

# SISTEMA «POINT OF CARE» DE MEDICIÓN DE LA RESORCIÓN ÓSEA EN ORINA Y COMPARACIÓN CON OTROS MÉTODOS

M. GASSÓ DE CAMPOS<sup>a</sup>, J. GÓMEZ ARIAS<sup>b</sup>, M.V. CAMACHO REINA<sup>a</sup>,  
M.J. CABEZA ARROYO<sup>a</sup>, J. LARA ARENAS<sup>a</sup> Y J. GARCÍA GARCÍA<sup>a</sup>

SERVICIOS DE <sup>a</sup>ANÁLISIS CLÍNICOS Y <sup>b</sup>GINECOLOGÍA.  
HOSPITAL UNIVERSITARIO MÉDICO-QUIRÚRGICO DE JAÉN.  
JAÉN.

**Introducción.** Con la depleción estrogénica se produce un aumento del remodelado óseo, cuyo grado podemos determinar mediante el análisis de los marcadores bioquímicos.

**Objetivos.** Comparar los resultados de los marcadores de resorción CrossLaps (CTx) en orina determinados por el Sistema Osteosal-Instaquant, con otros marcadores de resorción ósea en orina.

**Material y método.** Se seleccionaron aleatoriamente 45 mujeres posmenopáusicas (edades entre 48-52 años) a las cuales se recogió la segunda micción de orina, y se determinó, hidroxiprolina/creatinina, NTx/creatinina, D-piridinolina/creatinina, calcio/creatinina, y fósforo/creatinina y Test Osteosal-Instaquant (CTx).

**Resultados.** Encontramos correlación significativa entre el sistema «point of care» (POC) del Osteosal-Instaquant/C y la determinación de NTx/C ( $p = 0,008$ ) aunque con asociación débil ( $r = 0,392$ ). Había una correlación significativa entre el Sistema Osteosal-Instaquant/C y la determinación de DPD/C (dexopiridinolina/C) ( $p = 0,002$ ) aunque nuevamente con asociación débil ( $r = 0,455$ ). Existe una correlación significativa ( $p = 0,0015$ ) con asociación ( $r = 0,463$ ), entre el Sistema Osteosal-Instaquant/C y la determinación de hidroxiprolina/C (hidroxiprolina/C). Gran asociación entre los DPD/C y el NTx/C ( $r = 0,953$  y  $p = 0,000$ ), también existe una gran asociación entre la hidroxiprolina/C y los NTx/C ( $r = 0,992$  y  $p = 0,000$ ). Gran asociación entre DPD/C e hidroxiprolina/C ( $r = 0,940$  y  $p = 0,000$ ). No existe asociación entre el NTx/C y el calcio/C. **Conclusiones.** El Test Osteosal-Instaquant<sup>TM</sup> mide CTx en orina del paciente, mediante el denominado método POC, es fácil de usar, y a la vista de las conclusiones obtenidas, podría tener utilidad en la monitorización de los tratamientos antiresortivos.

**PALABRAS CLAVES:** posmenopausia, terapia antiresortiva, predicción de pérdida ósea y de fractura, beneficio del tratamiento.

**Introduction.** With the estrogen deficit, an increase takes place of remodelled bony which degree we can determine by means of the analysis of biochemical markers.

**Objectives.** To compare the results of the markers of resorption CrossLaps (CTx) in urine determined by the Osteosal-Instaquant System, with other markers of resorption bony in urine in patient with substitutive hormonal therapy (TSH).

**Material and method.** 45 women were selected by random post-menopause (ages among 48-52 years old) to whose were picked up the second micturition of urine, and it were determined hydroxyproline/C, NTx/C, deoxypridinoline/C (DPD/C), calcium/C, phosphorus/C and Osteosal-Instaquant Test (CTx).

**Results.** We found significant correlation between the «Point care» System of Osteosal-Instaquant/C and the NTx/C determination ( $p = 0.008$ ) though with weak association ( $r = 0.392$ ). There was a significant correlation between Osteosal-Instaquant/C System and the determination of DPD/C (deoxypridinoline/C) ( $p = 0.002$ ) though again with weak association ( $r = 0.455$ ). We found significant correlation between Osteosal-Instaquant/C System and the determination of hydroxyproline/C ( $r = 0.463$  and  $p = 0.0015$ ). Great association between the DPD/C and NTx/C ( $r = 0.953$  and  $p = 0.000$ ), also exists a great association between hydroxyproline/C and NTx/C ( $r = 0.992$  and  $p = 0.000$ ). Great association between DPD/C and hydroxyproline/C ( $r = 0.940$  and  $p = 0.000$ ). Association does not exist between NTx/C and calcium/C.

**Conclusions.** The Osteosal<sup>TM</sup> Test measures CTx urine of the patient, by means of the method called POC «Point of care». It is easy to use and, in view of the obtained conclusions, it could be useful in Ambulatory clinic monitoring of antiresortive treatments.

**KEY WORDS:** postmenopause, antiresortive therapy, prediction of bone loss and fracture, treatment benefit.

Con la depleción estrogénica se produce un aumento del remodelado óseo, cuyo grado podemos determinar mediante el análisis de los marcadores bioquímicos. En los últimos años se ha puesto mucho énfasis en establecer la relación entre estas tasas de remodelado óseo, determinadas a partir de los valores en los marcadores, con la pérdida ósea y la posibilidad de fractura, y como indicadores reales del beneficio de la terapia antiresortiva. Aunque existen varios estudios que demuestran su capacidad predictora de pérdida

ósea y de posibilidad de fractura, el uso más establecido en la actualidad es el de monitorizar el tratamiento y establecer la adhesión de la paciente a la terapia<sup>1,2</sup>.

La osteoporosis es una enfermedad muy común en las personas mayores, y actualmente constituye un grave problema de salud pública, cuya importancia aumenta conforme la población envejece. Consiste en el deterioro en la microestructura del tejido óseo a consecuencia de un desequilibrio entre los procesos de formación y de degradación del hueso, que se suceden de forma continuada a lo largo de la vida. Así pues, cuando la tasa de degradación de hueso es mayor que la tasa de formación, la porosidad del tejido óseo aumenta, incrementándose considerablemente el riesgo de fractura. Estos procesos de recam-

bio se llevan a cabo por medio de los osteoblastos encargados de la formación ósea y los osteoclastos encargados de la resorción.

Los osteoclastos actúan sobre el colágeno, vertiéndose al torrente sanguíneo componentes del hueso que posteriormente se excretan a través de la orina. Estos componentes nos van a servir como marcadores e indirectamente su medición nos indicará el grado de resorción ósea. El CrossLaps (CTx) es una secuencia de 8 aminoácidos situada en el extremo C del colágeno de tipo I, que se isomeriza durante el proceso de formación del tejido óseo. Al fragmentarse las moléculas de colágeno, la presencia de esta secuencia de aminoácidos en orina indica pérdida de masa ósea. Por tanto, el índice de resorción ósea

Correspondencia: M. Gassó de Campos.  
C/Federico del Castillo, 8-5E.  
Correo electrónico: mgasso@supercable.es

es proporcional al nivel de CTx en orina<sup>3,4</sup>. Diversos estudios han demostrado que las mediciones regulares de estos marcadores óseos pueden emplearse para monitorizar tratamientos contra la resorción ósea en pacientes que sufren de osteoporosis<sup>5,6</sup>. En España hay dos millones de mujeres afectadas por esta enfermedad. Como consecuencia, se calcula que una de cada ocho personas mayores de 50 años sufrirá una fractura en la columna, mientras que una de cada tres mujeres mayores de 80 años sufrirá una fractura de cadera. La osteoporosis no presenta síntomas clínicos y no suele diagnosticarse hasta que el paciente sufre una fractura. La morbilidad y mortalidad asociadas son elevadas. Sin embargo, la osteoporosis puede prevenirse y predecirse. La posibilidad de un test rápido para la monitorización de la respuesta al tratamiento, y de fácil uso en la propia consulta, podría presentar importantes ventajas para el paciente y el médico, con respecto a las mediciones realizadas en el laboratorio. Osteosal™ es un test rápido de inmunoensayo de química seca, para la determinación cuantitativa de una secuencia específica del colágeno tipo I, CrossLaps (CTx) en orina humana, que permite al médico proporcionar resultados inmediatos al paciente mediante el denominado método «point of care» (POC), con un aparato pequeño que abre expectativas importantes en el uso de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo.

## OBJETIVO

Comparar los resultados de los marcadores de resorción (CTx) en orina determinados por el sistema Osteosal-Instaquant, que permite la medición semicuantitativa de CTx en orina de una forma rápida y en 5 minutos, normalizados con el valor de creatinina, con otros marcadores de resorción ósea en orina cuantitativos, como NTx, D-piridinolina, calcio/creatinina, en pacientes con terapia hormonal sustitutiva (THS).

## MATERIAL Y MÉTODO

Se seleccionaron aleatoriamente 45 mujeres posmenopáusicas (edades entre 48-52

años) a las cuales se recogió la segunda micción de orina, y se determinó hidroxiprolina/creatinina, NTx/creatinina, D-piridinolina/creatinina, calcio/creatinina, y test Osteosal-Instaquant (CTx). El valor de la creatinina en los ensayos realizados con el test Osteosal-Instaquant se determinó con las tiras Microalbustix™ (Bayer Corporation). El resto de los tests se normalizaron mediante la determinación de creatinina en el autoanalizador CK4® (Beckman), por el método de Jaffé cuantitativo modificado.

## SISTEMA OSTEOSAL-INSTAQUANT

Es un ensayo inmunocromatográfico que se lleva a cabo en una tira dispuesta dentro de un estuche de plástico. Dispone de una ventana de resultados en la que aparecen dos líneas marcadas por las letras C (Control) y T (Test). La línea de control debe aparecer siempre, e indica que el ensayo funciona correctamente. La línea T indica el lugar en donde se analizan los CrossLaps (CTx). El test Osteosal™ es competitivo. Se han inmovilizado anticuerpos monoclonales con gran afinidad por los CTx, sobre partículas de látex azul que se encuentran en un compartimento de fibra de vidrio. Por medio del peine recolector se introduce la muestra de orina en el Osteosal™, de manera que ésta contacta con el látex recubierto de anticuerpos.

Las moléculas de CTx presentes en la orina se unirán a los anticuerpos. La orina y el látex emigran a través de la membrana hacia las zonas de Test y Control. La intensidad de la línea aparecida es inversamente proporcional a la concentración de CTx. La línea de Test que aparece es analizada por el fotómetro Instaquant en sólo 5 minutos, éste funciona emitiendo un haz de luz mediante unos LEDs, siendo absorbido por el látex del Osteosal™. La cantidad de luz absorbida es, tras la corrección del blanco, inversamente proporcional a la concentración de CTx en orina.

El test Osteosal™ necesita normalizar la creatinina, para ello se emplean las tiras Microalbustix™ (Bayer Corporation). Después se introducen los valores de creatinina en el Instaquant™ mientras se realiza la

medición. El software del instrumento normaliza el valor de la concentración de la creatinina para la muestra.

Se determinaron además los siguientes marcadores de remodelado óseo en la segunda micción de la mañana: dexosipiridinolina (DPD) se determinó en un autoanalizador Inmunolite® (Dipesa) mediante enzimoimmunoanálisis por quimioluminiscencia, NTx® (Cross-linked N-telopéptidos tipo I) se determinó por enzimoimmunoanálisis (EIA), hidroxiprolina con dieta previa exenta de colágeno mediante el Kit Hypronosticon® (Organón), calcio y fósforo se determinaron en autoanalizador Synchron CK4® (Beckman). Todos los valores obtenidos se normalizaron referidos a la creatinina.

El sistema utilizado para el análisis de datos fue el SPSS 10 para Windows.

## RESULTADOS

Los resultados estadísticos descriptivos de los marcadores de resorción ósea quedan reflejados en la tabla 1.

La creatinina determinada por las tiras reactivas Bayer Corporation®, necesarias para la normalización de los resultados del sistema Osteosal, mostraron una correlación importante y significativa ( $r = 0,848$ ) ( $p = 000$ ), con la determinada por el método de Jaffé cuantitativo.

Existe una correlación significativa ( $p = 0,008$ ), aunque con asociación débil ( $r = 0,392$ ), entre el sistema Osteosal-Instaquant/creatinina y la determinación de NTx/creatinina (tabla 2).

Existe una correlación significativa ( $p = 0,002$ ), aunque con asociación débil ( $r = 0,455$ ), entre el sistema Osteosal-Instaquant/creatinina y la determinación de DPD/creatinina (dexosipiridinolina/creatinina) (tabla 2).

Existe una correlación significativa ( $p = 0,0015$ ) con asociación ( $r = 0,463$ ) entre el sistema Osteosal-Instaquant/creatinina y la determinación de hidroxiprolina/creatinina (hidroxiprolina/creatinina) (tabla 2).

Gran asociación entre los DPD/creatinina y los NTx/creatinina ( $r = 0,953$  y  $p = 000$ ). También existe una gran asociación entre la hidroxiprolina/creatinina y los NTx/creatinina ( $r = 0,992$  y  $p = 000$ ). Gran aso-

**Tabla 1**  
Estadísticos descriptivos

	N.º	Media	E Típico M	Mínimo	Máximo	Desv. Típica
Creatinina cuantitativa mg/l	45	73,40	4,69	12,20	158,10	31,47
Creatinina semicuantitativa mg/l	45	89,22	8,48	20	200	56,91
NTx/creatinina nM/mM	45	81,38	41,45	1,35	1.861,54	278,06
M. Osteosal/creatinina	45	0,655	0,190	-1,70	3,40	1,279
DPD/creatinina nM/hM	45	8,15	1,00	3,20	48,8	6,72
Hidroxiprolina/creatinina mg/g	44	22,14	1,53	11	66,6	10,17
Calcio/creatinina mg/g	45	223,52	28,82	35,30	1.173,80	193,33
Fósforo/creatinina mg/g	45	818,23	49,19	84,10	1.497,70	330,03

ciación entre DPD/creatinina e hidroxiprolina/creatinina ( $r = 0,940$   $p = 000$ ). No existe asociación entre el NTx/C y el calcio/C (tabla 3).

## DISCUSIÓN

La relación de los marcadores de recambio óseo con fractura ósea es incierta. A partir de estudios retrospectivos resulta difícil determinar si unos valores elevados de éstos se relacionan con una alta tasa de recambio óseo causante de la fractura, o bien se deben a cambios agudos en el recambio óseo asociados a la fractura<sup>7,8</sup>.

Para poder predecir el riesgo de fractura a partir de los valores de los marcadores, se debe relacionar los valores basales de éstos y evaluar el riesgo de fractura en estudios prospectivos<sup>9,10</sup>, y este valor predictivo se debe analizar por separado frente a las fracturas de cadera, vertebrales y otras localizaciones, debido a la heterogeneidad en su patogenia.

Se ha descrito que las mujeres menopáusicas catalogadas como perdedoras rápidas de hueso, poseen un riesgo dos veces mayor de sufrir una fractura vertebral o periférica que aquéllas consideradas como normales o perdedoras lentas<sup>11,12</sup>.

En los últimos años, se ha suscitado en numerosas ocasiones la controversia de densitometría ósea o marcadores bioquímicos. Los defensores de la densitometría llegaron a afirmar que los marcadores bioquímicos de remodelado óseo tenían una utilidad muy limitada con relación a la densitometría. Sin embargo, ésta es una cuestión bastante discutible, y la prueba es el desarrollo que ha experimentado en fechas recientes el campo de los marcadores bioquímicos del remodelado óseo. En este sentido se ha planteado si los valores de los marcadores bioquímicos se pueden considerar junto con la determinación de la densidad mineral ósea (DMO) para conseguir una mayor precisión en la predicción del riesgo de fractura, y se ha observado que las mujeres que poseen una baja masa ósea y un elevado recambio óseo tienen un riesgo mayor de fractura que aquéllas con un único factor de riesgo<sup>13</sup>.

Mientras que la relación entre los marcadores de formación ósea y el riesgo de fractura no está clara, los valores de los marcadores de resorción (tabla 4) sí se relacionan con el riesgo de fractura ósea<sup>14,15</sup>. Garnero et al<sup>16</sup> en un estudio prospectivo observaron que en las mujeres que sufrieron una fractura, durante dos años de

seguimiento, los valores de CTx libre fueron más altos que los controles sin fracturas. Además, se demostró que la DMO y CTx poseen un valor de predicción muy parecido, siendo el mejor indicador de fractura un valor elevado de CTx en personas con historia de fractura, seguido por una baja DMO y un valor alto de CTx. De esta forma, un valor elevado de CTx (por encima de 2 DE) predijo mejor la fractura que una baja DMO (menor o igual a 2,9 DE)<sup>17</sup>.

Parece que la tasa de resorción ósea predice la fractura de manera independiente de la masa ósea, por lo que estos datos sugieren que una mayor resorción ósea puede conducir a un aumento en la fragilidad del esqueleto por dos mecanismos distintos: mediados por una reducción en la masa ósea y por un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo debidos a una mayor actividad osteoclástica<sup>18</sup>. Estos datos permiten concluir que una combinación de DMO y de marcadores de resorción aumentará la especificidad para la predicción de la fractura.

El principal uso de los marcadores de recambio óseo es el de identificar a pacientes con pérdida ósea acelerada, ya que la relación entre posibilidad real de fractura determinada mediante baja DMO

**Tabla 2**

Regresiones univariantes con variable predictora Osteosal/C y variables dependientes NTx/C, DPD/C, hidroxiprolina/C, calcio/C, fósforo/C

	gl	R	R <sup>2</sup>	Error típico/Estimación	Sig	Intervalos confianza
Osteosal/NTx	43	<b>0,392</b>	0,153	1,1911	0,008	0,135-0,882
Osteosal/DPD	43	<b>0,455</b>	0,207	1,1525	0,002	-0,599-0,497
Osteosal/calcio	43	0,008	0,000	1,2944	0,961	0,046-1,243
Osteosal/hidroxiprolina	42	<b>0,463</b>	0,214	1,096	0,0015	0,022-0,888
Osteosal/fósforo	43	0,125	0,016	1,2843	0,413	-0,783-1,301

**Tabla 3**  
Asociaciones entre los distintos marcadores de resorción ósea

	n	r	p
NTx/DPD	45	0,953	0,000
NTx/hidroxirolina	45	0,992	0,000
NTx/Osteosal(CTx)	45	0,392	0,008
NTx/fósforo	45	0,323	0,030
NTx/calcio	45	-0,155	0,309
DPD/hidroxirolina	45	0,939	0,000

**Tabla 4**  
Marcadores bioquímicos de resorción ósea

#### Actividad enzimática osteoclástica

Fosfatasa ácida tartrato resistente en suero

#### Derivados de la degradación de la fase mineral del hueso

Cociente calcio/creatinina en orina

#### Derivados de la degradación del colágeno óseo

Hidroxirolina en orina

Puentes de piridinolina: piridinolina y desoxipiridinolina (PYR y DPYR)

Telepéptidos aminoterminales del colágeno I unidos por puentes de piridinolina (NTX)

Telepéptido C-terminal de la cadena alfa 1 del colágeno tipo I. (Crosslaps, CTX)

Telepéptidos carboxiterminales del colágeno I unidos por puentes de piridinolina (ICTP)

y alto recambio óseo está clara; incluso para densitometrías normales, unos valores altos de marcadores son predictivos de una pérdida de masa ósea anual elevada.

En patologías como la osteoporosis posmenopáusicas, los marcadores de remodelado óseo son tremendamente útiles. En primer lugar, asociados a la densitometría para decidir, según el estado del remodelado y de la masa ósea, si es conveniente o no realizar un tratamiento a un determinado paciente. En segundo lugar, los marcadores son ideales para el seguimiento del tratamiento. El éxito o el fracaso de un determinado tratamiento (hormonal sustitutivo, bifosfonatos, calcitonina...) podrá ser valorado dos o tres meses después de haber comenzado, antes de que sea posible detectar variaciones apreciables en la DMO, para lo que tiene que transcurrir al menos el plazo de un año<sup>19</sup>.

Por el contrario, varios estudios han demostrado que los marcadores óseos se reducen considerablemente a los 3 meses (formación ósea) y a los 6 meses (formación ósea) tras instaurar la terapia. Este retraso en el descenso de los marcadores de formación refleja el acoplamiento fisiológico de la formación a la resorción, al-

canzándose una meseta a los 6-12 meses<sup>20</sup>.

El NTx y CTx en orina parecen presentar un mayor grado de supresión que las piridolinas y otros marcadores clásicos de resorción con la terapia antirresortiva. Al comparar varios marcadores con la DMO se encontró que las mujeres que no respondían al tratamiento, según la DMO, poseían unos valores séricos de osteocalcina y fosfatasa alcalina ósea y un CTx urinario mucho mayores que las que respondían, y que el CTx fue el marcador más predictivo y sensible<sup>21</sup>.

En resumen, una determinación previa de los marcadores antes de instaurar una terapia antirresortiva y su determinación cada 3-6 meses, ayudaría a identificar a las pacientes que, *a priori*, se beneficiarán más del tratamiento. El uso de estos marcadores en mujeres que están llevando una terapia antirresortiva son de gran utilidad, ya que revelan si la mujer responde o no al tratamiento y ayudan a identificar a aquellas pacientes con mayor riesgo de pérdida ósea<sup>22</sup>. La posibilidad de disponer de métodos rápidos, fiables y de fácil uso ambulatorio para los CTx en orina sería una gran ayuda en el control del tratamiento de mujeres posmenopáusicas sometidas a THS.

## CONCLUSIONES

El test Osteosal™ mide CTx en orina del paciente mediante el denominado método POC; es fácil de usar y, a la vista de las conclusiones obtenidas, podría tener utilidad en la monitorización ambulatoria de los tratamientos antirresortivos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996;11:337-49.
2. Garnero P, Wichung J, Shih J, Gineyts E, Karpf D, Delmas P. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1693-700.
3. 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(3):780-5.
4. Bonde M, Qvist P, Fledelins C, Riis BJ, Christiansen C. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin Chem* 1994;40(11):2022-5.
5. Hannon R, Blumsolhn A, Naylor K, Eastell R. Response of biochemical markers of bone turnover to hormone replacement therapy: impact of biological variability. *J Bone Miner Res* 1993;13:1124-33.
6. Riis BJ, Overgaard K, Christiansen C. Biochemical markers of bone turnover to monitor the bone response to postmenopausal hormone replacement therapy. *Osteoporos Int* 1995;5:276-80.
7. Melton LJ, Atkinson EJ, O'Connor MK, O'Fallon WM, Riggs BL. Bone density and fracture risk in men. *J Bone Miner Res* 1998;13:1915-23.
8. Akesson K, Vergnaud P, Gineyts E, Delmas PD, Obrant KJ. Impairment of bone turnover in elderly women with hip fracture. *Calcif Tissue Int* 1993;53:162-9.
9. Hedstrom M, Sjoberg K, Svensson J, Brosjo E, Dalen N. Changes in biochemical markers of bone metabolism and BMD during the first year after a hip fracture. *Acta Oethop Scand* 2001;72:248-51.
10. Tromp AM, Ooms ME, Popp-Snijders C, Roos JC, Lips P. Predictors of fractures in elderly women. *Osteoporos Int* 2000;11:134-40.
11. Garnero P, Sornay-Rendu E, Duboeuf F, Delmas PD. Makers of bone turnover predict postmenopausal forearm bone loss over 4 years: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 1999;14:1614-21.

12. Riis BJ, Hansen MA, Jensen AM, Overgaard K, Christiansen C. Low bone mass and fast rate of bone loss at menopause equal risk factors for future fracture: a 15-year follow-up study. *Bone* 1996;19:9-12.
13. Garnero P, Hausherr E, Chapuy MC, Marcelli C, Grandjean H, Muller C, et al. Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study. *J Bone Miner Res* 1996;11:1531-8.
14. Van Daele PL, Seibel MJ, Burger H, Hofman A, Grobbee DE, Van Leeuwen JP, et al. Case-control analysis of bone resorption markers, disability, and hip fracture risk: the Rotterdam study. *BMJ* 1996;312:482-3.
15. Riis BJ, Hansen MA, Jensen AM, Overgaard K, Christiansen C. Low bone mass and fast rate of bone loss at menopause equal risk factors for future fracture: a 15-year follow-up study. *Bone* 1996;19:9-12.
16. Garnero P, Hausherr E, Chapuy MC, Marcelli C, Grandjean H, Muller C, et al. Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study. *J Bone Miner Res* 1996;11:1531-8.
17. García Pérez MA, Moreno-Mercer J, Cano A. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo: su utilidad en el tratamiento de la osteoporosis. *Progresos de Obstetricia y Ginecología* 2002;45:391-7.
18. Parfitt AM. Bone age, mineral density, and fatigue damage. *Calcif Tissue Int* 1993;53(Suppl): 82-5.
19. Delmas PD, Ardí P, Gamero P, Dain MP. Monitoring individual response to hormone replacement therapy with bone markers. *Bone* 2000;26:553-60.
20. Johansen JS, Riis BJ, Delmas PD, Christiansen C. Plasma BGP: an indicator of spontaneous bone loss and of the effect of oestrogen treatment in postmenopausal women. *Eur J Clin Invest* 1998;18:191-5.
21. Garnero P, Gineyts E, Arbault P, Christiansen C, Delmas PD. Different effects of bisphosphonate and estrogen therapy on free and peptide-bound bone cross-links excretion. *J Bone Miner Res* 1995;10:641-9.
22. García Pérez MA, Moreno-Mercer J, Cano A. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo: su utilidad en el tratamiento de la osteoporosis. *Progresos de Obstetricia y Ginecología* 2002;45:391-7.