Niveles de referencia de osteocalcina en población sana de México

Jesús Nieto-Flores, José Rafael Villafán-Bernal, Edgar Alfonso Rivera-León, Iris Monserrat Llamas-Covarrubias, Mercedes Elvira González-Hita, Juan Luis Alcalá-Zermeno y Sergio Sánchez-Enríquez

Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Guadalajara, Jalisco, México

Resumen

Introducción: *Se ha demostrado que la osteocalcina tiene una relación inversa con la glucemia, resistencia a la insulina y adiposidad.* **Objetivo:** *Determinar la concentración sérica normal de osteocalcina en adultos sanos mexicanos y compararlos con los reportados en otras poblaciones.* **Método:** *Se determinó la concentración sérica de osteocalcina carboxilada y pobremente carboxilada en 100 adultos sanos mediante inmunoensayo enzimático; se calculó la concentración de osteocalcina total. Se hizo una comparación descriptiva con valores de otras poblaciones reportadas en la literatura.* **Resultados:** *Las medianas de las concentraciones de osteocalcina carboxilada y pobremente carboxilada fueron 3.22 ng/mL y 1.61 ng/mL, respectivamente; la media de osteocalcina total fue 7.40 ± 5.11 ng/mL. No hubo diferencia significativa entre los valores de osteocalcina total en nuestra población y los de poblaciones en las que se utilizaron métodos de cuantificación similares al nuestro.* **Conclusión:** *La concentración sérica promedio de osteocalcina total en la población analizada fue de 7.40 ng/mL. Las variaciones sutiles entre poblaciones son atribuibles a factores genéticos y poblacionales, sin embargo, el método de cuantificación fue el único que se comprobó influye significativamente en los niveles de osteocalcina en poblaciones sanas.*

PALABRAS CLAVE: *Osteocalcina. Concentración sérica. Osteogénesis. Glucemia.*

Abstract

Introduction: *Osteocalcin has been shown to have an inverse relationship with blood glucose, insulin resistance and adiposity.* **Objective:** *To determine osteocalcin normal serum concentration in Mexican healthy adults and compare it with values reported in other populations.* **Method:** *Carboxylated and undercarboxylated osteocalcin serum concentrations were determined in 100 healthy adults by means of enzyme immunoassay; osteocalcin total concentration was calculated. A descriptive comparison was made with other populations' values reported in the literature.* **Results:** *Carboxylated and undercarboxylated osteocalcin median concentrations were 3.22 ng/mL and 1.61 ng/mL, respectively. Mean total osteocalcin was 7.40 ± 5.11 ng/mL. There was no significant difference between the osteocalcin values in our population and those of populations where similar quantification methods to ours were used.* **Conclusion:** *Osteocalcin total serum concentration mean in the analyzed population was 7.40 ng/mL. There are subtle variations between populations that are attributable to genetic and population factors; however, the quantification method was the only variable that was shown to significantly influence on osteocalcin levels in healthy populations.*

KEY WORDS: *Osteocalcin. Serum concentration. Osteogenesis. Blood glucose.*

Correspondencia:
Sergio Sánchez-Enríquez
E-mail: serlucis@hotmail.com

Fecha de recepción: 14-04-2016
Fecha de aceptación: 09-05-2016
DOI://dx.doi.org/10.24875/GMM.18002564

Gac Med Mex. 2018;154:185-189
Disponible en PubMed
www.gacetamedicademexico.com

Introducción

La osteocalcina (OC) es un péptido de 49 aminoácidos codificado en el gen *BGLAP* y producido principalmente por los osteoblastos. Este péptido es el segundo más abundante en el hueso, solo después del colágeno. La OC tiene funciones osteogénicas y hormonales. Posterior a su síntesis en el retículo endoplásmico rugoso, la OC es carboxilada en sus residuos de ácido glutámico en las posiciones 17, 21 y 24, respectivamente, dando como resultado la osteocalcina carboxilada (OCc), la cual comprende 95 % de la OC corporal total.[1] Esta carboxilación es mediada por una carboxilasa dependiente de vitamina K y dicho proceso confiere a la OCc gran afinidad por la hidroxiapatita. La fracción pobremente carboxilada de la osteocalcina (OCnc) puede ser obtenida por carboxilación parcial durante su síntesis o descarboxilación de la OCc generada por el microambiente ácido inducido por los osteoclastos durante la resorción ósea.[2]

Las funciones de la OC dependerán del tejido donde actúe y del grado de carboxilación. En el hueso, la OC aumenta la formación ósea y mejora las propiedades mecánicas del mismo mientras que estimula la diferenciación osteoclástica. El efecto neto es formación, remodelación y mantenimiento óseo.[2,3]

Inicialmente, la OC se consideraba una hormona exclusiva del metabolismo óseo, sin embargo, gracias a los estudios realizados por Lee et al., se demostró asociación entre metabolismo energético y óseo, donde la OCnc tiene una relación inversa con la glucemia, resistencia a la insulina y adiposidad. Además, la OC aumenta la expresión y secreción de insulina en las células beta pancreáticas y la secreción de adiponectina desde el adipocito.[1] En pacientes con diabetes mellitus existen niveles disminuidos de OCnc y estos correlacionan negativamente con peso, índice de masa corporal y niveles de glucosa plasmática en ayuno, por lo que se ha propuesto a la OC como un predictor y una opción terapéutica de dicha enfermedad.[2] Por otro lado, la OC se ha visto implicada en la fertilidad, ya que correlaciona significativamente con los niveles de testosterona libre en la población masculina.[2] Finalmente, la OC pudiera influir en el desarrollo de trastornos del afecto y ansiedad, ya que se ha demostrado que inhibe la producción de GABA por el estriado y el hipocampo, donde aumenta la síntesis de neurotransmisores monoaminérgicos, con lo que disminuyó la ansiedad y la depresión en un modelo murino.[2,4]

El mecanismo exacto de cómo la OC realiza esta vasta gama de funciones se desconoce. Sin embargo, se ha identificado al receptor GPRC6A como el posible mediador exclusivo de las funciones de la OC, ya que el fenotipo de ratones *knock-out* de GPRC6A es muy similar a los *knock-out* de osteocalcina. A su vez, se ha identificado que las vías de señalización que dicho receptor estimula terminan en la expresión de genes que mejoran el perfil metabólico como el receptor gamma activado del proliferador de peroxisomas (PPAR-γ, *peroxisome proliferator activated receptor gamma*) y de genes que aumentan la esteroidogénesis, como el elemento de unión de respuesta al AMPc (CREB, *cAMP response element-binding*), todo por un mecanismo ligado a proteínas G. A pesar de esto, no se ha descrito la estructura molecular de dicho receptor ni su mecanismo de unión con la OC, por lo que sigue siendo solo una posibilidad.[2]

Actualmente la OC es utilizada como un marcador de formación ósea, tanto en la investigación como en la clínica. Entre sus aplicaciones destacan la determinación del riesgo de fracturas, de respuesta terapéutica a bisfosfonatos y remplazo hormonal, monitoreo de actividad metastática ósea, monitoreo de mieloma múltiple y respuesta a la administración de hormona de crecimiento en trastornos por deficiencia de esta, entre otras.[5-8]

Método

Se reclutaron 100 adultos clínicamente sanos en el Programa de Detección de Diabetes y Síndrome Metabólico del Laboratorio de Bioquímica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética, Investigación y Bioseguridad del centro y se alineó a las normas y principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki, ratificada en la 18.ª Asamblea Médica Mundial. Después de firmar el consentimiento informado se obtuvo la historia clínica y se realizó la exploración física, con la toma de las mediciones pertinentes para descartar hipertensión arterial, sobrepeso, obesidad y síndrome metabólico, utilizando los criterios y métodos estipulados en el Séptimo Reporte del Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, la Organización Mundial de la Salud y en el Adult Treatment Panel III, respectivamente.[9-11]

Posterior a un ayuno de 12 horas, se realizó la toma de muestra sanguínea para las determinaciones bioquímicas. Se excluyeron los individuos que reunían criterios para diabetes tipo 2, síndrome metabólico, hipertensión arterial sistólica, que indicaron alguna patología que pudiese alterar los niveles de OC o que

consumían medicamentos que pudieran influir en los niveles de OC: insulina, glucocorticoides, anticonceptivos orales, vitamina D, vitamina K, bisfosfonatos, calcio, calcitriol, tiazolidinedionas o anticoagulantes.

Todas las muestras sanguíneas obtenidas fueron centrifugadas y separadas para posteriormente almacenar los sueros a –20 °C. La determinación de OCc se hizo mediante inmunoensayo enzimático (EIA) tipo sándwich, que utiliza anticuerpos monoclonales dirigidos contra los fragmentos que contienen el residuo 17-γ-carboxiglutámico, específico para OCc (Gla-OC MK-111®, Takara Bio Inc., Japón). Dicha prueba tiene coeficientes intra e interensayo de 3.3-4.8 y 1.0-2.4, respectivamente. El ensayo para OCnc utiliza la misma técnica y se dirige contra los fragmentos que contengan los residuos 21 y 24 glutámicos, los cuales son específicos para OCnc con 5 % de reactividad cruzada con OCc (Glu-OC MK-118®, Takara Bio Inc., Japón). Dicha prueba tiene coeficientes intra e interensayo de 4.6-6.7 y 5.7-9.9, respectivamente. Para el cálculo de OCt se realizó la suma aritmética de los valores de OCc y OCnc, conforme se indica en diferentes publicaciones.[12-15]

El análisis estadístico se llevó a cabo con los programas SPSS versión 18.0 y Graphpad Prism versión 5. Se tomó como significativo un nivel de confianza de 95 % y un valor de $p < 0.05$. Para verificar una distribución normal en las variables determinadas se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se obtuvo media aritmética, desviación estándar, error estándar de la media y rango. Para el análisis inferencial se utilizó t de Student para variables con distribución normal, mientras que para variables con distribución no normal se utilizaron chi cuadrado, Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney.

Resultados

Se cuantificaron las concentraciones de OCc y OCnc de 78 mujeres y 22 hombres clínicamente sanos, con una edad promedio de 45.4 ± 5.9 años y se calcularon los niveles de osteocalcina total (Oct). La mediana de las concentraciones de OCc y OCnc fue de 3.22 ng/mL y 1.61 ng/mL, respectivamente; la media de la concentración sérica de OCt fue de 7.40 ± 5.11 ng/mL (Figura 1). Las características de los sujetos estudiados se presentan en la Tabla 1.

Con la finalidad de comparar los niveles de OCt de la población mexicana sana se recopiló información de este parámetro en controles sanos de diferentes poblaciones (Tabla 2), tanto de estudios transversales analíticos como de estudios de casos y controles. La mediana de la concentración de OCt en población

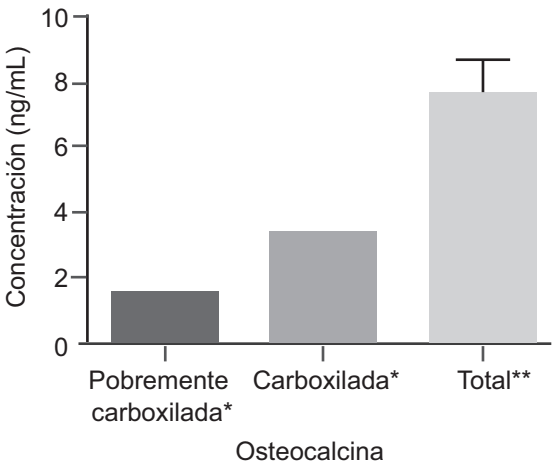

Figura 1. *Concentraciones séricas de las variantes de osteocalcina. *Mediana. ** Media.*

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de 100 adultos sanos en quienes se cuantificó la concentración sérica de las variantes de osteocalcina

Sexo	n
Masculino	22
Femenino	78
	Media ± DE
Edad (años)	45.4 ± 5.9
Peso (kg)	72.13 ± 14.8
Talla (cm)	161.05 ± 7.4
Presión arterial sistólica (mm Hg)	113.25 ± 10.96
Presión arterial diastólica (mm Hg)	74.9±7.51

australiana fue 6.6 ng/mL;[16] en turcos, de 8.82 ± 4.03 ng/mL y en estadounidenses, de 4.4 ± 1.4 ng/mL.[17,18] En población marroquí, la media de los niveles séricos de OCt fue de 18.3 ± 5.3 ng/mL, en brasileños de 33.2 ± 5.1 ng/mL y en austriacos de 40.0 ± 21.3 ng/mL, valores significativamente mayores en comparación con los obtenidos en nuestra población ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.0001$, respectivamente).[19-21]

Discusión

La principal utilidad clínica de la osteocalcina es la de un marcador de recambio óseo que puede ser aplicado a diferentes patologías como osteoporosis, enfermedad de Paget y neoplasias óseas.[2,3,22,23] A su vez, la OC puede ser empleada como indicador de riesgo cardiovascular,[24] riesgo metabólico y control glucémico en pacientes diabéticos.[25] Por lo anterior, consideramos de suma importancia disponer de un rango de referencia específico en la población mexicana.

En nuestro estudio, los rangos de normalidad de las concentraciones séricas de OCc, OCnc y Oct fueron

Tabla 2. Comparación de las concentraciones de osteocalcina y algunas variables clínicas y demográficas entre distintas poblaciones

Población	Oct (ng/mL)	Edad (años)	IMC (kg/m^2)	H/M	CrS (mg/dL)	Método	Referencia
Mexicana (n=100)	7.40 ± 5.11	45.4 ± 5.9	27.46 ± 5.14	22/78	0.88 ± 0.2	EIA	—
Australiana (n=37)	6.6†	62 ± 3***	25 ± 1*	20/17	1.0 ± 0.07	RIA	16
Turca (n=20)	8.82 ± 4.03†	54.35 ± 3.17***	26.73 ± 4.07†	0/20	--	ELISA	17
Estadounidense (n=20)	4.4 ± 1.4†	54.6 ± 11.7***	27.8 ± 2.7†	10/10	--	RIA	18
Marroquí (n=35)	18.3 ± 5.3*	53.2 ± 8***	25.4 ± 4.1†	35/0	--	EQm	19
Brasileña (n=24)	33.2 ± 5.1**	46.5 ± 1.1†	26.5 ± 0.6†	10/14	--	IRMA	21
Austriaca (n=588)	40.0 ± 21.3***	84.2 ± 6.3***	25.4 ± 4.8***	--	--	EQm	20

*p < 0.01, **p < 0.001, ***p < 0.0001, †Valor no significativo

Oct, osteocalcina total; IMC, índice de masa corporal; H/M, hombre/mujer; CrS, creatinina sérica; EIA, electroinmunoensayo; RIA, radioinmunoensayo; EQm, electroquimioluminiscencia; IRMA, ensayo inmunorradiométrico

3.22 ng/mL, 1.61 ng/mL (medianas) y 7.40 ± 5.11 ng/mL (media), respectivamente. Los valores de las concentraciones séricas de OC dependen de diferentes factores, entre los cuales destacan variaciones genéticas, raza, edad, sexo, vitamina D y geografía. Estudios de gemelos han demostrado que 80 % de la variación en la concentración sérica depende de la expresión genética,[26] lo que pudiera explicar las variaciones entre razas, menores en la caucásica y mayores en la negra.[27] La edad también influye en el nivel de OC: es mayor en niños y adolescentes, que tienen más capacidad osteogénica, que en adultos. Las mujeres suelen tener una menor concentración de osteocalcina en el periodo premenopáusico debido a que los estrógenos tienen un efecto inhibitorio en la síntesis de OC y existe aumento esperado de OC en la posmenopausia. La vitamina D es un estimulador de la transcripción del gen *BGLAP* y, por ende, las concentraciones de osteocalcina son menores en poblaciones con baja ingesta de esta o menor exposición a la luz solar.[28,29] Finalmente, la OC es degradada por enzimas renales, por lo que el deterioro de la función renal aumentará los niveles circulantes de dicha hormona.[27]

Al comparar nuestros valores con los de otras poblaciones del resto del mundo no encontramos diferencia estadística con los valores obtenidos en australianos, turcos y norteamericanos. Sin embargo, los valores que mostraron ser significativamente distintos fueron los obtenidos en población marroquí, brasileña y austriaca. Partiendo de la amplia heterogeneidad entre estas poblaciones no pudiéramos atribuir las diferencias a factores genéticos y ambientales, puesto que estos grupos humanos difieren ampliamente en la dieta que consumen, su genética y la geografía del lugar donde residen, a pesar de lo cual sus rangos de normalidad no difieren significativamente entre sí, como se esperaría. Lo que parece marcar la diferencia entre los grupos parece ser el método de cuantificación de la hormona, puesto que podemos hacer dos grandes grupos: los que usaron inmunoensayo enzimático, ELISA y radioinmunoensayo) contra los que utilizaron ensayo inmunorradiométrico y electroquimioluminiscencia). Existen numerosos métodos para cuantificar los niveles de OC, todos utilizan la interacción antígeno-anticuerpo como medio para identificar a la molécula de interés (OC en nuestro caso) y pueden ser divididos en tres grupos: basados en radiación, enzimáticos y por electroquimioluminiscencia. Los primeros son el radioinmunoensayo y el ensayo inmunorradiométrico, que emplean anticuerpos marcados con radiación, los cuales son cuantificables al unirse al antígeno (OC).[30] Los ensayos enzimáticos son el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y el inmunoensayo enzimático, que cuantifican el antígeno utilizando anticuerpos ligados a una enzima; después de la reacción antígeno-anticuerpo se agrega un sustrato para la enzima que resulta en una reacción colorimétrica medible.[31] Finalmente, la electroquimioluminiscencia se fundamenta en la unión de anticuerpos marcados con un material que después de un estímulo eléctrico da lugar a una reacción luminiscente cuantificable.[32]

Se ha demostrado alta correlación entre los valores de OC obtenidos por ELISA, inmunoensayo enzimático y radioinmunoensayo.[33]Sin embargo, los valores obtenidos por ensayo inmunorradiométrico suelen ser tres

a cuatro veces mayores. No encontramos estudios que correlacionen el método de electroquimioluminiscencia con ELISA, inmunoensayo enzimático y radioinmunoensayo, aun así, se reportan rangos hasta cinco veces mayores utilizando este método.[34] Las posibles razones de estas discrepancias se centran en la sensibilidad y especificidad particular de cada método y del laboratorio que produce el kit, así como del tipo de anticuerpos que se utiliza para la identificación de la molécula.

Ya que la OC intacta es una molécula inestable en el plasma, los métodos de cuantificación emplean la determinación de fragmentos, particularmente la suma del segmento aminoterminal (aa. 1-19) y medio (20-43), ya que es la parte de las moléculas que contiene los residuos de ácido glutámico carboxilables, otra razón responsable de la variabilidad en las mediciones.[22,33]

Conforme nuestro conocimiento, esta es la primera descripción de las concentraciones séricas de OCc, OCnc y OCt en individuos sanos de una población mexicana. Estamos conscientes que estos valores fueron obtenidos en un subgrupo poblacional representado por residentes del occidente de México, sin embargo, al no existir un consenso nacional pueden ser usados como referencia para investigaciones posteriores en diferentes regiones del país.

Los factores que afectan las concentraciones de OC son diversos, sin embargo, el método de cuantificación parece ser el más importante, por lo que es imperativo estandarizar el proceso de medición de dicha hormona.

Financiamiento

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología Jalisco-Universidad de Guadalajara (COECyTJAL), proyecto 25-718-2008, otorgado al doctor Sergio Sánchez Enríquez.

Bibliografía

1. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. Cell. 2007:130(3):456-469.
2. Li J, Zhang H, Yang C, Li Y, Dai Z. An overview of osteocalcin progress. J Bone Miner Metab. 2016;34(4):367-379.
3. Chapurlat RD, Confavreux CB. Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. Rheumatology (Oxford). 2016 ;55 (10):1714-1725.
4. Oury F, Khrimian L, Denny CA, Gardin A, Chamouni A, Goeden N, et al. Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions. Cell. 2013:155(1):228-241.
5. Power MJ, Fottrell PF. Osteocalcin: diagnostic methods and clinical applications. Crit Rev Clin Lab Sci. 1991:28(4):287-335.
6. Civitelli R, Armamento-Villareal R, Napoli N. Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. Osteoporos Int.2009:20(6):843-851.
7. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. Clin Biochem Rev. 2005:26(4):97-122.
8. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: Part II: Clinical applications in the management of osteoporosis. Clin Biochem Rev. 2006:27(3):123-138
9. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, et al. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 Report. JAMA. 2003:289(19):2560-2572.
10. Organización Mundial de la Salud. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Serie de Informes Técnicos Núm. 797. Ginebra, Suiza: OMS: 1990.
11. National Institutes of Health. Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). NIH Publication 01-3670. Bethesda, Md: National Institutes of Health; 2001.
12. Price PA, Lothringer JW, Nishimoto SK. Absence of the vitamin K-dependent bone protein in fetal rat mineral. Evidence for another gamma-carboxyglutamic acid-containing component in bone. J Biol Chem. 1980:255(7):2938-2942.
13. 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(1):17-23.
14. 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(12):1389-1398.
15. Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ, Bréart G, Kamihagi K, Delmas PD. Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: the EPIDOS Study. J Clin Endocrinol Metab. 1997:82(3):719-724.
16. Pietschmann P, Schernthaner G, Woloszczuk W. Serum osteocalcin levels in diabetes mellitus: analysis of the type of diabetes and microvascular complications. Diabetologia. 1988:31(12):892-895.
17. Akin O, Göl K, Aktürk M, Erkaya S. Evaluation of bone turnover in postmenopausal patients with type 2 diabetes mellitus using biochemical markers and bone mineral density measurements. Gynecol Endocrinol. 2003:17(1):19-29.
18. Rosato MT, Schneider SH, Shapses SA. Bone turnover and insulin-like growth factor I levels increase after improved glycemic control in noninsulin-dependent diabetes mellitus. Calcif Tissue Int. 1998:63(2):107-111.
19. Achemlal L, Tellal S, Rkiouak F, Nouijai A, Bezza A, Ghafir D, et al. Bone metabolism in male patients with type 2 diabetes. Clin Rheumatol. 2005:24(5):493-496.
20. Dobnig H, Piswanger-Sölkner JC, Roth M, Obermayer-Pietsch B, Tiran A, Strele A, et al. Type 2 diabetes mellitus in nursing home patients: effects on bone turnover, bone mass, and fracture risk. J Clin Endocrinol Metab. 2006:91(9):3355-3363.
21. Cutrim DM, Pereira FA, De-Paula FJ, Foss MC. Lack of relationship between glycemic control and bone mineral density in type 2 diabetes mellitus. Braz J Med Biol Res. 2007:40(2):221-227.
22. Shankar S, Hosking DJ. Biochemical assessment of Paget's disease of bone. J Bone Miner Res. 2006:21(Suppl 2):P22-P27.
23. Coleman R, Brown J, Terpos E, Lipton A, Smith MR, Cook R, et al. Bone markers and their prognostic value in metastatic bone disease: clinical evidence and future directions. Cancer Treat Rev. 2008;34(7):629-639.
24. Magni P, Macchi C, Sirtori CR, Corsi-Romanelli MM. Osteocalcin as a potential risk biomarker for cardiovascular and metabolic diseases. Clin Chem Lab Med. 2016;54(10):1579-1587.
25. Villafán-Bernal JR, Llamas-Covarrubias MA, Muñoz-Valle JF, Rivera-León EA, González-Hita ME, Bastidas-Ramírez BE, et al. A cut-point value of uncarboxylated to carboxylated index is associated with glycemic status markers in type 2 diabetes. J Investig Med. 2014:62(1):33-36.
26. Kelly PJ, Hopper JL, Macaskill GT, Pocock NA, Sambrook PN, Eisman JA. Genetic factors in bone turnover. J Clin Endocrinol Metab. 1991:72(4):808-813.
27. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. Physiol Rev. 1989:69(3):990-1047
28. O'Connor E, Molgaard C, Michaelsen KF, Jakobsen J, Cashman KD. Vitamin D-vitamin K interaction: effect of vitamin D supplementation on serum percentage undercarboxylated osteocalcin, a sensitive measure of vitamin K status, in Danish girls.Br J Nutr. 2010;104(8):1091-1095.
29. Stroud ML, Stilgoe S, Stott VE, Alhabian O, Salman K. Vitamin D-A review. Aust Fam Physician. 2008:37(12):1002-1005.
30. Giton F, Caron P, Bérubé R, Bélanger A, Barbier O, Fiet J. Plasma estrone sulfate assay in men: Comparison of radioimmunoassay, mass spectrometry coupled to gas chromatography (GC-MS), and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Clin Chim Acta. 2010;411(17-18):1208-1213.
31. Leguin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Clin Chem. 2005;51(12):2415-2418.
32. Carrozza C, Corsello SM, Paragliola RM, Ingraudo F, Palumbo S, Locantore P, et al. Clinical accuracy of midnight salivary cortisol measured by automated electrochemiluminescence immunoassay method in Cushing's syndrome. Ann Clin Biochem. 2010;47(Pt 3):228-232.
33. Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. Ann Clin Biochem. 2000;37(Pt 4):432-446.
34. Levinger JD, Zajac EG. Osteocalcin, undercarboxylated osteocalcin, and glycemic control in human subjects. En: Karsenty G. Translational endocrinology of bone. EE. UU.: Elsevier; 2013.