



## BIOMARCADORES DE METABOLISMO ÓSEO Y SU UTILIDAD EN LA OSTEOPOROSIS

José Ramón Vielma<sup>1,2</sup>, David Picón-Borregales<sup>3</sup>, Nelva Lara<sup>2</sup>, Luis Gutiérrez-Peña<sup>2,3</sup>.

1. Laboratorio de Fisiología de Parásitos, Centro de Biofísica y Bioquímica (CBB), Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Altos de Pipe, estado Miranda, Venezuela.
2. Laboratorio de Análisis Químico (LAQUNESUR), Universidad Nacional Experimental Sur del Lago “Jesús María Semprum” (UNESUR), Santa Bárbara de Zulia, estado Zulia, Venezuela.
3. Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes (ULA), Mérida, estado Mérida, Venezuela.

**Correspondencia:** José Ramón Vielma Guevara. Laboratorio de Fisiología de Parásitos, Centro de Biofísica y Bioquímica (CBB), Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Altos de Pipe, estado Miranda, Venezuela.

**E-mail:** jvielma@ivic.gob.ve.

### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es describir los principales biomarcadores del metabolismo óseo, agrupados como: clásicos (específicos, de mineralización, de formación, de resorción), de estrés oxidativo y nuevos biomarcadores o biomarcadores en estudio y su utilidad en la osteoporosis y otras enfermedades óseas. Estos biomarcadores son sustancias químicas secretadas principalmente por las células óseas



(osteoblastos y osteoclastos) que se liberan al torrente sanguíneo y pueden ser determinados principalmente en sangre y/o en la orina. Otras células, e incluso glándulas endocrinas pueden producir estas sustancias o compuestos. Los biomarcadores son el reflejo de la dinámica de cada hueso de nuestro cuerpo, así como también del recambio óseo. Esta característica les confiere un valor agregado adicional y los diferencia de la densitometría ósea y la radiografía, por cuanto proporcionan un cuadro estático de un sitio específico del esqueleto, por ejemplo cadera, fémur, columna vertebral.

**PALABRAS CLAVE:** Biomarcadores del metabolismo óseo, boro, estroncio, hueso, formación ósea, resorción ósea.

## BIOMARKERS OF BONE METABOLISM AND ITS UTILITY IN OSTEOPOROSIS

### ABSTRACT

The aim of the work is to describe the main biomarkers of bone metabolism, grouped as: classical (specific, mineralization, formation, and resorption), oxidative stress, and new biomarkers or biomarkers under study, and their usefulness in osteoporosis and other bone diseases. These biomarkers are chemicals secreted primarily by bone cells (osteoblasts and osteoclasts) that are released into the bloodstream and can be determined primarily in the blood and/or urine. Other cells, and even endocrine glands, can produce these substances or compounds. Biomarkers of bone metabolism are the reflection of the dynamics of every bone in our body, as well as the bone turnover. This feature gives them added value and differentiates them from bone densitometry and x-



ray, as they provide a static picture of a specific site of the skeleton, for example hip, femur, spine.

**KEY WORDS:** Biomarkers of bone metabolism, boron, strontium, bone, bone formation, bone resorption.

## INTRODUCCIÓN

El tejido óseo está compuesto por componentes orgánicos e inorgánicos. El primero está formado en un 95% por la osteonectina, la osteocalcina, el colágeno, las glicoproteínas, lípidos y componentes celulares como los osteoblastos y osteoclastos. Por su parte, el componente inorgánico está formado por sales de fosfato y carbonato cálcico y en menor proporción por magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (K), boro (B), cobalto (Co), flúor (F), sulfatos y citratos (1-5). Este tejido sufre continuamente un recambio para mantenerse joven, con un equilibrio, en condiciones fisiológicas entre reabsorción (resorción), formación y reparación, en

respuesta a las necesidades mecánicas y metabólicas corporales (1, 4-5). El recambio óseo ocurre en pequeños focos distribuidos al azar por la superficie ósea denominados unidades de recambio óseo, en donde los osteoclastos excavan una laguna o cavidad en el hueso (resorción) y posteriormente los osteoblastos depositan matriz ósea que rellena dicha cavidad y termina mineralizándose (formación) (1, 6). La pérdida ósea ocurre tanto por aumento de la actividad osteoclástica, por disminución de la actividad osteoblástica o por ambos; por consiguiente, la masa ósea es el resultado del equilibrio y acoplamiento de estas dos actividades metabólicas



opuestas pero complementarias (1, 5-10). En los seres humanos, el ciclo del remodelamiento óseo se completa en 3 a 6 meses, y predomina la fase formativa (meses) sobre la resortiva (días) (11-12). La dinámica del remodelamiento óseo es controlada por una gran variedad de factores endógenos y exógenos, entre los cuales podemos mencionar: factores genéticos, mecánicos, vasculo-nerviosos, nutricionales, hormonales, locales, entre otros (13-14). En química analítica designamos como “analito” a toda sustancia de naturaleza química (compuesto, ión o molécula) susceptible de ser detectada (cualitativamente o cuantificada) en una muestra biológica, que nos indique una valoración (dentro de un límite o rango de valores considerados “normales” o “alterados” “altos o bajos” o “en el límite inferior o superior”) de células, órganos o sistemas (5). Tradicionalmente los biomarcadores del metabolismo óseo se

han clasificado como marcadores clásicos (de resorción ósea, de formación ósea, de mineralización, específicos), marcadores de estrés oxidativo útiles en osteoporosis y más recientemente se han incorporado como nuevos biomarcadores la relación del ligando del activador del receptor para el factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL, acrónimo en inglés) y la osteoprotegerina (relación RANKL/OPG), los micro-ácidos ribonucleicos (miRNAs) y se ha sugerido el posible papel de dos elementos trazas como el B y el estroncio (Sr) (10). El Sr es el menos abundante de los metales alcalinotérreos. Los principales minerales son la celestita, sulfato de estroncio, la estroncianita y el carbonato de estroncio. El principal vínculo del Sr al metabolismo óseo es a través del tratamiento de la osteoporosis con el ranelato de Sr (15). Por su parte, el B es un elemento no metálico esencial para las plantas y su



esencialidad en el hombre se encuentra en discusión, su principal vía de ingreso al organismo es la digestiva, principalmente a través de la ingesta de frutas y vegetales, del agua y de algunos productos de origen animal. Una vez absorbido el B es distribuido por vía sanguínea al hígado, piel, huesos, bazo, corazón y riñón; se elimina fundamentalmente a través de la orina y en pequeñas cantidades por el tracto gastrointestinal (2, 6-7, 10, 16-17). La relación más importante del B con el metabolismo óseo ocurre en las mitocondrias de las células renales en la reacción de hidroxilación de la vitamina D (6, 7, 10). El objetivo del presente trabajo es describir las principales características de los biomarcadores de metabolismo óseo, incorporando información reciente sobre el B y el Sr como posibles nuevos marcadores bioquímicos útiles en la osteoporosis, considerada como la enfermedad del siglo.

## CLASIFICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES DEL METABOLISMO ÓSEO

Con fines netamente didácticos consideramos los biomarcadores clásicos (específicos, de mineralización, de formación y resorción ósea), biomarcadores de estrés oxidativo útiles en la osteoporosis, y nuevos biomarcadores o marcadores en estudio (10, 13-14, 18).

### 1).- Biomarcadores clásicos

A).- Biomarcadores específicos. Los varones poseen dos glándulas denominadas testículos, cuya función principal es producir la hormona esteroidea testosterona. En las mujeres ésta hormona se produce en los ovarios en mucha menor cantidad que en el hombre. La función biológica de la testosterona es favorecer el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, favorece el desarrollo de la masa muscular y ósea, además del pelo



corporal. En el adulto se encarga de mantener el vigor sexual, y es muy importante en la prevención de la osteoporosis (19-20). En la determinación de testosterona el espécimen de elección es la sangre venosa tomada entre 7 y 10 am preferiblemente. El rango de los valores de referencia para este y los demás analitos citados en el texto, pueden variar de acuerdo a la técnica empleada y de acuerdo a cada laboratorio clínico. Barba-Evia, 2011 (13) señala entre 4,0-8,0 ng/mL para los hombres y <0,6 ng/mL para las mujeres. Por ensayo inmunoradiométrico (IRMA) se han señalado como valores de referencia en mujeres 0,26-1,3 ng/mL y para los hombres de 2,6-11,0 ng/mL. El hipotálamo, es la porción del encéfalo ubicada por encima de la glándula pituitaria o hipófisis, encargado de la secreción de hormonas que liberaran o frenan la producción de las hormonas producidas en la hipófisis. A éstas se les conoce como hormonas liberadoras, la

que más vinculada está al metabolismo óseo es la hormona liberadora de la tirotropina o TRH, que controla la liberación de la hormona estimulante de la tiroides o TSH. Es la tirotropina, hormona tirotrópica o TSH el biomarcador específico del metabolismo óseo, por cuanto se encarga de estimular a la glándula tiroides para que produzca las hormonas T3 y T4, las cuales son las encargadas de la regulación del metabolismo del cuerpo, la energía, el crecimiento, el desarrollo, y la actividad del sistema nervioso (19). Como valor de referencia para la TSH se pueden manejar 0,3-3,5 mU/L o 0,5 a 4,0 mU/L en muestras de suero (13). Con respecto al último marcador considerado como específico del metabolismo óseo, tenemos al cortisol (13). Cada glándula adrenal puede ser vista como dos órganos endocrinos separados en porciones anatómicas a las que señalamos como médula y corteza. Las hormonas consideradas



esenciales para nuestra vida son las sintetizadas en la corteza y es allí donde se produce el cortisol. El cortisol o hidrocortisona es una hormona de naturaleza esteroidea o glucocorticoide, que ayuda a nuestro cuerpo a controlar los niveles de glicemia, aumenta el consumo de proteínas y de grasa y la respuesta a los estímulos considerados como estresantes, tales como las infecciones, fiebre y las lesiones. Dos enfermedades están vinculadas a problemas en la corteza adrenal, estas son: el síndrome de Cushing (producido por un exceso de cortisol) y la enfermedad de Addison (producida por una deficiencia de cortisol). Los efectos nocivos sobre el hueso debido al exceso de glucocorticoides, están mediados por la acción directa del cortisol, por la reducción de la formación ósea y el aumento de la resorción ósea, y por mecanismos indirectos como la mal absorción de calcio, la hipercalciuria y el hipogonadismo. La condición de hipercortisolismo manifiesta, también

llamada síndrome de Cushing, conduce a la osteoporosis y las fracturas en hasta al 70% de los casos, incluso en presencia de la condición gonadal normal en los hombres (10). Abdel-Kader y col., en el año 2012 (21) presentan el caso de una mujer de 41 años, que acudió al servicio de urgencias con dolor osteomuscular generalizado, especialmente en el tórax, la columna y la zona inguinal. Las radiografías iniciales mostraron múltiples fracturas, en el esternón a nivel del tercio superior del cuerpo esternal, dos fracturas vertebrales dorsales severas o de grado 3 y una tercera fractura dorsal de grado 1-2. En la exploración posterior se halló hipertensión arterial y rasgos cushingoides consistentes en facies de luna llena y obesidad central. Antes de proseguir con el relato de este interesante caso clínico, llama poderosamente la atención la edad, se trata de una mujer joven con fuertes dolores, se sospecha primariamente de



síndrome de Cushing, sin embargo, el compromiso del sistema osteomuscular debió ser monitoreado. En este apartado, es importante destacar un aspecto fisiológico muy básico, pero muy útil, las hormonas de nuestro cuerpo siguen un ritmo circadiano particular, es decir, los ritmos biológicos, u oscilaciones de las variables biológicas (como los analitos) en intervalos regulares de tiempo.

En los estudios analíticos, el cortisol y la determinación de adrenocorticotropina o ACTH (hormona producida por la hipófisis que regula la secreción del cortisol) basales se encontraron elevados. El cortisol basal fue de 319 ng/mL (valores de referencia de este laboratorio: entre 50-250 ng/mL) y para la ACTH de 57,4 pg/mL (en condiciones fisiológicas es indetectable o menor de 10 pg/mL). Los niveles de cortisol libre urinario y cortisol nocturno también resultaron elevados:

847 nmol/L y 290,7 ng/mL, respectivamente. Es importante acotar que los niveles de cortisol nocturno, en condiciones fisiológicas deben ser no detectables. Pese a que la osteoporosis es una manifestación cardinal en pacientes con síndrome de Cushing, existen pocas publicaciones al respecto, a pesar que las fracturas se encuentran en un 19-50% en pacientes con esta enfermedad. Los autores finalmente concluyen considerar siempre la posibilidad de una osteoporosis secundaria, ante la aparición de una fractura espontánea, especialmente en varones y mujeres pre y perimenopáusicas, donde la frecuencia de osteoporosis secundaria es cercana o mayor del 50% (21).

B).-Biomarcadores de mineralización. La mayor parte del calcio se encuentra en el esqueleto como fosfatos, el 2-3% en los tejidos blandos y el 1% en el líquido extracelular. El calcio plasmático representa el 0,03% del





calcio total del organismo, y puede ser dividido en tres fracciones: a) unida a las proteínas y no filtrable por el riñón (40%); b) difusible pero no ionizado, formando quelatos con los aniones séricos: bicarbonato, fosfato, lactato, sulfato y citrato (13%); y c) ionizado (47%). La fracción ionizada ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es la única fisiológicamente activa y regulada homeostáticamente (22). En un estudio realizado en Venezuela en 2012, no se encontró diferencias significativas en los niveles de calcio total en el suero de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis ( $9,25 \pm 0,72$  mg/dL, rango: 8,3-10,4 mg/dL) al ser comparados con los valores obtenidos en el grupo control, constituido por mujeres posmenopáusicas sin osteoporosis ( $9,08 \pm 0,64$  mg/dL, rango: 7,3-11,6 mg/dL). La técnica empleada fue la espectroscopia de absorción atómica en llama (7). Esta técnica se considera de referencia mundial para la determinación de este analito (10).

Para la cuantificación del calcio iónico puede utilizarse la potenciometría de electrodo de ión selectivo. La potenciometría puede ser definida simplemente como la medición de un potencial en una celda electroquímica. Es la única técnica electroquímica en la que se mide directamente un potencial de equilibrio termodinámico y en la cual esencialmente no fluye corriente neta. El instrumental necesario para las mediciones potenciométricas comprende un electrodo de referencia, un electrodo indicador y un dispositivo de medida de potencial (23). En un estudio realizado en Venezuela con ésta técnica en muestras de mujeres posmenopáusicas con y sin osteoporosis nuestro grupo de investigación (6) trató de determinar los niveles de calcio iónico; no obstante, los resultados obtenidos para este analito y los registros del pH sanguíneo en las pacientes y controles fueron incompatibles con la vida, indicando en algunos casos acidosis o alcalosis, pero



sin ningún signo o síntoma, sugestivo de ello. En el grupo control se obtuvieron valores de pH de  $7,42 + 0,24$  con un rango que osciló entre 6,9-7,7 y con respecto al grupo de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis los valores fueron  $7,44 + 0,16$  con un rango entre 7,0-7,7. El error en estas determinaciones correspondió a la fase pre-analítica, donde el contacto prolongado de los especímenes (sangre total) y muestras (suero) con el oxígeno afectó el pH de las mismas; en segundo lugar, la toma de muestra con torniquete generó éxtasis venoso, pudiendo este proceso demorar más de 2 minutos por paciente. Al éxtasis venoso se le adicionó la acción de bombeo por la actividad muscular, modificando los valores del calcio iónico. Finalmente, solo en algunos casos el suero se mantuvo en anaerobiosis y se centrifugaron tapados antes de las 3 horas, preferentemente en centrífuga refrigeradas, debido a que la temperatura afecta el pH y por lo tanto

el resultado (6). El coeficiente de variación por temperatura para calcio iónico es de 0,006 mmol/L por cada 1°C (23). Los valores de referencia para suero y sangre capilar, se muestran en la tabla 2 y 3 respectivamente (24). Para el manejo clínico del paciente son considerados los siguientes valores críticos para el calcio iónico por potenciometría de electrodo ión selectivo: límite inferior  $< 0,78$  mmol/L y límite superior  $> 1,60$  mmol/L (24).

Existen un conjunto de normas sencillas a tener en cuenta para la determinación de calcio (y en general de cualquier analito) en muestras biológicas: la condición ideal es el ayuno de 12 a 14 horas, se aconseja una dieta ligera la noche anterior, minimizar el estrés antes y durante la toma de muestras, evitar la ingesta de bebidas alcohólicas y la realización de ejercicios vigorosos, al menos tres días antes a la fecha de la realización de los exámenes, suspensión de la ingesta de



anticonceptivos orales durante 7 días y reportar cualquier medicamento que se esté ingiriendo y pudiese afectar los resultados del laboratorio clínico. En el caso del calcio, la ingesta de tiazidas pueden alterar los resultados (25). Para la cuantificación de calcio y fósforo en orina de 24 horas se recomienda: usar frascos de 500 a 1000 mL de capacidad, limpios y secos; vasija de boca ancha y embudo, eliminar la primera orina de la mañana, anotar la hora y desde ese momento se recogen todas las micciones hasta esa misma hora el día siguiente, guardar en nevera a 4 °C y hasta el momento de su traslado. Cuando se trate de la determinación de calcio y fósforo en orina de 24 horas se debe considerar adicionalmente el uso del HCl 6N (30 mL) como preservante, suspender los suplementos que contengan calcio (tipo citrato de calcio, entre otros), la ingestión de grandes cantidades de fosfatos y orinas alcalinas tienden a producir resultados de falsos negativos (es decir bajos niveles de

calcio, en orinas de 24 horas) (25-28). El calcio urinario de 24 horas proviene del metabolismo general y representa la cantidad filtrada por los glomérulos y no reabsorbida en los túbulos renales, siendo los valores de referencia de hasta 250 mg/24 horas en la mujer y hasta 300 mg/24 horas en el hombre. La calciuria de 2 horas se mide en la segunda orina de la mañana recogida en ayunas, después de ingerir 200 mL de agua destilada, no se recomienda el uso de agua potable, por cuanto algunas marcas comerciales contienen calcio (29). La determinación de la relación calcio/creatinina en orina es el método utilizado en niños menores de 4 años, por lo difícil que resulta la recolección de orina de 24 horas. Los valores normales en niños mayores de 2 años en ayunas son: 0,14-0,20 mg/mg, sin condiciones de ayuno: < 0,20 mg/mg. En niños menores de 2 años: < 0,3 mg/mg. Otros estudios realizados en Venezuela han reportado valores normales de < 0,6 mg/mg para neonatos

y lactantes menores de 6 meses y de < 0,4 mg/mg para lactantes de 6 a 12 meses (30). Ambas cuantificaciones (calcio en orina de 24 horas y relación calcio/creatinina en orina parcial) son poco específicas y sensibles, al ser consideradas con los otros biomarcadores descritos en la tabla 1, pero como se trata de un marcador muy económico y accesible a cualquier laboratorio de rutina, se continúa utilizando para detectar cambios en el recambio óseo (10, 14, 29-30). El Mg, es el segundo catión intracelular más abundante del cuerpo humano después del K, siendo esencial en gran número de procesos enzimáticos y metabólicos. El Mg es un cofactor de todas las reacciones enzimáticas que involucran al ATP y forma parte de la bomba de membrana que mantiene la excitabilidad eléctrica de las células musculares y nerviosas. Una de las características más significativas del Mg es la distribución no uniforme del ión en los compartimentos líquidos del

organismo; más de la mitad de los depósitos corporales totales se localizan en el hueso y menos de un 1% en el plasma. La distribución del Mg en adultos es: en el hueso un 55%, en músculo 27%, y en tejidos blandos 20% (19, 22). En el laboratorio clínico puede determinarse Mg total en suero o plasma, Mg iónico en suero o plasma y Mg total en orina de 24 horas o relación magnesio/creatinina (o índice magnesio/creatinina) en orina de dos horas (31). Vielma y col., en el año 2012 (7) determinaron los niveles de Mg total en suero y el índice magnesio/creatinina en orina de dos horas de mujeres posmenopáusicas con y sin osteoporosis. La técnica empleada fue la espectroscopia de absorción atómica en llama empleando una lámpara de cátodo hueco multi-elemento. Los valores de Mg total en suero obtenidos para el grupo de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis fue en promedio  $2,84 \pm 0,51$  mg/dL y para el índice



magnesio/creatinina  $0,1216 + 0,0446$  mg/mg. Para el grupo control los valores de Mg total obtenidos en suero fueron en promedio  $2,48 + 0,53$  mg/dL y para el índice magnesio/creatinina fue de  $0,0905 + 0,029$  mg/mg. No existiendo diferencias al comparar entre estos dos grupos. Los valores de referencia para el Mg total por espectroscopia de absorción atómica en llama en suero son los siguientes: 1,7-2,8 mg/dL y en orina de dos horas es 6,1-8,5 md/dL (6). Pueden emplearse otras técnicas y señalarse los valores de referencias en otras unidades. Por absorción atómica en llama los valores de referencia para el Mg total en orina de 24 horas es 8,2 - 49,7 mEq/24 horas (6). El fósforo es un mineral que constituye el 1% del peso corporal total de una persona. Está presente en el ADN y ARN de cada célula. La mayor parte del fósforo en el organismo se encuentra en los dientes y en los huesos (22). El fósforo en suero y orina puede ser determinado por espectroscopia de

absorción molecular. Bajo este enfoque obtuvimos un promedio de  $3,73 + 1,02$  mg/dL en suero de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis y  $3,54 + 0,55$  mg/dL en el grupo control sin osteoporosis, sin diferencias al comparar entre grupos (6-7). En contrario, destacamos una diferencia significativa en el valor del índice de excreción urinario fósforo/creatinina en la orina de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis y sin osteoporosis ( $0,678 + 0,218$  mg/mg y  $0,489 + 0,243$  mg/mg;  $p < 0,05$  respectivamente), lo cual sugiere una pérdida mayor de fósforo en la orina de las mujeres posmenopáusicas con osteoporosis en comparación al control (7). El porcentaje de reabsorción tubular de fosfato (RTF) se puede determinar con el uso de muestras de suero y orina de 24 horas. Puede ser determinado por espectrofotometría UV. Una desventaja de esta prueba es la dependencia de la ingesta de fosfatos (32). Para el cálculo

de la RTF se emplea la siguiente fórmula:

$$RTF (\%) = 100 \times \left( 1 - \frac{Pu \times Crs}{Ps \times Cru} \right)$$

Donde:

Pu = concentración de fosfato inorgánico (mg/dL) en orina.

Ps = concentración de fosfato inorgánico (mg/dL) en suero.

Cru = concentración de creatinina (mg/dL) en orina.

Crs = concentración de creatinina (mg/dL) en suero.

Valor de referencia >85% (entre 80-90%) (32).

La eliminación renal de fosfato depende del aporte dietético de fósforo y de la acción de la PTH, aunque está influido también por otros factores (hormonas tiroideas, acidosis, corticoides, catecolaminas). En pediatría el valor de referencia para el

fósforo en orina de 24 horas es de 12,4 mg/Kg/día (33). Para finalizar con los marcadores de mineralización ósea encontramos la PTH y el calcitriol. El calcitriol o 1- $\alpha$ , 25-dihidroxicolecalciferol (abreviado 1,25-(OH)2D3) es la forma activa de la vitamina D que se encuentra en el cuerpo (vitamina D3). Lo producen los riñones que hidroxilan el 25-hidroxicolecalciferol (25-OHD, o calcifediol) el cual a su vez es previamente hidroxilado en el hígado y regula los niveles de calcio, incrementando la absorción del mismo en el tracto gastrointestinal. Por su parte la PTH o paratirina, es una hormona proteica secretada por la glándula paratiroides, que interviene en la regulación del metabolismo del calcio y del fósforo. Por radioinmunoanálisis (RIA) el valor de referencia para calcitriol es 15-60 pg/mL, con respecto a los valores de referencia para PTH se manejan 10-55 pg/mL (34).



C).- Biomarcadores de formación ósea. La fosfatasa alcalina total (FAL) es una glicoproteína tetramérica, que pertenece a la familia de proteínas unidas a las membranas plasmáticas mediante anclas GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) carboxilo terminales. La FAL tiene una vida media de 1-2 días, lo que contribuye a que su variación diurna sea mínima (14). Los valores de referencia para este analito son 0-35 U/L (13), pudiendo ser determinada por absorción molecular. La FAL cataliza la hidrólisis del 4-nitrofenilfosfato (4-NFF) formando 4-nitrofenol y fosfato inorgánico, actuando un tampón alcalino como aceptor del grupo fosfato. La reacción se sigue cinéticamente a 405 nm, a partir de la velocidad de formación del 4-nitrofenol, la cual es proporcional a la actividad FAL presente en la muestra de suero. La actividad de la FAL procede de diversos tejidos, tales como hígado, hueso, placenta, intestino y células germinales, siendo las

isoformas ósea y hepática las más frecuentes (90%) (35). Ambas se encuentran en la misma proporción en el individuo sano y se diferencian en el patrón de glicosilación, existiendo una reactividad cruzada en un 10-20%, según estudios con anticuerpos monoclonales (36). La isoforma ósea posee la ventaja de no presentar variación entre sexos y no estar influida por el ritmo circadiano, de forma que, a pesar de presentar una baja sensibilidad y especificidad en el estudio de la enfermedad metabólica ósea, resulta ser un marcador sencillo en ausencia de gestación y patología hepática (37). La osteocalcina es la proteína no colágena más abundante de la matriz extracelular. Específica del hueso y la dentina, se encuentra elevada en situaciones de recambio óseo acelerado, posee una vida media corta y se elimina por vía urinaria, por lo que sus niveles estarán incrementados en situaciones de insuficiencia renal (35, 38). Su función exacta en el



remodelamiento óseo no está bien establecida. En trabajos recientes, se ha analizado el papel que podría desempeñar la osteocalcina infra-carboxilada en la predicción de masa ósea y de riesgo de fractura (35, 39). La osteocalcina puede ser determinada mediante ELISA o RIA; además es considerado un biomarcador específico y sensible de la actividad osteoblástica (40-41). Los valores de referencia en muestras de suero oscilan entre 2-22 ng/mL (13). La colágena es una proteína sintetizada como pro-colágeno que contiene péptidos de extensión amino (N) y carboxilo (C) terminales (PINP y PICP, respectivamente, ver tabla 1). Ambos son producidos en radios equimolares de colágeno, los cuales son liberados a la circulación y pueden ser determinados mediante anticuerpos policlonales específicos con inmunoensayos (por ejemplo, sistemas de microELISA). Debe tomarse en cuenta que no todo el pro-colágeno tipo I circulante procede del

hueso, también forma parte de la piel, encías, tendones cartílago, intestino, entre otros (13). En Venezuela el grupo de González, De Freitas y Peinado en 2002 (42) determinaron la DMO y los niveles de osteocalcina y N-telopéptidos (NTX, biomarcador de resorción ósea) en 20 mujeres posmenopáusicas sin terapia de reemplazo hormonal y un mínimo de dos años de menopausia establecida. Los N-telopéptidos fueron determinados por microELISA con un valor promedio de  $42,075 \pm 10,527$  nM ECO/nM de creatinina en muestras de orinas parciales, los cuales se encuentran dentro de los valores de referencia para esta técnica de 5-65 nM ECO/nM de creatinina. Con respecto a las mediciones de osteocalcina, este grupo utilizó el RIA para su cuantificación y obtuvieron un valor promedio de  $13,03 \pm 1,162$  ng/mL, es decir, con ligera elevación para los valores de referencia de 2-12 ng/mL. Estos autores concluyen que el



verdadero valor de la aplicación de estos biomarcadores está en la evaluación de respuestas a terapias anti-resortivas, en la osteoporosis y las tasas de pérdidas óseas, ya que la sola medición de la masa ósea no es indicativo de si se está perdiendo hueso en la actualidad o si este se perdió en el pasado (42).

D).- Biomarcadores de resorción ósea. La fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRACP 5b) constituye un grupo de enzimas lisosomales, con 6 isoenzimas conocidas, entre ellas destaca la tipo 5; la cual es resistente a la inhibición por tartrato y se encuentra en hueso, bazo, placenta, macrófagos, pulmones y piel. Existe en dos sub-isoformas denominadas 5a y 5b, aunque solamente 5b (TRACP 5b) ha mostrado ser característica de los osteoclastos (13, 43-44). La TRACP 5b puede ser determinada mediante espectroscopia de absorción molecular, siendo los valores de referencia de  $< 7$  mU/mL

para muestras de suero (13). En la actualidad, los telopeptidos N- y C-terminal, conocidos como NTX y CTX, respectivamente, son los marcadores más sensibles y específicos de la resorción ósea. Estos fragmentos se forman por la actividad de la catepsina K y aparecen en cantidades significativas, tanto en sangre como en orina, donde pueden medirse por inmunoensayos específicos (14). En los procesos de resorción ósea, los osteoclastos liberan minerales y fragmentos del colágeno. Algunos de estos fragmentos peptídicos de los extremos amino o carboxilo terminales no presentan la estructura helicoidal típica de la fibra de colágeno. Las regiones telopeptídicas, que se unen a los puentes piridolínicos, pasan a la circulación. Según las fracciones que engloben se denominan:

D1).- Péptidos carboxilo terminales del colágeno tipo I (ICTP, CTX, acrónimo del inglés). Constituyen la fracción



conjunta de las regiones carboxilo terminales de la región  $\alpha$ -1 y los puentes de piridolina (11). D2).- Péptidos amino terminales del colágeno tipo I (INTP, NTX, acrónimo del inglés). Constituyen la fracción conjunta de las regiones amino terminales de las cadenas  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2, junto a los puentes de piridolina. Ambos (CTX y NTX) han mostrado una correlación significativa con la DMO en mujeres posmenopáusicas (11). La medición sérica proporciona una ventaja con respecto al ensayo en orina, porque evita el efecto aditivo de la variabilidad biológica de la excreción de creatinina urinaria (45). Existen dos ensayos para el NTX, uno urinario por ELISA y el otro automatizado tanto en suero como en orina; en ambos casos se utiliza un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cadena  $\alpha$ 2, que no reacciona con la parte lineal de la secuencia peptídica, ya que necesita de la existencia de un producto de entrecruzamiento (Pir o D-Pir) entre

dos moléculas de colágeno vecinas N-terminales; en otros términos, de un motivo conformacional para el reconocimiento antígeno-anticuerpo (14). La hidroxiprolina es un aminoácido no esencial que proviene de la hidroxilación de la prolina y constituye el 10% del contenido de colágeno maduro. La mayoría de las técnicas empleadas para su cuantificación presentan alta variabilidad (coeficiente de variación entre 10 a 12%). Puede determinarse por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, acrónimo en inglés), técnica limitada a propósitos de investigación, más que a uso clínico. El uso primordial de este biomarcador es en el seguimiento de la enfermedad de Paget. En osteoporosis presenta baja sensibilidad y si bien la determinación de hidroxiprolina urinaria fue el marcador de resorción histórico, con el tiempo ha sido reemplazado por otros más sensibles y específicos de hueso (14). La hidroxilisina es otro de los



aminoácidos procedentes del colágeno, y su derivado galactosil-OH-lisina, concretamente deriva del colágeno óseo, pero en gran proporción se encuentra también en la fracción C1q del sistema del complemento. No se reutilizan, ni metabolizan en hígado, ni están influidas por la dieta, pero se emplean poco por los problemas metodológicos que implica su cuantificación. Los puentes de piridolina han sido los biomarcadores de resorción ósea más medidos en los últimos años. Proceden de tres residuos de moléculas del tropo colágeno que se condensan para formar un anillo de piridolina. Por su estructura pueden dividirse en puentes de piridolina (Pyr), formados por dos residuos de hidroxilisina y uno de lisina, y deoxipiridolina (DPyr), formados por tres residuos de hidroxilisina. La Pyr se localiza en el hueso y el cartílago, y en pequeñas cantidades en otros tejidos (11, 46-47), mientras que la D-Pyr procede exclusivamente del hueso y la

dentina (46, 48). No obstante, como el recambio de colágeno en los otros tejidos es escaso, se acepta que la mayoría de la Pyr y, sobre todo, la D-Pyr son de origen óseo (46, 49). Esto explica la magnífica correlación existente entre la excreción de Pyr y la tasa de resorción ósea medida por estudios de cinética de calcio (50), y entre la tasa de D-Pyr y estudios de resorción ósea mediante radio-trazadores (51). Aunque están presentes en la dieta, no se absorben, y se excretan por orina en forma libre en el 30% o unidas al péptido amino terminal. Su determinación se realiza mediante HPLC o ELISA (49). Están aumentadas en todas las situaciones que cursan con un incremento de remodelamiento óseo (46, 51). La catepsina K fue descrita en 1994 a partir del análisis diferencial del ADN de osteoclastos y macrófagos en ratones. Es una proteasa de cisteína, constituida por 215 aminoácidos, secretada en forma de pro-enzima de 329



aminoácidos. Esta proteasa es expresada abundante y selectivamente en osteoclastos donde se localiza en los lisosomas, en el borde rugoso del osteoclasto maduro y en la laguna de resorción sobre la superficie ósea. Esta proteasa tiene capacidad para degradar el colágeno tipo I en las regiones helicoidal y telopeptídica, así como la de actuar a pH ácido y neutro. También se ha demostrado la propiedad de escindir el colágeno tipo II, presente en el líquido sinovial; lo cual puede ser relevante en la destrucción del cartílago en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide. El papel de la catepsina K en el proceso de resorción ósea ha quedado demostrado en la displasia ósea conocida como picnodisostosis (caracterizada por esclerosis ósea y bajo nivel de remodelado), la cual se genera por mutaciones del gen de la catepsina K. Por otra parte, la delección de este gen en ratones da lugar a osteopetrosis. Para su

medición existen varios inmunoensayos descritos (13, 52).

Para finalizar el apartado de los biomarcadores de resorción ósea mencionamos a la sialoproteína. Esta constituye entre 5-10% de la matriz no colágena del hueso, es el mayor de los productos de la síntesis de los osteoblastos y odontoblastos. Su principal función está en el proceso de adhesión de la matriz celular y en la organización supramolecular de la matriz extracelular de tejidos mineralizados. Su medición se realiza por ELISA (13).

2).- Biomarcadores de estrés oxidativo útiles en osteoporosis Los radicales libres se han visto implicados en más de 100 enfermedades desde artritis reumatoide, shock hemorrágico, hasta el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Niveles anormales de las enzimas antioxidantes peroxidada de glutatión (GPx, acrónimo del inglés), dismutasa de



superóxido (SOD, acrónimo del inglés) y la reducción del estado de los antioxidantes totales, se han visto implicados en varias infecciones y/o enfermedades (53-54). Numerosos estudios sugieren que el estrés oxidativo desempeña un papel central en el inicio y desarrollo de la osteoporosis posmenopáusicas; sin embargo, se obtuvieron resultados contradictorios en cuanto a la asociación de los biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo y dicha enfermedad (18). Sugerimos como posibles biomarcadores a la homocisteína, óxido nítrico, folato, peroxidasa de glutatión, dismutasa del superóxido y el TAP por el estudio de metanálisis de Zhou y col., 2016 (18). Por otra parte en el trabajo de Cervellati y col., 2016 (55) destacan niveles urinarios más altos de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) (en este estudio utilizado como único biomarcador de estrés oxidativo), asociados con una peor relación

RANKL/OPG en mujeres posmenopáusicas con osteopenia, en comparación al grupo control (DMO normal) y mujeres posmenopáusicas con osteoporosis. Es necesario profundizar en el potencial uso de la 8-OHdG como biomarcador de enfermedades óseas (55). Otro marcador útil en osteoporosis son los AOPPs (productos de la oxidación avanzada de las proteínas) debido a que en mujeres posmenopáusicas con osteoporosis, la elevación de este biomarcador, se asoció con una reducción de la DMO y un incremento en los biomarcadores de recambio óseo (FAL y TRACP 5b) (56). En contraposición a todo lo anterior el grupo de Sharma y col., en 2015 (57) no encuentran asociación entre la DMO y los niveles de los antioxidantes en suero de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis al compararlas con los resultados obtenidos en mujeres posmenopáusicas sin osteoporosis y en mujeres en edad reproductiva ( $p > 0,05$ ),

sin embargo, los autores apoyan la hipótesis que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en la patogénesis de la osteoporosis posmenopáusica y sus resultados son debido a lo complejo y dinámico de la relación osteoporosis-estrés oxidativo.

#### 6).- Biomarcadores en estudio y consideraciones finales

Los osteoclastos activados de forma anormal pueden conducir a una baja DMO, que causará osteopenia, osteoporosis y otros trastornos óseos. Hasta la fecha, el mecanismo de cómo los precursores de osteoclastos se diferencian en osteoclastos maduros permanece sin dilucidarse. Los micro-ácidos ribonucleicos (miRNAs, acrónimo del inglés) son nuevos factores reguladores que desempeñan un importante papel en numerosos procesos celulares, como la diferenciación celular y la apoptosis (por la regulación post-transcripcional génica). Varios estudios han revelado

que los miRNAs participan en la homeostasis ósea, incluyendo la resorción ósea, que arroja luz sobre los mecanismos subyacentes a la diferenciación de los osteoclastos (58). La identificación de miRNAs específicos, es un paso importante para nuevos enfoques de diagnóstico y con fines terapéuticos. El foco de interés en los miRNAs como biomarcadores surgió de su identificación como moléculas extracelulares en la circulación, asociados con varios tipos de cáncer y enfermedades óseas (59).

Se han identificado miARNs específicos en pacientes con fracturas osteoporóticas, en comparación con los pacientes con fracturas no osteoporóticas. Para el análisis de los denominados arreglos por PCR o “PCR-array” (acrónimo del inglés), los miARNs transcritos fueron aislados del suero de 20 pacientes con fracturas de cadera y las muestras se dividieron de la siguiente forma: 10 muestras de

fracturas osteoporóticas y 10 derivadas de fracturas no osteoporóticas. Para cada grupo de muestras, tanto al suero, hueso y plasma se les realizaron los miARN-PCR-array, identificando 83 diferentes moléculas de miRNAs. Con el análisis de validación de los miRNAs, se identificaron 9 miRNAs, a saber: miR-21, miR-23a, miR-24, miR-93, miR-100, miR-122a, miR-124a, miR-125b y miR-148a, que se incrementaron significativamente en el suero de pacientes con osteoporosis (60). En el tejido óseo de pacientes osteoporóticas, se identificó que miR-21, miR-23a, miR-24, miR-25, miR-100 y miR-125b mostraron una expresión significativamente mayor. Un total de 5 miRNAs mostraron una sobre-regulación tanto en el suero como en el tejido óseo. Este estudio reveló un papel importante para varios miRNAs en pacientes osteoporóticas y sugirió que pueden ser utilizados como biomarcadores con fines de diagnóstico y puede ser un objetivo para el

tratamiento de la pérdida ósea y la optimización de la curación de fracturas en pacientes con osteoporosis (60).

El trabajo de Gifre y col., 2017 (61) demostró que los niveles de RANKL se incrementan después de la lesión a la médula espinal (LME) y se correlaciona con la pérdida de la DMO en el fémur proximal, llegando a ser indetectable después del tratamiento con denosumab. El efecto del denosumab en la prevención de la pérdida de hueso sub-esencial, especialmente en pacientes con niveles indetectables de RANKL durante el tratamiento, sugiere un papel contributivo de RANKL en este proceso de LME. Los niveles de OPG permanecieron sin cambios entre el grupo de estudio y el grupo control.

Hoy en día, se ha prestado cada vez más atención a la osteoporosis causada por la diabetes mellitus. Los niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias en pacientes diabéticos



activan la actividad de los osteoclastos a través de la vía RANKL/OPG. El factor de transcripción nuclear SREBP2, un regulador maestro del metabolismo del colesterol, se ha encontrado implicado en la osteoclastogénesis. Zheng y col., 2017 (62) demostraron que la anhidroicaritina también disminuye el nivel de SREBP2 y de sus genes diana en osteoclastos inducidos por RANKL, sin una citotoxicidad significativa concomitante. Además, la anhidroicaritina suprimió la diferenciación de los osteoclastos inducida por RANKL. En el modelo de ratones diabéticos, la anhidroicaritina disminuyó el nivel de glucosa en la sangre y alivió la resistencia a la acción de la insulina. Más importante aún, la anhidroicaritina inhibió la diferenciación de los osteoclastos y rescató la pérdida ósea inducida por la diabetes in vivo. A juicio de estos autores, la anhidroicaritina inhibe la formación de osteoclastos y mejora la

pérdida de hueso inducida por la diabetes (62). En relación al Sr este puede intercambiarse equimolarmente con el calcio en una relación 1:10 en el hueso, e integrarse en los cristales de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), mineral del cual está constituido el hueso, sin afectar sus propiedades. De igual forma se establece que el Sr favorece la formación ósea, el aumento de la DMO, a la vez que frena la resorción del hueso. Su principal uso es en el tratamiento de las pacientes con osteoporosis, bajo la forma de ranelato de Sr, reservado a aquellos casos que poco o nada responden al tratamiento con bifosfonatos orales o intravenosos, denosumab, teriparatida y los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs) (63). Su posible inclusión como biomarcador de metabolismo óseo fue sugerida (10). No obstante, son necesarios estudios clínicos controlados para acceder a este posible rol.





Nuestro grupo de investigación es pionero en la posible relación del B y la osteoporosis en pacientes con la enfermedad en Venezuela (6-7, 10). Un aporte continuo de B sobre la ingesta dietética diaria de 2 mgB/día aseguraría un aporte continuo de B hasta las mitocondrias del riñón, para favorecer la hidroxilación hasta la forma activa de la vitamina D, el Calcitriol, con participación del citocromo P450, el oxígeno, NADPH, el Mg, la  $\alpha$ -1 hidroxilasa (64), es decir, parece existir un consenso que señala un valor agregado como elemento nutricional importante para la salud ósea del humano (65). Los estudios clínicos sobre la relación del B con la osteoporosis no son concluyentes. Entre otros factores podemos mencionar: el bajo número de pacientes, controles e incluso voluntarios incluidos en los estudios sobre el efecto del B en la osteoporosis; sin embargo, los resultados obtenidos en animales de experimentación (ratas,

cerdos y conejos) apuntan hacia un papel muy relevante del B en el metabolismo mineral y de allí sugerir su posible vínculo a la osteoporosis. La homeostasis del boro en el plasma es dinámica, por lo que resulta difícil evidenciar diferencias de este no metal en esta muestra, entre individuos alimentados con una dieta pobre, adecuada o alta en B. De igual forma es difícil acceder o poder controlar todas las posibles fuentes de alimentos que contengan B y realizar seguimientos a largo plazo (años) debido a que la osteoporosis se presenta por regla general después de los 45 años en el ser humano (64-65)

## REFERENCIAS

1. Uebelhart D, Chantraine A, Demiaux B. Use for biochemical markers to assess bone metabolism: a critical review for the rehabilitation medicine physician. *J Rehabil Sci* 1995; 8: 34-38.



2. Nielsen F. New essential trace elements for the life sciences. *Biol Trace Elem* 1990; 26: 599-611.
3. Heaney R, Recker R, Watson P, Lappe J. Phosphate and carbonate salts of calcium support robust building in osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2010; 92 (1): 101-105.
4. Hadjidakis D, Androulakis I. Bone remodelling. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1092: 385-396.
5. Arévalo E, Martínez M. Marcadores bioquímicos del metabolismo óseo. *Rev Fac Farm* 1998; 34: 14-20.
6. Mora M, Vielma JR, Arévalo E, Alarcón-Corredor OM. Boro en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis. [Trabajo especial de grado]. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. 2000, 31 pp. Disponible en Internet desde : [https://www.researchgate.net/publication/44489120\\_Boro\\_en\\_mujeres\\_postmenopausicas\\_con\\_osteoporosis\\_Marylu\\_Mora\\_Jose\\_Vielma](https://www.researchgate.net/publication/44489120_Boro_en_mujeres_postmenopausicas_con_osteoporosis_Marylu_Mora_Jose_Vielma).
7. Vielma JR, Mora-Mora M, Alarcón OM, Hernández G, Linares LJ, Urdaneta-Romero H, Arévalo-González E. Estudio comparativo de la excreción urinaria de boro, calcio, magnesio y fósforo en mujeres posmenopáusicas con y sin osteoporosis. *Invest Clin* 2012; 53 (1): 3-15.
8. Clarke B, Kosla S. Physiology of bone loss. *Radiol Clin North Am* 2010; 48(3): 483-495.
9. Álvarez L, Bonín R, De la Piedra C, Díaz A, Martínez M. Exploración bioquímica del metabolismo óseo. Segunda edición. Madrid, España. Publicaciones del hospital La Paz. 1996.
10. Vielma JR, Carrero P, Gutiérrez LV, Delgado Y, Picón D, Chirinos R.



Boro y osteoporosis, tratamiento y biomarcadores de metabolismo óseo. [Libro]. Editorial Académica Española. ISBN: 978-3-8417-5790-6. 2016. 189 pp.

11. Torres E, Mezquita P, De la Higuera M, Fernández D, Muñoz M. Actualización sobre la determinación de marcadores de remodelado óseo. *Endocrinol Nutr* 2003; 50 (6): 237-243.

12. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21: 115-37.

13. Barba-Evia JR. Marcadores de remodelado óseo y osteoporosis. *Rev Mex Patol Clin* 2011; 58 (3): 113-137.

14. Reynaga-Montecinos B, Zeni SN. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo. Utilidad clínica. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2009; 43 (2): 177-193.

15. Bernabei R, Martone AM, Ortolani E, Landi F, Marzetti E. Screening, diagnosis and treatment of osteoporosis: a brief review. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2014; 11 (3): 201-207.

16. Nielsen F. Biochemical and physiologic consequences of boron deprivation in humans. *Environ Health Perspect* 1994; 102 (7): 59-63.

17. Woods W. An introduction to boron: history, sources, uses and chemistry. *Environ Health Perspect* 1994; 102 (7): 5-11.

18. Zhou Q, Zhu L, Zhang D, Li N, Li Q, Dai P, Mao Y, Li X, Ma J, Huang S. Oxidative Stress-Related Biomarkers in Postmenopausal Osteoporosis: A Systematic Review and Meta-Analyses. *Dis Markers* 2016; 2016: 7067984. doi: 10.1155/2016/706798.

19. Isselbacher K, Braunwald E, Wilson J, Martin J, Sauci A, Kasper D. *Harrison Principios de Medicina*



- Interna. Decimotercera edición. Madrid, España. Interamericana McGraw-Hill. 1994.
20. Tuck SP, Francis RM. Testosterone, bone and osteoporosis. *Front Horm Res* 2009; 37: 123-132.
21. Abdel-Kadera N, Cardielb MH, Navarro Compana V, Piedra Priegoa J, González A. Enfermedad de Cushing como causa de osteoporosis grave. Un reto clínico. *Reumatol Clin* 2012; 8 (5): 278-279.
22. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kenelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harper Bioquímica Ilustrada. Trigésima edición. McGRAW-HILL Interamericana Editores. México DF, México, ISBN: 978-607-15-1368-7. 2016.
23. Boink AB, Buckley BM, Christiansen TF, Covington AK, Maas AH, Müller-Plathe O, Sachs C, Siggaard-Andersen O. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), scientific division: IFCC recommendation on sampling transport and storage for the determination of the concentration of ionized calcium in whole blood, plasma and serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29 (11): 767-772.
24. Tietz NW, Wu AHB. Tietz clinical guide to laboratory tests. 4th ed. Edinburgh: Elsevier Saunders. 2006.
25. Céspedes-Quevedo MC, Seringe SE. Preparación del paciente y colección de muestras para análisis de Laboratorio Clínico. *MEDISAN* 1999; 3 (1): 31-35.
26. Fischbach FT, Bawon B, Colesaco C, Debver BS, Dunning MB. Laboratory diagnostic test. Ed. New York: Lippincott; 1992.
27. Young D. Effects of drugs on clinical chemistry test. 3 ed. New York: AACC Press; 1990.



28. Needham C. Specimen collection. In: Diagnostic procedures for bacterial infections. Washington, DC: American Public Health; 1987.
29. Jamal SA, Leiter RE, Bayoumi AM, Bauer DC, Cummings SR. Clinical utility of laboratory testing in women with osteoporosis. *Osteoporos Int* 2005; 16: 534-540.
30. Sociedad venezolana de puericultura y pediatría. Pautas nacionales de hipercalciuria, capítulo de nefrología de la sociedad venezolana de puericultura y pediatría. *Arch Venez Puer Ped* 2007; 70 (1): 28-31.
31. Rondón LJ, Rayssiguier Y, Nowacki W, Mazur A. Métodos para la determinación del estado del magnesio en humanos. *Acta bioquím clín latinoam* 2014; 48 (3): 319-328.
32. Lothar T. *Clinical Laboratory Diagnostics: Use and assessment of clinical laboratory results*, English edition, 1998.
33. Fraga-Rodríguez GM, Huertes-Díaz B. Evaluación básica de la función renal en pediatría. *Protoc Diagn Ter Pediatr* 2014; 1: 21-35.
34. Navarro-Moreno MA, Alía-Ramos P. Metabolismo óseo. Vitamina D y PTH. *Endocrinol nutr* 2006; 53 (3): 199-208.
35. Romero-Barco CM, Manrique-Arija S, Rodríguez-Pérez M. Marcadores bioquímicos en osteoporosis. Utilidad en la práctica clínica. *Reumatol Clin* 2012; 8 (2): 149-152.
36. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2000; 11 (Suppl 6): 2-17.
37. Clowes JA, Hannon RA, Yap TS, Hoyle NR, Blumsohn A, Eastell R. Effect of feeding on bone turnover



- markers and its impact on biological variability of measurements. *Bone* 2002; 30: 886-890.
38. Brown JP, Albert C, Nassar BA, Adachi JD, Cole D, Davison KS, Dooley KC, Don-Wauchope A, Douville P, Hanley DA, Jamal SA, Josse R, Kaiser S, Krahn J, Krause R, Kremer R, Lepage R, Letendre E, Morin S, Ooi DS, Papaioannou A, Ste-Marie LG. Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. *Clin Biochem* 2009; 42: 929-942.
39. Booth SL, Broe KE, Peterson JW, Cheng DM, Dawson-Hughes B, Gundberg CM, Cupples LA, Wilson PW, Kiel DP. Associations between vitamin K biochemical measures and bone mineral density in men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4904-4909.
40. Seibel MJ. Biochemical markers of bone remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003; 32: 83-113.
41. Molina-Restrepo JF, González-Naranjo LA. Osteoporosis: enfoque clínico y de laboratorio. *Medicina & Laboratorio* 2010; 16: 111-140.
42. González B, De Freitas H, Peinado M. Correlación de la osteocalcina y de los n-telopéptidos con la densitometría ósea en mujeres postmenopáusicas de Cumaná, estado Sucre. *Saber* 2002; 14 (1): 48-54.
43. Mandalunis P. Remodelación ósea. *Actualiz Osteol* 2006; 2 (1): 16-18.
44. Cañabete J, Zapata I, Oltra J, Hernández P. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo en el estudio de la masa ósea en la mujer con menopausia reciente sin osteoporosis. *Med Clin (Barc)* 2005; 124 (7): 241-249.
45. Scariano JK, Garry PJ, Montoya GD, Wilson JM, Baumgartner RN.



Critical differences in the serial measurement of three biochemical markers of bone turnover in the sera of pre- and postmenopausal women. *Clin Biochem* 2001; 34: 639-644.

46. Riesco-Prieto M, Sastre-Alzamora MP. Marcadores bioquímicos del metabolismo óseo. *Medicina Balear* 1998; 13 (3): 150-158.

47. Robins SP, Duncan A, Riggs BL. Direct measurement of free hydroxypriridinium crosslinks of collagen in urine as new markers of bone resorption in osteoporosis. In: Christiansen C, Overgard K, editors. *Osteoporosis*. Copenhagen: Osteopress, 1990.

48. Eyre D. New biomarkers of bone resorption. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: A470-C470.

49. Eyre DR, Koob TJ, Van Ness KP. Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-

performance liquid chromatography. *An Biochem* 1984; 137: 380-388.

50. Eastell R, Hampton L, Colwell A. Urinary collagen crosslinks are highly correlated with radio isotopic measurements of bone resorption. In: Christiansen C, Overgaard K, editors. *Proceedings of the third International Symposium on Osteoporosis*. Denmark: Osteopress, 1990.

51. Uebelhart D, Gineyts EC, Chapuy MC, Delmas PD. Urinary excretion of pyridinium cross-links: a new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Miner* 1990; 8: 87-96.

52. Blumsohn A, Naylor K, Assiri A, Eastell R. Different responses of biochemical markers of bone resorption to bisphosphonate therapy in Paget disease. *Clin Chemistry* 1995; 41 (11): 1592-1598.

53. Becerra-Depablos G, Arévalo-González E. Envejecimiento vs.



radicales libres. Rev Facu Far 2000; 38: 20-26.

54. Vielma JR, Bonilla E, Chacín-Bonilla L, Mora M, Medina-Leendertz S, Bravo Y. Effects of melatonin on oxidative stress and resistance to bacterial, parasitic, and viral infections. Acta Tropica. 2014; 137: 81-87.

55. Cervellati C, Romani A, Cremonini E, Bergamini CM, Fila E, Squerzanti M, Greco P, Massari L, Bonaccorsi G. Higher Urinary Levels of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine Are Associated with a Worse RANKL/OPG Ratio in Postmenopausal Women with Osteopenia. Oxid Med Cell Longev 2016; 2016: 6038798. doi: 10.1155/2016/6038798.

56. Wu Q, Zhong ZM, Pan Y, Zeng JH, Zheng S, Zhu SY, Chen JT. Advanced Oxidation Protein Products as a Novel Marker of Oxidative Stress in Postmenopausal Osteoporosis. Med Sci Monit 2015; 21: 2428-2432.

57. Sharma T, Islam N, Ahmad J, Akhtar N, Beg M. Correlation between bone mineral density and oxidative stress in postmenopausal women. Indian J Endocrinol Metab 2015; 19 (4): 491-497.

58. Tang P, Xiong Q, Ge W, Zhang L. The role of microRNAs in osteoclasts and osteoporosis. RNA Biol 2014; 11 (11): 1355-1363.

59. Kocijan R, Muschitz C, Geiger E, Skalicky S, Baierl A, Dormann R, Plachel F, Feichtinger X, Heimel P, Fahrleitner-Pammer A, Grillari J, Redl H, Resch H, Hackl M. Circulating microRNA Signatures in Patients With Idiopathic and Postmenopausal Osteoporosis and Fragility Fractures. J Clin Endocrinol Metab 2016; 101 (11): 4125-4134.

60. Seeliger C, Karpinski K, Haug AT, Vester H, Schmitt A, Bauer JS, van Griensven M. Five freely circulating miRNAs and bone tissue miRNAs are



associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 2014; 29 (8): 1718-1728.

61. Gifre L, Ruiz-Gaspà S, Carrasco JL, Portell E, Vidal J, Muxi A, Monegal A, Guañabens N, Peris P. Effect of recent spinal cord injury on the OPG/RANKL system and its relationship with bone loss and the response to denosumab therapy. *Osteoporos Int* 2017; doi: 10.1007/s00198-017-4090-4.

62. Zheng ZG, Zhang X, Zhou YP, Lu C, Thu PM, Qian C, Zhang M, Li P, Li HJ, Xu X. Anhydroicaritin, a SREBPs inhibitor, inhibits RANKL-induced osteoclastic differentiation and improves diabetic osteoporosis in STZ-induced mice. *Eur J Pharmacol* 2017; 809: 156-162.

63. Picón-Borregales D, Carrero PE, Gutiérrez-Peña LV, Vielma JR. Relación del estroncio con el metabolismo mineral óseo y la osteoporosis. Una revisión de la

literatura. *Avances en Biomedicina*. 2018; 7: En prensa.

64. Vielma JR, Picón-Borregales D, Vergara MA, Carrero PE, Gutiérrez-Peña LV. El Boro, un Elemento Benéfico que ayuda a prevenir la Osteoporosis en el Humano: Una Revisión de Literatura. *Avances en Biomedicina*. 2017; 6: En prensa.

65. Sosa-Baldivia A, Ruiz Ibarra G, Robles-de La Torre RR, Gordillo-Sobrino G, Tasistro A, Etchevers-Barra JD, Reyna-Santamaría L. Five causes why boron essentiality on humans has not been confirmed: A hypothesis. *Integr Food Nutr Metab* 2016; 4: 1-5 doi: 10.15761/IFNM.1000170.