

DETERMINACIÓN DE OSTEOCALCINA EN NIÑOS CON  
DEFICIENCIA DE HORMONA DE CRECIMIENTO POR DOS  
INMUNOENSAYOS COMERCIALES:  
ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA (ECLIA) Y  
QUIMIOLUMINISCENCIA (CLIA)

Páez Núñez, A; Honeker, M; Schwab, G; Muñoz, L; Sobrero, G; Silvano, L Miras, M  
Centro Privado de Endocrinología Infanto Juvenil (Córdoba)  
Hospital de Niños de Córdoba (Córdoba)

Palabras clave: Osteocalcina; Marcadores óseos; Osteocalcina en niños. Osteocalcina en déficit de GH; Inmunoensayos para Osteocalcina

Bioq. Alejandra Páez Núñez  
Centro Privado de Endocrinología Infanto juvenil  
Balcarce 454. Pta Baja B. Nueva Córdoba  
Córdoba (5.000)  
T.E: 4256213- 4256221  
e- mail: alex\_paezn@yahoo.com.ar

## RESUMEN

La determinación de Osteocalcina (OC) ha sido propuesta en niños con deficiencia de Hormona de Crecimiento (GHD) para evaluar el efecto del tratamiento con Hormona de Crecimiento sobre el remodelado óseo. Se compararon los valores de OC en niños con GHD bajo tratamiento, con un grupo control de niños sanos utilizando dos inmunoensayos comerciales (ECLIA y CLIA) en suero y plasma. La media obtenida en niños con GHD fue significativamente más alta que el grupo control con ambas metodologías (CLIA: GHD 74,5 +/- 28,6 ng/ml, control 57,5 +/- 25,6 ng/ml; ECLIA: GHD 109,6 +/- 37,8 ng/ml, control 79,9 +/- 29,6 ng/ml;  $p < 0,001$ ).

Si bien GH tiene un efecto bifásico sobre el remodelado óseo, se desconoce la proporción relativa de OC y fragmentos que proviene de cada proceso. Por consiguiente es conveniente utilizar un mismo método en el seguimiento de estos niños con GHD debido a las diferencias metodológicas halladas. Nuestros valores fueron significativamente mayores en plasma que en suero, lo que podría atribuirse a una mayor estabilidad de OC.

## **INTRODUCCIÓN**

Osteocalcina (OC) es la proteína no colágena que más abunda en hueso. Este péptido de 49 aa se sintetiza principalmente en osteoblastos. Si bien la mayor parte se incorpora a la matriz ósea, una pequeña fracción se libera a circulación donde se puede cuantificar con diferentes inmunoensayos. (1 – 7, 31)

En la actualidad OC se utiliza como marcador de formación ósea. Se ha demostrado “in vitro” que tanto la molécula intacta como sus fragmentos se liberan de la matriz ósea durante el proceso de resorción, motivo por el cual su determinación reflejaría ambos procesos del remodelado óseo. (8 - 9)

Es posible observar además variaciones con los distintos inmunoensayos utilizados, debido a la presencia de fragmentos de diferente reactividad lo cual limita su utilidad en la práctica clínica. (1 – 3, 10 - 14)

Aproximadamente un tercio de la OC circulante es molécula intacta, otro tanto corresponde al fragmento amino terminal (N mid) y el resto a fragmentos de menor tamaño, producidos por proteólisis “in vivo” (10). Garnero y colaboradores (col) identificaron dichas formas predominantes de OC en mujeres normales y con osteopenia, sugiriendo que la elección de una metodología adecuada dependerá, en gran parte, de la patología subyacente (3). Además “in vitro” la molécula de OC es muy inestable generando en especial, el fragmento N mid (15 - 16), por lo que ensayos que detecten sólo la molécula intacta serán “sensibles” a la degradación “in vitro”, y aquellos que detecten fragmentos, podrán “sobrestimar” la concentración de OC intacta (10).

Se ha propuesto la determinación de OC en niños con deficiencia de Hormona de Crecimiento (GHD) bajo tratamiento con GH recombinante (rGH) para evaluar el efecto del mismo sobre el remodelado óseo (2, 17 – 18), ya que GH incrementa los marcadores de formación y resorción ósea (19). Su verdadera utilidad en la práctica clínica aún resulta controvertida (20, 30).

En base a lo dicho, nuestros objetivos son:

- Comparar los valores de OC en niños con GHD bajo tratamiento con rGH con un grupo control de niños sanos utilizando dos inmunoensayos comerciales: ECLIA (ensayo que mide los niveles de molécula intacta y N mid) y CLIA (sólo mide molécula intacta).
- Comparar los valores obtenidos de OC en suero y plasma con heparina por ambos métodos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Materiales:** Se midió OC por ECLIA y CLIA en 87 muestras de suero y plasma con heparina. Se analizaron dos grupos:

I) grupo control (40 niños y jóvenes; 19 mujeres y 21 varones; rango de edad: entre 2 y 20 años).

Criterio de exclusión: niños y jóvenes que toman alguna medicación o presentan alguna patología endócrina o que esté relacionada con el metabolismo óseo.

II) niños y jóvenes con GHD bajo tratamiento con rGH (13 mujeres y 34 varones; rango de edad: 2 a 17 años).

**Metodología:** Las determinaciones de OC se hicieron por ECLIA en un analizador Roche Elecsys 2010; y por CLIA en un analizador Siemens Immulite 1000, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Para ECLIA el coeficiente de variación (CV) intraensayo fue 5,3 % y el CV interensayo de 6,8 %. Para CLIA, el CV intraensayo fue de 6,4 % y el CV interensayo: 8,4 %

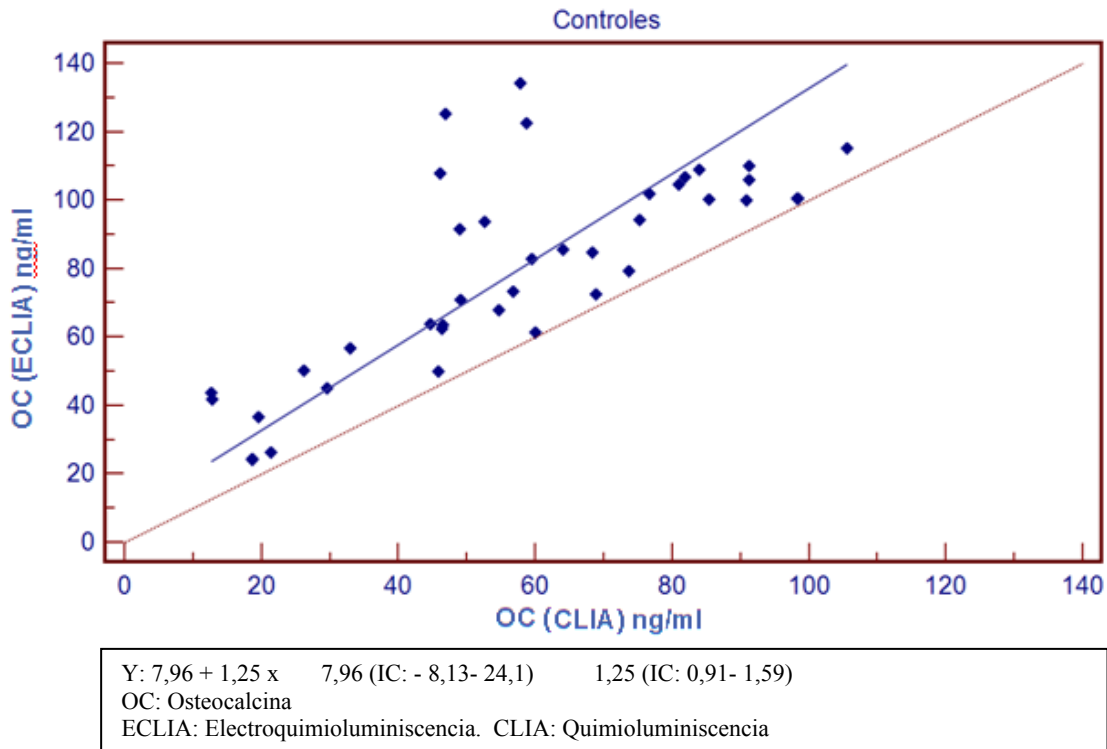
**Toma de muestra:** La muestra se tomó entre las 8.30 y 10 hs de la mañana y se conservó a 4° C hasta su centrifugación antes de la hora de extracción. Todas las muestras fueron conservadas en freezer a - 20° C hasta su procesamiento.

**Análisis estadístico:** Se empleó el análisis de regresión de Deming para comparar los valores de OC por ECLIA y CLIA en ambos grupos y para comparar los valores en suero y plasma con heparina entre ambos métodos. Una  $p < 0,05$  fue considerada estadísticamente significativa.

## RESULTADOS

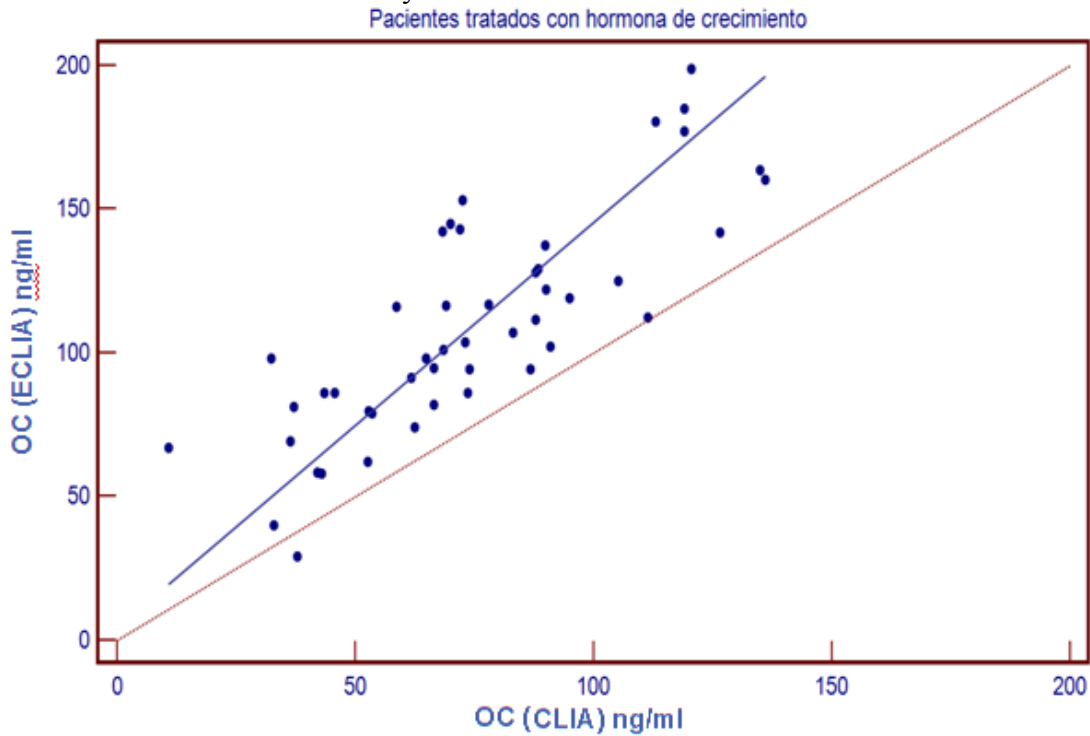
El valor medio de OC obtenido en el grupo control fue de 79,9 +/- 29,6 ng/ml para ECLIA y 57,5 +/- 25,6 ng/ml para CLIA. En la comparación de ambos métodos, la recta obtenida fue:  $y = 1,25x + 7,96$ . ECLIA valoró en este grupo un 25% más que CLIA ( $r: 0,8148$ ;  $p < 0,001$ ) Figura 1.

**Figura 1:** NIVELES DE OC EN UN GRUPO CONTROL DE NIÑOS Y JÓVENES SANOS (N: 40). COMPARACIÓN DE DOS INMUNOENSAYOS: ECLIA y CLIA



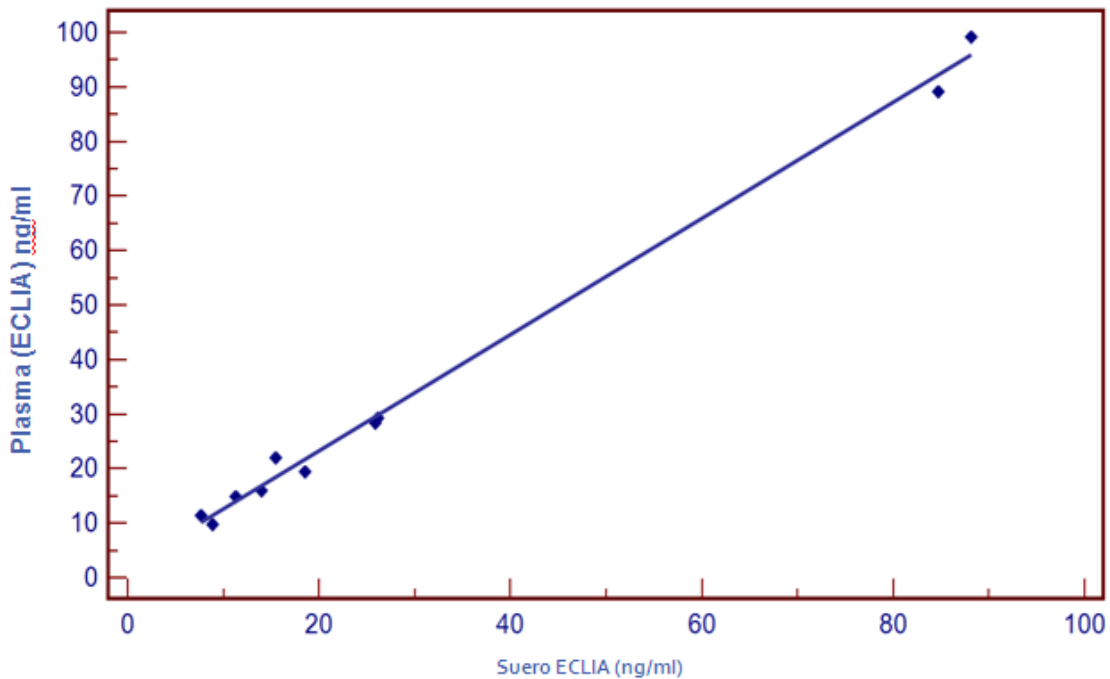
Para el grupo de niños y jóvenes con GHD bajo tratamiento con rGH el valor medio fue 109,6 +/- 37,8 ng/ml para ECLIA y 74,5 +/- 28,6 ng/ml para CLIA. La media de este grupo fue significativamente más alta que el grupo control tanto para ECLIA ( $p < 0,001$ ) como para CLIA ( $p < 0,006$ ). En la comparación de ambos métodos la recta obtenida fue  $y = 1,41x + 4,43$ . ECLIA valoró un 41% más que CLIA ( $r: 0,772$ ;  $p < 0,001$ ) Figura 2. Con ambos métodos se obtuvo muy buena correlación en los resultados obtenidos con suero y plasma, aunque la diferencia entre los valores medios fue estadísticamente significativa como se observa en la figura 3 (ECLIA suero 30 ng/ml; plasma 34 ng/ml;  $r = 0,9976$ ;  $p < 0,0001$ ) y en la figura 4 (CLIA suero 31,5 ng/ml; plasma 40,1 ng/ml;  $r = 0,9821$ ;  $p < 0,0001$ ).

**Figura 2:** NIVELES DE OC EN NIÑOS Y JÓVENES CON GHD BAJO TRATAMIENTO CON rGH (N: 47). COMPARACIÓN DE DOS INMUNOENSAYOS: ECLIA y CLIA



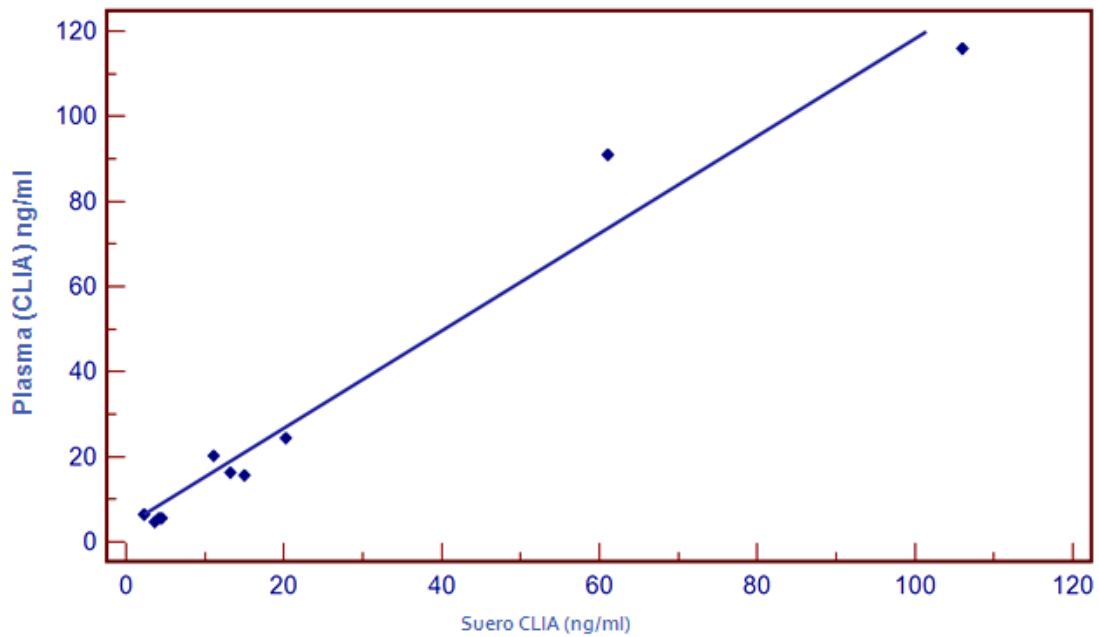
$Y: 4,43 + 1,41 x - 4,43$  (IC: - 19,7- 28,5)     1,41 (IC: 1,10- 1,74)  
 ECLIA: Electroquimioluminiscencia. CLIA: Quimioluminiscencia  
 (OC ECLIA: Control 79,9 +/- 29,6 ng/ml; GHD 109,6 +/- 39,8 ng/ml. P< 0,001)  
 (OC CLIA: Control 57,5 +/- 25,6 ng/ml; GHD 74,5 +/- 28,6 ng/ml. P< 0,006)

**Figura 3:** COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE OC OBTENIDOS EN SUERO Y PLASMA CON HEPARINA: ECLIA



OC: Osteocalcina  
 ECLIA: Electroquimioluminiscencia. CLIA: Quimioluminiscencia

Figura 4: COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE OC OBTENIDOS EN SUERO Y PLASMA CON HEPARINA: CLIA



OC: Osteocalcina.

ECLIA: Electroquimioluminiscencia. CLIA: Quimioluminiscencia

## DISCUSIÓN

La OC en suero es un “pool” heterogéneo de formas moleculares estructuralmente diferentes (10). OC intacta es muy inestable “in vitro”, generando principalmente el fragmento N mid (1-43); motivo por el cual, algunos autores postulan que aquellos ensayos que miden molécula intacta más N mid podrían resultar de mayor utilidad. (21) Garnero y col utilizaron anticuerpos monoclonales para identificar los fragmentos circulantes en sujetos sanos y en pacientes con enfermedades óseas metabólicas. Sus resultados mostraron un incremento en el fragmento N mid en pacientes con Enfermedad de Paget, y un incremento de OC intacta y N mid en pacientes con insuficiencia renal crónica; sugiriendo que la elección de una metodología adecuada dependerá en gran parte de la patología subyacente (3). Aún existen controversias acerca del inmunoensayo que puede ser de mayor utilidad en la práctica clínica. (21)

En niños con GHD se ha demostrado que el tratamiento con rGH incrementa los marcadores del remodelado óseo (19). El efecto de rGH es bifásico: aumenta inicialmente la resorción y luego la formación (22), ejerciendo su acción en forma directa o indirecta, a través del factor de crecimiento insulino similar (IGF1). (23 , 24)

Estudios “in vitro” han demostrado que GH estimula la osteoblastogénesis, la proliferación de osteoblastos y su función diferenciada (28); e IGF1 estimula la osteoclastogénesis (24) aumentando así los niveles de OC. Además, rGH estimula la carboxilación de la OC (26), proceso necesario para la formación normal del hueso, contribuyendo a la microheterogeneidad de las formas circulantes de OC, la cual podría deberse a diferentes grados de  $\gamma$ carboxilación o glicosilación (27).

Los estudios realizados por Ivaska y col (8) demostraron que durante el proceso de resorción ósea se libera a circulación tanto OC intacta como sus fragmentos, si bien no se puede estimar la proporción relativa de OC que proviene de cada proceso (formación o resorción) en una determinada situación clínica.

Baroncelli y col (25) estudiaron el impacto de rGH sobre la dinámica de los marcadores bioquímicos en 24 niños con GHD bajo tratamiento durante 9 años. Durante ese período los niveles de OC estuvieron por encima de sus valores pre tratamiento en todas las determinaciones hasta que adquirieron la talla final. Nuestros resultados concordaron con lo informado por Baroncelli y col utilizando un diferente protocolo de trabajo. Estos autores determinaron los niveles de OC total (intacta más N mid) en dichos niños con un ensayo inmunoradiométrico antes del tratamiento con rGH y una vez al año después de iniciado el mismo, hasta completar el estudio (25).

Hubina y col (26) estudiaron el efecto de rGH en adultos con GHD observando un incremento en los niveles de OC total y carboxilada, permaneciendo elevados por encima de sus niveles basales durante los 18 meses de tratamiento.

En nuestro grupo de estudio los niveles de OC fueron más elevados en niños con GHD bajo tratamiento con rGH por ambos inmunoensayos respecto al grupo control, siendo esa diferencia significativamente mayor por ECLIA. Estos resultados demuestran la conveniencia de utilizar un mismo método en el seguimiento de estos niños.

Existen reportes en la bibliografía que indican que el uso de anticoagulantes puede influir en la inmunorreactividad de la OC (4, 29). Si bien obtuvimos muy buena correlación en los resultados obtenidos con suero y plasma, nuestros valores fueron significativamente mayores en plasma, lo que podría deberse a una mayor estabilidad de OC.



## **CONCLUSIÓN**

Nuestros resultados demuestran la conveniencia en la utilización de un mismo método en el seguimiento de pacientes tratados con rGH debido a las diferencias metodológicas halladas. Son necesarios estudios posteriores que permitan correlacionar el comportamiento con otros marcadores del remodelado y factores de crecimiento, los cuales podrían arrojar nuevos conocimientos sobre estas diferencias observadas. Cada laboratorio debería estandarizar el tipo de muestra a utilizar para la determinación de OC (suero o plasma), si bien resta determinar si dicha diferencia es clínicamente relevante.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Masters PW, Jones RG, Purves DA, Cooper EH, Cooney JM. Commercial assays for serum Osteocalcin give clinically discordant results. *Clin Chem* 1994; 40/3: 358- 63
- 2) Diaz Diego EM, Guerrero R, De la Piedra C. Six Osteocalcin assays compared. *Clin Chem* 1994; 40/11: 2071- 7
- 3) Power MJ, Fottrell PF. Solid – phase enzymeimmunoassay for Osteocalcin in Human serum o plasma, with use of monoclonal antibody. *Clin Chem* 1989; 35/10: 2087- 92
- 4) Käkönen SM, Hellman J, Karp M, Laaksonen P, Obrant KJ, Väänänen HK, Lövgren T, Pettersson K. Development and evaluation of three immunofluorometric assays that measure different forms of Osteocalcin in serum. *Clin Chem* 2000; 46/3; 332- 7
- 5) Kao PC, Riggs BL and Schryver PG. Development and evaluation of an Osteocalcin chemiluminoimmunoassay. *Clin Chem* 1993; 39/7: 1369- 74
- 6) Schmidt- Gayk H, Spanuth E, Kötting J, Bartl R, Felsenberg D, Pfeilschifter J, Raue F and Jürgen Roth H Performance evaluation of automated assays for B-Crosslaps, Nmid Osteocalcin and intact parathyroid hormone (Biorose multicenter study). *Clin Chem Lab Med* 2004; 42(1): 90- 5
- 7) Gundberg C, Wilson P S, Gallop P M and Parfitt M. Determination of Osteocalcin in human serum: results with two kits compared with those by a well characterized assay. *Clin Chem* 1985; 31/10: 1720- 3
- 8) Ivaska KK, Hentunen TA, Vääräniemi J, Ylipahkala H, Pettersson K, Väänänen HK. Release of Intact and Fragmented Osteocalcin Molecules from bone matrix during bone resorption in vitro. *The J Biol Chem* 2004; 279/ 18: 18361- 9
- 9) Singer FR, Eyre DR. Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice. *Cleve Clin J Med* 2008; 75: 739- 50
- 10) Takahashi M, Kushida K, Nagano A, Inoue T. Comparison of the analytical and clinical performance characteristics of an N- Mid versus an intact osteocalcin immunoradiometric assay. *Clin Chim Acta* 294. 2000: 67- 76
- 11) Souberbielle LC, Marque D, Bonnet P, Herviaux P and Sachs CH. Simple method to evaluate specificity of Osteocalcin immunoassays *Clin Chem* 1997; 43: 1663- 5
- 12) Knapen MHJ, Eisenwiener HG, Vermeer C. Osteocalcin detection in aging serum and whole blood: stability of different osteocalcin fractions. *Clin Chim Acta* 256, 1996: 151- 64
- 13) Kleerekoper M. Biochemical markers of bone turnover: why theory, research, and clinical practice are still in conflict. *Clin Chem* 2001; 47 (8): 1347- 49
- 14) Seibel MJ, Lang M, Geilenkeuser W J Interlaboratory variation of biochemical markers of bone turnover. *Clin Chem* 2001; 47(8): 1443- 50
- 15) Blumsohn A, Hannon Rosemary A; Eastell R. Apparent instability of Osteocalcin in serum as measured with different commercially available immunoassays. *Clin Chem* 1995; 41/2: 318- 9
- 16) Banfi G; Daverio R. In vitro stability of Osteocalcin *Clin Chem* 1994; 40/5: 833- 4
- 17) Vihervuori E; Turpeinem M; Siimes MA; Koistinen H; Sorva R. Collagen formation and degradation increase during growth hormone therapy in children. *Bone* 1997; 20: 133- 8
- 18) Tapanainen P; Knip M; Risteli L; Kempainen L; Käär ML and Risteli J. Collagen metabolites in the prediction of response to GH therapy in short children. *Eur J Endocrinol* 1997; 137: 621- 5

- 19) Léger J; Mercat I; Alberti C; Chevenne D; Armoogum P; Tichet J and Czernichow P. The relationship between the GH / IGF- I axis and serum markers of bone turnover metabolism in healthy children. *Eur J Endocrinol* 2007; 157: 685 - 92.
- 20) Laursen T. Markers of bone turnover in the evaluation of the response to GH treatment in GH- deficient children. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 545 - 7.
- 21) Lee A J; Hodges S and Eastell R. Measurement of Osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 432- 46
- 22) Giustina A, Mazziotti G, Canalis E. Growth hormone, insulin- like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev* 2008; 29(5): 535- 59.
- 23) Ohlsson C, Bengtsson B A, Isaksson O G, Andreassen T and Słootweg M. Growth hormone and bone. *Endocr Rev* 1998, 19(1): 55- 79
- 24) Mochizuki H, Hakeda Y, Wakatsuki N, Usui N, Akashi S, Sato T, Tanaka K and Kumegawa M. Insulin- like growth factor I supports formation and activation of Osteoclasts. *Endocrinology* 1992: 131 (3): 1075- 80
- 25) Baroncelli GI, Bertelloni S, Ceccarelli C, Cupelli D, Saggese G. Dynamics of bone turnover in children with deficiency treated with GH until final height. *Eur J Endocrinol* 2000 ; 142: 549 - 56.
- 26) Hubina E, Lakatos P, Kovács L, Szabolcs I, Rácz K, Tóth M, Szúcs N and Góth M. Effects of 24 months of growth hormone (GH) treatment on serum carboxylated and undercarboxylated osteocalcin levels in GH- deficient adults. *Calcif Tissue int* 2004; 74: 55- 9
- 27) Ivaska K. Tesis: Osteocalcin Novel insights into the use of osteocalcin as a determinant of bone metabolism Turku 2005  
<https://oa.doria.fi/bitstream/handle/10024/46615/diss2005ivaska.pdf?sequence=1>.
- 28) Di Girolamo D, Mukherjee A, Fulzele K, Gan Yujun, Cao X, Frank S and Clemens T. Mode of growth hormone action in osteoblasts. *J Biol Chem* 2007; 282 (43): 31666- 74
- 29) Power M, O, Dwier B, Breen E and Fottrell P. Osteocalcin concentrations in plasma prepared with different anticoagulants. *Clin Chem* 1991; 37/2: 281- 4
- 30) Rota F; Savanelli MC; Tauchmanova L; Savastano S; Lombardi G; Colao A and Di Somma C. Bone density and turnover in Young adult patients with growth hormone deficiency after 2- year growth hormone replacement according with gender. *J Endocrinol invest* 2008; 31: 94 – 102.
- 31) Morishita T, Nomura M, Hanaoka M, Saruta T, Matsuo T and Tsukamoto Y A new assay method that detects only intact Osteocalcin. Two step non – invasive diagnosis to predict adynamic bone disease in haemodialysed patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 659 – 67.