



Ciência Rural

ISSN: 0103-8478

cienciarural@mail.ufsm.br

Universidade Federal de Santa Maria
Brasil

Cardoso, Mauro José Lahm; Costa, Fabiano Séllos; Muniz, Lucy Marie Ribeiro; Melussi, Maíra;
Valério, Maria Aparecida

Marcadores do metabolismo ósseo em gatos

Ciência Rural, vol. 40, núm. 8, agosto, 2010, pp. 1765-1769

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33117729010>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Marcadores do metabolismo ósseo em gatos

Bone metabolism markers in cats

Mauro José Lahm Cardoso^{I*} Fabiano Séllos Costa^{II} Lucy Marie Ribeiro Muniz^{III}
Maíra Melussi^{IV} Maria Aparecida Valério^I

RESUMO

A formação e reabsorção óssea são processos contínuos no organismo e uma das maneiras de avaliar as alterações, a intensidade ou alterações desse processo é pela mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo no soro ou na urina. Os objetivos deste estudo foram identificar se os testes comerciais para detectar osteocalcina (OC), peptídeo aminoterminal do procolágeno tipo I (PINP) e telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP) em seres humanos podem ser utilizados em gatos; e mensurar os valores de OC, PINP e ICTP e correlacioná-los com a densitometria mineral óssea (DMO) em gatos adultos jovens. As médias das concentrações séricas da OC e do ICTP obtidas foram, respectivamente, $0,15 \pm 0,03 \text{ ng mL}^{-1}$ e $8,59 \pm 5,78 \text{ ng mL}^{-1}$. A média ($\pm DP$) da DMO apresentada foi $1,40 \pm 0,23 \text{ mmAl}$. Os marcadores do metabolismo ósseo apresentaram baixa correlação entre si e com a DMO. Este estudo concluiu que o teste comercial para mensuração da OC e ICTP em seres humanos podem ser utilizados em gatos, e o teste comercial para mensuração do PINP em seres humano não é viável para essa espécie.

Palavras-chave: marcadores, metabolismo, osso, osteocalcina, ICTP.

ABSTRACT

Bone formation and resorption are continuous processes and a tool to evaluate alterations these activities is to measure seric or urinary markers of bone metabolism. The aims of this study were to identify if commercial sets available

to detect human osteocalcin, (OC) amino-terminal propeptides of procollagen type I (PINP), type-I collagen carboxi-terminal telopeptide (ICTP) are also available for usage in domestic cats; measure seric levels of OC, PINP and ICTP; correlate findings with bone mineral density (BMD) in young adult cats. OC and ICTP means ($\pm SD$) was $0.15 \pm 0.03 \text{ ng mL}^{-1}$ and $8.59 \pm 5.78 \text{ ng mL}^{-1}$, respectively. BMD while $1.40 \pm 0.23 \text{ mm Al}$. Bone metabolism markers showed low correlation between then and also BMD. This paper concludes that commercial sets designed for OC and ICTP measures in humans may be used for same purpose in cats to evaluate bone metabolism activity alterations and that kits used for PINP in human should not be used to evaluate in cats.

Key words: markers, metabolism, bone, osteocalcin, ICTP.

INTRODUÇÃO

A mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo quantifica em tempo real a atividade de formação ou reabsorção das células ósseas, enquanto a densitometria mineral e as radiografias ósseas não o fazem em tempo real (COLEMAN, 1994). Diferentemente de biopsias ósseas repetidas, mensurações dos marcadores ósseos séricos ou urinários não interferem no metabolismo ósseo (ALLEN, 2003).

^IHospital Veterinário, Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), campus Luiz Meneghel (CLM), Bandeirantes, BR 369, Km 54, CP 261, 86360-000, Bandeirantes, PR, Brasil. E-mail: maurolahm@uenp.edu.br. *Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES, Brasil.

^{III}Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Botucatu, Botucatu, SP, Brasil.

^{IV}Médica Veterinária Autônoma, Londrina, PR, Brasil.

Os marcadores bioquímicos da remodelação óssea podem ser divididos em: de formação e de reabsorção óssea e podem ser dosados tanto no sangue, como na urina (DELMAS et al., 1993). Os marcadores bioquímicos do remodelamento (*turnover*) ósseo são enzimas sintetizadas por osteoblastos e osteoclastos, ou compostos orgânicos liberados durante a síntese e reabsorção da matriz óssea (SEIBEL, 2000). O objetivo da mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo é a correlação das concentrações séricas ou urinárias com a atividade dos osteoblastos (formação) e dos osteoclastos (reabsorção) (ALLEN, 2003).

Os marcadores da formação óssea incluindo a osteocalcina (OC), a fosfatase alcalina total (FAT), a fosfatase alcalina óssea (FAO), o peptídeo carboxiterminal do procolágeno tipo I (PICP) e o peptídeo aminoterminal do procolágeno tipo I (PINP) são detectados somente no soro. Os marcadores da formação óssea incluindo a fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) e o telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP), a piridinolina (U-PYD), deoxipiridinolina (U-DPD), a hidroxiprolina (U-HYP), a porção aminoterminal do procolágeno I (U-NTX) e a porção carboxiterminal do procolágeno I (U-CTX) podem ser detectados no soro ou na urina (DELMAS, 2001; ALLEN, 2003).

A sensibilidade e especificidade dos marcadores da formação e da reabsorção óssea em animais necessitam de comprovação, portanto são necessários trabalhos que correlacionem as concentrações destes com os achados da histomorfometria e da densitometria mineral óssea (DMO). O hipertireoidismo felino, conforme descrito por COSTA (2002), pode provocar diminuição da densidade mineral óssea; entretanto, este trabalho não correlacionou os marcadores do metabolismo ósseo com as alterações da densitometria óssea. Foi realizada recentemente a mensuração na urina e no soro de marcadores da formação e reabsorção óssea em gatos (DELAURIER et al., 2004).

Em relação à radiografia simples, a DMO, além de detectar a osteopenia, possui a vantagem de melhorar a identificação e a quantificação das alterações regionais ou sistêmicas (ALLEN et al., 2000), porém poucos centros veterinários utilizam esse meio diagnóstico na prática clínica. Um dos inconvenientes da densitometria óssea é a incapacidade de distinguir se a alteração foi provocada por efeitos da formação ou da reabsorção óssea. Já os marcadores do metabolismo ósseo mensurados na urina ou no soro são específicos para identificar qual fase do remodelamento ósseo está ocorrendo, ou seja, formação ou reabsorção (ALLEN, 2003).

Os objetivos deste estudo foram identificar se os testes comerciais para detectar osteocalcina (OC), peptídeo aminoterminal do procolágeno tipo I (PINP) e telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP) em seres humanos podem ser utilizados em gatos; e mensurar os valores de OC, PINP e ICTP e correlacioná-los com a densitometria mineral óssea (DMO) em gatos adultos jovens.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em 14 gatos sem raça definida, sendo nove fêmeas e cinco machos, não castrados, com idade entre um e três anos. O estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo (SP).

Os animais permaneceram em gaiolas individuais de ferro esmaltado, foram alimentados com ração seca comercial e água à vontade e dispunham de local para movimentação. Os animais estavam vacinados, vermifugados e livres de ectoparasitas.

As coletas de sangue, para obtenção do soro, foram realizadas entre nove e 10 horas da manhã, para minimizar a variação (LIESEGANG et al., 1999). As amostras de sangue obtidas da veia jugular foram colocadas em tubos contendo gel ativador de coágulo e centrifugadas a 2000 x giros, por 10 minutos, em menos de uma hora após a coleta. Em seguida, fracionava-se o soro obtido em cinco frascos de 1,2mL para congelamento a -70°C, em freezer, até o momento da realização dos testes.

Para a mensuração das concentrações séricas do PINP (Procollagen PINP, Orion Diagnostica, Espoo, Finlândia), do ICTP (ICTP, Orion Diagnostica, Espoo, Finlândia) e da osteocalcina (Osteocalcina, DSL, Texas, USA), utilizaram-se testes comerciais humanos. Os protocolos recomendados pelos fabricantes para a realização das avaliações foram seguidos. Mensuraram-se todas as amostras em duplicata e obteve-se a concentração a partir da média dos resultados. Quando o coeficiente de variação foi maior que 15%, nas amostras em duplicata, estas eram excluídas do estudo. O teste detecta concentração de ICTP de humanos entre 0-50µg l⁻¹, com sensibilidade mínima de 0,4µg l⁻¹. O teste detecta concentração de osteocalcina de humanos entre 0-60µg ml⁻¹, com sensibilidade mínima de 0,3ng ml⁻¹.

Foram utilizados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) da mensuração em duplicata das amostras para determinar a precisão

intraensaio dos marcadores do metabolismo ósseo séricos e a média do CV para a precisão interensaio. Para a determinação da precisão, foram feitos *pool* (n=16) das amostras e este foi testado seis vezes dentro do mesmo teste.

A avaliação da densidade mineral óssea (DMO) da extremidade distal do rádio direito foi realizada pela técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas por RAHAL et al. 2002), em quatro momentos. Para melhor análise sequencial dos valores densitométricos, padronizou-se a seleção da região da metáfise localizada 5mm acima da epífise.

A análise estatística das variáveis foi realizada considerando-se a técnica de análise de variância para medidas repetidas, o teste de Fisher e o teste de Tukey. Para a interpretação das letras, deve-se considerar que duas médias seguidas pelo menos de uma mesma letra não diferem com nível de 5% de significância. Para o estudo da correlação entre as variáveis, utilizou-se o coeficiente de correlação linear de Pearson.

RESULTADOS

Os resultados das concentrações séricas da osteocalcina e do ICTP séricos e dos valores da DMO estão descritos na tabela 1. Os testes comerciais para mensuração da osteocalcina e do ICTP em soro humano detectaram esses marcadores no soro felino. O teste para mensuração do PINP humano não detectou o PINP no soro felino. Os marcadores do metabolismo ósseo apresentaram baixa correlação entre si e com a DMO. Os marcadores do metabolismo ósseo apresentaram baixa correlação (Tabela 2) com a DMO (-0,15 com a osteocalcina e -0,06 com o ICTP) e isso também ocorreu entre a OC e o ICTP, em que a correlação foi de -0,21. O coeficiente de variação (CV) das amostras medidas em duplicatas foi usado para a determinação da precisão intraensaio. O CV para OC e ICTP foram, respectivamente, de 8,13 e 4,96. O CV do *pool* de amostras da OC e do ICTP foram, respectivamente, de

Tabela 1 - Média, desvio padrão e intervalo da concentração sérica da osteocalcina (OC) e do telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP) e valores da densidade mineral óssea (DMO) em milímetros de alumínio (mmAl), em gatos saudáveis (n=14).

	Média ± DP	Intervalo
DMO (mmAl)	1,40 ± 0,23	1,03-1,68
OC (ng ml ⁻¹)	0,15 ± 0,03	0,12-0,19
ICTP (ng ml ⁻¹)	8,59 ± 5,78	1,51-9,92

Tabela 2 - Correlação entre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e a densidade mineral óssea em gatos saudáveis (n=14).

	DMO	OC	ICTP
Densidade mineral óssea (DMO)	-	-0,15	-0,06
Osteocalcina (OC)	-	-	-0,21
Telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP)	-	-	-

10,99 e 3,65 e o coeficiente de variação das amostras foram definidas como a precisão interensaio para cada ensaio.

DISCUSSÃO

Embora haja descrições da mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo em gatos (ARCHER & TAYLOR, 1996; DELAURIER et al., 2004), é a primeira vez que são correlacionados marcadores do metabolismo ósseo com a densitometria mineral óssea nessa espécie.

Os resultados da OC descritos por ARCHER & TAYLOR (1996) variaram de zero a 0,25ng ml⁻¹, enquanto neste estudo o intervalo foi de 0,12-0,19ng ml⁻¹ (média 0,15ng ml⁻¹). Essa diferença provavelmente é decorrente da idade dos gatos visto que ARCHER & TAYLOR (1996) usaram animais com três a 18 anos de idade, enquanto que na presente pesquisa essa variabilidade etária foi menor, de um a três anos.

Em cães com idade entre um e dois anos e entre três e sete anos, foi encontrada concentração sérica de osteocalcina de 13,62ng mL⁻¹ e 4,9ng mL⁻¹, respectivamente (ALLEN et al., 1998). Os valores são superiores aos descritos em gatos e esse fato provavelmente é decorrente do fim do crescimento do esqueleto, que em gatos ocorre aproximadamente aos nove meses de idades, idade do fechamento completo das placas de crescimento (DELAURIER et al., 2004). No entanto, segundo esses mesmos autores, a maturidade do esqueleto de gatos acontece por volta dos dois anos, época em que ocorre redução dos marcadores da formação óssea. Para comprovar essa hipótese, seria necessário um estudo dos marcadores ósseos em gatos com idade inferior a 12 meses. Outro fator que deve ser ressaltado foi o fato de ter sido utilizado teste específico para cães, para a mensuração da OC em cães, enquanto que, nos gatos, se utilizou teste para osteocalcina humana. O teste comercial para osteocalcina de cães não está disponível comercialmente.

A conservação da capacidade de detecção pelos testes é um ponto crítico da mensuração dos

produtos da degradação do colágeno. Porém, já foi descrita a capacidade de detecção entre o soro de equinos e os testes para PICP e ICTP de humanos (PRICE et al., 1995; PRICE et al., 2001) e entre o soro canino e o teste de ICTP humano (PHILIPPOV et al., 1995; ALLEN et al., 1998). Os resultados deste estudo confirmam que o teste comercial para detecção de ICTP no soro humano pode ser usado para a mensuração sérica do ICTP em gatos, e isso já havia sido descrito tanto no soro, quanto na urina dessa espécie (DELAURIER et al., 2004).

Não se observou capacidade de detecção do teste comercial para mensuração do PINP em humanos, no soro dos gatos deste estudo, e isso já havia sido descrito em cães (ALLEN et al., 1998). Provavelmente esse evento se deve às baixas concentrações desse marcador nos felinos ou à necessidade de teste espécie-específico.

Até a realização deste estudo, não havia dados acerca dos valores do ICTP sérico, mensurados por radioimunoensaio, em gatos. No entanto, havia sido descrita a mensuração do ICTP sérico utilizando outros métodos, como ELISA (DELAURIER et al., 2004), portanto a comparação entre os resultados aqui encontrados e os obtidos por esses autores não foi possível. Contudo, em cães com idade entre um e sete anos a concentração do ICTP sérico foi de 1,0 a 18,2 ng mL⁻¹ (ALLEN et al., 1998; BREUR et al., 2004). Estes valores são semelhantes aos observados nos gatos deste estudo, onde a concentração sérica de ICTP foi de 8,59±5,78 ng mL⁻¹ (1,51-9,92 ng mL⁻¹).

Neste estudo, não se observou correlação significativa negativa ou positiva entre a OC e o ICTP. Porém, era esperado que houvesse correlação entre os marcadores de formação e reabsorção óssea, fato já verificado em gatos (DELAURIER et al., 2004), em cães (ALLEN et al., 2000) e em equinos (PRICE et al., 1995). Segundo DELAURIER et al. (2004), a correlação indica que, em gatos saudáveis com o esqueleto maturo, os processos de formação e reabsorção óssea poderão estar intimamente associados. Alguns gatos deste estudo tinham idade inferior a dois anos, idade inferior à época da maturidade do esqueleto (DELAURIER et al., 2004), e esse fato pode ter contribuído com a falta de correlação. Em cães com esqueleto imaturo, não há associação entre absorção e reabsorção óssea (ALLEN et al., 2000) e isso pode ter ocorrido neste estudo.

A DMO é uma técnica padrão-ouro de avaliação da atividade das células ósseas (DELAURIER et al., 2004) que neste estudo não apresentou correlação com a OC e o ICTP. Este resultado, provavelmente, é

decorrente do equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea em animais adultos, por ação combinada dos osteoblastos e osteoclastos (FROST, 1992). Se houvesse predomínio do processo de formação, era esperado que houvesse correlação entre a OC e a DMO. Em humanos, foi descrita a correlação entre os níveis séricos da OC e a formação óssea mensurados pela histomorfometria óssea (EASTELL et al., 1988) e entre os níveis séricos do ICTP e a reabsorção óssea (ERIKSEN et al., 1993).

A razão da baixa correlação entre a OC e o ICTP e entre eles e a densitometria mineral óssea não pode ser esclarecida neste estudo, pois a idade, o sexo, a raça, a dieta, o exercício e as alterações circadianas fazem com que ocorra grande variação nas concentrações dos marcadores do metabolismo ósseo em humanos (WATTS, 1999) no entanto, não foram publicados trabalhos, em felinos, avaliando esses parâmetros nos níveis séricos da OC e ICTP. Essa lacuna de conhecimento deve ser preenchida com novos estudos. Nesta pesquisa, foram adotadas medidas para minimizar as alterações circadianas, como a realização da coleta de sangue no mesmo horário e adaptação dos animais à mesma dieta e aos mesmos cuidados gerais.

Os resultados deste estudo indicam que a OC e o ICTP não devem ser utilizados isoladamente para avaliar o remodelamento ósseo em gatos. Também são sugeridos novos estudos utilizando outros marcadores do metabolismo ósseo e correlacionando-os com a DMO e a histomorfometria, antes da utilização clínica do ICTP e da OC.

CONCLUSÃO

Com este trabalho, é possível concluir que testes comerciais para mensuração da osteocalcina e do ICTP, por RIE, em humanos, podem ser usados em gatos com o objetivo de avaliar as alterações no remodelamento ósseo, enquanto o teste para avaliação do PINP não deve ser utilizado em gatos saudáveis.

Além disso, conclui-se que a OC e o ICTP em gatos com idade entre um e três anos não apresentam correlação entre si, bem como com a DMO. A mensuração sérica dos marcadores da formação óssea (OC) ou da reabsorção óssea (ICTP) representa um meio simples e não invasivo de avaliação do metabolismo ósseo.

São necessários mais estudos antes da aplicação clínica dos marcadores do metabolismo ósseo em gatos, em virtude da baixa correlação entre os marcadores e a densidade mineral óssea.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento das pesquisas relacionados ao metabolismo ósseo felino e hipertireoidismo felino.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, L.C. et al. A comparison of two techniques for the determination of serum bone-specific alkaline phosphatase activity in dogs. **Research Veterinary Science**, v.68, p.231-235, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/rvsc.1999.0369>>. Acesso em: 10 dez. 2005. doi:10.1053/rvsc.1999.0369.
- ALLEN, M.J. Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. **Veterinary Clinical Pathology**, v.32, p.101-113, 2003.
- ALLEN, M.J. et al. Serum markers of bone metabolism in dogs. **Research Veterinary Science**, v.59, p.250-254, 1998. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288\(03\)00110-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288(03)00110-3)>. Acesso em: 10 dez. 2005. doi: 10.1016/S0034-5288(03)00110-3.
- ARCHER, J.T.; TAYLOR, S.M. Alkaline phosphatase bone isoenzyme and osteocalcin in the serum of hyperthyroid cats. **Canadian Veterinary Journal**, v.37, p.735-739, 1996.
- BREUR, G.J. et al. Markers of bone metabolism in dog breeds of different size. **Research Veterinary Science**, v.76, p.53-55, 2004. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288\(03\)00110-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288(03)00110-3)>. Acesso em: 13 fev. 2005. doi: 10.1016/S0034-5288(03)00110-3.
- COSTA, F.S. **Tirotoxicose experimental em gatos: efeitos sobre o tecido ósseo, níveis séricos de fosfatase alcalina e metabolismo de cálcio e fósforo**. 2002. 101f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, SP.
- DELAURIER, A. et al. A comparison of methods for measuring serum and urinary markers of bone metabolism in cats. **Research Veterinary Science**, v.77, p.29-39, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.02.007>>. Acesso em: 01 maio, 2005. doi: 10.1016/j.rvsc.2004.02.007.
- DELMAS, P.D. Bone marker nomenclature. **Bone**, v.28, p.575, 2001.
- DELMAS, P.D. et al. Immunoassay of pyridinoline crosslink excretion in normal adults and in Paget's disease. **Journal Bone Mineral Research**, v.8, p.643-648, 1993.
- EASTELL, R. et al. Bone formation rate in older normal women: concurrent assessment with bone histomorphometry, calcium kinetics, and biochemical markers. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v.67, p.741-748, 1998.
- ERIKSEN, E.F. et al. Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation to bone histomorphometry. **Journal Bone Mineral Research**, v.8, p.127-132, 1993.
- FROST, H.M. Perspectives: bone's mechanical usage windows. **Bone Mineral**, v.19, p.257-271, 1992.
- LIESEGANG, A. et al. Diurnal variation in concentrations of various markers of bone metabolism in dogs. **American Journal Veterinary Research**, v.60, p.949-953, 1999.
- PHILIPPOV, J.P. et al. Changes in serum carboxyterminal telopeptide of type I collagen in an experimental model of canine osteomyelitis. **Calcified Tissue International**, v.57, p.152-154, 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF00298436>>. Acesso em: 13 fev. 2004. doi: 10.1007/BF00298436.
- PRICE, J.S. et al. Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses. **Equine Veterinary Journal**, v.27, p.201-207, 1995.
- PRICE, J.S. et al. Biochemical markers of bone metabolism in growing throughbreds: a longitudinal study. **Research Veterinary Science**, v.71, p.37-44, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/rvsc.2001.0482>>. Acesso em: 01 maio, 2005. doi: 10.1053/rvsc.2001.0482.
- RAHAL, S.C. et al. Densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. **Ciência Rural**, v.32, p.421-425, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000300009>>. Acesso em: 05 abr. 2007. doi: 10.1590/S0103-84782002000300009.
- REMES, T. et al. The association of bone metabolism with bone mineral density, serum sex hormone concentrations, and regular exercise in middle-aged men. **Bone**, v.34, p.439-447, 2004.
- SEIBEL, M.J. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. **Osteoporosis International**, v.11, p.18-29, 2000.
- WATTS, N.B. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, v.45, p.1359-1368, 1999.