

Guadalix S¹, Martínez-Conde L², Martínez Díaz-Guerra G¹, Vargas C², Hawkins F¹

1 Servicio de Endocrinología

2 Servicio de Bioquímica

Hospital Universitario 12 de Octubre - Madrid

PINP en pacientes con insuficiencia hepática: Comparación de dos métodos de medida y asociación con diferentes parámetros bioquímicos

Correspondencia: Sonsoles Guadalix Iglesias - Hospital Universitario 12 de Octubre - Servicio Endocrinología - Centro Actividades Ambulatorias (3^a B) - Avda. de Córdoba, s/n - 28041 Madrid (España)
Correo electrónico: sonsoguadalix@gmail.com

Fecha de recepción: 08/02/2013

Fecha de aceptación: 18/03/2013

Resumen

Introducción: El propéptido N-terminal del colágeno tipo I (PINP) es un marcador de formación ósea. El PINP en suero se encuentra en forma trimérica y monomérica. Hay dos métodos automatizados para su determinación. R-PINP (Roche Diagnostics) determina ambas formas (PINP total). IDS-PINP (IDS iSYS N-Mid® Vitro) determina la fracción trimérica (PINP intacta).

Objetivo: Comparar ambos métodos.

Material y método: Se reclutaron 81 pacientes (64 hombres y 17 mujeres, edad media de 53 ± 8 años) con insuficiencia hepática terminal. Se midió PINP por ambos métodos, creatinina, PTH, 25-OH-vitamina D, beta-crosslaps (β -CTX), desoxipiridinolina (Dpyr) y la función hepática. Se midió la densidad mineral ósea (DMO) en columna lumbar y cuello femoral (Hologic®, QDR 4500). La comparación entre ambos métodos se realizó por análisis de Bland-Altman y Passing Bablok.

Resultados: R-PINP mostró valores mayores que IDS-PINP ($85,03 \pm 56,67$ vs. $55,22 \pm 32,81$ ng/mL, $p < 0,001$). La correlación entre ambos métodos fue $r = 0,81$ ($p < 0,01$) y el análisis de regresión de Passing-Bablok $Y = 0,570 [0,475-0,669] X + 7,724 [2,130-12,542]$.

Conclusión: Existe una buena correlación entre ambos métodos en pacientes con insuficiencia hepática, si bien no son proporcionales ni intercambiables.

Palabras clave: PINP, marcadores de remodelado óseo, densitometría ósea, insuficiencia hepática.

PINP in patients with hepatic insufficiency: Comparison of two methods of measurement and association with different biochemical parameters

Summary

Introduction: N-terminal propeptide of type 1 collagen (PINP) is a marker for bone formation. Blood PINP is found in trimeric and monomeric forms. There are two automated methods for its determination. R-PINP (Roche Diagnostics) determines both forms (Total PINP). IDS-PINP (IDS iSYS N-Mid® Vitro) determines the trimeric part (Intact PINP).

Objective: To compare the two methods.

Material and method: 81 patients (64 men and 17 women, average age of 53 ± 8 years) with terminal hepatic insufficiency were recruited. Creatinine, PTH, 25-OH-vitamin D, beta-crosslaps (β -CTX), desoxypyridinoline (Dpyr), hepatic function and PINP with both methods, were measured. Bone mineral density (BMD) was measured (Hologic®, QDR 4500) in the lumbar spine and femoral neck. The comparison between the two methods was carried out using a Bland-Altman and Passing-Bablok analysis.

Results: R-PINP showed higher values than IDS-PINP (85.03 ± 56.67 vs. 55.22 ± 32.81 ng/mL, $p < 0.001$). The correlation between the two methods was $r = 0.81$ ($p < 0.01$) and the Passing-Bablok regression analysis $Y = 0.570 [0.475-0.669] X + 7.724 [2.130-12.542]$.

Conclusion: There is a good correlation between the two methods in patients with hepatic insufficiency, although not proportional or interchangeable.

Key words: PINP, bone turnover markers, bone mineral density, liver insufficiency.

Introducción

Los marcadores de remodelado óseo (MRO) proporcionan información acerca del riesgo de fractura y pueden ser útiles en la monitorización del tratamiento de la osteoporosis, tanto con fármacos antirresortivos como con anabólicos¹. Los primeros marcadores de formación ósea empleados fueron la osteocalcina y la fosfatasa alcalina ósea (FAO). Ambos tienen varias limitaciones. La osteocalcina puede proceder de otros tejidos, circula de forma intacta y en fragmentos, su expresión se regula por la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ y por los corticoides, es de limitado valor en pacientes con insuficiencia renal y poco estable a temperatura ambiente². Con respecto a la FAO, puede verse afectada por patologías hepáticas³.

El colágeno tipo I constituye el 90% de las proteínas óseas y se sintetiza como procolágeno tipo I. En el procesamiento extracelular del procolágeno tipo I se liberan el fragmento amino terminal del colágeno tipo I (PINP) y el fragmento carboxi terminal (PICP). Estos propéptidos circulan en la sangre y se emplean como marcadores de formación ósea.

Las ventajas preanalíticas de PINP incluyen una baja variabilidad diurna, intra-individual y estabilidad a temperatura ambiente. Se puede determinar tanto en suero como en plasma, y sus concentraciones no se ven afectadas por la ingesta de alimentos, a diferencia de los marcadores de resorción ósea^{4,5}.

Actualmente el PINP se considera uno de los marcadores de formación con mayor rendimiento

clínico. Así, se ha descrito en 14 pacientes, que tras la menopausia quirúrgica, PINP es el marcador de formación ósea que presenta una mayor sensibilidad diagnóstica, superando a la FAO y a la osteocalcina⁶. Los resultados descritos en 51 pacientes con enfermedad ósea de Paget son similares, donde además se observó una buena correlación con los índices de extensión y actividad del proceso⁷.

Hay dos formas de PINP en sangre, la intacta o trimérica y la monomérica⁸. Los métodos actualmente disponibles miden la forma trimérica (PINP intacta) o bien la forma trimérica y la monomérica (PINP total). Existen muy pocos datos publicados comparando los distintos métodos de determinación de PINP entre sí, y menos aún en poblaciones especiales, como es el caso de pacientes con hepatopatía crónica candidatos a trasplante hepático.

El objetivo de este estudio ha sido comparar dos métodos de determinación automatizada de PINP: Cobas E 601, Roche Diagnostics (R-PINP) e IDS® Vitro (IDS- PINP), en pacientes con hepatopatía crónica avanzada candidatos a trasplante hepático.

Material y métodos

Se incluyeron 81 pacientes con hepatopatía crónica avanzada incluidos en la lista de espera de trasplante hepático del Hospital Universitario 12 de Octubre y estudiados en la consulta de Enfermedades Metabólicas Oseas. El estudio fue aprobado por el comité ético local y se realizó

bajo consentimiento informado de todos los pacientes. Cuando se realizaron las analíticas, los pacientes no recibían ningún tratamiento para su patología ósea. Todos los parámetros analizados fueron determinados en las mismas muestras séricas. Las extracciones se realizaron en ayunas y las muestras se recogieron entre las 8.00 y las 10.00 h, almacenándose a -70°C .

El análisis de PINP total (R-PINP) se llevó a cabo mediante un ensayo electroquimioluminiscente en un equipo ELECSYS 2010 (Roche diagnostics). Este método detecta la forma monomérica y la trimérica (total). Presenta una sensibilidad analítica $<5,0$ ng/mL. Los coeficientes de variación (CV) intra e interensayo referidos oscilan entre 2,3-3,7% y 1,8-2,9%, respectivamente. El rango de normalidad es de 20 a 100 ng/mL. El análisis de la forma trimérica de PINP (intacto) (IDS-PINP) se realizó por un método automatizado quimioluminiscente (IDS-iSYS). El CV intra e interensayo referidos oscilan entre 2,6-3% y 4,2-5,3%, respectivamente. Los valores normales en adultos son 27,7-127,6 ng/mL.

Se midieron también: la creatinina, el filtrado glomerular, el MRO sérico, beta-*crosslaps* (β -CTX) y el MRO urinario desoxipiridinolina (Dpyr), la paratohormona (PTH), la 25 hidroxivitamina D (25-OH D_3), y parámetros de función hepática (GOT, GPT, GGT, fosfatasa alcalina, albúmina y bilirrubina). El cálculo del filtrado glomerular se realizó por la fórmula CKD-EPI⁹.

El marcador β -CTX se determinó mediante un ensayo electroquimioluminiscente tipo *sandwich* en un equipo ELECSYS 1010 (Roche diagnostics). El CV intra e interensayo es $<4,1\%$ y $<5,7\%$ respectivamente. La sensibilidad analítica es 0,01 g/l. El rango de normalidad es de 0,20 a 0,70 ng/mL. El análisis de Dpyr se realizó con una muestra de orina de la segunda micción de la mañana. La determinación se lleva a cabo mediante inmunoensayo quimioluminiscente en fase sólida, en un equipo IMMULITE 2000 (SIEMENS). Los resultados se expresan en nanomoles/litro (nM/l) de Dpyr y se normalizan refiriéndolos a la excreción de creatinina urinaria (mM/l). La sensibilidad analítica es de 6 nM/l de Dpyr. El método presenta un CV que oscila entre un 2,5 y un 11,8%. El rango de normalidad es de 2,3 a 7 nM-mM creatinina.

La densidad mineral ósea (DMO) se midió en columna lumbar y cuello femoral (Hologic®, QDR 4500), calculándose la T-score de acuerdo con una población española de edad y sexo similar¹⁰. Se definieron osteoporosis y osteopenia de acuerdo a los criterios de la O.M.S.¹¹

Análisis estadístico

El marcador se transformó logarítmicamente para reducir su asimetría. El estudio de comparación de los procedimientos de medida se realizó mediante análisis de regresión lineal con el método de Passing-Bablok¹². Si dos métodos son comparables y dan resultados similares, el intervalo de confianza al 95% de la pendiente ("a") debería incluir el valor 1 y el intervalo de confianza al 95% de la ordenada en el origen ("b") debería incluir el valor 0. Si "a" no

incluye el valor 1 existen errores sistemáticos proporcionales. Si "b" no incluye el valor 0, habrá errores sistemáticos constantes. El grado de concordancia entre ambos métodos se calculó con el método de Bland-Altman¹³. Los coeficientes de correlación fueron calculados según Pearson. Los cálculos se realizaron con el programa estadístico SPSS (*Statistical Package For Social Sciences*, Waltham, USA) versión 15.0 y CBstat (*Statistical Analysis in Clinical Biochemistry*) versión 5.

Resultados

En la Tabla 1 se resumen las características de la población estudiada. Participaron 64 hombres y 17 mujeres. La edad media fue 53 ± 8 años. De ellos, 44 pacientes (54%) presentaban osteopenia y 37 pacientes (46%) osteoporosis densitométrica.

Los valores obtenidos con R-PINP fueron superiores a los valores de IDS-PINP ($85 \pm 56,7$ vs. $55,2 \pm 32,8$ ng/mL, $p < 0,001$), acorde con la metodología (PINP total vs. intacto). El coeficiente de correlación entre ambos métodos fue $r = 0,81$ ($p < 0,01$). El análisis de regresión Passing-Bablok (Figura 1) mostró que el intervalo de confianza al 95% de la pendiente no incluye al 1: $a = 0,570$ (0,475 ; 0,669), y que el intervalo de confianza al 95% de la ordenada en el origen no incluye al 0: $b = 7,724$ (2,130 ; 12,542); por tanto existen errores sistemáticos proporcionales y constantes.

La diferencia de valores pareados (análisis de Bland Altman) fue $-29,81 \pm 4,34$ (Figura 2). Se encontraron correlaciones entre R-PINP y creatinina ($r = 0,36$; $p < 0,01$), R-PINP y β -CTX ($r = 0,26$; $p < 0,021$) y entre R-PINP y 25-OH D_3 ($r = -0,27$; $p < 0,017$). La Dpyr mostró correlación significativa tanto con R-PINP como con IDS-PINP ($r = 0,29$; $p < 0,007$). No se encontró correlación entre PINP por ninguno de los dos métodos y los valores de PTH, DMO (en ninguna localización) y parámetros de función hepática.

Se observó una tendencia a aumentar la diferencia entre ambos métodos con concentraciones elevadas de PINP, como se puede ver en la Figura 1, al igual que al analizar los rangos: R-PINP (9,4-259,2 ng/mL). IDS-PINP (9,5-192,6 ng/mL). Con valores de PINP <70 ng/mL, la comparación de los métodos de R-PINP e IDS-PINP no muestra errores sistemáticos proporcionales: $a = 0,7973$ (95% IC: 0,6015 ; 1,1011), ni errores sistemáticos constantes: $b = 2,0609$ (95% IC: -7,4225 ; 8,4048).

Al estudiar ambos métodos clasificando a los pacientes según tuvieran osteopenia ($n = 44$) u osteoporosis ($n = 37$), no se encontraron diferencias significativas en los valores de PINP intacta o total entre ellos. Sin embargo, se observó que en los pacientes con osteoporosis existe mayor concordancia entre los métodos, no habiendo errores sistemáticos proporcionales ni constantes, como puede verse en los valores de la pendiente y la ordenada en el origen obtenidos por Passing Bablok:

- Pacientes con osteopenia: $a = 0,4583$ (95% IC: 0,3065 ; 0,6502), $b = 14,679$ (95% IC: 3,4471 ; 21,2231).

- Pacientes con osteoporosis: $a = 0,7062$ (95% IC: 0,4292 ; 1,2244), $b = -5,9053$ (95% IC: -39,4974 ; 10,4624).

Tabla 1. Características clínicas y bioquímicas de la población de estudio

	Mediana [P ₂₅ ;P ₇₅]	Valores normales
Sexo H:76,5%/M:23,50%		
Edad (años)	57 [49;62]	
Creatinina (mg/dL)	1,1 [0,8;1,4]	0,3-0,7
GOT (U/L)	26 [18;38]	5-37
GPT (U/L)	59 [39;101]	5-45
GGT (U/L)	129 [88;244]	8-61
PTH (pg/mL)	46 [33;84]	15-51
25-OH Vitamina D (pg/mL)	15 [11;21]	15-54
β-CTX (ng/mL)	0,7 [0,5;1,1]	0,2-0,7
Bilirrubina (mg/dL)	1,1 [0,8;1,8]	0,2-1,1
Albumina (g/dL)	3,4 [2,9;3,8]	3,5-5,0
Calcio (mg/dL)	8,8 [8,4;9,3]	8,4-11,0
DMO Columna lumbar (mg/cm ²)	0,832 [0,761;0,885]	0,970-1,280
DMO cuello femoral (mg/cm ²)	0,701 [0,618;0,770]	0,970-1,280
DMO fémur total (mg/cm ²)	0,825 [0,716;0,892]	0,970-1,280
Osteopenia/Osteoporosis: 54% / 46%		

PTH: paratohormona; β-CTX: β-Crosslaps; DMO: densidad mineral ósea.

Al clasificar a los pacientes según la función renal, se observó mejor asociación entre ambos métodos cuando la función renal era normal. En pacientes con filtrado glomerular >60 ml/min/1,73m² (n= 33) no se encontraron errores sistemáticos proporcionales: a= 0,7007 (95% IC: 0,4912 ; 1,0137), ni errores sistemáticos constantes: b= 5,5611 (95% IC: -7,2525 ; 14,3792). Sin embargo, en pacientes con filtrado glomerular <60 ml/min/1,73m² (n= 48), se observan errores sistemáticos proporcionales: a= 0,5540 (95% IC: 0,4391 ; 0,6563), pero no errores sistemáticos constantes: b= 5,5698 (95% IC: -4,4497 ; 13,1874).

Discusión

El empleo de los MRO en el manejo de la patología metabólica ósea se ha incrementado notablemente en los últimos años. En este sentido, recientemente, la Fundación Internacional de Osteoporosis y la Federación Internacional de Química Clínica y Laboratorios de Medicina han recomendado la determinación sérica de PINP como marcador de formación ósea de elección¹⁴. En este trabajo se comparan dos métodos de determinación de PINP (formas intacta y total) en pacientes con hepatopatía crónica avanzada con osteopenia u osteoporosis. Nuestros datos muestran que existe una buena correlación entre ambos métodos, si bien, no hay una transferibilidad directa entre ambos resultados,

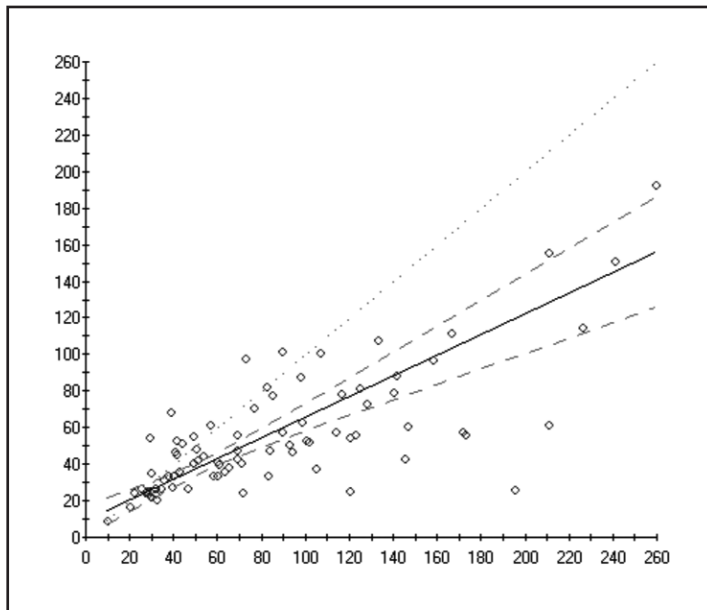
al no incluir el cero en la ordenada en el origen ni el uno en la pendiente de la recta de regresión.

Existen pocos estudios que comparen distintos métodos de determinación de PINP. No está bien establecido en qué medida dos formas circulantes de PINP son reconocidas por los diferentes métodos. El aclaramiento de PINP intacto se caracteriza por una rápida captación por las células endoteliales hepáticas, mientras que las formas monoméricas dependerían en mayor grado de la función renal.

Koivula y cols.¹⁵ estudiaron un método manual de PINP intacta (RIA, Orion Diagnostica) frente al método R-PINP. La correlación entre ambos, en sujetos sanos, fue 0,89, similar a la encontrada en nuestro estudio, si bien las concentraciones de PINP fueron semejantes entre ambos métodos, a pesar de que uno determina la forma intacta y el otro la total.

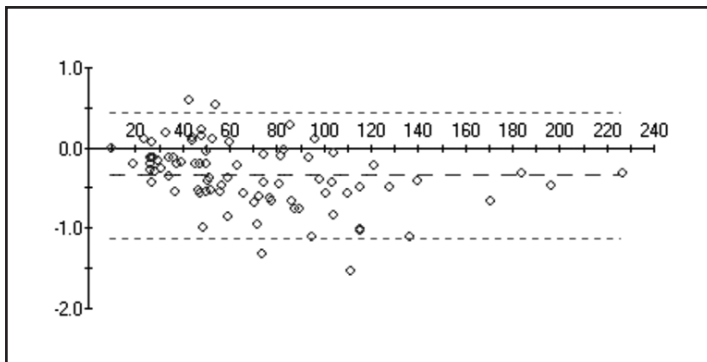
El motivo por el que observamos una mayor diferencia entre R-PINP e IDS-PINP a medida que el valor de PINP se incrementa es incierto. Otros autores han encontrado resultados similares comparando métodos de determinación de PINP por RIA vs. métodos automatizados basados en quimioluminiscencia. Dichos autores hacen referencia a un posible efecto techo por RIA, a concentraciones elevadas de PINP, que podría justificar la diferencia entre ambos métodos a dichas concentraciones¹⁵.

Figura 1. Analisis de regresión Passing-Bablok



$a = 0,570 [0,475-0,669]$; $b = 7,724 [2,130-12,542]$.
 Regresión lineal: $r = 0,81$; $p < 0,01$.

Figura 2. Análisis de Bland-Altman



R-PINP (en eje x) ($\mu\text{g/L}$).
 Diferencia (R PINP- IDS PINP) (en eje y) ($\mu\text{g/L}$).
 Diferencia de valores pareados $-29,81 \pm 4,34$.
 Comparación de R PINP con IDS PINP en 81 pacientes con hepatopatía usando Bland-Altman. El gráfico muestra las diferencias entre los valores de PINP por ambos métodos en cada paciente (eje y) en relación con los valores medios obtenidos con los dos métodos (eje x). La línea central representa la diferencia media entre los dos métodos y las líneas superior e inferior el intervalo de confianza al 95% de esta diferencia.

Encontramos una débil correlación significativa entre el marcador de resorción en suero β -CTX y R-PINP, pero no con IDS-PINP, posiblemente porque éste mide sólo la forma trimérica. Sin embargo, el marcador urinario de resorción Dpyr se correlacionó con ambos métodos. También se encontró una correlación negativa entre los niveles de 25-OH D_3 y los valores de R-PINP, lo que podría deberse a la influencia del *estatus* de vitamina D en el remodelado óseo.

Los datos encontrados con respecto a la correlación positiva entre creatinina y R PINP son similares a los referidos por otros autores. En sujetos sanos, PINP total e intacto muestran resultados similares, pero en pacientes con insuficiencia renal crónica los resultados difieren. El aumento se debe al incremento de las formas monoméricas, que se acumulan en el suero de pacientes con insuficiencia renal¹⁶⁻¹⁸. En pacientes hemodializados con insuficiencia renal terminal, aunque el PINP mostró un aumento inicial durante la hemodiálisis, al final de la sesiones no se observaron cambios significativos en el PINP intacto o total¹⁹⁻²¹.

Los cambios en los MRO pueden ser útiles para monitorizar el tratamiento de la osteoporosis, confirmar el cumplimiento terapéutico y valorar la eficacia del tratamiento⁸. En los pacientes con insuficiencia hepática terminal después del trasplante está indicado el uso de bisfosfonatos²²⁻²⁴. Los valores de PINP encontrados no parecen verse afectados por la hepatopatía, ya que no se correlacionaron con los parámetros de función hepática en este grupo de pacientes con insuficiencia hepática que aún no habían recibido el tratamiento inmunosupresor correspondiente al postrasplante, ni recibían tratamiento antirresortivo. Desconocemos si ambos métodos serían sensibles para detectar de manera comparable los cambios en el remodelado óseo que se producen tras el trasplante hepático²⁵ y con el tratamiento antiosteoporótico²²⁻²⁴. Garnero y cols.¹⁸ mostraron que R-PINP, en comparación con RIA manual (PINP intacto), detectaba el aumento del remodelado óseo en mujeres postmenopáusicas, y era sensible para percibir cambios significativos en el remodelado óseo inducido por el tratamiento con PTH 1-84 y con alendronato.

En resumen, aunque hemos encontrado una buena correlación entre ambos métodos de determinación de PINP (formas total e intacta), existen diferencias que hacen que sus resultados no sean concordantes.

Bibliografía

1. Bonnick SL, Shulman L. Monitoring osteoporosis therapy: bone mineral density, bone turnover markers, or both? *Am J Med* 2006;119:S25-31.
2. Garnero P, Grimaux M, Seguin P, Delmas PD. Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res* 1994;9:255-4.

3. Garnero P, Delmas PD. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1046-53.
4. Lee J, Vasikaran S. Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis. *Ann Lab Med* 2012;32:105-12.
5. 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* 1999;25:349-53.
6. Peris P, Álvarez L, Monegal A, Guañabens N, Durán M, Pons F, et al. Biochemical markers of bone turnover after surgical menopause and hormone replacement therapy. *Bone* 1999;25:349-53.
7. Álvarez L, Peris P, Pons F, Guañabens N, Herranz R, Monegal A, et al. Relationship between biochemical markers of bone turnover and bone scintigraphic indices in assessment of Paget's disease activity. *Arthritis Rheum* 1997;40:461-8.
8. Brown JP, Albert C, Nassar BA, Adachi JD, Cole D, Davison KS, et al. Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. *Clin Biochem* 2009;42:929-42.
9. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al. CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12.
10. Díaz Curiel M, Carrasco de la Peña JL, Honorato Pérez J, Pérez Cano R, Rapado A, Ruiz Martínez I. Study of bone mineral density in lumbar spine and femoral neck in a Spanish population. Multicentre Research Project on Osteoporosis. *Osteoporos Int* 1997;7:59-64.
11. World Health Organization Scientific Group Research on Menopause. (1998) WHO Technical Service Report Series 670, WHO Geneva.
12. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *J Clin Chem Clin* 1983;21:709-20.
13. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-10.
14. Vasikaran S, Cooper C, Eastell R, Griesmacher A, Morris HA, Trenti T, et al. International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Position on bone marker standards in osteoporosis. *Clin Chem Lab Med* 2011;24:1271-4.
15. Koivula MK, Ruotsalainen V, Björkman M, Nurmenniemi S, Ikäheimo R, Savolainen K, et al. Difference between total and intact assays for N-terminal propeptide of type I procollagen reflects degradation of pN-collagen rather than denaturation of intact propeptide. *Ann Clin Biochem* 2010;47:67-71.
16. Melkko J, Kauppila S, Niemi S, Risteli L, Haukipuro K, Jukkola A, et al. Immunoassay for intact amino-terminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem* 1996;42:947-54.
17. Koivula MK, Richardson J, Leino A, Valleala H, Griffiths K, Barnes A, et al. Validation of an automated intact N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) assay. *Clin Biochem* 2010;43:1453-7.
18. Garnero P, Vergnaud P, Hoyle N. Evaluation of a fully automated serum assay for total N-terminal propeptide of type I collagen in postmenopausal osteoporosis. *Clin Chem* 2008;54:188-96.
19. Ueda M, Inaba M, Okuno S, Nagasue K, Kitatani K, Ishimura E, et al. Clinical usefulness of the serum N-terminal propeptide of type I collagen as a marker of bone formation in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2002;40:802-9.
20. Álvarez L, Torregrosa JV, Peris P, Monegal A, Bedini JL, Martínez de Osaba MJ, et al. Effect of hemodialysis and renal failure on serum biochemical markers of bone turnover. *J Bone Miner Metab* 2004;22:254-9.
21. Koivula MK, Riseli L, Riseli J. Measurement of amino-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) in serum. *Clin Biochem* 2012;45:920-7.
22. Gilfraguas L, Guadalix S, Martínez G, Jodar E, Vara J, Gómez-Sánchez MA, et al. Bone loss after heart transplant: effect of alendronate, etidronate, calcitonin, and calcium plus vitamin D3. *Prog Transplant* 2012;22:237-43.
23. Guadalix S, Martínez-Díaz-Guerra G, Lora D, Vargas C, Gómez-Juaristi M, Cobaleda B, et al. Effect of early risedronate treatment on bone mineral density and bone turnover markers after liver transplantation: a prospective single-center study. *Transpl Int* 2011;24:657-65.
24. Valero MA, Loinaz C, Larrodera L, Leon M, Moreno E, Hawkins F. Calcitonin and bisphosphonates treatment in bone loss after liver transplantation. *Calcif Tissue Int* 1995;57:15-9.
25. Hawkins FG, Leon M, López MB, Valero MA, Larrodera L, García-García I, et al. Bone loss and turnover in patients with liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 1994;41:158-61.