diferencias significativas si $p \leq 0.05$ (las "p" significativas se representan en negrita).

En la Tabla XIV y Figura 22 se muestra la evolución de los marcadores de formación ósea estudiados en este grupo de pacientes durante el tratamiento con tiludronado (3 meses).

Tabla XIV: Marcadores Bioquímicos de Formación Ósea en pacientes con Enfermedad Ósea de Paget: niveles basales y tras el tratamiento con tiludronato

	Tiempo de Tratamiento (meses)			
	0	1	2	3
FAt (UI/L)	620±194 (278-887)	342±138 (104-600)	275±113 (159-521)	273±164 (128-694)
		p=0.000⁰	p=0.000⁰ p=0.011¹	p=0.000⁰ p=0.942²
FAO (µg/L)	261±99 (144-431)	180±86 (94-371)	136±81 (56-327)	110±75 (46-290)
		p=0.000⁰	p=0.000⁰ p=0.000¹	p=0.000⁰ p=0.000²
BGP (ng/mL)	29.4±8.8 (15.2-39.5)	25.9±8.2 (12.8-37.4)	25.1±14.3 (5.6-48.8)	30.2±11.6 (14.2-50.3)
		p=0.000⁰	p=0.287⁰ p=0.828¹	p=0.689⁰ p=0.154²
PICP (µg/L)	319±129 (150-510)	176±60 (87-296)	189±49 (104-286)	210±63 (105-322)
		p=0.001⁰	p=0.004⁰ p=0.458¹	p=0.007⁰ p=0.053²

Las determinaciones se realizaron en un grupo de 10 pacientes. **FAt**: Fosfatasa alcalina total en suero. **FAO**: Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina en suero. **BGP**: Osteocalcina en suero. **PICP**: Propéptido carboxiterminal del procolágeno I en suero. Los valores se expresan como media±desviación estándar. UI: Unidades internacionales. El rango de valores se indica entre paréntesis y en cursiva. Significación estadística realizada frente al nivel basal⁰, primer¹ y segundo² mes de tratamiento (test de ANOVA para medidas repetidas). Se consideraron diferencias significativas si $p \leq 0.05$ (las "p" significativas se representan en negrita).

El tratamiento con este bifosfonato produce un descenso del 44.8% en los niveles de FAt después del primer mes, un 55.6% después del segundo mes y un 55.9% después del tercer mes (no hay diferencia significativa con respecto al segundo mes); la FAO desciende de forma progresiva desde el primer mes de tratamiento hasta el último (31%, 47.9% y 57.8% de descenso respectivamente); la BGP es el marcador que experimenta un menor descenso después del tratamiento con tiludronato (11.9% y 14.6% después del primer y segundo mes respectivamente) observándose incluso un ligero incremento del 2.72% (no significativo) después del segundo mes. Por último, el PICP disminuye un 44.8% (primer mes), 40.7% (segundo mes) y un 34.2% (tercer mes).

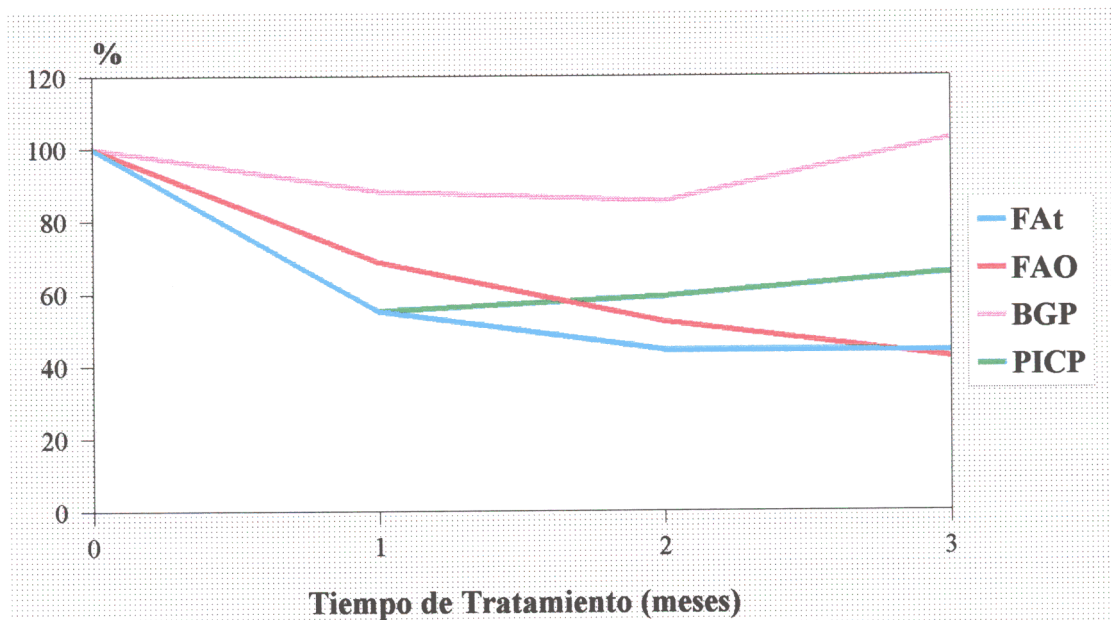


Fig. 22: Evolución en el tiempo de los marcadores bioquímicos de formación ósea estudiados en pacientes con enfermedad ósea de Paget tratados con tiludronato (400 mg/día) durante tres meses. FAt: Fosfatasa alcalina total en suero. FAO: Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina en suero. BGP: Osteocalcina en suero. PICP: Propéptido carboxiterminal del procolágeno I en suero.

En la figura 23 se representan los niveles individuales de FAt, FAO, BGP y PICP en los pacientes con EOP estudiados, en condiciones basales y a diferentes tiempos del tratamiento con tiludronato.

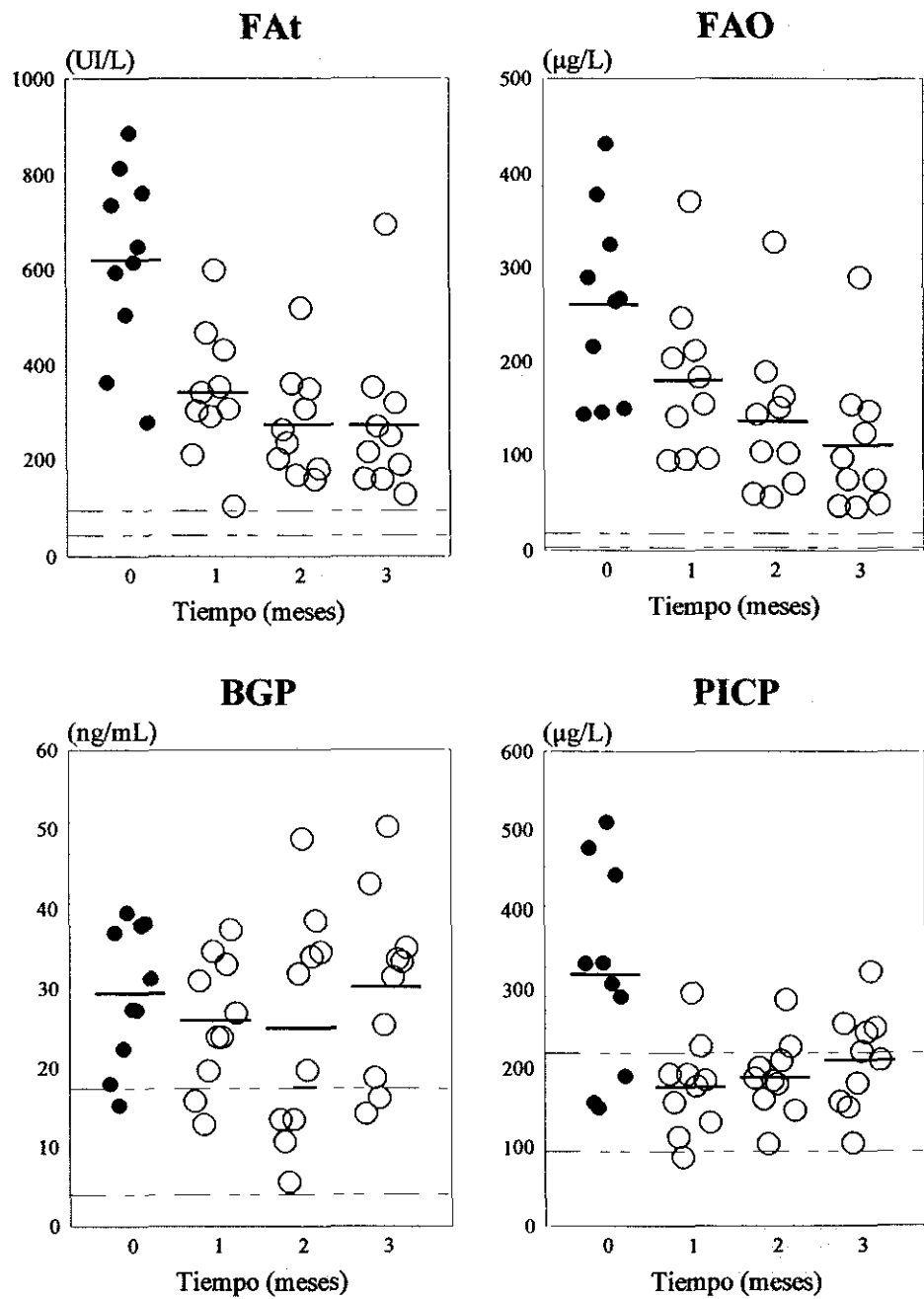


Fig. 23: Niveles individuales de fosfatasa alcalina total (FAt), isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina (FAO), osteocalcina (BGP) y propéptido carboxiterminal del procolágeno I (PICP) en suero de pacientes con enfermedad ósea de Paget, en condiciones basales (●) y durante un periodo de tres meses de tratamiento con tiludronato (○). Las líneas horizontales continuas representan el valor medio de cada grupo. Entre líneas paralelas discontinuas se representa el rango de normalidad (FAt: 44-95 UI/L; FAO: 3.4-18.4 µg/L; BGP: 4-17.4 ng/mL; PICP: 95-220 µg/L).

4.2.2. Marcadores bioquímicos de resorción ósea

La Tabla XV muestra los valores (expresados como media±desviación estándar) de los marcadores de resorción ósea (Ca/Cr, Hp/Cr, PYD/Cr, ICTP y CTX/Cr) determinados en un grupo control y en un grupo de pacientes con enfermedad ósea de Paget (EOP). Todos los marcadores estudiados estaban significativamente elevados en el grupo de pacientes con EOP con respecto al grupo control. En condiciones basales, el 100% de los pacientes presentaban niveles de Hp/Cr, PYD/Cr y CTX/Cr por encima del límite superior de normalidad, y el 30% y 80% de ellos presentaban niveles de Ca/Cr e ICTP respectivamente, por encima de dicho límite.

Tabla XV: Marcadores Bioquímicos de Resorción Ósea en pacientes con Enfermedad Ósea de Paget

	C	EOP	Sig. Est.***
Ca/Cr *	0.086±0.052 (0.033-0.2) n=15	0.176±0.086 (0.058-0.3) n=10	p=0.0000
Hp/Cr**	0.026±0.007 (0.014-0.039) n=29	0.159±0.088 (0.057-0.35) n=10	p=0.0000
PYD/Cr (nM/mM)	21.4±7.3 (6.4-37.5) n=46	192±105 (81-446) n=10	p=0.0000
ICTP (µg/L)	3.5±0.9 (1.7-4.8) n=29	11±13.4 (3.8-48.6) n=10	p=0.0042
CTX/Cr (µg/mmol)	140.2±66.7 (34-334) n=43	994±256 (612-1299) n=10	p=0.0000

C: Grupo Control. EOP: Grupo de pacientes con enfermedad ósea de Paget. Ca: Calcio en orina. Cr: Creatinina en orina. PYD: Piridinolinas totales libres en orina. ICTP: Telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en suero. CTX: Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I en orina. Los valores se expresan como media±desviación estándar. El rango de valores se indica entre paréntesis y en cursiva; n=n° de sujetos en los que se ha determinado cada marcador. *ambos en mg/dL. **ambos en mmol/L. ***Significación estadística realizada frente al grupo control (t de Student no emparejada). Se consideraron diferencias significativas si $p \leq 0.05$ (las "p" significativas se representan en negrita).

En la Figura 24 y Tabla XVI se muestra la evolución de los marcadores de resorción ósea estudiados en este grupo de pacientes durante el tratamiento con tiludronato (3 meses).

Todos los marcadores estudiados, a excepción del ICTP, descendieron significativamente con respecto al nivel basal durante los tres meses que duró el tratamiento con tiludronato en los pacientes con EOP: El Ca/Cr descendió un 67.6% (primer mes), 61.25% (segundo mes) y 50% (tercer mes); Hp/Cr: 44.5%, 56.9% y 60.6% respectivamente; PYD/Cr: 34.9%, 45.8% y 47.9% respectivamente y CTX/Cr: 26.6%, 37.16% y 31.9% respectivamente. Con respecto al ICTP, no se detectaron diferencias significativas durante los tres meses que duró el tratamiento.

En las Figuras 25, 26 y 27 se representan los valores individuales de Ca/Cr, Hp/Cr, ICTP, CTX/Cr y PYD/Cr en los pacientes con EOP.

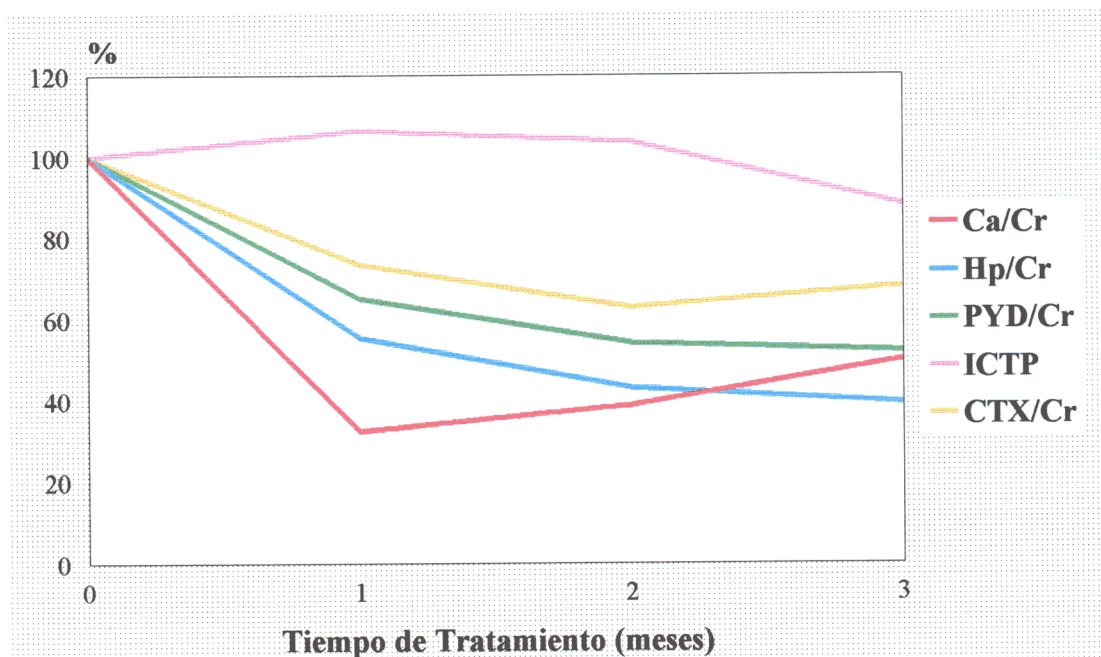


Fig. 24: Evolución en el tiempo de los marcadores bioquímicos de resorción ósea estudiados en pacientes con enfermedad ósea de Paget tratados con tiludronato (400 mg/día) durante tres meses. Ca: Calcio en orina. Cr: Creatinina en orina. Hp: Hidroxiprolina en orina. PYD: Piridinolinas totales libres en orina. ICTP: Telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en suero. CTX: Telopéptido carboxiterminal de la cadena α -1 del colágeno tipo I en orina.

Tabla XVI: Marcadores Bioquímicos de Resorción Ósea en pacientes con Enfermedad Ósea de Paget: niveles basales y tras el tratamiento con tiludronato

	Tiempo de Tratamiento (meses)			
	0	1	2	3
Ca/Cr (mg/dL/mg/dL)	0.176±0.086 (0.058-0.3)	0.057±0.03 (0.022-0.1)	0.0682±0.0415 (0.016-0.134)	0.088±0.057 (0.018-0.178)
		p=0.000⁰	p=0.001⁰ p=0.249 ¹	p=0.001⁰ p=0.108 ²
Hp/Cr (mM/mM)	0.1596±0.0885 (0.057-0.35)	0.0891±0.0600 (0.027-0.201)	0.0687±0.0422 (0.015-0.140)	0.0628±0.0380 (0.02-0.135)
		p=0.001⁰	p=0.001⁰ p=0.033¹	p=0.001⁰ p=0.168 ²
PYD/Cr (nM/mM)	192±105 (81-446)	125±82 (55-341)	104±45 (47-182)	100±71 (42-283)
		p=0.000⁰	p=0.002⁰ p=0.202 ¹	p=0.000⁰ p=0.748 ²
ICTP (µg/L)	10.9±13.4 (3.8-48.6)	11.6±13.6 (3.9-49.3)	11.3±14.5 (4.4-52)	9.6±11.1 (2.7-40.2)
		p=0.380 ⁰	p=0.502 ⁰ p=0.488 ¹	p=0.215 ⁰ p=1.181 ²
CTX/Cr (µg/mmol)	993±256 (612-1299)	729±375 (310-1662)	624±277 (179-1149)	676±411 (148-1265)
		p=0.006⁰	p=0.000⁰ p=0.160 ¹	p=0.006⁰ p=0.648 ²

Las determinaciones se realizaron en un grupo de 10 pacientes. Ca: Calcio en orina. Cr: Creatinina en orina. Hp: Hidroxiprolina en orina. PYD: Piridinolinas totales libres en orina. ICTP: Telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en suero. CTX: Telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I en orina. Los valores se expresan como media±desviación estándar. El rango de valores se indica entre paréntesis y en cursiva. Significación estadística realizada frente al nivel basal⁰, primer¹ y segundo² mes de tratamiento (test de ANOVA para medidas repetidas). Se consideraron diferencias significativas si $p \leq 0.05$ (las "p" significativas se indican en negrita).

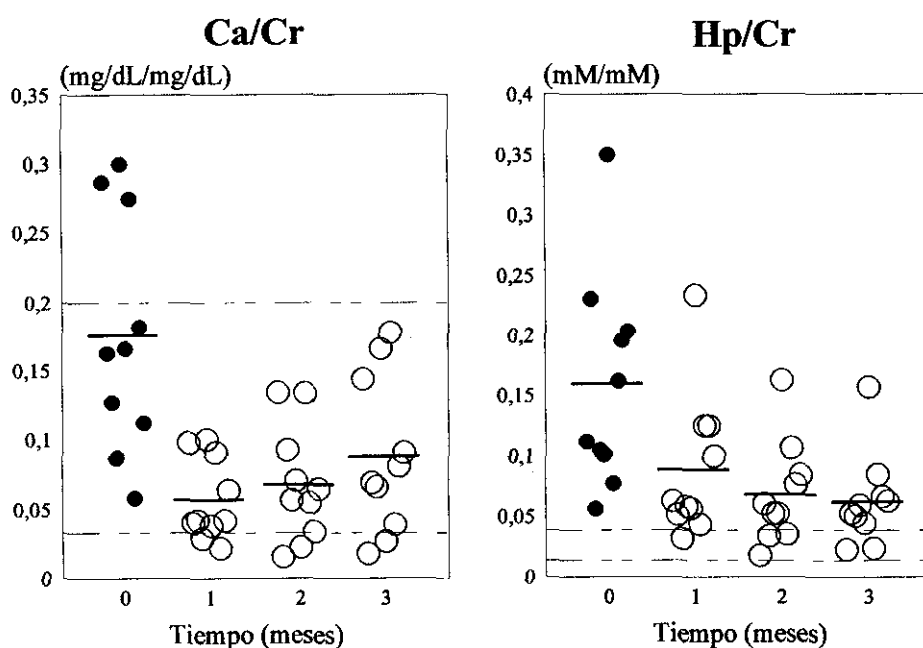


Fig. 25: Niveles individuales de calcio/creatinina (Ca/Cr) y de hidroxiprolina/creatinina (Hp/Cr) en orina de pacientes con enfermedad ósea de Paget, en condiciones basales (●) y durante un periodo de tres meses de tratamiento con tiludronato (○). Las líneas horizontales continuas representan el valor medio de cada grupo. Entre líneas paralelas discontinuas se representa el rango de normalidad (Ca/Cr: 0.033-0.2; Hp/Cr:0.014-0.039).

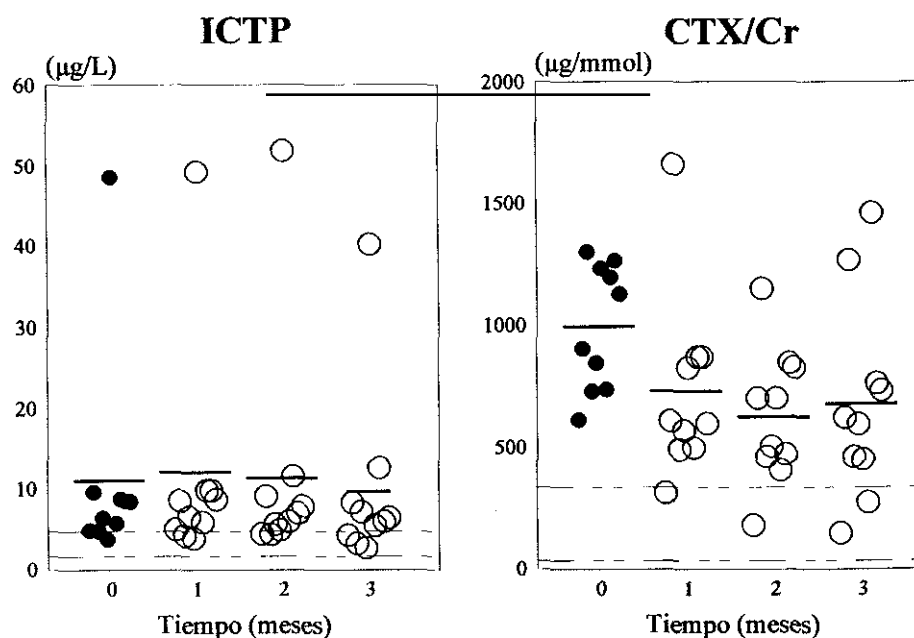


Fig. 26: Niveles individuales de los telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina (ICTP) en suero y del telopéptido carboxiterminal de la cadena al del colágeno tipo I (CTX) en orina de pacientes con enfermedad ósea de Paget, en condiciones basales (●) y durante un periodo de tres meses de tratamiento con tiludronato (○). Las líneas horizontales continuas representan el valor medio de cada grupo. Entre líneas paralelas discontinuas se representa el rango de normalidad (ICTP:1.7-4.8 μg/L; CTX/Cr:34-334 μg/mmol).

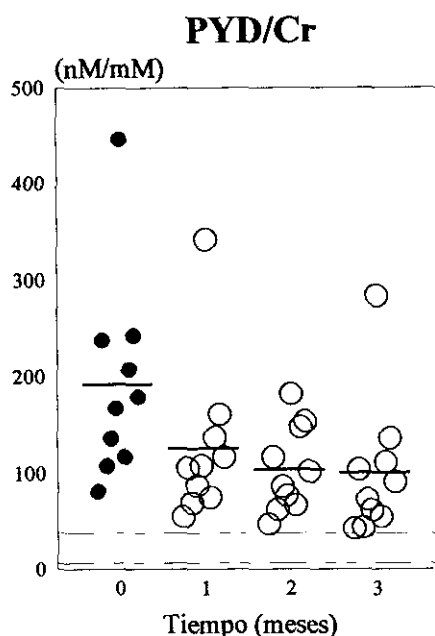


Fig. 27: Niveles individuales de piridinolinas totales libres (PYD) en orina de pacientes con enfermedad ósea de Paget, en condiciones basales (●) y durante un periodo de tres meses de tratamiento con tiludronato (○). Las líneas horizontales continuas representan el valor medio de cada grupo. Entre líneas paralelas discontinuas se representa el rango de normalidad (6.4-37.5 nM/mM).

4.3. Estudio 3: Detección precoz de las metástasis óseas en el carcinoma de próstata

4.3.1. Marcadores bioquímicos de formación ósea

En las Tablas XVII y XVIII y Figuras 28 y 29 se muestran los valores del antígeno sérico prostático (PSA) y de los marcadores bioquímicos de formación ósea (FAt, FAO, BGP, PINP y PICP) (expresados como media±desviación estándar) determinados en el suero de pacientes con hiperplasia benigna de próstata y en pacientes con carcinoma de próstata en los estadios I, II, III y IV.

En las Figuras 30 y 31 se representan los valores individuales de los marcadores estudiados en todos los grupos de pacientes.

Todos los pacientes del grupo HBP+I+II presentaban niveles de los marcadores estudiados dentro del rango de normalidad, con la excepción de tres pacientes que presentaban algún parámetro elevado. Uno, niveles elevados de FAO

(21.4 $\mu\text{g/L}$), otro, niveles elevados de BGP (37.4 ng/mL), y por último, un paciente que presentaba niveles de dos marcadores por encima del límite superior de normalidad (FAt: 146 UI/L , FAO: 30.5 $\mu\text{g/L}$) y que posteriormente se demostró que padecía hepatitis C crónica.

Todos los pacientes del grupo III-a presentaban, al igual que los pacientes del grupo HBP+I+II, valores de los marcadores bioquímicos de formación ósea, FAt, FAO, BGP, PINP y PICP dentro del rango de normalidad, a excepción de un paciente, que tenía niveles elevados de FAO, muy próximos al límite superior de normalidad (20 $\mu\text{g/L}$) y otro paciente con niveles elevados de BGP también muy próximos al límite superior de normalidad (40.1 ng/mL). De todos los marcadores estudiados, solamente la BGP estaba significativamente elevada en el grupo III-a con respecto al grupo HBP+I+II.

Todos los pacientes del grupo III-b (6/6) presentaban niveles elevados de FAO y PINP. La BGP estaba elevada en 2/3 pacientes y sólo un paciente presentaba niveles de FAt y de PICP por encima del límite superior de normalidad. Al igual que en el grupo III-a, los pacientes del grupo III-b presentaban niveles significativamente elevados de BGP con respecto del grupo HBP+I+II. Por otra parte, y al contrario de lo que ocurría en el grupo III-a, los niveles de PINP estaban significativamente elevados en el grupo III-b versus el grupo HBP+I+II.

A diferencia de los demás marcadores de formación estudiados, el PINP fué el único capaz de detectar diferencias significativas entre los grupos III-a y III-b.

Seis pacientes del grupo IV (en nuestro estudio todos con metástasis óseas) presentaban niveles de FAt por encima del límite superior de normalidad (6/10), nueve de FAO (9/10), dos de BGP (2/7), diez de PINP (10/10) y tres de PICP (3/7). Los niveles medios de todos los marcadores estaban significativamente elevados en el grupo IV, versus los grupos HBP+I+II, y/o III-a, y/o III-b.

Con respecto a los niveles de PSA, seis pacientes del grupo HBP+I+II (3 del grupo HBP, 1 del grupo I y 2 del grupo II) mostraban niveles de este marcador por encima del límite superior de normalidad (4 $\mu\text{g/L}$). Todos los pacientes del grupo III-a presentaban valores de PSA por debajo de 4 $\mu\text{g/L}$. En el grupo III-b, dos

pacientes (2/6) mostraban niveles de PSA más altos de 4 µg/L pero más bajos de 100 µg/L, y el resto, 4/6 pacientes presentaban niveles de PSA dentro del rango de normalidad.

Con respecto a los pacientes del grupo IV, 4/10 presentaban niveles de PSA por encima de 100 µg/L, 2/10 entre 4-100 µg/L y, sorprendentemente, 4/10 mostraban valores de PSA por debajo de 4 µg/L.

En orden a calcular los valores de especificidad y sensibilidad de los marcadores estudiados, se consideró que los pacientes de los grupos HBP, I, II y III (III-a+III-b) no presentaban metástasis óseas y que los pacientes del grupo IV sí presentaban metástasis óseas (según diagnóstico realizado por técnicas de imagen).

La sensibilidad y especificidad observada para cada marcador, relacionando las metástasis óseas con valores más altos que el límite superior de normalidad de cada uno de ellos, fueron las siguientes: FAt: 60% (6/10) y 95% (40/42); FAO: 90% (9/10) y 79% (34/43); BGP: 29% (2/7) y 86% (24/28); PINP: 100% (10/10) y 87% (39/45), PICP: 43% (3/7) y 96% (27/28), y PSA (valor más alto de 100 µg/L: 40% (4/10) y 100% (42/42) respectivamente.

Tabla XVII: Niveles de Antígeno Sérico Prostático (PSA) determinado en pacientes con Hiperplasia Benigna de Próstata y en pacientes con Carcinoma de Próstata

	HBP+I+II ⁰	III-a ¹	III-b ²	IV
PSA (µg/L)	6.5±15.46 (0-74.4) n=24	0.34±0.73 (0-2.5) n=12	3±5.2 (0-12.8) n=6	552±941 (0-2770) n=10
* (0-4 µg/L)				p<0.05 ⁰
**p=0.005				p<0.05 ¹ p<0.05 ²

HBP: Pacientes con hiperplasia benigna de próstata. **I, II, III y IV:** Grupos de pacientes con carcinoma de próstata en los estadios I, II, III y IV según la clasificación de la UICC. **III-a:** pacientes con carcinoma de próstata en el estadio III que tienen, en términos generales, niveles normales de FAt, FAO, BGP, PINP y PICP. **III-b:** pacientes con carcinoma de próstata en el estadio III, que tienen, al menos, niveles de dos marcadores de remodelado óseo por encima del límite superior de normalidad. * rango de normalidad. El rango de valores se indica en cursiva y entre paréntesis. n=número de sujetos en los que se ha determinado cada marcador. Estudio comparativo entre grupos realizado mediante ANOVA, nivel de significación **p. Prueba post hoc Student-Newman-Keuls test realizada frente a los grupos HBP+I+II⁰, III-a¹, III-b² respectivamente. Se consideraron diferencias significativas si p≤0.05.

Tabla XVIII: Marcadores Bioquímicos de Formación Ósea determinados en pacientes con Hiperplasia Benigna de Próstata y en pacientes con Carcinoma de Próstata

	HBP+I+II ⁰	III-a ¹	III-b ²	IV
FAt * (40-117 UI/L) **p=0.001	73±26 <i>(40-146)</i> n=24	71.8±15.1 <i>(56-98)</i> n=12	102±21.8 <i>(80-140)</i> n=6	315±287 <i>(66-863)</i> n=10 p<0.05 ⁰ p<0.05 ¹ p<0.05 ²
FAO * (3.4-18.4 µg/L) **p=0.001	11±5.3 <i>(4.5-30.5)</i> n=25	12.88±4.3 <i>(6.9-20)</i> n=12	25±5.6 <i>(19.4-35.5)</i> n=6	84.14±76.7 <i>(10.1-206)</i> n=10 p<0.05 ⁰ p<0.05 ¹ p<0.05 ²
BGP * (6.8-34.3 ng/mL) **p=0.003	16.7±6.25 <i>(8.6-37.4)</i> n=18	26±8.62 <i>(11.5-40.1)</i> n=7 p<0.05 ⁰	36.2±18.4 <i>(15.6-50.8)</i> n=3 p<0.05 ⁰	28.13±12.27 <i>(9.5-42.2)</i> n=7 p<0.05 ⁰
PINP * (20-80 µg/L) **p=0.002	43.3±12.6 <i>(23-75)</i> n=27	57.3±12.8 <i>(42-79)</i> n=12	125.16±38.6 <i>(99-201)</i> n=6 p<0.05 ⁰ p<0.05 ¹	175.4 ± 105 <i>(88-403)</i> n=10 p<0.05 ⁰ p<0.05 ¹ p<0.05 ²
PICP * (95-220 µg/L) **p=0.028	115.12±25.17 <i>(75-174)</i> n=17	135±18.4 <i>(102-161)</i> n=8	216±60.6 <i>(158-279)</i> n=3	364±400 <i>(146-1264)</i> n=7 p<0.05 ⁰ p<0.05 ¹

FAt: Fosfatasa alcalina total en suero. **FAO:** Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina en suero. **BGP:** Osteocalcina en suero. **PINP:** Propéptido aminoterminal del procolágeno I en suero. **PICP:** Propéptido carboxiterminal del procolágeno I en suero. **HBP:** Pacientes con hiperplasia benigna de próstata. **I, II, III y IV:** Grupos de pacientes con carcinoma de próstata en los estadios I, II, III y IV según la clasificación de la UICC. **III-a:** pacientes con carcinoma de próstata en el estadio III que tienen, en términos generales, niveles normales de FAt, FAO, BGP, PINP y PICP. **III-b:** pacientes con carcinoma de próstata que tienen, al menos, niveles de dos marcadores de remodelado óseo por encima del límite superior de normalidad. * rango de normalidad. El rango de valores se indica en cursiva y entre paréntesis. n=número de sujetos en los que se ha determinado cada marcador. Estudio comparativo entre grupos realizado mediante ANOVA, nivel de significación **p. Prueba post hoc Student-Newman-Keuls test realizada frente a los grupos HBP+I+II⁰, III-a¹, III-b² respectivamente. Se consideraron diferencias significativas si p≤0.05.

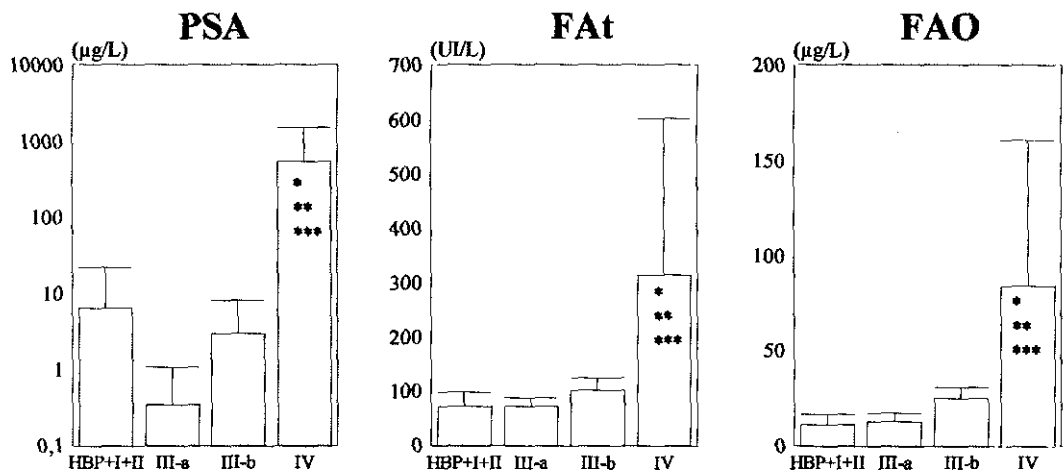


Fig. 28: Representación gráfica de los niveles (media±DS) de antígeno prostático (PSA), fosfatasa alcalina total (FAI) e isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina (FAO) determinados en el suero de pacientes con hiperplasia benigna de próstata (HBP) y en pacientes con carcinoma de próstata en los estadios I, II, III y IV. UI: Unidades internacionales. Significación estadística: $P < 0.05$ realizada frente al grupo HBP+I+II (*), III-a (**), y III-b (***) (ANOVA; prueba post hoc: Student-Newman-Keuls test).

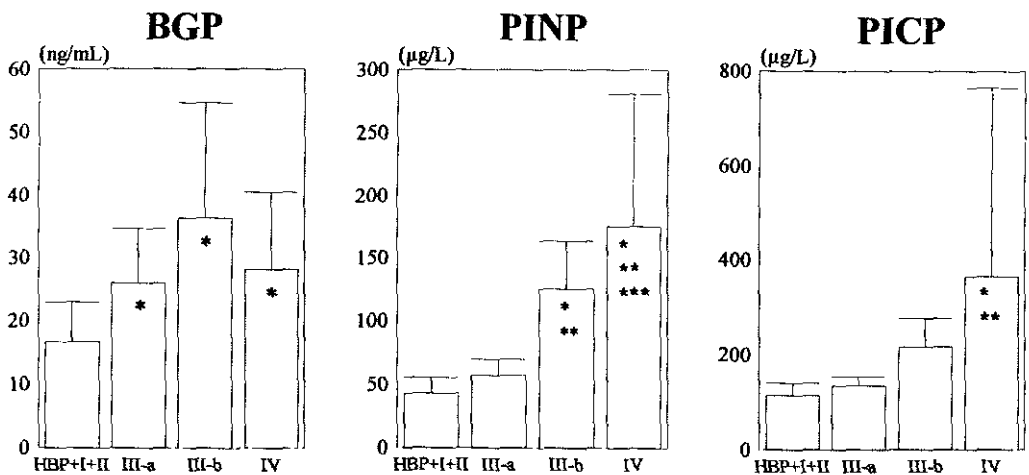


Fig. 29: Representación gráfica de los niveles (media±DS) de la osteocalcina (BGP) y de los péptidos amino y carboxiterminales del procolágeno I (PINP y PICP respectivamente) determinados en el suero de pacientes con hiperplasia benigna de próstata (HBP) y en pacientes con carcinoma de próstata en los estadios I, II, III y IV. Significación estadística: $P < 0.05$ realizada frente al grupo HBP+I+II (*), III-a (**), y III-b (***) (ANOVA; prueba post hoc: Student-Newman-Keuls test).

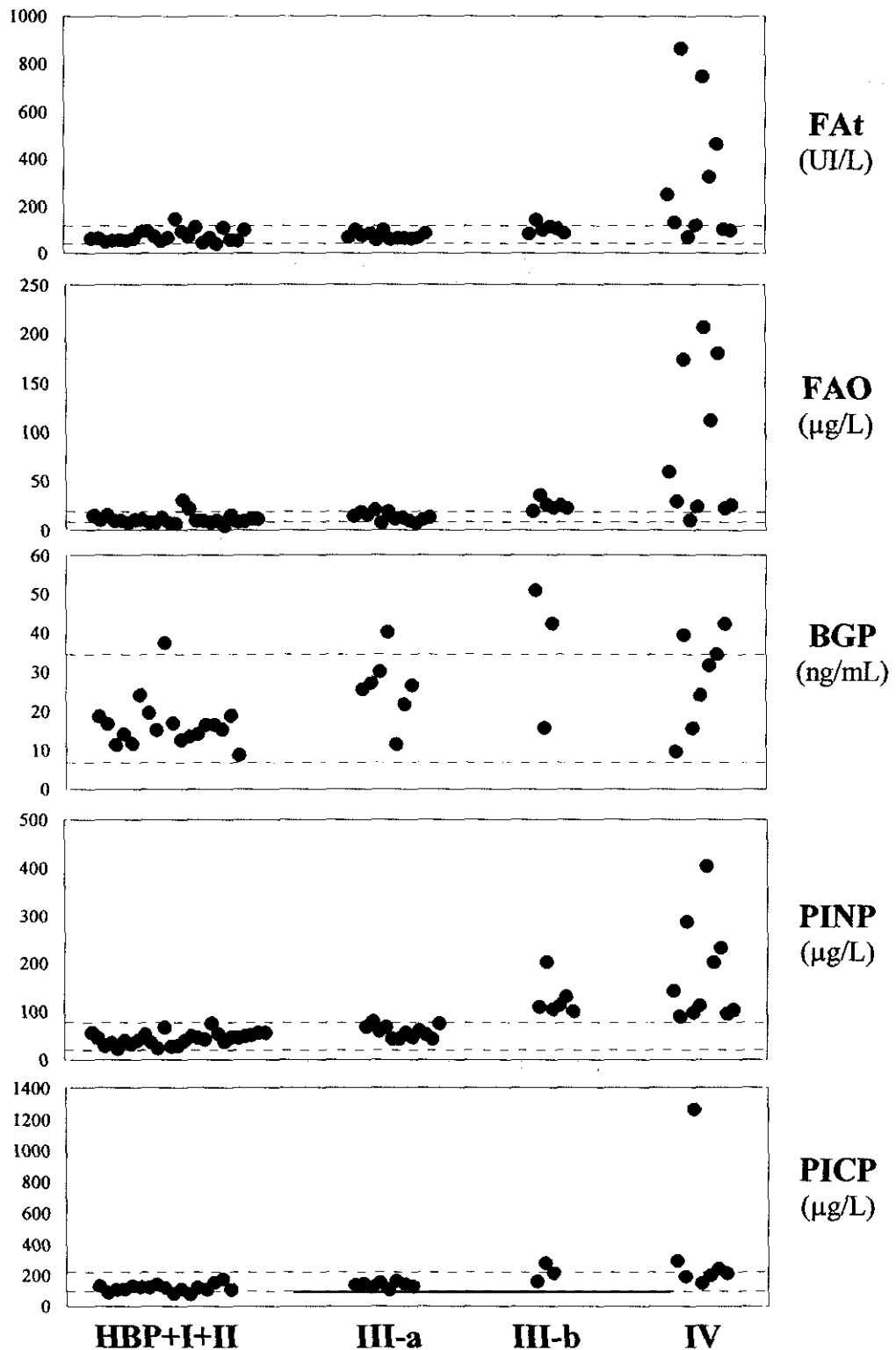


Fig. 30: Niveles individuales de fosfatasa alcalina total (FAt), isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina (FAO), osteocalcina (BGP) y de los propéptidos amino y carboxiterminales del procolágeno I (PINP y PICP respectivamente) determinados en el suero de pacientes con hiperplasia benigna de próstata (HBP) y con carcinoma de próstata en los estadios I, II, III y IV. Entre líneas discontinuas se representa el rango de normalidad (FAt: 40-117 UI/L; FAO: 3.4-18.4 $\mu\text{g/L}$; BGP: 6.8-34.3 ng/mL; PINP: 20-80 $\mu\text{g/L}$; PICP: 95-220 $\mu\text{g/L}$).

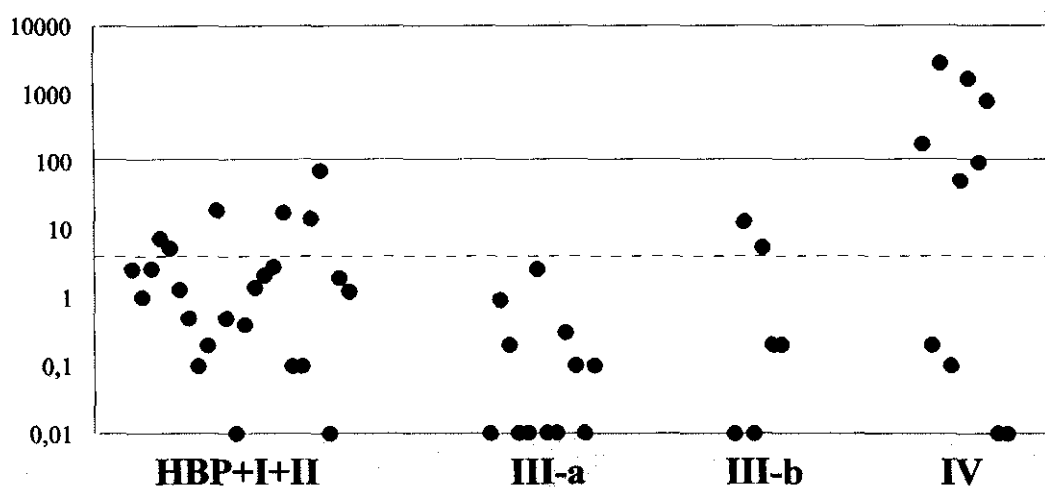


Fig. 31: Niveles individuales de antígeno prostático (PSA) en suero de pacientes con hiperplasia benigna de próstata (HBP) y con carcinoma de próstata en los estadios I, II, III y IV. Por debajo de la línea discontinua se representa el rango de normalidad (PSA: 0-4 µg/L). Por encima de la línea continua se representan los valores de PSA superiores a 100 µg/L. Todos los pacientes se encontraban bajo tratamiento. Los pacientes de los estadios HBP, I y II se trataron con conducta expectante, prostatectomía radical o telecobaltoterapia. Los estadios III y IV se trataron con bloqueo androgénico farmacológico.

5

Discusión

En el presente trabajo hemos estudiado la utilidad clínica de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo en el estudio de la OSP postmenopáusicas, en el seguimiento del tratamiento con tiludronato en pacientes con enfermedad ósea de Paget, y en la detección precoz de las metástasis óseas en el carcinoma de próstata.

Con respecto a la **OSTEOPOROSIS POSTMENOPAÚSICA**, hemos evaluado la utilidad clínica de los marcadores de formación ósea, FAt, FAO, BGP, PINP y PICP en suero; y de los marcadores de resorción ósea, Ca/Cr, Hp/Cr, PYD/Cr, Dpd/Cr, NTx/Cr, y CTX/Cr en orina, e ICTP en suero.

Todos los *marcadores de formación ósea*, a excepción de la FAt ($p=0.1364$) estaban significativamente elevados en el grupo de pacientes con **OSP postmenopáusica** con respecto al grupo control. Las mayores diferencias significativas se observaron con la FAO y el PINP ($p=0.0013$ y $p=0.0000$ respectivamente). Además, los niveles medios de estos marcadores eran los más elevados de todos los estudiados (el PINP aumentaba el 84.4% y la FAO aumentaba el 60%) con respecto al valor medio de una población control.

En nuestro trabajo observamos una mayor sensibilidad de la FAO sobre la determinación de FAt para el estudio de la OSP postmenopáusica, la FAO aumenta un 60% ($p=0.0013$) frente al 18% ($p=0.1364$) de aumento de FAt, observándose también una mayor eficacia diagnóstica (relación sensibilidad/especificidad) de la FAO sobre la FAt (áreas bajo las curvas ROC: 80% FAO frente al 61% de FAt, $p=0.006$). Nuestros resultados coinciden con los de otros autores que observan que la determinación de la FAO mejora mucho la sensibilidad, con respecto a la FAt, en orden de detectar el incremento del remodelado óseo después de la menopausia (182).

El método que hemos utilizado en este estudio para la cuantificación de la FAO es el EIA ALKPHASE-B™ (44). Con objeto de validar este EIA se han realizado estudios de correlación de esta técnica con otras técnicas ya existentes anteriormente como el IRMA TANDEM®-OSTASE™ ó la técnica de precipitación con lectina de germen de trigo, obteniéndose muy buenas correlaciones ($y=1.32x -6.4$, $r=0.99$; e $y=1.41x+4.8$; $r=0.99$

respectivamente) (44). En 1996, nuestro grupo realizó un estudio comparativo entre la determinación de la FAO por EIA ALKPHASE-B™ y por precipitación con lectina de germen de trigo en pacientes con transplante renal, observándose muy buena correlación entre ambas técnicas en estos pacientes ($r=0.92$, $p<0.001$). Además también observamos que los coeficientes de variación intra e interensayo eran más bajos por EIA ALKPHASE-B™ que por precipitación con lectina (183). Según los autores del método (44) los anticuerpos monoclonales de este ensayo presentan una reactividad cruzada de tan sólo el 3-8% con la isoenzima hepática. Sin embargo, en un estudio previo de nuestro grupo (184) observamos que la reactividad cruzada con la isoenzima hepática era del 22.5%.

Con respecto a la utilización de la BGP en el estudio de la OSP postmenopáusica, hay resultados contradictorios. Este marcador bioquímico ha sido ampliamente utilizado en condiciones basales y en el seguimiento de distintos tratamientos (185). Nuestros resultados no muestran una buena sensibilidad en cuanto a su capacidad de diferenciación entre las dos poblaciones de mujeres (controles y con OSP postmenopáusica). Las discrepancias entre nuestros resultados y los de otros autores podrían ser debidas a las diferencias en la especificidad de los anticuerpos anti-osteocalcina utilizados contra los diferentes epítomos de la molécula (71,72) y al hecho de que existen diferentes fragmentos de BGP circulantes en el suero (60). En este estudio (OSP postmenopáusica) hemos utilizado el ELISA NovoCalcin™ (70) que detecta la molécula de BGP intacta. Este ELISA presenta la ventaja, con respecto a otros métodos utilizados anteriormente para la determinación de BGP (IRMAs ó RIAs) de no utilizar isótopos radiactivos, lo que es importante para aquellos laboratorios que no disponen de áreas de trabajo con radiactividad.

Un punto interesante de este trabajo, es la diferencia de comportamiento entre el PINP y el PICP en la OSP postmenopáusica. Nosotros observamos un incremento en los niveles de PINP (molécula intacta) en mujeres con OSP postmenopáusica del 84.4% frente a un incremento del 37.4% de PICP con respecto a una población postmenopáusica control, a pesar de que, teóricamente, ambos propéptidos se liberan en cantidades

proporcionales durante el proceso de síntesis de las moléculas de colágeno (sección 1.4.1.2.2.2.). Estudios previos han mostrado la falta de sensibilidad del PICP para detectar el incremento del remodelado óseo en mujeres con menopausia temprana (186) y con menopausia tardía (159) así como en pacientes con diferentes enfermedades metabólicas óseas (88). Hassager et al. (186) observaron un aumento significativo, aunque marginal (20%), en los niveles de PICP sérico que no se correlacionaba con el coeficiente de pérdida ósea medido por densitometría. También se ha observado que el PICP sérico está correlacionado débilmente con la formación ósea histológica, con valores de r desde 0,36 a 0,50 en pacientes con osteoporosis vertebral (187).

Las diferencias en los porcentajes de aumento de PINP y PICP que nosotros observamos en el presente trabajo en las pacientes con OSP postmenopáusica, pueden estar relacionadas con diferencias en su liberación desde la molécula de procolágeno en los tejidos, diferencias en sus posteriores destinos sistémicos y metabolismo hepático en el organismo (85,86) ó a la posible existencia de distintas variantes bioquímicas de procolágeno tipo I en diferentes condiciones fisiológicas ó patológicas (188) por lo que la molécula circulante de PICP en la OSP puede ser inmunológicamente diferente del antígeno PICP del ensayo. Se sabe que los sistemas de receptores involucrados en el aclaramiento de los propéptidos son distintos (85,86), y ahora se tienen pruebas para pensar que la captación del PICP está sujeta a una regulación hormonal, por ejemplo, las hormonas tiroideas aumentan la tasa de captación de PICP, lo que conduce a concentraciones séricas de propéptido aparentemente demasiado bajas. Hasta la fecha, no hay hallazgos similares en el aclaramiento del PINP.

Como ya comentamos en la introducción, los ensayos de los propéptidos del colágeno tipo I están basados en la detección inmunológica. Con respecto al PICP, los ensayos comunicados en la literatura para su determinación son más comparables entre sí que los ensayos del PINP. La principal diferencia entre las variantes más nuevas (94,189, 190) y el ensayo inicial (191) es la purificación más rigurosa del antígeno PICP antes de la inmunización. Por el contrario, los ensayos comunicados en la literatura para la determinación del PINP no son directamente comparables unos con otros, ya que varían

respecto a su especificidad para reaccionar con una ó con las dos formas séricas del antígeno PINP (molécula intacta ó dominio Col1) (88-93).

En el presente trabajo hemos utilizado el RIA PROCOLLAGEN INTACT PINP [¹²⁵I] (93) que detecta solamente la molécula intacta de PINP, y, según el autor del método, la reactividad cruzada de la molécula intacta con el antígeno más pequeño es tan sólo del 1.2%. El hecho de utilizar un inmunoensayo que detecte solamente la molécula intacta de PINP, consideramos que es una ventaja por varias razones. 1) como ya comentamos en la introducción, el antígeno más pequeño de PINP parece estar más relacionado con la degradación del colágeno PN tipo I (Col1) que con la degradación de la molécula intacta de PINP y estas moléculas de colágeno que han retenido el propéptido aminoterminal parecen estar presentes en los tejidos blandos pero ausentes en el hueso mineralizado; 2) el aclaramiento de circulación de los productos de metabolismo depende de la función renal, regulación que difiere del aclaramiento hepático de la forma intacta; 3) la estandarización y una buena reproducibilidad de la medida sólo puede conseguirse cuando se está midiendo un antígeno homogéneo.

En conclusión, la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina y el propéptido aminoterminal del procolágeno I, son los marcadores de formación ósea que presentan una eficacia superior, sobre los demás marcadores de formación estudiados, fosfatasa alcalina total, osteocalcina y propéptido carboxiterminal del procolágeno I, para el estudio de la osteoporosis postmenopáusica.

Con respecto a los *marcadores de resorción ósea* determinados en la *OSP postmenopáusica*, todos, a excepción del ICTP, estaban significativamente elevados en estas pacientes con respecto al grupo control.

El calcio urinario de una muestra de orina de primera hora de la mañana, corregido por la eliminación de creatinina, ha sido un clásico marcador de resorción ósea pero presenta poca sensibilidad en la OSP (185). En el presente trabajo, la sensibilidad de este marcador tampoco fué buena para el estudio de la osteoporosis postmenopáusica. El área

bajo la curva ROC de este marcador en esta patología fué del 78%, significativamente inferior a la observada con la Dpd/Cr, NTx/Cr y CTX/Cr.

El dato más interesante del presente trabajo, en el estudio de la OSP postmenopáusicas, es el diferente comportamiento de los marcadores derivados de la degradación del colágeno óseo. Como podemos deducir de la introducción de este trabajo, de todos los marcadores de resorción ósea derivados de la degradación del colágeno tipo I (Hp/Cr, PYD/Cr, Dpd/Cr, ICTP, NTx/Cr, CTX/Cr) la Hp/Cr es el menos específico para el estudio de la resorción ósea. Está localizada en diferentes tejidos, además de en el tejido óseo, sufre metabolismo hepático, es absorbida por el intestino, etc. y además, el método de cuantificación de Hp es largo y tedioso, que requiere una hidrólisis previa de la muestra de orina para liberar la hidroxiprolina unida a péptidos. Sin embargo, a pesar de los inconvenientes de su determinación, este aminoácido ha sido utilizado durante muchos años como marcador de resorción del hueso (192).

Por otra parte, a pesar de que la Hp/Cr es, teóricamente, el marcador menos específico (de todos los derivados de la degradación del colágeno óseo) para el estudio de la resorción ósea, nosotros observamos un incremento significativo en los niveles de Hp en pacientes con OSP postmenopáusicas del 30% ($p=0.0049$) versus mujeres postmenopáusicas controles, y el único marcador con el que no observamos diferencias significativas en pacientes con OSP postmenopáusicas, versus mujeres postmenopáusicas controles, es con el ICTP (teóricamente más específico de resorción ósea que la Hp).

En el presente trabajo, observamos un incremento significativo ($p=0.0000$) en los niveles de PYD/Cr y de Dpd/Cr en pacientes con OSP postmenopáusicas, del 47.2% y 133.8% respectivamente, versus mujeres postmenopáusicas sanas (PYD/Cr: 31.5 ± 11.8 nM/mM versus 21.4 ± 7.3 nM/mM, Dpd/Cr: 15.2 ± 6.6 nM/mM versus 6.5 ± 2.2 nM/mM). Sin embargo, el análisis que hemos realizado sobre la utilidad diagnóstica (relación sensibilidad/especificidad) de estos marcadores en esta patología, ha mostrado que el marcador Dpd/Cr es más sensible y específico (área bajo la curva ROC: 97%) para el estudio de la OSP postmenopáusicas que la PYD/Cr cuyo área bajo la curva ROC es del 77%. Para una especificidad del 100%, la sensibilidad de la Dpd/Cr fué del 80%, frente

al 28% de sensibilidad para la PYD/Cr. Este hecho confirma la mayor especificidad teórica de la Dpd sobre la determinación de la PYD, para el estudio de la resorción ósea.

Nuestros valores de normalidad, en una población postmenopáusica control fueron: 21.4 ± 7.3 nM/mM para la PYD/Cr (ELISA PYRILINKS[®]) y 6.5 ± 2.2 nM/mM para la Dpd/Cr (ELISA PYRILINKS[™]-D), semejante a los observados por Ebeling et al. (193) y por los autores del método (130).

El autor del método ELISA PYRILINKS[®] (que mide piridinolinas totales libres: PYD=Pyr+Dpd) observa muy buena correlación entre los niveles de PYD libres, mediante este ELISA, con los de piridinolinas totales por HPLC ($r=0.97$, $p<0.001$) y con los de Hp ($r=0.90$, $p<0.001$) (129).

El ELISA PYRILINKS[™]-D (130), que mide desoxipiridinolinas libres (Dpd), utiliza un anticuerpo que tiene una reactividad cruzada con la Pyr libre menor del 1% y prácticamente nula con las formas unidas a péptidos. Según el autor del método, el cociente Dpd/Cr por este ELISA es aproximadamente un 15% mayor en mujeres que en los hombres. Diferencias similares a estas observaron Seibel et al. (194) utilizando un inmunoensayo que reconoce ambos anillos, Pyr y Dpd. El autor del método también observa muy buena correlación entre los niveles de Dpd libres determinados por este ELISA con los niveles de Dpd totales por HPLC en un amplio rango de grupos con diferentes alteraciones del metabolismo mineral, como la OSP, la EOP, el hiperparatiroidismo primario, ó en las metástasis óseas derivadas del cáncer de mama (130).

Nuestro trabajo coincide con el de otros autores, que observan que las piridinolinas discriminan mejor entre mujeres sanas y pacientes con OSP que la Hp (198,199). En un trabajo previo de nuestro grupo, las piridinolinas también fueron más sensibles que la Hp para monitorizar la terapia con bifosfonatos en estas pacientes (199).

La aparición en los años 80 de las piridinolinas y desoxipiridinolinas, supuso un avance importante en el estudio de la resorción ósea respecto a la determinación de Hp. La determinación de piridinolinas en orina tiene muchas ventajas con respecto a la determinación de Hp urinaria: 1) sus niveles no se ven influenciados por la dieta porque

no son absorbidas en el intestino (200); 2) los anillos de piridinolina sólo pueden derivarse de las fibras de colágeno mientras que la Hp puede proceder del colágeno y de otras fuentes diferentes a éste; 3) los anillos de piridinolina son más específicos del colágeno óseo que la hidroxiprolina porque las piridinolinas sólo se forman cuando las moléculas de colágeno han sido liberadas al medio extracelular, y no en el interior de las células, por lo que representan productos de degradación del colágeno maduro y nunca del “pool” de nuevas moléculas de colágeno, que por diversas razones no van a llegar a formar fibras de matriz extracelular. La Hp, sin embargo, puede proceder de moléculas de colágeno neoformado; 4) las piridinolinas, debido a su estructura química, no son catabolizadas en el organismo, sino que son excretadas totalmente en orina, por lo que proporcionan una medida directa de la cantidad de colágeno resorbido (110,113,127); 5) si bien la determinación de piridinolinas comenzó realizándose por cromatografía líquida de alta resolución (método bastante tedioso y no disponible en todos los laboratorios) hoy en día se dispone ya de técnicas bastante sensibles y específicas, basadas en la utilización de anticuerpos monoclonales. Son técnicas de inmunoensayo, que permiten la cuantificación en orina de Pyr y Dpd de un modo rápido y sencillo (129,130).

A pesar de las ventajas que presenta la determinación de piridinolinas frente a la determinación de hidroxiprolina, hemos de tener en cuenta que las piridinolinas pueden formarse como modificaciones post-traduccionales de cualquier tipo de colágeno fibrilar, incluyendo los colágenos tipos I y III de los tejidos blandos. De hecho, el tejido de granulación es particularmente rico en piridinolinas, como también lo es el tejido fibroso del hígado. Estos hallazgos no indican que las piridinolinas no puedan utilizarse como marcadores de la degradación del hueso, sin embargo, enfatizan la necesidad de utilizar el término “específico de hueso” con mucha precaución.

Se ha observado que la concentración de piridinolinas aumenta durante el periodo perimenopáusico y se mantiene elevada, al menos, durante los primeros años después de la menopausia (193,197,201), habiéndose observado incluso, niveles significativamente elevados en mujeres con menopausia temprana, con respecto a aquellas con menopausia normal (202). A este respecto, tenemos que decir que, existen trabajos realizados con piridinolinas en los que se han intentado comparar mujeres premenopáusicas con

postmenopáusicas no emparejadas en edad, incrementándose así el aparente efecto de la menopausia sobre la eliminación de piridinolinas (116,142,193,203). En nuestro estudio ambos grupos, mujeres controles y pacientes con OSP postmenopáusica, estaban emparejados en edad.

Queremos destacar aquí, el hecho de que tanto la PYD como la Dpd que hemos determinado han sido en forma libre, al hacer la determinación por enzimoimmunoensayo. En este punto, sería interesante destacar un trabajo realizado por Garnero et al. (142) en el que se demuestra que los bifosfonatos y los estrógenos pueden afectar de diferente forma a la rotura del colágeno mediada por los osteoclastos. Los autores observaron una disminución significativa ($p < 0.001$) de los niveles de piridinolinas totales y de las unidas a péptidos, pero no de las piridinolinas libres, en pacientes con OSP y EOP después del tratamiento durante corto periodo de tiempo con pamidronato. Los mismos resultados observaron Kamel et al. (204) en un grupo de mujeres de edad avanzada tras la suplementación con vit. D y calcio. Por otra parte, Garnero et al. (142) sí observan una disminución de las piridinolinas libres (además de las totales y de las ligadas a péptidos) en mujeres postmenopáusicas después de 6 meses de tratamiento con estrógenos. Debido a que las piridinolinas libres no varían después del tratamiento con pamidronato en pacientes con OSP y EOP, y sí varían después del tratamiento con estrógenos, estos autores plantean la hipótesis de que los bifosfonatos al entrar en contacto con las fibras de colágeno óseo mineralizadas, interfieren en el proceso de degradación del mismo, impidiendo la liberación de piridinolinas libres, mientras que los estrógenos intervienen en el proceso de resorción vía indirecta, uniéndose a receptores nucleares del osteoblasto (205,206) no modificando el proceso de degradación del colágeno óseo, y permitiendo así la liberación de ambas formas (libres y unidas a péptidos). Por otra parte, se ha de tener en cuenta, que dado que el metabolismo renal de las piridinolinas es aún desconocido, no se puede descartar que parte de las piridinolinas libres puedan ser generadas a partir de las unidas a péptidos en el riñón y que el tratamiento con estrógenos ó bifosfonatos pueda afectar al metabolismo de las mismas.

Ebeling et al. (193) observaron un descenso significativo en los niveles de Pyr y Dpd totales por HPLC en mujeres postmenopáusicas tratadas con estrógenos-

progestágenos, pero no observaron diferencias significativas en los niveles de Dpd libres en este mismo grupo.

Hassager et al. (207) en un estudio realizado en 1994, observaron que los niveles de Pyr y Dpd totales determinados por HPLC, estaban mucho más elevados en mujeres postmenopáusicas que los demás marcadores de resorción ósea estudiados (ICTP, Ca/Cr, Hp/Cr) y que ambas piridinolinas descendían considerablemente después de un año de tratamiento con terapia hormonal sustitutiva.

Es posible, por tanto, que las diferencias observadas en nuestro trabajo, entre pacientes con OSP y controles, fueran aún más marcadas si se hubiera realizado la determinación de Pyr y Dpd totales por HPLC (libres+ligadas a péptidos) en lugar de por inmunoensayo (sólo las formas libres).

Entre las piridinolinas unidas a péptidos que hemos estudiado en esta patología destacan el ICTP y el NTx. Ambos son telopéptidos unidos por puentes de piridinolina. Hay resultados preliminares que indican que las piridinolinas unidas a péptidos, representan una mejora importante en el estudio del remodelado óseo, sobre la determinación de piridinolinas y desoxipiridinolinas por HPLC (132).

Con respecto al ICTP, nuestro valor de normalidad, para una población de mujeres postmenopáusicas sanas, es de 3.5 ± 0.9 $\mu\text{g/L}$ (media \pm DS) (rango 1.7-4.8 $\mu\text{g/L}$), niveles semejantes a los observados por otros autores (3.1 ± 2 $\mu\text{g/L}$) (203) y a los observados por los autores del método (3.46 ± 1.11 $\mu\text{g/L}$, rango: 1.8-5.4 $\mu\text{g/L}$) (131) en un grupo de mujeres sanas de la misma edad. Nosotros no hemos observado diferencias significativas entre los niveles de ICTP de las pacientes con OSP postmenopáusica versus el grupo control (3.5 ± 0.5 $\mu\text{g/L}$ versus 3.5 ± 0.9 $\mu\text{g/L}$).

Nuestros resultados no están de acuerdo con los obtenidos por Kushida et al. en un trabajo publicado en 1995 (203). Estos autores sí observaron niveles de ICTP significativamente elevados ($p < 0.001$) en pacientes con OSP postmenopáusica (versus mujeres postmenopáusicas sanas). Los niveles de ICTP que estos autores observan en mujeres con OSP postmenopáusica son mucho mayores a los nuestros (9.4 ± 1.8 $\mu\text{g/L}$ versus 3.5 ± 0.5 $\mu\text{g/L}$) y a los de otros autores (159). Este hecho puede ser debido a las características del grupo. Nosotros estudiamos mujeres con una edad máxima de 70 años

para evitar la inclusión en el estudio de mujeres con OSP senil, y Kushida et al. estudian mujeres de hasta 91 años de edad (203). Es probable que estos autores estén incluyendo en el estudio mujeres con OSP senil y que la patofisiología del hueso en este tipo de OSP sea diferente a la de la OSP postmenopáusicas.

A pesar de la mayor especificidad teórica del ICTP sobre la Hp/Cr ó las piridinolinas, como marcador de resorción ósea, nosotros en nuestro trabajo, no observamos incremento significativo de los niveles de ICTP en pacientes con OSP postmenopáusicas ($3.5 \pm 0.5 \mu\text{g/L}$) versus mujeres postmenopáusicas sanas ($3.5 \pm 0.9 \mu\text{g/L}$), y sí observamos incremento significativo en los niveles de Hp/Cr y de piridinolinas en estas pacientes. Además observamos que, para una especificidad del 100 %, la sensibilidad del ICTP para el estudio de la OSP postmenopáusicas, fué nula (0 %) y la sensibilidad de las PYD y Dpd fueron del 28% y 80% respectivamente. Estos resultados no dejan de ser sorprendentes si tenemos en cuenta que el ICTP sérico es específico del colágeno tipo I (colágeno del hueso) y que la Hp y piridinolinas en orina pueden proceder también de otros tipos de colágeno (no óseo).

En concordancia con nuestros resultados, encontramos un trabajo de Pedrazzoni et al. (208) realizado en 1995 en pacientes con OSP y EOP, en el que observaron que los marcadores bioquímicos de resorción ósea determinados en orina (Hp, PYR y NTx) descendían en mayor grado que los marcadores determinados en suero (ICTP) después del tratamiento con bifosfonatos.

Hemos observado también resultados contradictorios en la bibliografía con respecto a la utilización del ICTP para monitorizar pacientes tratados con terapia hormonal sustitutiva. Hassager et al. (207) encontraron que la medida de los niveles de ICTP sérico puede servir para detectar cambios en el proceso de resorción ósea causados por la menopausia y por el tratamiento con THS, pero que este marcador era menos sensible que los marcadores bioquímicos de resorción ósea determinados en orina. Brixen et al. (209) observaron que los niveles de ICTP aumentaban a medida que se aumentaba la dosis de hormona de crecimiento en mujeres postmenopáusicas con osteopenia. Por otra parte, en un estudio realizado en 1996 por nuestro grupo de trabajo (199) sobre la utilidad clínica de los nuevos marcadores derivados de la degradación del colágeno para

el estudio de la OSP postmenopáusicas, el ICTP no fué sensible para monitorizar la terapia con etidronato sódico+vit. D+Ca en estas mujeres.

Con respecto al NTx, los resultados del presente estudio muestran que los niveles de este marcador en la OSP postmenopáusicas aumentan el 149% con respecto a un grupo control de su misma edad, frente a un aumento del 30% de la Hp/Cr, del 47.2% de las PYD/Cr libres y un aumento cero de los niveles de ICTP. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Rosen et al. (210) en un trabajo previo publicado en 1994. En este trabajo los autores evalúan la especificidad urinaria del NTx como marcador bioquímico de resorción ósea. Los autores observaron que después del tratamiento con bifosfonatos los niveles de NTx disminuyeron en un 85% frente al 20% y 25% de inhibición de la Hp y de la PYD respectivamente. Este hecho sugiere que cuando es inhibida la resorción ósea muy poco NTx procede de fuentes extraóseas mientras que la Hp y la PYD también proceden en gran cantidad de otras fuentes diferentes del hueso. De hecho, existen trabajos recientes en los que se observa que el nuevo marcador de resorción NTx es mucho más específico del proceso de resorción ósea que la Hp, Pyr, Dpd e ICTP; y que sus niveles en orina proporcionan una medida directa del proceso de resorción del hueso (142,193,204,208,211-213).

Si comparamos los resultados que hemos obtenido en el presente estudio entre los dos telopeptidos NTx e ICTP, observamos que la determinación de los niveles de NTx en orina, representa una medida mucho más específica del proceso de resorción ósea que la del ICTP sérico (132) para el estudio de la OSP postmenopáusicas. Este hecho está en concordancia con descubrimientos previos, en los que se observa, que de todos los péptidos recogidos en orina que contienen anillos de hidroxilisilpiridinolina (Pyr) y lisilpiridinolina (Dpd), los NTx son los más abundantes y que el extremo N-terminal de la molécula de colágeno es la fuente del 60% de lisilpiridinolina (Dpd) (139). Por otra parte, también se ha visto que en la formación del anillo de piridinolina del NTx sólo se da la interacción $\alpha_1(I)-\alpha_2(I)$ entre las regiones telopeptídicas aminoterminales, uniones que distinguen al colágeno tipo I del hueso del colágeno tipo I de otros tejidos. La unión $\alpha_1(I)-\alpha_1(I)$ en el NTx es la menos abundante, mientras que en el ICTP sólo se da la

interacción $\alpha_1(I)$ - $\alpha_1(I)$ entre las regiones telopeptídicas carboxiterminales. Esto es debido a que la región telopeptídica α_2 en el ICTP carece de residuo de lisina (214).

El NTx, también ha mostrado ser más sensible que las piridinolinas libres y totales, para detectar el incremento de resorción ósea que comienza a producirse durante el periodo perimenopaúsico (193) y para predecir la aparición de metástasis óseas en pacientes con cáncer (215).

En un interesante estudio realizado por Sone et al. (216) se evalúan los factores que afectan a las variaciones biológicas del NTx y se definen los límites de referencia de este nuevo marcador. Nuestro valor de normalidad para una población postmenopaúsica sana (rango de edad: 41-70 años) es de 45.4 ± 23.9 nM ECO/mM Cr, semejante a los obtenidos por otros autores en una población de iguales características (216,217). En pacientes con OSP postmenopaúsica, observamos un aumento significativo ($p=0.0000$) en los niveles de NTx con respecto al grupo control de su misma edad (aumento del 149%).

En un trabajo realizado por Garnero et al. (159) en el que se evalúa la utilidad clínica del NTx para el estudio de la OSP postmenopaúsica, este autor observa un incremento en los niveles de NTx del 271% en las pacientes, niveles que casi duplican el incremento que nosotros observamos (149%). Estos autores están comparando dos grupos de mujeres no emparejadas en edad (pacientes con OSP postmenopaúsica versus mujeres premenopáusicas sanas) incrementándose así el efecto de la OSP con el de la menopausia; y en nuestro trabajo comparamos mujeres emparejadas en edad (postmenopáusicas con OSP versus postmenopáusicas sanas). A ello puede deberse que el incremento que nosotros observamos sea menor.

A la vista de nuestros resultados, el NTx demostró ser un buen marcador, con una buena relación sensibilidad/especificidad (área bajo la curva ROC del 93%), para el estudio de la osteoporosis postmenopaúsica.

Con respecto al CTX nuestros resultados también confirman la gran especificidad teórica de este marcador. En pacientes con OSP postmenopaúsica no observamos incremento significativo en los niveles de ICTP con respecto al grupo control ($p=0.7955$), mientras que sí se observa con el CTX ($p=0.0000$). La secuencia peptídica de 8

aminoácidos correspondiente al CTX, es mucho más específica del colágeno óseo que el ICTP (211). El ICTP está formado por tres fragmentos peptídicos, correspondientes a moléculas de colágeno diferentes, unidos por un puente de piridinolina. Dos de estos péptidos proceden de la región telopeptídica $\alpha_1(I)$ y el tercero procede de la región helicoidal de una cadena $\alpha_1(I)$ ó $\alpha_2(I)$. Como la región helicoidal de las cadenas α de la molécula de colágeno, al contrario que la región telopeptídica, está fuertemente conservada genéticamente en todos los tipos de colágeno, es posible que en el ICTP se dé reactividad cruzada con la región helicoidal de moléculas de colágeno tipo II ó de colágeno tipo III. A este respecto tenemos que comentar que Kjeldsen et al (218) observaron niveles significativamente elevados de ICTP ($6.2\mu\text{g/L}$ versus $2.6\mu\text{g/L}$, $p < 0.0001$) en pacientes con enfermedad de Crohn's, patología caracterizada por un deterioro gradual de las fibras intestinales formadas por gran cantidad de colágeno tipos I, III y V. El CTX al ser una cadena peptídica específica de la región telopeptídica carboxiterminal de una cadena $\alpha_1(I)$ de la molécula de colágeno tipo I, no presenta problema de reactividad cruzada con otras moléculas de colágeno distintas del colágeno tipo I, por lo que este marcador es más específico del proceso de resorción ósea que el ICTP.

Por otra parte, comparando el CTX con las piridinolinas, observamos que en estas pacientes los niveles de CTX aumentan un 135,5% frente a un aumento del 47,2% de las PYD libres y un aumento del 133,8% de las Dpd libres (recordemos que el NTx aumentaba el 149%). Los niveles de CTX determinados por el ELISA CrossLapsEIA (141) correlacionan bien con los de piridinolinas por HPLC y con los de Hp (219,220). También se ha observado una correlación lineal negativa entre los niveles de CTX en orina y el porcentaje de masa ósea en mujeres postmenopáusicas, por lo que la determinación de CTX puede ser, también, un parámetro útil para predecir el riesgo de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas (220), así como para predecir el riesgo de fracturas en mujeres de edad avanzada (158).

Recientemente se ha llevado a cabo un interesante y amplio estudio prospectivo sobre la predicción de fracturas utilizando marcadores de resorción ósea. El estudio

EPIDOS (158) encontró que el NTx/Cr, CTX/Cr y Dpd/Cr, determinados utilizando los mismos ensayos que nosotros hemos utilizado para el estudio de la OSP postmenopáusicas (130,132,141) eran significativamente más altos en mujeres controles postmenopáusicas que en mujeres premenopáusicas controles, pero solamente los niveles de CTX/Cr y Dpd/Cr eran más altos en pacientes con fractura de cadera que en los sujetos controles de la misma edad que no se habían fracturado. Los autores concluyen que los valores de CTX/Cr y de Dpd/Cr más altos que el límite superior de normalidad ($\text{media} \pm 2\text{DS}$) de las mujeres premenopáusicas están asociados con un incremento del riesgo de fractura de cadera en mujeres de edad avanzada. Nuestros resultados sobre la eficacia diagnóstica de los marcadores CTX/Cr y Dpd/Cr están de acuerdo con los resultados de Garnero et al. (158).

En otro trabajo publicado paralelamente por los mismos autores del estudio EPIDOS (157) se evalúa la utilidad del NTx/Cr y del CTX/Cr junto con otros marcadores de formación ósea, para predecir el riesgo que tienen las mujeres de padecer osteoporosis en la etapa postmenopáusicas. Los autores hacen un seguimiento de estos marcadores en mujeres premenopáusicas, perimenopáusicas (alteración del ciclo menstrual y niveles de hormona folículo estimulante elevados) y mujeres postmenopáusicas (con más de un año de menopausia). Es sorprendente observar cómo los niveles de CTX/Cr y de NTx/Cr ya están significativamente elevados en la perimenopausia con respecto a la premenopausia en estas mujeres. Estos resultados también coinciden con la mayor sensibilidad que nosotros observamos, en el presente trabajo, con estos marcadores para el estudio de la OSP postmenopáusicas.

A la vista de nuestros resultados en el estudio de la OSP postmenopáusicas, podemos concluir que los marcadores de resorción ósea con mayor eficacia diagnóstica para el estudio de esta patología fueron la Dpd/Cr, el NTx/Cr y el CTX/Cr (áreas bajo las curvas ROC: 97%, 93% y 91% respectivamente).

La segunda patología objeto de estudio en el presente trabajo ha sido la **ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET**.

La fosfatasa alcalina total en suero (FAt) y el cociente hidroxiprolina/creatinina (Hp/Cr) en orina se han utilizado a lo largo del tiempo para evaluar los efectos del tratamiento con calcitonina (221) ó bifosfonatos (222-224) sobre el remodelado óseo en la EOP.

En el presente trabajo hemos evaluado la utilidad clínica de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo (formación: FAt, FAO, BGP y PÍCP séricos; resorción: Ca/Cr, Hp/Cr, PYD/Cr, y CTX/Cr en orina e ICTP sérico) para el seguimiento del tratamiento con tiludronato, en dosis de 400 mg/día durante 3 meses, en pacientes con EOP.

Todos los *marcadores de formación ósea*, estaban significativamente elevados en el grupo de pacientes con EOP (en condiciones basales) con respecto a un grupo control emparejado en edad y sexo con el de los pacientes.

Los marcadores más sensibles para monitorizar la capacidad de respuesta del tiludronato en esta patología fueron la FAt y la FAO. Si bien la FAt disminuye en mayor proporción que la FAO durante los dos primeros meses de tratamiento, la inhibición de ambas fué del mismo orden de magnitud después de los tres meses (FAt: 55.9%, FAO: 57.8%; $p=0.000$ versus los niveles basales en ambos casos). Nuestros resultados coinciden con los de otros autores (169,171). Roux et al. (169) observaron una inhibición de los niveles séricos de FAt del 57.4% después de 3 meses de tratamiento con tiludronato en pacientes con EOP. Reginster et al. (171) observaron una inhibición en los niveles séricos de FAt del 47.2%, en pacientes con EOP que tenían una actividad FAt menor de dos veces el límite superior de normalidad, y del 49.3% en pacientes con EOP cuya actividad FAt era mayor de dos veces el límite superior de normalidad. Los pacientes de nuestro grupo tenían un nivel basal medio de FAt de 5.5 veces el límite superior de normalidad (620 UI/L versus 95 UI/L). Por otra parte, el nivel basal medio de FAO en los pacientes de nuestro grupo era de 14.2 veces el límite superior de normalidad (261 $\mu\text{g/L}$ versus 18.4 $\mu\text{g/L}$).

Nosotros no hemos encontrado en la literatura ningún trabajo en el que se evalúe la utilidad clínica de la FAO para el seguimiento del tratamiento de la EOP con tiludronato. Sin embargo, en un trabajo previo realizado por Garnero et Delmas (182) los autores observan una mayor inhibición de la FAO (58%) que de FAt (43%) en pacientes con EOP después de seis meses de tratamiento con pamidronato, un bifosfonato de segunda generación.

Con respecto a la BGP sólo se observa inhibición significativa después del primer mes de tratamiento (11.9%). Nuestros resultados están de acuerdo con los observados por otros autores que confirman que la BGP no es un marcador útil para el estudio de la EOP (225-227). A este respecto hemos de comentar que, dado que el remodelado óseo en esta patología está muy incrementado, es posible que se generen fragmentos de BGP que no sean detectados por el ensayo. Nuestros resultados también coinciden con los de Ryan et al (228) que observaron que después de seis semanas de tratamiento con pamidronato los niveles séricos de BGP no mostraban cambios significativos.

El método que nosotros hemos utilizado para la determinación de BGP en estos pacientes es el IRMA ELSA-OST-NAT, que solamente detecta la BGP intacta. La estabilidad de los valores de osteocalcina medida con este IRMA, bajo diferentes condiciones de mantenimiento de la muestra, no es muy buena debido a la degradación que sufre en suero la molécula intacta de osteocalcina, tanto a temperatura ambiente como a 4°C (71). Por lo tanto, cuando se trabaja con el IRMA ELSA-OST-NAT, el suero ha de ser congelado, en caso de no ser procesado, dentro de la hora siguiente al momento de la extracción. Este hecho ha sido tenido en cuenta a la hora de realizar el presente trabajo en las condiciones de obtención de las muestras.

Con respecto al PICP, observamos una inhibición del 44.8% al primer mes de tratamiento con tiludronato en estos pacientes. Por el contrario, no observamos nuevos cambios al aumentar el tiempo de tratamiento durante los dos meses posteriores.

En conclusión, en el presente trabajo, se observa que, de todos los marcadores de formación ósea estudiados, los niveles séricos de FAt y de FAO son los marcadores más sensibles para el seguimiento del tratamiento con tiludronato en pacientes con EOP. Sin embargo, debido a la diferencia de precio entre los dos marcadores, la FAO sérica

debería ser elegida únicamente cuando se dé coexistencia de patología hepática. El PÍCP sérico muestra menos sensibilidad que la FAt sérica, y la BGP sérica no es indicada como marcador de remodelado óseo para el estudio de la EOP.

Los **marcadores de resorción** que hemos evaluado para el seguimiento del tratamiento con tiludronato en la EOP han sido el Ca/Cr, Hp/Cr, PYD/Cr, y CTX/Cr en orina, y el ICTP en suero. Todos ellos estaban significativamente elevados en los pacientes con EOP (en condiciones basales) con respecto al grupo control.

Los niveles de Ca/Cr, descienden un 67% después del primer mes de tratamiento, observándose un ligero incremento en los dos meses posteriores.

El clásico marcador de resorción ósea Hp/Cr, ha sido ampliamente utilizado en el seguimiento de diferentes tratamientos en la EOP, obteniéndose muy buenos resultados (171,223,224) a pesar de su falta de especificidad ósea. Nosotros observamos una inhibición en orden creciente en los niveles de este marcador, desde el primer mes de tratamiento hasta el tercero (44.5%, 56.9% y 60.6% respectivamente).

En el presente trabajo observamos, en pacientes con EOP, un aumento en los niveles urinarios de PYD libres del 800% versus un grupo control ($p=0.0000$); niveles que descienden hasta en un 47.9% al tercer mes de tratamiento con tiludronato ($p=0.000$) (229). Nuestros resultados coinciden con los de Pedrazzoni et al. (208) que utilizando el mismo ensayo que nosotros, observan una inhibición en los niveles de PYD del 42% en pacientes con EOP después de 7 días de tratamiento con otros bifosfonatos (clodronato+alendronato) por vía parenteral. Delmas et al. (197) utilizando también el mismo ensayo, observan una inhibición del 71% en los niveles de PYD en pacientes con EOP después de 3 días de tratamiento con pamidronato vía intravenosa. Por el contrario, Garnero et al. (142), no observaron disminución en los niveles de piridinolinas y de desoxipiridinolinas libres en pacientes con EOP y OSP después de tres días de tratamiento con pamidronato vía intravenosa. Estas diferencias observadas, en la eliminación de piridinolinas, (142,197,208) pueden ser debidas a las características de los grupos en estudio. El trabajo de Delmas et al. (197) (71% de inhibición), se realizó en un grupo de pacientes con un remodelado óseo tres veces mayor que el de los pacientes del

trabajo de Garnero et al. (142) (0% de inhibición). Por otra parte, en el trabajo de Delmas et al. se observa un 70% de inhibición en la eliminación de piridinolinas totales frente al 25%-40% de inhibición en los niveles de piridinolinas totales que observan Garnero et al.

Las razones por las que se observan resultados tan contradictorios no están claras, pero parecen responder, al menos en parte, a las diferentes formas de degradación del colágeno, que se producen en los distintos niveles de remodelado óseo (EOP activa ó media) y en las distintas patologías que afectan al hueso (OSP, EOP, etc.).

En el presente trabajo, también observamos, al igual que ocurre con la Hp/Cr, que los niveles de PYD/Cr descienden progresivamente, desde el primer mes de tratamiento con tiludronato hasta el tercer mes (34.9%, 45.8% y 47.9% respectivamente) aunque el orden de magnitud es menor que con la Hp/Cr. Nuestros resultados están de acuerdo con los de Hamdy et al. (105) y Seibel et al. (113) en que las piridinolinas no parecen ofrecer ventajas sobre la determinación del clásico marcador de resorción Hp/Cr para la monitorización del tratamiento en pacientes con EOP.

Bettica et al. (230) hicieron un estudio comparativo sobre la utilidad clínica de cuatro marcadores bioquímicos de resorción ósea (Hp/Cr, galactosilhidroxiliisina, Pyr y Dpd) para el estudio de la resorción ósea en sujetos con diferentes patologías del hueso. Estos autores concluyen que los cuatro marcadores tienen la misma capacidad de respuesta ante grandes cambios del remodelado óseo. Sin embargo, ante pequeños cambios de remodelado, la Hp/Cr era la que menor poder de discriminación tenía con respecto a los otros tres marcadores. Resultados contradictorios con los de estos autores (230) son los del grupo de Alvarez et al. (104) que observan que la Pyr/Cr es más eficaz que la Hp/Cr para el diagnóstico de la EOP, especialmente en el caso de pacientes con baja actividad metabólica.

Con respecto al ICTP, tenemos que destacar, que al contrario de lo que ocurría en la OSP postmenopáusica, en pacientes con EOP sí observamos un incremento significativo en los niveles de ICTP (utilizando el mismo RIA para su determinación en ambos estudios). Recordemos que en la EOP se produce un aumento muy significativo del remodelado del hueso (formación y resorción) y que en la OSP postmenopáusica los cambios que se producen en el remodelado del hueso son cambios muy sutiles. Por otra

parte, el ICTP es el marcador cuyo aumento es menos significativo en los pacientes con EOP de todos los marcadores estudiados en esta patología. Además, este marcador tampoco es sensible para monitorizar el tratamiento con tiludronato en estos pacientes. Los niveles de ICTP en el presente trabajo, no varían significativamente durante los tres meses que duró el tratamiento con tiludronato. Este hecho resulta sorprendente, si tenemos en cuenta que el ICTP es, teóricamente, más específico que las piridinolinas para el estudio de la resorción ósea (las piridinolinas descendían progresivamente hasta el tercer mes de tratamiento). Nuestros resultados coinciden con los de otros autores que también observan mayor especificidad de las piridinolinas sobre el ICTP, para el seguimiento del tratamiento con bifosfonatos de diversas enfermedades metabólicas óseas (208,211,222). Es posible, que debido al acelerado remodelado que se produce en la EOP, se generen otros telopéptidos que no sean detectados por el ensayo utilizado en el presente trabajo. Esta posibilidad se confirma en un trabajo de Hankey et al. (231) que observaron que los osteoblastos pagéticos secretaban un telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I alterado de 30K-Da.

Por otra parte, a pesar de que se han observado muy buenas correlaciones entre los niveles de ICTP sérico con los de otros marcadores bioquímicos de remodelado óseo, FAt, PICP, Pyr y Dpd (203); así como con los niveles de PTH en el hiperparatiroidismo primario (232), existen muchas discrepancias acerca de la especificidad y sensibilidad del ICTP como marcador de resorción ósea en el estudio de las enfermedades metabólicas óseas (135,199,229) y se postula si este marcador debe ser considerado más bien como un marcador de degradación del colágeno tipo I en general que como un marcador de resorción ósea (159).

Las variaciones observadas en literatura, respecto a los niveles séricos de ICTP, sugieren que los niveles de este marcador podrían reflejar otros aspectos además de la resorción ósea, como por ejemplo componentes de los tejidos blandos. Aunque no se descarta la posibilidad de que estas variaciones puedan ser debidas al efecto del aclaramiento renal de la estructura del ICTP (131).

Con respecto al CTX, en el presente trabajo observamos la mayor inhibición al segundo mes de tratamiento (37.16%), pero esta inhibición es menor a la que observamos

con la Hp/Cr. Los niveles basales medios de CTX/Cr en pacientes con EOP aumentan 2 veces por encima del límite superior de normalidad. Nuestros resultados no están de acuerdo con los obtenidos por Garnero et al. (233) en un trabajo previo, en el que observan que los niveles basales de CTX/Cr están elevados 6 veces por encima del límite superior de normalidad en pacientes con EOP. Por otra parte, estos autores (233) observan que los niveles de CTX/Cr disminuyen en mayor proporción que los de Hp en pacientes con EOP después de 4 días de tratamiento con pamidronato. Nosotros, sin embargo, observamos una mayor disminución en los niveles de Hp/Cr que de PYD/Cr en pacientes con EOP después del tratamiento con tiludronato.

De acuerdo con nuestros resultados, el clásico marcador de resorción ósea Hp/Cr parece ser el más sensible para el seguimiento del tratamiento con tiludronato en la EOP. Sin embargo, sería interesante realizar más estudios con la PYD y el CTX, debido a que son métodos más fáciles de usar en el laboratorio. Por otra parte, nuestros resultados muestran que el ICTP no es un marcador adecuado para el seguimiento del tratamiento con tiludronato en la EOP.

Como última parte de este trabajo, se ha tratado de estudiar la **detección precoz de las METÁSTASIS ÓSEAS asociadas al carcinoma de próstata.**

Según estudios previos, los marcadores bioquímicos de formación ósea han sido utilizados para detectar la presencia de metástasis óseas, así como para monitorizar la eficacia de la terapia antitumoral en estos pacientes (175,234,235).

En el presente trabajo, todos los pacientes del grupo IV (con metástasis óseas detectadas por técnicas de imagen) presentaban niveles significativamente elevados, versus el grupo HBP+I+II (sin metástasis óseas), de los marcadores de formación ósea FAt, FAO, BGP, PINP y PICP. El objetivo del presente trabajo fué evaluar si estos marcadores de formación ósea, podrían mejorar la sensibilidad de las técnicas habituales de detección de metástasis óseas en el cáncer de próstata, determinación de PSA, gammagrafía ósea y radiología ósea.

Como ya mencionamos en la introducción (1.5.3.), el antígeno sérico prostático (PSA) es, en la actualidad, el marcador más ampliamente utilizado, no sólo para el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata, sino también para detectar la evidencia de metástasis óseas (174) (criterio utilizado: un nivel de PSA de más de 100ng/mL indica que hay una alta probabilidad de metástasis óseas). En un reciente trabajo de Lorente et al. (175), 8 de 52 pacientes (15%) sin metástasis óseas presentaban un nivel de PSA de más de 100 ng/mL (especificidad del 85%), y 10 de 48 pacientes con metástasis óseas (21%) presentaban niveles de PSA por debajo de 100 ng/mL (sensibilidad del 79%). La sensibilidad de este marcador en el diagnóstico de las metástasis óseas oscila entre el 42.9% y el 83.3% de acuerdo con otros autores (234,236,237).

Nuestros resultados muestran una especificidad para la PSA del 100% (ningún paciente sin metástasis óseas presentaba niveles de PSA por encima de 100 µg/L) y una sensibilidad del 40%, 4/10 pacientes (40%) del grupo IV (con metástasis óseas) presentaban niveles de PSA por encima de 100 µg/L. Por otra parte, 4 de los pacientes del grupo IV mostraban niveles normales de PSA (menores de 4µg/L). La variabilidad observada en los niveles de PSA detectados en los pacientes de este grupo puede ser debida a que ninguno de ellos estaba en condiciones basales, todos estaban bajo tratamiento. Por eso, en estas condiciones, los marcadores bioquímicos de formación ósea podrían indicar mejor el desarrollo de las metástasis óseas que la PSA.

La FAt ha sido también ampliamente utilizada en el estudio del desarrollo y progresión de las metástasis óseas en el cáncer de próstata (238,239) con una sensibilidad entre el 60% y el 85 % (238,239). Entre los pacientes sin metástasis óseas, estudiados en el presente trabajo, solamente dos presentaban niveles de FAt por encima del límite superior de normalidad (especificidad del 95%, 40/42). Uno de ellos era un paciente del grupo HBP+I+II que tenía hepatitis C asociada. Por otra parte, seis pacientes del grupo IV (grupo con metástasis óseas confirmada), mostraron niveles elevados de FAt (sensibilidad del 60%, 6/10). Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Rudnicki et al. (234) en un trabajo previo publicado en 1995, que observaron que la FAt tenía una sensibilidad y especificidad, para la detección de las metástasis óseas en pacientes con carcinoma de próstata, del 69% y 91% respectivamente.

La osteocalcina sérica (BGP), otro marcador de formación del hueso, ha sido también utilizada para la detección de las metástasis óseas asociadas a varios tipos de cáncer por diversos autores. Kamby et al. (240) encontraron que la medida de BGP no estaba asociada ni con la extensión ni con el número de metástasis óseas en pacientes con carcinoma de mama. Burlina et al. (241) encontraron una gran especificidad (81%) pero una pobre sensibilidad (55%) en la detección de las metástasis óseas en 65 pacientes con cáncer y con metástasis óseas, hepáticas ó de nódulos linfáticos y Marcellini et al. (242) observaron valores elevados de BGP en 22 de 27 pacientes con metástasis óseas derivadas de carcinoma de próstata. En el presente trabajo la sensibilidad y especificidad de la BGP fueron del 29% y 86% respectivamente.

El método que nosotros utilizamos para la determinación de BGP en estos pacientes es el IRMA ELSA-OSTEO. La estabilidad de la osteocalcina, bajo diferentes condiciones de mantenimiento de la muestra, es muy buena con este IRMA. El mantenimiento de las muestras a temperatura ambiente durante 24 h, conduce a valores de osteocalcina solamente un 20% por debajo de los valores basales, y si la muestra ha sido mantenida 2 horas a temperatura ambiente, los valores son similares a los basales (97%) (71). Los anticuerpos empleados en este IRMA reconocen la molécula intacta de BGP y el fragmento aminoterminal-medio resultante de la proteólisis. La baja sensibilidad de este marcador para detectar las metástasis óseas puede ser debida a que en este tipo de patología se generen otro tipo de fragmentos diferentes a los que reconoce el IRMA ELSA-OSTEO.

Nuestros resultados coinciden, por lo tanto, con los de otros autores en el sentido de que los marcadores bioquímicos de formación ósea, FAt y BGP, no muestran la especificidad y sensibilidad deseadas en la detección de las metástasis óseas en el carcinoma de próstata.

La isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina es otro marcador de formación ósea que ha sido utilizado por los clínicos con el fin de detectar la presencia de metástasis óseas en pacientes con cáncer.

Un reciente trabajo, muy interesante de Lorente et al. (175) mostraba que la determinación de FAO podría tener la más alta eficacia clínica en el diagnóstico de las

metástasis óseas en el cáncer de próstata. De acuerdo con estos autores, un nivel de FAO de más de 30 ng/mL presentaba una sensibilidad de 87.5% y una especificidad de 100%. Nuestros resultados están de acuerdo con estos autores, en el hecho de que la FAO es un marcador muy sensible y específico para la detección de las metástasis óseas en el cáncer de próstata. Utilizando un nivel de 18.4 µg/L como límite superior de normalidad, nosotros encontramos una sensibilidad del 90% (9 de 10 pacientes del grupo IV presentaban niveles elevados de FAO), pero nuestra especificidad es del 79% (34/43).

Es interesante destacar aquí, que a pesar de la alta especificidad de los anticuerpos monoclonales utilizados en el IRMA TANDEM[®]-OSTASE (45), hay una reactividad cruzada con la isoenzima hepática de aproximadamente el 20% de acuerdo con estudios previos realizados por nuestro grupo (184) ó del 15% de acuerdo con los resultados de Garnero et Delmás (182). Por el contrario, los autores de esta técnica atribuyen a la determinación de la FAO una reactividad cruzada con la isoenzima hepática de tan sólo un 3%. Este hecho podría sugerir que la FAO es un buen marcador en la predicción de las metástasis óseas, excepto cuando hay coexistencia de patología hepática (hepatitis, metástasis hepáticas...) En este último caso, la reactividad cruzada con la isoenzima hepática es importante que sea considerada.

Otros trabajos previos también utilizaron la FAO para la detección de las metástasis óseas. Burlina et al. (241) utilizaron la determinación de la FAO por precipitación con lectina de germen de trigo y encontraron que la isoenzima ósea era un marcador muy específico para el diagnóstico de las metástasis óseas. Houzé et al. (243) también encontraron en 30 pacientes con carcinoma de próstata que la medida de FAO por el método IRMA TANDEM[®]-OSTASE, el mismo que hemos utilizado nosotros (45), podría permitir el diagnóstico de las metástasis óseas. En otro trabajo, Casetta et al. (244), utilizando el mismo método, encontraron altos valores de FAO en algunos pacientes de los estadios A, B, y C de acuerdo con la American Urological Association Staging System, y en todos los pacientes del estadio D. Al igual que nosotros observamos, los resultados de estos autores mostraban una buena sensibilidad aunque una menor especificidad.

En un trabajo reciente, Withold et al. (245) usando un ELISA con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la FAO, encontraron que en las metástasis óseas (detectadas por técnicas de imagen), la actividad FAO estaba fuertemente incrementada comparada con un grupo de sujetos emparejados en edad y sexo con el de los pacientes, mientras que en pacientes tumorales sin metástasis óseas la FAO no difería del grupo control.

Los niveles séricos de PICP también han sido utilizados por diversos autores en el estudio de las metástasis óseas derivadas del cáncer de próstata. Koizumi et al. (246) en un reciente trabajo publicado en 1996 concluyen que el PICP es un marcador sensible para detectar las metástasis óseas de alta actividad, pero no es sensible para detectar aquellas de baja actividad.

En el presente trabajo los valores de sensibilidad y especificidad del PICP para la detección de las metástasis óseas fueron del 43% y 96% respectivamente. Nuestros valores no están de acuerdo con los observados por otros autores (247).

Debido al poco tiempo transcurrido desde que se comercializara el RIA para la cuantificación en suero del PINP, son muy pocos los trabajos que se han publicado (si se compara con su homólogo carboxiterminal, el PICP) sobre la utilidad de este marcador en el estudio de las metástasis óseas. En algunos trabajos previos acerca del estudio de la osteoporosis y otras patologías (248,249) el PINP mostraba una gran sensibilidad como marcador bioquímico de remodelado óseo. Sin embargo, sólo hemos encontrado en la literatura un trabajo (250) en el que se evalúa la utilidad clínica del PINP, para el estudio de las metástasis óseas en pacientes con cáncer de mama. Estos autores (250) observan una especificidad y sensibilidad del 30% y 98% para el PINP. Sin embargo, no hemos encontrado en la literatura ningún trabajo en el que se evalúe la utilidad clínica de este marcador en la detección de las metástasis óseas asociadas al cáncer de próstata.

En el presente trabajo, nosotros observamos los mejores resultados en sensibilidad y especificidad con el uso de PINP. Todos los pacientes del grupo IV, con metástasis óseas, presentaban niveles de PINP por encima del límite superior de normalidad (sensibilidad del 100%) y 6/45 pacientes sin metástasis óseas, presentaban niveles de PINP por encima de dicho límite superior de normalidad (especificidad del 87%). La

sensibilidad y especificidad observadas con el PINP en el presente trabajo, fueron aún mejor que las observadas con la FAO (90% de sensibilidad y 79% de especificidad), para la detección de las metástasis óseas en el carcinoma de próstata.

Con respecto a la especificidad, especialmente interesante es el análisis del grupo III. Como ya mencionamos en el apartado 3.1.1.3., en estos pacientes el tumor ha extravasado la cápsula prostática, pero no se evidencian metástasis óseas mediante gammagrafía ósea. Sorprendentemente, al estudiar los marcadores de formación ósea observamos que había un número de pacientes que presentaban niveles de los marcadores dentro del rango de normalidad (grupo III-a), mientras que otros (grupo III-b), presentaban, al igual que ocurría en el grupo IV (con metástasis óseas confirmadas por técnicas de imagen) niveles elevados de FAO y PINP (los marcadores que presentaban mejor relación sensibilidad/especificidad para el estudio de las metástasis óseas). Es posible sugerir a este respecto que, en los pacientes del grupo III-b, las metástasis óseas no son todavía evidentes por técnicas de imagen y que podrían corroborarse con el tiempo. Si las metástasis se confirman en un futuro, los valores predictivos de estos marcadores se confirmarían.

En este punto, queremos destacar, que para el cálculo de la especificidad de los marcadores estudiados en el presente trabajo, nosotros hemos utilizado todos los pacientes que no presentaban metástasis óseas confirmadas mediante diagnóstico realizado por técnicas de imagen. Sin embargo, si los pacientes del grupo III-b no se consideran para este cálculo, la especificidad del PINP y de la FAO podrían mejorar de 87% (39/45) a 100% (39/39) el PINP y de 79% (34/43) a 92% (34/37) la FAO.

Es importante resaltar que en una revisión posterior a la realización del presente trabajo, uno de los pacientes que nosotros incluimos en el grupo III-b ya había desarrollado metástasis óseas confirmado por gammagrafía ósea. En orden de alcanzar resultados definitivos, sería necesario ampliar el número de pacientes, especialmente de los grupos III y IV incluyendo un importante número de pacientes en condiciones basales, no bajo tratamiento.

De acuerdo con los resultados del presente trabajo, podemos concluir que los marcadores bioquímicos de formación ósea, FAO y PINP, presentan la mejor relación

sensibilidad/especificidad para el estudio de las metástasis óseas en el carcinoma de próstata, de todos los marcadores estudiados. Sin embargo es importante tener en cuenta que la FAO presenta la desventaja de su reactividad cruzada con la isoenzima hepática, a pesar del uso de anticuerpos monoclonales para su determinación.

El propéptido aminoterminal del procolágeno I (PINP) muestra resultados prometedores en orden de detectar precozmente las metástasis óseas, antes de que éstas se evidencien por gammagrafía ósea. Según nuestros resultados, podríamos concluir que un valor de PINP por encima del límite superior de normalidad podría ser indicativo de la presencia de metástasis óseas.

6

Conclusiones

- 6.1 Los marcadores bioquímicos de formación ósea que presentan una mayor sensibilidad y especificidad para la detección de los desórdenes del remodelado óseo asociados a la **OSTEOPOROSIS POSTMENOPAÚSICA**, son la *isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina* y el *propéptido aminoterminal del procolágeno I en suero*. Estos marcadores muestran una eficacia superior a la de los demás marcadores de formación ósea estudiados, fosfatasa alcalina total, osteocalcina y propéptido carboxiterminal del procolágeno I en suero.
- 6.2. Los marcadores bioquímicos de resorción ósea que presentan una mayor sensibilidad y especificidad para la detección de los desórdenes del remodelado óseo asociados a la **OSTEOPOROSIS POSTMENOPAÚSICA** son las *desoxipiridinolinas libres*, los *telopéptidos aminoterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina* y el *telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I en orina*. Estos marcadores muestran una eficacia superior a la de los demás marcadores de resorción ósea estudiados, calcio, hidroxiprolina y piridinolinas totales libres en orina, y telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en suero.
- 6.3 La *fosfatasa alcalina total en suero* es el marcador de formación ósea idóneo para el seguimiento del tratamiento con tiludronato en pacientes con **ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET**. La isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina en suero presenta la misma sensibilidad que la fosfatasa alcalina total sérica, pero la relación coste/eficacia hacen que esta última (fosfatasa alcalina total en suero) sea el marcador de elección, siempre que no coexista una alteración hepática en el paciente.
- 6.4. Se confirma el hecho de que la osteocalcina sérica no es el marcador adecuado para medir el grado de formación ósea en la **ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET**.

- 6.5. El clásico marcador de resorción ósea *hidroxiprolina en orina* presenta la mayor sensibilidad entre los marcadores de resorción ósea estudiados (calcio, hidroxiprolina, piridinolinas totales libres y telopéptido carboxiterminal de la cadena α_1 del colágeno tipo I en orina, y telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en suero) para el seguimiento del tratamiento con tiludronato en pacientes con **ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET**.
- 6.6. El marcador de resorción ósea, telopéptidos carboxiterminales del colágeno tipo I unidos por puentes de piridinolina en suero, no presenta ninguna sensibilidad para el seguimiento de la resorción ósea, tras el tratamiento con tiludronato, en pacientes con **ENFERMEDAD ÓSEA DE PAGET**.
- 6.7. Entre los marcadores de formación ósea estudiados (fosfatasa alcalina total, isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina, osteocalcina, y propéptidos amino y carboxiterminales del procolágeno I en suero) la *isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina* y el *propéptido aminoterminal del procolágeno I en suero*, son los marcadores que presentan la mayor sensibilidad para la **detección precoz de las METÁSTASIS ÓSEAS asociadas al cáncer de próstata**.
- 6.8. Aunque la sensibilidad de la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina y la del propéptido aminoterminal del procolágeno I en suero, para la **detección precoz de las METÁSTASIS ÓSEAS asociadas al carcinoma de próstata**, son similares, la especificidad del propéptido aminoterminal del procolágeno I en suero, es superior a la de la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina sérica.
- 6.9. Los presentes resultados muestran que **no existe un marcador ideal para la evaluación del remodelado óseo** sino que el/los marcador/es más adecuado/s dependen del tipo de patología ósea en estudio.

7

Bibliografía

- 1 BARON R. "Anatomy and ultrastructure of bone". En: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Third edition. Publ by American Society for Bone and Mineral Research. Ed. Favus MJ et al., Lippincott-Raven, Cap. 1: 3-10, Philadelphia, New York 1996.
- 2 GREEN J, KLEEMAN CR. "Role of bone in regulation of systemic acid-base balance". *Kidney Int* 1991; 39: 9.
- 3 RAISZ LG. "Local and sistemic factors in the pathogenesis of osteoporosis". *N Engl J Med* 1988; 318: 818-828.
- 4 RUSSELL RGG. "The physiological regulation of bone metabolism in relation to osteoporosis". En: *Osteoporosis and Bone Mineral Measurement*". Publ by Institute on physical sciences in medicine. Ed. Ring EFJ et al., Cap 19: 147-176, New York 1989.
- 5 RICO LENZA H. "El esqueleto como órgano endocrino". *Med Clin* 1987; 88: 588-589.
- 6 ROBEY GH, FEDARKO NS, HEFFERAN TE, BIANCO P, VETTER UK, GRZESIK W et al. "Structure and molecular regulation of bone matrix proteins". *J Bone Miner Res* 1993; 8 (Sup. 2): S483-S487.
- 7 MARKS SC, POPOFF SN. "Bone cell biology: The regulation of development, structure and function in the skeleton". *Am J Anat* 1988; 183: 1-44.
- 8 PUZAS JE. "Osteoblast cell biology. Lineage and functions". En: *Primer on the Metabolic Bone Biseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Third edition. Ed. Favus MJ et al. Lippincot-Raven, pp 11-16, Philadelphia, New York 1996.
- 9 CLARKE AH. "Matrix vesicle calcification: Review and update". En: *Bone and Mineral Research* 3. Ed. WA. Peck, Elsevier Science Publishers, pp 109-149, Amsterdam 1985.
- 10 VAES G. "Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption". *Clin Orthop* 1987; 231: 239-271.
- 11 BLAIR HC, SCHLESINGER PH, ROSS F, TEITELBAUM SL. "Recent advances toward understanding osteoclast physiology". *Clin Orthop* 1993; 294: 7-22.
- 12 GLUCK S. "The osteoclast as an unicellular protontransporting epithelium". *Am J Med Sci* 1992; 303: 134-139.
- 13 FROST HM. *Bone Biodynamics*. Ed. HM Frost, Little, Brown and Co, pp 315-333. Boston 1964.
- 14 BONUCCI E. "The basic multicellular unit of bone". *Miner Electrolyte Metab* 1990; 4: 115-125.

- 15 SKJØDT H, RUSSELL G. "Bone cell biology and the regulation of bone turnover". Ed. Maxine Gowen, CRC, Boca Raton Ann Arbor, Cap. 1: 14-28, Londres 1992.
- 16 EASTELL R. "Assessment of bone density and bone loss". *Osteoporosis Int* 1996; 6(Supp 1): 3-5.
- 17 DELMAS PD, SCHLEMMER A, GINEYTS E, RIIS B, CHRISTIANSEN C. "Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis". *J Bone Miner Res* 1991; 6: 639-644.
- 18 DELMAS PD. "Biochemical markers of bone turnover". *J Bone Miner Res* 1993; 8(Sup 2): S549-S555.
- 19 FISHMAN WH. "Alkaline phosphatase isoenzymes: recent progress". *Clin Biochem* 1990; 23: 99.
- 20 CROFTON PM. "Biochemistry of AP-isoenzymes". *Crit Rev Clin Lab Sci* 1982; 16: 161-194.
- 21 CHIANDUSSI L, CREENE SF, SHERLOCK S. "Serum alkaline phosphatase actions in hepato-biliary and bone diseases". *Clin Sci* 1962; 22: 425.
- 22 RODIN A, DUNCAN A, QUARTERO HWP, PISTOFIDIS G, MASHITER G, WHITAKER K et al. "Serum concentration of alkaline phosphatase isoenzymes and osteocalcin in normal pregnancy". *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 1123-1127.
- 23 STOLBACH LL. "Clinical application of alkaline phosphatase isoenzyme analysis". *Ann N Y Acad Sci* 1969; 166: 760.
- 24 DELMAS PD. "Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic disease". *Endocrinol Metab Clin North Am* 1990; 19: 1-18.
- 25 LOWRY OH, ROBERTS NR, MEILING WV et al. "The quantitative histochemistry of brain enzyme measurement". *J Biol Chem* 1954; 207: 19-37.
- 26 HARRIS H. "The human alkaline phosphatase: what we know and what we don't know". *Clin Chim Acta* 1989; 186: 133.
- 27 BOYER SH. "Human organ alkaline phosphatases: discrimination by several means including starch gel electrophoresis of antienzyme-enzyme supernatants fluids". *Ann N Y Acad Sci* 1963; 103: 938.
- 28 JOHSON RB Jr. "A new fluorometric method for the estimation or detection of total and fractionated alkaline phosphatase". *Clin Chem* 1969; 15: 108-123.

- 29 SMITH I, LIGHTSTONE PJ, PERRY JD. "Separation of human tissue alkaline phosphatase by electrophoresis on acrylamide disc gels". *Clin Chim Acta* 1968; 19: 499.
- 30 DEMETRIOU JA, BEATTIE JM. "Electrophoretic separation on agarose thin film of isoenzymes of alkaline phosphatase from human serum and tissues". *Clin Chem* 1972; 18: 417-421.
- 31 FRITSCHER HA Jr, ADAMS-PARK HR. "Cellulose acetate electrophoresis of alkaline phosphatase isoenzymes in human serum and tissues". *Clin Chem* 1972; 18: 417-421.
- 32 POSEN S, NEALE FC, CLUBB JS. "Heat inactivation in the study of human alkaline phosphatases". *Ann Intern Med* 1965; 62: 1234-1243.
- 33 HORNE M, CORNISH CJ, POSEN S. "Use of urea denaturation in the identification of human alkaline phosphatases". *J Lab Clin Med* 1968; 72: 905-915.
- 34 FISHMAN NH, GREEN S, INGLISH NI. "L-phenylalanine: an organ specific, stereospecific inhibitor of human intestinal alkaline phosphatase". *Nature* 1963; 198: 685.
- 35 ROSALKI SB, FOO AY. "Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma". *Clin Chem* 1984; 30: 1182-1186.
- 36 SCHOENAU E, HERZOG KH, BOEHLES HJ. "Liquid-chromatographic determination of isoenzymes of alkaline phosphatase in serum and tissue homogenates". *Clin Chem* 1986; 32: 816-818.
- 37 SCHOENAU E, HERZOG KH, BOEHLES HJ. "Clinical relevance of alkaline phosphatase isoenzyme determinations by high performance liquid chromatography". *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1986; 24: 641-646.
- 38 BEILBY JP, CHIN C. "Alkaline phosphatase isoenzymes incompletely resolved by "fast protein liquid chromatography". *Clin Chem* 1987; 33: 2327.
- 39 LEHMANN FG. "Human alkaline phosphatases: evidence of three isoenzymes by lectin binding affinity and immunological specificity". *Biochim Biophys Acta* 1980; 616: 41-59.
- 40 Mc COMB RB, BOWEN GN, POSEN S. "Alkaline phosphatase". *New York and London: Plenum Press* 1979; 373-524.
- 41 LAWSON GM, KATZMAN JA, KIMLINGER TK, O'BRIAN JF. "Isolation and preliminary characterization of a monoclonal antibody that interacts preferentially with the liver isoenzyme of human alkaline phosphatase". *Clin Chem* 1985; 31: 381-385.
- 42 BAILYES EN, SEABROOK RN, CALVIN J, MAGUIRRE GA, PRICE CP, SIDDLE K, LUZIO JP. "The preparation of monoclonal antibodies to human bone and liver

- alkaline phosphatase and their use in immunoaffinity purification and in studying these enzymes when present in serum". *Biochem J* 1987; 244: 725-733.
- 43 HILL CS, WOLFERT RL. "The preparation of monoclonal antibodies which react preferentially with human bone alkaline phosphatase and not liver alkaline phosphatase". *Clin Chim Acta* 1989; 186:315-20.
- 44 GOMEZ B Jr, ARDAKANI S, JU J, JENKINS D, CERELLI MJ, DANILOFF GY et al. "Monoclonal antibody assay for measuring bone-alkaline phosphatase activity in serum". *Clin Chem* 1995; 41: 1560-1566.
- 45 PANIGRANI K, DELMAS PD, SINGER G, RYAN W, REISS O, FISHER R et al. "Characteristics of a two-site immunoradiometric assay for human skeletal alkaline phosphatase in serum". *Clin Chem* 1994; 40: 822-828.
- 46 PRICE PA. "Vitamin K-dependent bone proteins". En: *Calcium Regulation and Bone Metabolism. Basic and Clinical Aspects*. Ed. Cohn DV, Martin TJ, Meunier PJ, Elsevier Science Publishers BV, pp 419-426, Amsterdam 1987.
- 47 BERESFORD JN, GALLAGHER JA, POSER JW, RUSSELL RGG. "Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)₂D₃, parathyroid hormone and glucocorticoids". *Metab Bone Dis Report Res* 1984; 5: 229-234.
- 48 PRICE PA, BAUKOL SA. "1,25 dihydroxyvitamin D₃ increases serum levels of the vitamin k-dependent bone protein". *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 99: 928-935.
- 49 HAUSCHKA PV, LIAN JB, GALLOP PM. "Direct identification of the calcium binding aminoacid gamma-carboxy-glutamate in mineralized tissue". *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3925-3929.
- 50 PRICE PA, OTSUKA AS, POSER JW, KRISTAPORIS J, RAMAN N. "Characterization of gamma-carboxyglutamic acid-containing protein for bone". *Proc Nat Acad Sci USA* 1976; 73: 1447-1451.
- 51 PRICE PA. "Osteocalcin". En: *Bone and Mineral Research*, Annual 1. Ed. WA. Peck, Elsevier, pp 157-190, Amsterdam 1983.
- 52 HAUSCHKA PV. "Osteocalcin and its functional domains". En: *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. Ed. WT Butler, Ebsco Media Inc, pp 149-158, Birmingham 1985.
- 53 PRICE PA, PARTHEMORE JG, DEFTOS LJ. "New biochemical marker of bone metabolism". *J Clin Invest* 1980; 66: 878-883.
- 54 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.

-
- 55 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.
- 56 FARRUGIA W, MELICK RA. "Metabolism of osteocalcin". *Calcif Tissue Int* 1986; 39: 234-238.
- 57 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.
- 58 DELMAS PD, WILSON DM, MANN KG, RIGGS L. "Effect of renal function on plasma levels of bone gla-protein". *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 1028-1030.
- 59 GUNDBERG CM, WEINSTEIN RS. "Multiple immunoreactive forms of osteocalcin in uremic serum". *J Clin Invest* 1986; 77: 1762-1767.
- 60 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.
- 61 PRICE PA, PARTHEMORE JG, DEFTOS LJ. "New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay for bone Gla-protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease". *J Clin Invest* 1980; 66: 878-883.
- 62 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.
- 63 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; 355: 8685-8691.
- 64 DELMAS PD, CHRISTIANSEN C, MANN KG, PRICE PA. Bone gla protein (osteocalcin) assay standardization report". *J Bone Miner Res* 1990; 5: 5-11.
- 65 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.
- 66 KOYAMA N, OHARA K, YOKOTA H, KUROME T, KATAYAMA M, HINO F et al. "A one step sandwich enzyme immunoassay for γ -carboxylated osteocalcin using monoclonal antibodies". *J Immunol Methods* 1991; 139: 17-23.
- 67 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.

- 68 HOSODA K, EGUCHI H, NAKAMOTO T, KUBOTA T, HONDA H, JINDAI S et al. "Sandwich immunoassay for intact human osteocalcin". *Clin Chem* 1992; 38: 2233-2238.
- 69 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.
- 70 GOMEZ B, BALLY CA, JENKINS DK et al. "An enzyme immunoassay for intact, newly synthesized osteocalcin: A marker of bone formation". *International Conference on Progress in Bone and Mineral Research, October 14-16. Vienna, Austria 1994*.
- 71 DIAZ EM, GUERRERO R, DE LA PIEDRA C. "Six osteocalcin assays compared". *Clin Chem* 1994; 40: 2071-2077.
- 72 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.
- 73 DÍAZ DIEGO EM, NACHER M, RAPADO A, SERRANO S, BOSCH J, AUBIA J, DE LA PIEDRA C. "Immunoreactive osteocalcin forms in conditioned media from human osteoblast culture and in sera from healthy adult control subjects and patients with bone pathologies". *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 48-58.
- 74 ROBINS SP, BAILEY AJ. "Isolation and characterization of glycosyl derivatives of the reducible cross-links in collagens". *FEBS Letters* 1974; 38: 334-336.
- 75 STEIN GS, LIAN BJ, OWEN TA. "Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation". *FASEB J* 1990; 4: 3111-3123.
- 76 ERIKSEN EF, CHARLES P, MELSEN F, MOSEKILDE L, RISTELI L, RISTELI J. "Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry". *J Bone Miner Res* 1993; 8: 127-132.
- 77 CHARLES P, MOSEKILDE L, RISTELI L, RISTELI J, ERIKSEN EF. "Assesment of bone remodeling using biochemical indicators of type I collagen synthesis and degradation: Relation to calcium kinetics". *Bone Miner* 1994; 24: 81-90.
- 78 TRIVEDI P, RISTELI J, RISTELI L, HINDMARSH PC, BROOK CGD, MOWAT AP. "Serum concentrations of the type I and III propeptides as biochemical markers of growth velocity in infants and children and in children with growth disorders". *Pediatr Res* 1991; 30: 276-280.

- 79 JENSEN LT, OLESEN HP, RISTELI J, LORENZEN I. "External thoracic duct-venas shunt in conscious pigs for long term studies of connective tissue metabolites in lymph". *Lab Anim Sci* 1990; 40: 620-624.
- 80 ZHU G-G, RISTELI J, PUISTOLA U, KAUPPILA A, RISTELI L. "Progressive ovarian carcinoma induces synthesis of type I and type III procollagens in tumor tissue and in the peritoneal cavity". *Cancer Res* 1993; 53: 5028-5032.
- 81 CLARK CC. "The distribution and initial characterization of oligosaccharide units on the COOH-terminal propeptide extensions of the pro- α_1 and pro- α_2 chains of type I procollagen". *J Biol Chem* 1979; 254: 10798-10802.
- 82 FLEISCHMAJER R, PERLISH JS, BURGESSON RE, SHAIKH-BAHAI F, TIMPL R. "Type I, type III collagen interactions during fibrillogenesis". *Ann N Y Acad Sci* 1990; 580: 161-175.
- 83 FLEISCHMAJER R, TIMPL R, TUDERMAN L, RAISHER L, WIESTNER M, PERLISH JS, GRAVES PN. "Ultrastructural identification of extension aminopropeptides of type I and III collagen in human skin". *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7360-7364.
- 84 RISTELI J, RISTELI L. "Analysing connective tissue metabolites in human serum. Biochemical, physiological and methodological aspects". *J Hepatol* 1995; 22(Suppl. 2): 77-81.
- 85 SMEDSRØD B, MELKKO J, RISTELI L, RISTELI J. "Circulating carboxyterminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells". *Biochem J* 1990; 271: 345-350.
- 86 MELKKO J, HELLEVIK T, RISTELI J, SMEDSRØD B. "Clearance of NH₂-terminal propeptides of types I and III procollagen is a physiological function of the scavenger receptor in liver endothelial cells". *J Exp Med* 1994; 179: 405-412.
- 87 JENSEN LT, HENRIKSEN JH, OLESEN HP, RISTELI J, LORENZEN I. "Lymphatic clearance of synovial fluid in conscious pigs: the aminoterminal propeptide of type III procollagen". *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 778-784.
- 88 EBELING PR, PETERSON JM, RIGGS BL. "Utility of type I procollagen propeptide assays for assessing abnormalities in metabolic bone diseases". *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1243-1250.
- 89 LINKHART SG, LINKHART TA, TAYLOR AK, WERGEDAHL JE, BETTICA P, BAYLINK DJ. "Synthetic peptide-based immunoassay for amino-terminal propeptide of type I procollagen: Application for evaluation of bone formation". *Clin Chem* 1993; 39: 2254-2258.

- 90 TEISNER B, BOJE RASMUSSEN H, HØJRUP P, YDE-ANDERSEN E, SKJØDT K. "Fetal antigen 2: an amniotic protein identified as the aminopropeptide of the α_1 chain of human procollagen type I. *APMIS* 1992; 100: 1106-1114.
- 91 PRICE KM, SILMAN R, ARMSTRONG P, GRUDZINSKAS JG. "Development of a radioimmunoassay for fetal antigen 2". *Clin Chim Acta* 1994; 224: 95-102.
- 92 JUUKOLA A, RISTELI L, MELKKO J, RISTELI J. "Procollagen synthesis and extracellular matrix deposition in MG-63 osteosarcoma cells". *J Bone Miner Res* 1993; 8: 651-657.
- 93 MELKKO J, KAUPPILA S, NIEMI S, RISTELI L, HAUKIPURO K, JUUKOLA A, RISTELI J. "Immunoassay for the intact aminoterminal propeptide of human type I procollagen (PINP)". *Clin Chem* 1996; 42: 947-954.
- 94 MELKKO J, NIEMI S, RISTELI L, RISTELI J. "Radioimmunoassay for the carboxyterminal propeptide of human type I procollagen (PICP)". *Clin Chem* 1990; 36: 1328-1332.
- 95 LAST JA, ARMSTRONG LJ, REISER KM. "Biosynthesis of collagen crosslinks [review]". *Int J Biochem* 1990; 22: 559-564.
- 96 MACIEWICZ RA, WOTTON SF, ETHRINGTON DJ, DUANCE VC. "Susceptibility of the cartilage collagen II, IX and XI to degradation by cysteine proteinases, cathepsins B and L". *FEBS Lett* 1990; 269: 189.
- 97 RIFKIN BR, VERNILLO AT, KLECKNER AP, AUSZMANN JM, ROSENBERG LR, ZIMMERMANN M. "Cathepsin B and L activities in isolated osteoclasts". *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 63-69.
- 98 PROCKOP OJ, KIVIRIKKO KI. "Hydroxyproline and the metabolism of collagen". En: *Gould BS*. Ed. *Treatise on collagen*, Academic Press, pp 215-246, New York 1968.
- 99 PROCKOP OJ, KIVIRIKKO KI, TUDERMAN K et al. "The biosynthesis of collagen and its disorders". *N Engl J Med* 1979; 301: 13-23.
- 100 KIVIRIKKO KI. "Excretion of urinary hydroxyproline peptides in the assesment of bone collagen deposition and resorption". En: *Clinical Disorders of Bone and Mineral Metabolism*. Ed. B. Frame y J.T. Potts, Excerpta Medica, International Congress Series. Pinceton, pp 105-107, Amsterdam, Oxford, 1983.
- 101 PROCKOP DJ. "Isotopic studies on collagen degradation and the urine excretion of hydroxyproline". *J Clin Invest* 1964; 43: 453-460.
- 102 DELMAS PD. "Biochemical markers of bone turnover. I: Theoretical considerations and clinical use in osteoporosis". *Am J Med* 1993; 95: 11S-16S.

- 103 KIVIRIKKO KI, LAITINEN O, PROCKOP DJ. "Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine". *Anal Biochem* 1967; 19: 249-55.
- 104 ALVAREZ L, GUAÑABENS N, PERIS P, MONEGALA, BEDINI JL, DEULOFEN R et al. "Discriminative value of biochemical markers of bone turnover in assessing the activity of Paget's disease". *J Bone Miner Res* 1995; 10: 458-465.
- 105 HAMDY NAT, PAPAPOULOS SE, COLWELL A, EASTELL R, RUSSELL RGG. "Urinary collagen crosslink excretion: A better index of bone resorption than hydroxyproline in Paget's disease of bone?". *Bone Miner* 1993; 22: 1-8.
- 106 DELMAS PD. "Biochemical markers of bone turnover for the clinical of metabolic disease". *Endocrinol Metab Clin North Am* 1990; 19: 1-18.
- 107 EYRE DR. "Collagen crosslinking aminoacids". *Methods Enzymol* 1987; 44: 115-139.
- 108 EYRE DR, DICKSON IR, VAN NESS KP. "Collagen crosslinking in human bone and cartilage: age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues". *Biochem J* 1988; 252: 495-500.
- 109 GUNJA-SMITH Z, BOUCEK RJ. "Collagen cross-linking compounds in human urine". *Biochem J* 1981; 197: 759-762.
- 110 EYRE DR. "Editorial: New biomarkers of bone resorption". *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 470A-470C.
- 111 DEMERS L. "New biochemical marker of bone disease: is it a breakthrough?". *Clin Chem* 1992; 38: 2169-2170.
- 112 EDITORIAL. "Pyridinium crosslinks as markers of bone resorption". *Lancet* 1992; 340: 278-279.
- 113 SEIBEL MJ, ROBINS SP, BILEZIKIAN JP. "Urinary pyridinium crosslinks of collagen. Specific markers of bone resorption in metabolic bone disease". *Trends Endocrinol Metab* 1992; 3: 263-270.
- 114 ROBINS SP, STEWARD P, ASTBURY C, BRID HA. "Measurement of the cross-linking compound pyridinoline in urine as a index of collagen degradation in joint disease". *Ann Rheum Dis* 1986; 45: 969-973.
- 115 UEBELHART D, ONGCHI D, PIETRYLA DW, CHAPUY MC, THONAR EJ. "Pyridinium crosslinks content in various tissues of three species". *Bone Miner* 1992; 17: S134.
- 116 UEBELHART D, GINEYTS E, CHAPUY MC, DELMAS PD. "Urinary excretion of pyridinium crosslinks: A new marker of bone resorption in metabolic bone disease". *Bone Miner* 1990; 8: 87-96.

- 117 EYRE DR, KOOB TJ, VAN NESS KP. "Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography". *Anal Biochem* 1984; 137: 380-388.
- 118 ROBINS SP, DUNDAN A. "Pyridinium crosslinks of bone collagen and their location in peptides isolated from rat femur". *Biochim Biophys Acta* 1987; 914: 233-239.
- 119 EYRE DR. (1984) "Cross-linking in collagen and elastin". *Ann Rev Biochem* 1984; 53: 717-748.
- 120 SEIBEL MJ, DUNCAN A, ROBINS SP. "Urinary hydroxy-pyridinium crosslinks provide indices of cartilage and bone involvement in arthritic diseases". *J Rheumatol* 1989; 16: 964-970.
- 121 UEBELHART D, SCHLEMMER A, JOHANSEN JS, GINEYTS E, CHRISTIANSEN C, DELMAS PD. "Effect of menopause and hormone therapy on the urinary excretion of pyridinium cross-links". *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 367-373.
- 122 BEARDSWORTH LY, EYRE DR, DICKSON IR. "Changes with age in the urinary excretion of lysil- and hydroxylysyl pyridinoline: Two new markers of bone collagen turnover". *J Bone Miner Res* 1990; 5: 671-676.
- 123 EASTELL R, HAMPTON L, COLWELL A, GREEN JR, ASSIRI AMA, HESP R et al. "Urinary collagen crosslinks are highly correlated with radioisotopic measurements of bone resorption". En: *Osteoporosis*. Ed. Christiansen C, Overgaard K, Osteopress, pp. 469-470, Copenhagen 1990.
- 124 DELMAS PD. "Biochemical markers for the assesment of bone turnover". En: *Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management*, Second Edition, Ed. Riggs BL, Melton LJ III, Lippincott-raven , pp 319-33. Phipadelphia 1995.
- 125 ROBINS SP. "Collagen crosslinks in metabolic bone disease". *Acta Orthop Scand* 1995; 66: 171-175.
- 126 EYRE DR, ERICSSON L, SIMON L, KRANE S. "Identification of urinary peptides derived from cross-linking sites in bone collagen in Paget's disease". *J Bone Miner Res* 1988; S210.
- 127 FUGIMOTO D, SUZUKI M, UCHIMAYA A, MIYAMOTO S, INOUE T. "Analysis of pyridinoline, a crosslinking compound of collagen fibers in human urine". *J Biochem* 1983; 94: 1133-1136.
- 128 BLACK D, DUNCAN A, ROBINS SP. "Quantitative analysis of pyridinium crosslinks of collagen in urine using ion-paired-reverse phase high-performance liquid chromatography". *Anal Biochem* 1988; 169: 197-203.

- 129 SEYEDIN SM, KUNG VT, DANILOFF YN, HESLEY RP, GOMEZ B, NIELSEN LA et al. "Immunoassay for urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption". *J Bone Miner Res* 1993; 8: 635-641.
- 130 ROBINS SP, WOITGE H, HESLEY R, JU J, SEYEDIN S, SEIBEL MJ. "Direct, enzyme-linked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption". *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1643-1649.
- 131 RISTELI J, ELOMAA Y, NIEMI S, NOVAMO A, RISTELI L. "Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone collagen degradation". *Clin Chem* 1993; 39: 635-640.
- 132 HANSON DA, WEYS MAE, BOLLEN AM, MASLAN SL, SINGER FR, EYRE DR. "A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: Quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine". *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1251-1258.
- 133 ABILGAARD N, BENTZEN SM, NIELSEN JL, HEICKENDORFF L. "Serum markers of bone metabolism in multiple myeloma: prognostic value of the carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP). Nordic Myeloma Study Group (NMSG)". *Br J Haematol* 1997; 96: 103-110.
- 134 ELOMAA I, VIRKKUNEN P, RISTELI L, RISTELI J. "Serum concentration of the cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) is a useful prognostic indicator in multiple myeloma". *Br J Cancer* 1992; 66: 337-341.
- 135 KYLMÄLÄ T, TAMMELA TLJ, RISTELI L, RISTELI J, KONTTURI M, ELOMAA I. "Type I collagen degradation product (ICTP) gives information about the nature of bone metastases and has prognostic value in prostate cancer". *Br J Cancer* 1995; 71: 1061-1064.
- 136 YAMAMOTO I, MIURA H, KIGAMI Y, YAMAMURA Y, OHTA T, YUU I et al. "Detection of bone metastases by serial measurement of C-terminal telopeptide of type I collagen in patients with malignancy". *Kaku Igaku* 1996; 33: 423-429.
- 137 HASSAGER C, RISTELI J, RISTELI L, JENSEN SB, CHRISTIANSEN C. "Diurnal variation in serum markers of type I collagen synthesis and degradation in healthy premenopausal women". *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1307-1311.
- 138 HAKALA M, RISTELI L, MANELIUS J, NIEMINEN P, RISTELI J. "Increased type I collagen degradation correlates with disease severity in rheumatoid arthritis". *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 866-869.
- 139 OGAWA T, ONO T, TSUDA M, KAWANISKI Y. "A novel fluor in insoluble collagen: A crosslinking moiety in collagen molecule". *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107: 1252-1257.
- 140 KÜHN K. "Chemical properties of collagen. En: *Immunochemistry of the Extracellular Matrix*". Ed. Furthmayr H, Boca Raton, FL CRC Press, pp 1-30, 1982.

- 141 BONDE M, QUIST P, FLEDELIUS C, RIIS BJ, CHRISTIANSEN C. "Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated". *Clin Chem* 1994; 40: 2022-2025.
- 142 GARNERO P, GINEYTS E, ARBAULT P, CHRISTIANSEN C, DELMAS PD. "Different effects of biphosphonate and estrogen therapy on free and peptide-bound bone cross-links excretion". *J Bone Miner Res* 1995; 10: 641-649.
- 143 ERIKSEN EF, BRIKEN K, CHARLES P. "New markers of bone metabolism; clinical use in metabolic bone disease". *Eur J Endocrinol* 1995; 132: 251-263.
- 144 PECK WA, CHRISTIANSEN C, FLEISCH HA, GENANT HK, GENNARI C, MARTIN TJ et al. "Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis". *Am J Med* 1993; 94: 646-650.
- 145 HANSEN MA, OVERGAARD K, RIIS BJ, CHRISTIANSEN C. "Role of peak bone mass and bone loss in postmenopausal osteoporosis", *Br Med J* 1991; 303: 961-964.
- 146 MATKOVIC V, JELIC T, WARLAW GM, ILICH JZ, GOEL PK, WRIGHT JK et al. "Timing of peak bone mass in caucasian females and its implication for the prevention of osteoporosis". *J Clin Invest* 1994; 93: 799-808.
- 147 RIGGS BL, WAHNER HW, MELTON LJ, RICHELSON LS, JUDD HL, OFFORD KP. "Rates of bone loss in the appendicular and axial skeletons of women. Evidence of substantial vertebral bone loss before menopause". *J Clin Invest* 1986; 77: 1487-1491
- 148 RIGGS BL. "Overview of Osteoporosis". *West J Med* 1991; 154: 63-77.
- 149 BURGER HG, DUDLEY EC, HOPPER JL, SHELLEY JM, GREEN A, SMITH A et al "The endocrinology of the menopausal transition: A cross-sectional study of a population-based study". *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3537-3545.
- 150 OHTA H, IKEDA T, MASUZAWA T, MAKITA K, SUDA Y, NOZAWA S. "Differences in axial bone mineral density, serum levels of sex steroids and bone metabolism between postmenopausal and age- and body size-matched premenopausal subjects". *Bone* 1993; 14: 111-116.
- 151 NILAS L, CHRISTIANSEN C. "Bone mass and its relationship to age and the menopause". *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65: 679-702.
- 152 ARNAUD CD. "Osteoporosis: Using bone markers for diagnosis and monitoring". *Geriatrics* 1996; 51: 24-30.
- 153 TURNER AS, ALVIS M, MYERS W, STEVENS ML, LUNDY MW. "Changes in bone mineral density and bone-specific alkaline phosphatase in ovariectomized ewes". *Bone* 1995; 17(Sup 4): 395S-402S.

- 154 CALERO JA, DE LA PIEDRA C, DÍAZ CURIEL M. "Usefulness of serum pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptides of type I collagen (ICTP) and osteocalcin (BGP) in the study of bone resorption rate in oophorectomized rats". *Mineral and Electrolyte* 1997; (en prensa).
- 155 DÍAZ CURIEL M, CALERO JA, GUERERRO LÓPEZ R, GALA JL, GAZAPO R, DE LA PIEDRA C. "LY 117018 HCl on bone remodeling and mineral density in the oophorectomized rats". *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, (en prensa).
- 156 ETTINGER B, GENANT HK, CANN CE. "Long-term estrogen replacement therapy prevents bone loss and fractures". *Ann Intern Med* 1985, 102: 319-324.
- 157 GARNERO P, SORNAY-RENDU E, CHAPUY MC, DELMAS PD. "Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis". *J Bone Miner Res* 1996; 11: 337-349.
- 158 GARNERO P, HAUSHERR E, CHAPUY MC, GRANDJEAN H, MULLER C, CORMER C et al. "Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: The EPIDOS prospective study". *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1531-1538.
- 159 GARNERO P, SHIH WJ, GINEYTS E, KARPFB DB, DELMAS PD. "Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to treatment". *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1693-1700.
- 160 ADAMI S, PASSERI M, ORTOLANI S, BROGGINI M, CARRATELLI L, CARUSO I et al. "Effects of oral alendronate and intranasal salmon calcitonin on bone mass and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with osteoporosis". *Bone* 1995; 17: 383-390.
- 161 GHIRON LJ, THOMPSON JL, HOLLOWAY L, HINTZ RL, BUTTERFIELD GE, HOFFMAN AR, MARCUS R. "Effects of recombinant insulin like growth factor I and growth hormone on bone turnover in elderly women". *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1844-1852.
- 162 OVERGAARD K, CHRISTIANSEN C. "A new biochemical marker of bone resorption for follow-up on treatment with nasal salmon calcitonin". *Calcif Tissue Int* 1996; 59: 12-16.
- 163 MEUNIER PJ, VIGNOT E. "Therapeutic strategy in Paget's disease of bone". *Bone* 1995; 17(Sup 5): 489S-491S.
- 164 LICATA AA. "Bisphosphonate therapy". *Am J Med Sci* 1997; 313: 17-22.
- 165 ALEXANDRE CM, CHAPUY MC, VIGNON E, EDOUARD C, JOHNSTON CC, MEUNIER PJ. "Treatment of Paget's disease of bone with ethane-1, hydroxy-1, 1diphosphonate (EHPD) at a low dosage (5 mg/Kg/day)". *Clin Orthop* 1983; 174: 193-205.

- 166 MEUNIER PJ, RAVAUULT A. "Treatment of Paget's disease with etidronate disodium". En: *Paget's Disease of Bone: Clinical assesment, present and future therapy*". Ed. RF Singer, S Wallach, Elsevier, New York 1991.
- 167 REGINSTER JY, JEUGMANS-HUYNEN AM, ALBERT A, DENIS D, DEROISY R, LECART MP et al. "Biological and clinical assesment of a new bisphosphonate, in the treatment of Paget's disease of bone". *Bone* 1988; 9: 349-354.
- 168 AUDRAN M, CLOCHON P, ETHGEN D, MAZIERES B, RENIER JC. "Treatment of Paget's disease of bone with (4-chloro-phenyl) thiomethylene bisphosphonate". *Clin Rheumatol* 1989; 8: 71-79.
- 169 ROUX C, GENNARI G, FARRERONS J, DEVOGELAER P, MULDER H, KRUSE HP et al. "Comparative prospective, double-blind, multicenter study of the efficacy of tiludronate and etidronate in the treatment of Paget's disease of bone". *Arthritis Rheum* 1995; 38: 851-858.
- 170 BONJOUR JP, AMMANN P, BARBIER A, CAVERZASIO J, RIZZOLI R. "Tiludronate: bone pharmacology and safety". *Bone* 1995; 17: 473S-477S.
- 171 REGINSTER JY, TREVES R, RENIER JC, AMOR B, SANY J, ETHGEN D et al. "Efficacy and tolerability of a new formulation of oral tiludronate (tablet) in the treatment of Paget's disease of bone". *J Bone Miner Res* 1994; 9: 615-619.
- 172 GALASCO CSB. "Skeletal metastases". *Clin Orthop* 1986; September: 18-30.
- 173 KOSTENVIT PJ, SANCHEZ SWEATMAN O, ORV FW, SINGH G. "Bone cell matrix promotes the adhesion of human prostatic carcinoma cells via the alpha 2 beta 1 integrin". *Clin Exp Metastasis* 1996; 14: 19-26.
- 174 PARTIN AW, OESTERLING JE. "The clinical usefulness of prostate specific antigen: update 1994". *J Urol* 1994; 152: 1358-1368.
- 175 LORENTE JA, MOROTE J, RAVENTOS C, ENCABO G, VALENZUELA H. "Clinical efficacy of bone alkaline phosphatase and prostate specific antigen in the diagnosis of bone metastasis in prostate cancer". *J Urol* 1996; 155: 1348-1351.
- 176 DIAZ CURIEL M, CASTRO N. "Bone mineral density in the spanish population by Dual X Ray Absorptiometry (DEXA)". *Bone Miner* 1992; 17(Sup 1): 133.
- 177 SCHRÖDER FH, HERMANEK P, DENIS L, FAIR WR, GOSPODAROWICZ MK, PAVONE-MACALUSO M. "The TNM classification of prostate cancer". *Prostate* 1992; 4: 129-138
- 178 HENRY R.J. *Quimica Clinica. Bases y Principios*. Vol 1. Jims, Barcelona 1969.
- 179 BABSON AL. "The IMMULITE automated immunoassay system". *J Clin Immunoassay* 1991; 14: 83-88.

- 180 BONE SCAN. En: *The Mayo Clinic Manual of Nuclear Medicine*. First Edition. Ed. Michael K O'Connor, pp 447-454. Churchill Livingstone 1996.
- 181 ZWEIG MH, CAMPBELL G. "Receiver-Operating Characteristic (ROC) Plots: A fundamental evaluation tool in clinical medicine". *Clin Chem* 1993; 39: 561-577.
- 182 GARNERO P, DELMAS PD. "Assesment of the serum leveles of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease". *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1046-1053.
- 183 SUQUÍA B, MORALES LJ, BREÑAS MT, DÍAZ MARTÍN MA, DE LA PIEDRA C. "Comparación entre la determinación de la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina por precipitación con lectina y por ELISA en pacientes con transplante renal". *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas* 1996; 5: 129-132.
- 184 DIAZ MARTIN MA, MARTIN I, SOLDEVILLA MJ, SANCHEZ A, LOZOYA B, DÍAZ A, DE LA PIEDRA C. "Estudio de la reactividad cruzada en la determinación de la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina por dos métodos: Tandem R-Ostase y Alkphase B, el primero un IRMA y el segundo un ELISA". *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas* 1995; 4(Supp A): 21.
- 185 DELMAS PD. "Biochemical markers of bone remodeling in osteoporosis". En: *Osteoporosis*. Ed. Papapoulos SE et al., Elsevier, pp. 191-204, Amsterdam 1996.
- 186 HASSAGER C, FABBRI-MABELLI G, CHRISTIANSEN C. "The effect of the menopause and hormone replacement therapy on serum carboxyterminal propeptide of type I collagen". *Osteoporosis Int* 1993; 3: 50-52.
- 187 PARFITT AM, SIMON LS, VILLANUEVA AR, KRANE SM. "Procollagen type I carboxyterminal extension peptide in serum as a merker of collagen byosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase". *J Bone Miner Res* 1987; 2: 427-436.
- 188 RISTELI J, NIEMI S, KAUPPILA S, MELKKO J, RISTELI L. "Collagen propeptides as indicators of collagen assembly". *Acta Orthop Scand* 1995; 66(Suppl 266): 183-188.
- 189 PEDERSEN B, BONDE M. "Purification of human procollagen type I carboxy-terminal propeptide cleaved as in vivo from procollagen and used to calibrate a radioimmunoassay of the propeptide". *Clin Chem* 1994; 40: 811-816.
- 190 WINTERBOTTOM N, VERNON S, FREEMAN K, DANILOFF G, SEYEDIN A. "A serum immunoassay for the C-terminal propeptide of type I collagen". *J Bone Miner Res* 1993; 8: S341.
- 191 TAUBMAN MB, GOLDBERG B, SHERR CJ. "Radioimmnuoassay for human procollagen". *Science* 1974; 186: 1115-1117.

- 192 DELMAS PD. "Biochemical markers of bone turnover in osteoporosis". En: *Osteoporosis*. Ed. Riggs BL, Melton III LJ, Raven Press, pp 297-316, New York 1988.
- 193 EBELING PR, ATLEY LM, GUTHRIE JR, BURGER HG, DENNERSTEIN L, HOPPER JL, WARK JD. "Bone turnover markers and bone density across the menopausal transition". *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3366-3371.
- 194 SEIBEL MJ, WOITGE H, SCHEIT-NAVE, ZIPF A, DUNCAN A, NICOL P et al. "Population screening for bone resorption using pyridinium crosslinks of collagen: Comparison of direct ELISA with HPLC assays". *Calcif Tissue Int* 1993; 52 (Sup 1): S6.
- 195 ROBINS SP, BLECK D, PATERSON CR, REID DM, DUNCAN A, SEIBEL MJ. "Evaluation of urinary hydroxypyridinium crosslink measurements as resorption markers in metabolic bone diseases". *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 310-315.
- 196 ROBINS SP, DUNCAN A, RIGGS BL. "Direct measurement of free hydroxypyridinium crosslinks of collagen in urine as a new marker of bone resorption in osteoporosis". En: *Osteoporosis*. Ed. Christiansen C, Overgaard K, Osteopress Aps, pp. 465-468. Copenhagen 1990.
- 197 DELMAS PD, GINEYTS E, BERTHOLIN A, GARNERO P, MARCHAND F. "Immunoassay of pyridinoline crosslink excretion in normal adults and in Paget's disease". *J Bone Miner Res* 1993; 8: 643-648.
- 198 EASTELL R, ROBINS SP, COLWELL T, ASSIRI AMA, RIGGS BL, RUSSEL 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.
- 199 GUERRERO R, DÍAZ MARTÍN MA, DÍAZ DIEGO EM, TURBI DISLA C, RAPADO A, DE LA PIEDRA C. "New biochemical markers of bone resorption derived from collagen breakdown in the study of postmenopausal osteoporosis". *Osteoporosis Int* 1996; 6: 297-302.
- 200 COLWELL A, EASTELL R, ASSIRI AMA, RUSSEL RGG. "Effect of diet on deoxypyridinoline excretion". En: *Osteoporosis*. Ed. Christiansen C, Overgaard K. pg 590-591. Copenhagen 1990.
- 201 HASSAGER C, COLWELL A, ASSIRI AMA, EASTELL R, RUSSEL RGG, CHRISTIANSEN C. "Effect of menopause and hormone replacement therapy on urinary excretion of pyridinium cross-links: a longitudinal and cross-sectional study". *Clin Endocrinol* 1992; 37: 45-50.
- 202 OHTA T, SUGIMOTO I, MASUDA A, SOMUKAI S, SUDA Y, MAKITA K et al. "Decreased bone mineral density associated with early menopause progresses for at

- least ten years; cross-sectional comparisons between early and normal menopausal women". *Bone* 1996; 18: 227-231.
- 203 KUSHIDA K, TAKAHASHI M, KAWANA K, INOUE T. "Comparison of markers for bone formation and resorption in premenopausal and postmenopausal subjects, and osteoporosis patients". *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2447-2450.
- 204 KAMEL S, BRAZIER M, ROGEZ JC, VINCENT O, MAAMER M, DESMET G, SEBERT JL. "Different responses of free and peptide-bound cross-links to vitamin D and calcium supplementation in elderly women with vitamin D insufficiency". *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3717-3721.
- 205 KOMM BS, TERPENING CH, BENZ DJ, GRAEME KA, GALLEGOS A, KORE M et al. "Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells". *Science* 1988; 241:81-83.
- 206 ERIKSEN EF, COLVARD DS, BERG NJ, GRAHAM ML, MANN KG, SPELSBERG et al. "Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells". *Science* 1988; 241: 84-86.
- 207 HASSAGER C, RISTELI J, RISTELI L, CHRISTIANSEN C. "Effect of the menopause and hormone replacement therapy on the carboxy-terminal pyridinoline cross-linked telopeptide of type I collagen". *Osteoporosis Int* 1994; 4: 349-352.
- 208 PEDRAZZONI M, ALFANO FS, GATTI C, FANTUZZI M, GIRASOLE G, CAMPANINI C et al. "Acute effects of bisphosphonates on new and traditional markers of bone resorption". *Calcif Tissue Int* 1995; 57: 25-29.
- 209 BRIXEN K, KASSEM M, NIELSEN HK, LOFT AG, FLYVBJERG A, MOSEKILDE L. "Short term treatment with growth hormone stimulates osteoblastic and osteoclastic activity in osteopenic postmenopausal women: A dose response study". *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1865-1874.
- 210 ROSEN HN, DRESMER RP, MOSES AC, ROSENBLATT M, ZEIND AJ, CLEMENS JD et al. "Specificity of urinary excretion of cross-linked N-telopeptides of type I collagen as a marker of bone turnover". *Calcif Tissue Int* 1994; 54: 26-29.
- 211 BLUMSOHN A, NAYLOR KE, ASSIRI AMA, EASTELL R. "Different responses of biochemical markers of bone resorption to bisphosphonate therapy in Paget's disease". *Clin Chem* 1995; 41: 1592-1598.
- 212 PAPAPOULOS SE, FRÖLICH M. "Prediction of the outcome of treatment of Paget's disease of bone with bisphosphonates from short-term changes in the rate of bone resorption". *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3993-3997.
- 213 CHESNUT III CH, BELL NH, CLARK GS, DRINKWATER BL, ENGLISH SC, JOHNSTON CC et al. "Hormone replacement therapy in postmenopausal women:

- Urinary N-telopeptide of type I collagen monitors therapeutic effect and predicts response of bone mineral density". *Am J Med* 1997; 102: 29-37.
- 214 BERNARD MP, MYERS JC, CHU ML, RAMIREZ F, EIKENBERRY EF, PROCKOP DJ. "Structures of a cDNA for the pro α_2 chain of human type I procollagen. Comparison with chick cDNA for pro α_2 (I) identifies structurally conserved features of the protein and the gene" *Biochemistry* 1983; 22: 1139-1145.
- 215 DEMERS LM, COSTA L, CHINCHILLI VM, GAYDOS L, CURLEY E, LIPTON A. "Biochemical markers of bone turnover in patients with metastatic bone disease". *Clin Chem* 1995; 41: 1489-1494.
- 216 SONE T, MIYAKE M, TAKEDA N, FUKUNAGA M. "Urinary excretion of type I collagen crosslinked N-telopeptides in healthy japanese adults: Age and sex-related changes and reference limits". *Bone* 1995; 17: 335-339.
- 217 TSAI KS, PAN WH, HSU SHJ, CHENG WC, CHEN CK, CHIENG PU et al. "Sexual differences in bone markers and bone mineral density of normal chinese". *Calcif Tissue Int* 1996; 59: 454-460.
- 218 KJELDSSEN J, SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL OB, JUNKER P. "Seromarkers of collagen I and III metabolism in active Crohn's disease. Relation to disease activity and response to therapy". *Gut* 1995; 37: 805-810.
- 219 SILSAND T, REINE A, DUGAL S, LUNDE T, SMEDSRUD B, SEEBERG T. "Urinary concentration of a specific peptide of type I collagen of bone (CrossLaps): correlation to hidroxyproline". *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55:187-192.
- 220 BONDE M, QUIST P, FLEDELIUS C, RIIS BJ, CHRISTIANSEN C. "Applications of an enzyme immunoassay for a new marker of bone resorption (CrossLaps): Follow-up on hormone replacement therapy and osteoporosis risk assesment". *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 864-868.
- 221 SINGER FR. "Clinical efficacy of salmon calcitonin in Paget's disease of bone". *Calcif Tissue Int* 1991; 49(Sup 2): S7-S8.
- 222 RANDALL AG, KENT GN, GARCIA-WEBB P, BHAGAT CI, PEARCE DJ, GUTTERIDGE DH et al. "Comparison of biochemical markers of bone turnover in Paget disease treated with pamidronate and a proposed model for the relationships between measurements of the different forms of pyridinoline cross-links". *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1176-1184.
- 223 REGINSTER JY, LECART MP, DEROISY R, ETHGEN D, ZEGELS B, FRANCHIMONT P. "Paget's disease of bone treated with a five day course of oral tiludronate". *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 54-57.

- 224 O'DOHERTY DP, GERTZ BJ, TINDALE W, SCIBERRAS DG, SURVILL TT, KANIS JA. "Effects of five daily 1 h infusions of alendronate in Paget's disease of bone". *J Bone Miner Res* 1992; 7: 81-87.
- 225 DELMAS PD, MALAVAL L. "Serum bone Gla-protein is not a sensitive marker of bone turnover in Paget's disease of bone". *Calcif Tissue Int* 1986; 38: 60-61.
- 226 TORRES R, DE LA PIEDRA C, RAPADO A. "Binding of serum osteocalcin of hydroxyapatite in Paget's disease of bone". *Bone Miner* 1991; 14: 55-65.
- 227 DAVIE MW, WORSFOLD M, SHARP CA. "Differential response of serum alkaline phosphatase and serum osteocalcin in Paget's osteosarcoma". *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 194-194
- 228 RYAN PJ, SHERRY M, GIBSON T, FOGELMAN I. "Treatment of Paget's disease by weekly infusions of 3-amino hydroxypropylidene-1, 1-bisphosphonate (APD). *Br J Rheumatol* 1992; 31: 97-101.
- 229 DE LA PIEDRA C, RAPADO A, DÍAZ DIEGO EM, DÍAZ MARTÍN MA, AGUIRRE C, LÓPEZ GAVILANES E et al. "Variable efficacy of bone remodeling biochemical markers in the management of patients with Paget's disease of bone treated with tiludronate". *Calcif Tissue Int* 1996; 59: 95-99.
- 230 BETTICA P, MORO L, ROBINS SP, TAYLOR AK, TALBOT J, SINGER FR, BAYLINK DJ. "Bone-resorption markers galactosyl hydroxylysine, pyridinium crosslinks and hydroxyproline compared". *Clin Chem* 1992; 38:2313-2318.
- 231 HANKEY DP, HUGHES AE, MOLLAN RA, NICHOLAS RM. "Extracellular protein secretion of cultured normal and Pagetic osteoblasts". *Electrophoresis* 1993; 14: 644-649.
- 232 DE LA PIEDRA C, DÍAZ MARTÍN MA, DÍAZ DIEGO EM, LÓPEZ GAVILANES E, GONZÁLEZ PARRA E, CARAMELO C, RAPADO A. "Serum concentrations of carboxyterminal cross-linked telopeptide of type I collagen (ICTP), serum tartrate resistant acid phosphatase, and serum levels of intact parathyroid hormone in parathyroid hyperfunction". *Scand J Clin Lab Invest* 1994; 54: 11-15.
- 233 GARNERO P, GINEYTS E, RIOU JP, DELMAS PD. "Assessment of bone resorption with a new marker of collagen degradation in patients with metabolic bone disease". *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 780-785.
- 234 RUDNICKI M, JENSEN LT, IVERSEN D. "Collagen derived serum markers in carcinoma of prostate". *Scand J Urol Nephrol* 1995; 29: 317-321.
- 235 AKIMOTO S, AKAKURA K, SHIMAZAKI J. "Clinical usefulness of serum carboxyterminal propeptide of type I procollagen and pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen in patients with prostate cancer". *Jpn J Clin Oncol* 1996; 26: 157-163.

- 236 MILLER PD, EARDLEY I, KIRBY RS. "Prostate specific antigen and bone scan correlation in the staging and monitoring of patients with prostatic cancer". *Br J Urol* 1992; 70: 295-302.
- 237 O'DOMOGHUE JM, ROGERS E, GRIMES H, McCARTHY P, CORCORAN M, BREDIN H, GIVEN HF. "A reappraisal of serial isotope bone scans in prostate cancer". *Brit J Radiol* 1993; 66: 672-676.
- 238 GOLDBERG DM, ELLIS G. "An assesment of serum acid and alkaline phosphatase determinations in prostatic cancer with a clinical validation of an acid phosphatase assay utilizing adenosine 3'-monophosphate as substrate". *J Clin Pathol* 1974; 27: 140-144.
- 239 WAJSMAN Z, CHU T, BROSS D et al. "Clinical significance of serum alkaline phosphatase isoenzyme levels in advanced prostatic carcinoma". *J Urol* 1978; 119: 244-250.
- 240 KAMBY C, EGSMOSE C, SÖLETORMOS G, DOMBERNOWSKY P. "The diagnostic and pronostic values of serum Bone Gla Protein (Osteocalcin) in patients with recurrent breast cancer". *Scand J Clin Lab Invest* 1993; 53: 439-446.
- 241 BURLINA A, RUBIN D, SECCHIERO S, SCIACOVELLI L, ZANINUTTO M, PLEBANI M. "Monitoring skeletal cancer metastases with the bone isoenzyme of tissue unspecific alkaline phosphatase". *Clin Chim Acta* 1994; 226: 151-158.
- 242 MARCELLINI M, DE CARLI P, ABBOLITO MR, MAINIERO G, CANTIANI R. "Serum osteocalcin in monitoring bone metastases in advanced prostatic cancer". *Eur Urol* 1992; 21 (Suppl 1): 102-104.
- 243 HOUZÉ P, RANAIVOSOAR R, PROST AC, LONCHAMPT MF. "Metastases osseues des cancers de la prostate: apport du dosage spécifique de la phosphatase alkaline osseue". *Immunoanal Biol Spec* 1995; 10: 27-33.
- 244 CASETTA G, GAMBA P, PIANA P, PECCHIO F, TIZZANI A. "Measurement of skeletal alkaline phosphatase in prostatic carcinoma". *Minerva Urol Nefrol* 1995; 47: 9-12.
- 245 WITHOLD W, SCHULTE U, REINAUER H. "Method for determination of bone alkaline phosphatase activity: analytical performance and clinical usefulness in patients with metabolic and malignant bone diseases". *Clin Chem* 1996; 42: 210-217.
- 246 KOIZUMI M, YAMADA Y, TAKIGUCHI T, SUZUKI C, AKASHI T, NOMURA E et al. "Serum concentration of pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP) and carboxyterminal propeptide of human type I procollagen (PICP) in the diagnosis of bone metastases". *Kaku-Igaku* 1996; 33: 77-84.

- 247 PIOVESAN A, BERNUTI A, OSELLA G, RAUCCI CA, TORTA M, DOGLIOTTI L, ANGELI A. "Serum levels of carboxyterminal propeptide of type I procollagen in cancer patients with osteoblastic and osteolytic bone metastases". *Int J Biol Markers* 1994; 9: 243-246.
- 248 RISTELI L. "Marcadores óseos procedentes del colágeno tipo I: PICP, ICTP y PINP". *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas* 1996; 5: 81-85.
- 249 DOMINGUEZ C, SOSA M, DE LA PIEDRA C, TRABA ML. "Biochemical markers of bone formation in the study of postmenopausal osteoporosis". *Bone* 1997; 20: 33S.
- 250 TAHTELA R, THOLIX E. "Serum concentrations of type I collagen carboxyterminal telopeptide (ICTP) and type I procollagen carboxy- and aminoterminal propeptides (PICP, PINP) as markers of metastatic bone disease in breast cancer". *Anticancer Res* 1996; 16: 2289-2293.