



## ORIGINAL

**Marcadores del metabolismo óseo en adolescentes españoles. Estudio HELENA**

## Bone metabolism markers in Spanish adolescents. The HELENA Study

Gracia-Marco L<sup>1,2</sup>, Vicente-Rodríguez G<sup>1,3</sup>, Valtueña J<sup>3</sup>, Rey-López J P<sup>1,2</sup>, Díaz Martínez A E<sup>4</sup>, Mesana M I<sup>1,2</sup>, González-Gross M<sup>3,5</sup>, Moreno L A<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación GENU: Growth, Exercise, Nutrition and Development. <sup>2</sup> Escuela Universitaria de Ciencias de la Salud. Departamento de Fisiatría y Enfermería, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, (España). <sup>3</sup> Departamento de Salud y Rendimiento Humano. Facultad de Ciencias de la Actividad Física y del Deporte. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, (España). <sup>4</sup> Laboratorio Clínico. Centro de Medicina y el Deporte. Consejo Superior de Deportes, Madrid, (España) <sup>5</sup> Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften. Humanernährung, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn, (Alemania).

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

**Resumen**

**Objetivo del trabajo:** Describir el metabolismo óseo a lo largo de la adolescencia, según la edad y el desarrollo puberal en adolescentes.

**Material (pacientes) y método:** El análisis de los marcadores de metabolismo óseo se realizó a partir de muestras de suero con osteocalcina (OC; n=95), propeptido aminoterminal del procolágeno de tipo 1 (P1NP; n=87) y C-telopéptidos  $\beta$ -isomerizados ( $\beta$ -CTX; n=65) y de orina [ $\beta$ -CTX (n=209)] que se analizaron mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia.

**Resultados:** La concentración de los marcadores de formación y resorción ósea eran más altos en los chicos y las chicas menos desarrollados comparado con los grupos de mayor desarrollo puberal ( $p < 0.05$ ), excepto  $\beta$ -CTX (en orina) en chicos ( $p = 0,105$ ). Sin embargo, la osteocalcina no mostró una tendencia significativa en chicos ( $p = 0.264$ ) al agrupar por edades. Los chicos adolescentes presentaron un remodelado óseo superior al de las chicas.

**Conclusiones:** Los chicos adolescentes presentaron un remodelado óseo superior al de las chicas, lo que sugiere una mayor actividad metabólica de éstos durante la adolescencia.

**Palabras clave:**

Adolescentes, hueso, marcadores de metabolismo óseo.

**Abstract**

**Objetivos:** To describe bone metabolism throughout adolescence, according to age and pubertal development.

**Material and methods:** Bone metabolism markers were analysed on serum [Osteocalcin (n=95), aminoterminal propeptide of type I procollagen (PINP, n=87) and  $\beta$ -isomerised C-telopeptides ( $\beta$ -CTX, n=65)] and urine samples [ $\beta$ -CTX (n=209)] by electrochemiluminescence immunoassay.

**Results:** bone formation and resorption biomarkers concentration were higher in males and females with lower pubertal development compared with those groups with higher development ( $p < 0.05$ ), except urine  $\beta$ -CTX in males ( $p = 0,105$ ). Osteocalcin did not show a significant trend in males ( $p = 0.264$ ) when grouping by age. Males had an increased bone turnover compared to females.

**Conclusions:** Males showed an increased bone turnover compared to females, suggesting higher metabolic activity during adolescence.

**Key-words:** Adolescents, bone, bone metabolism markers.

**Correspondencia**

L. Gracia-Marco  
GENUD. Departamento de Fisiatría y Enfermería, E.U. de Ciencias de la Salud  
Avd. Domingo Miral s/n. CP: 50009. Zaragoza, España  
lgracia@unizar.es



## Introducción

La mayor acumulación de masa ósea durante la infancia y adolescencia determina la salud ósea en la edad adulta [1]. De hecho, durante la adolescencia se producen los mayores incrementos de contenido mineral, especialmente entre los 11 y los 14 años en chicas y entre los 14 y los 16 años en los chicos [2], alcanzando un máximo del 51% del pico de masa ósea durante el crecimiento puberal [3][4]. Se puede considerar que el riesgo de osteoporosis depende del pico de masa ósea alcanzado antes de los 20 años [5], por lo que los análisis realizados durante esta edad son importantes como factor preventivo de una futura osteoporosis [6][7].

El desarrollo del hueso depende de su actividad metabólica, incluyendo la formación y la resorción ósea, y como consecuencia de ello, también el remodelado óseo. El hecho de poder obtener información del metabolismo del hueso puede revelar importantes datos de un desarrollo óseo deficiente. Esta información podría ayudar a prevenir una fragilidad ósea aumentada y el riesgo de fracturas traumáticas de los huesos.

Se han descrito varios marcadores de actividad metabólica del hueso [8], entre los que se incluyen los de formación ósea, como son la osteocalcina, y el propéptido aminoterminal del procolágeno de tipo 1 (P1NP) y como marcador de resorción ósea el isómero, del telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo 1  $\beta$ -CTX, tanto en suero como en orina. La osteocalcina es comúnmente utilizada como marcador de formación ósea y es, además, la mayor proteína no colagénica de la matriz de hueso [8], siendo específicamente producida por los osteoblastos. Concentraciones elevadas de osteocalcina están asociadas con niveles elevados de formación ósea e incluso de remodelado óseo [9]. El P1NP es un indicador específico de la deposición de colágeno tipo 1 y, por lo tanto, puede ser definido como un marcador específico de formación ósea. Más del 90% del colágeno tipo 1 se encuentra en la matriz orgánica del hueso [10]. Durante la rotura del colágeno, los fragmentos de diferentes tamaños del telopéptido C-terminal son liberados a la circulación. Se ha observado que las moléculas de colágeno tipo 1 pueden sufrir una  $\beta$ -isomerización del residuo del ácido aspártico dentro de sus telopéptidos [11][12] y por eso las moléculas de colágeno tipo 1 pueden encontrarse en la matriz del hueso como lineal ( $\alpha$ ) o C-telopéptidos  $\beta$ -isomerizados ( $\beta$ -CTX) [13]. Determinando los marcadores de formación y resorción, se puede estimar el remodelado óseo.

Existe poca información sobre marcadores de formación y resorción durante la adolescencia. Cabe destacar, que esta información puede ser de especial interés en las chicas, ya que tienen un mayor riesgo de desarrollar osteoporosis [14]. HE-

LENA (Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence) es un proyecto financiado por la Unión Europea [15][16] que incluye un estudio multicéntrico transversal que fue llevado a cabo en diez ciudades europeas. El rango de edad de los adolescentes fue 12 años y medio hasta los 17 años y medio [17].

Nuestra hipótesis de trabajo es que los chicos tienen mayores niveles de formación y resorción que las chicas, y por lo tanto un mayor remodelado óseo que, por otra parte, se ve reducido durante la adolescencia. Para demostrar esta hipótesis nos hemos propuesto describir los marcadores de formación y resorción (osteocalcina, P1NP y  $\beta$ -CTX) a lo largo de la adolescencia.

## Población y metodología

Para nuestro estudio hemos seleccionado una submuestra de los adolescentes de Zaragoza en los cuales se evaluó también el metabolismo óseo. En el protocolo de HELENA se estableció que a 1/3 de los adolescentes se les tomaría una muestra sanguínea. El análisis de los marcadores de hueso se realizó a partir de muestras de suero [OC (n=95), P1NP (n=87) y  $\beta$ -CTX (n=65)] y de orina [ $\beta$ -CTX (n=209)]. El consentimiento informado por escrito fue firmado por los padres y por los propios adolescente. El estudio fue preparado siguiendo las pautas éticas de la Declaración de Helsinki de 1961 (revisión de Edimburgo en 2000). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Gobierno de Aragón (CEICA). La descripción completa respecto a temas éticos y de buena práctica clínica dentro del estudio HELENA ya ha sido publicada [18].

Los criterios de inclusión en el estudio HELENA fueron: no participar simultáneamente en otro estudio clínico, no haber tenido ninguna enfermedad aguda en la última semana y tener datos válidos de la edad, sexo e índice de masa corporal. Además, la historia médica sobre enfermedades o medicamentos que afecten al metabolismo del hueso fue considerado como criterio de exclusión específico para este estudio.

Se aplicaron las pautas internacionales de antropometría en adolescentes [19-22]. Se pesó y talló a los sujetos en ropa interior y descalzos. El peso (kg) y altura (cm) fueron medidos con una báscula electrónica (marca SECA 861), precisión 100 g, rango 0-150 kg y un estadiómetro (marca SECA 225), precisión 0,1cm, rango 70 - 200 cm, respectivamente.

Se realizó un examen físico para clasificar a los adolescentes en uno de los cinco estadios de maduración sexual definidos por Tanner and Whitehouse [23].

Las concentraciones de osteocalcina, P1NP y  $\beta$ -CTX (en suero y orina) se determinaron mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) usando un analizador



Elecsys 2010. Para el control de calidad se usó «Elecsys PreciControl Bone 1, 2, y 3». Los controles con diferentes intervalos de concentración se realizaron con el test en determinaciones simples 1 vez cada 24 horas, con cada kit de reactivos y después de cada calibración.

#### Osteocalcina en suero

El test Elecsys N-MID Osteocalcin emplea dos anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra los epítopes del fragmento N-MID y del fragmento N-terminal, detectando con ello tanto el fragmento N-MID estable como la osteocalcina (aún) intacta. En el suero recogido se evitó la hemólisis, porque los eritrocitos contienen proteasa, la cual degrada la osteocalcina. Se usó la Técnica sándwich con una duración total de 18 minutos cada ensayo. El intervalo de medición fue 0,5-300 ng/mL (definido por el límite de detección y el máximo de la curva principal). Los valores inferiores al límite de detección se indican como  $< 0,500$  ng/mL. Los valores por encima del intervalo de medición fueron diluidos. Sensibilidad analítica (límite inferior de detección) fue  $< 0,50$  ng/mL.

#### P1NP total en suero

Se usó el test inmunológico *in vitro* para la determinación cuantitativa del P1NP total en suero y plasma humanos. Este test determina el extremo aminoterminal, el así llamado P1NP - propéptido aminoterminal del procolágeno de tipo 1. El test Elecsys P1NP detecta ambas fracciones presentes en la sangre, razón por la cual se lo considera un análisis del P1NP total. Se usó la técnica sándwich con una duración total de 18 minutos cada ensayo. El intervalo de medición fue 5-1200 ng/mL (definido por el límite de detección y el máximo de la curva principal). Los valores inferiores al límite de detección se indican como  $< 5$  ng/mL. Los valores por encima del intervalo de medición fueron diluidos. La sensibilidad analítica (límite inferior de detección) fue  $< 5$  ng/mL.

#### $\beta$ -CTX en suero y orina

El test Elecsys  $\beta$ -CrossLaps/serum está destinado específicamente para determinar los fragmentos reticulados isomerizados de colágeno de tipo I independientemente de la naturaleza de la reticulación. La especificidad del test se garantiza por la aplicación de dos anticuerpos monoclonales que reconocen los octapéptidos lineales  $\beta$ -8AA (EKAHD- $\beta$ -GGR). El test Elecsys  $\beta$ -CrossLaps/serum cuantificó así todos los fragmentos de la degradación del colágeno de tipo I que contienen el octapéptido  $\beta$ -8AA isomerizado ( $\beta$ -CTX) por partida doble. Se usó la técnica sándwich con una duración total de 18 minutos cada ensayo. El intervalo de medición fue 0,01 -

6 ng/mL (definido por el límite de detección y el máximo de la curva principal). La hemólisis (Hb  $> 0,5$  g/dL) produce concentraciones disminuidas falsas de  $\beta$ -CTX. La sensibilidad analítica (límite inferior de detección) fue 0,01 ng/mL. La sensibilidad funcional fue 0,07 ng/mL.

Los datos de marcadores de metabolismo óseo se presentan como mediana e intervalo intercuartil, ya que los residuos no mostraron una distribución normal.

Para el análisis por edad y estadio de Tanner se usó el test U de Mann Whitney con el fin de determinar las diferencias entre sexos. Para determinar las diferencias entre grupos de edad o estadios de Tanner, se usó el test H de Kruskal-Wallis fue usado. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 14.0 con un nivel de significación fijado a 0,05.

#### Resultados

Las tablas 1 y 2 describen las concentraciones de osteocalcina, P1NP y  $\beta$ CTX (en suero y orina) en chicos y chicas adolescentes por grupos de edad o de maduración sexual. Los chicos presentaron mayores concentraciones de marcadores de formación (osteocalcina y P1NP) en todos los grupos de edad, además de los estadios de Tanner III y V ( $p < 0,05$ ). Para los marcadores de resorción los chicos también presentaron mayores concentraciones, de la siguiente forma:  $\beta$ -CTX (suero): grupos de edad 14-15 y 16-17 años y medio ( $p < 0,05$ );  $\beta$ -CTX (orina): todos los grupos de edad ( $p < 0,05$ ) excepto el rango 14 - 15 ( $p = 0.058$ ). Estos marcadores de resorción presentaron también mayores concentraciones en los chicos en el estadio de Tanner V ( $p < 0,05$ ) (Tabla 2).

Al avanzar la adolescencia, los marcadores de formación mostraron una disminución significativa en sus concentraciones tanto en chicos como chicas comparando los grupos de mayor con los de menor edad ( $p < 0,05$ ) (Tabla 1), aunque la concentración de osteocalcina no disminuyó significativamente en los chicos ( $p = 0.264$ ) (Tabla 1) cuando la muestra fue agrupada en función de la edad. Los marcadores de resorción mostraron una concentración significativamente menor comparando los grupos de mayor con los de menor desarrollo cuando la muestra se agrupó por estadio de Tanner ( $p < 0,05$ ), aunque los  $\beta$ -CTX (en orina) en chicos no disminuyeron de forma significativa ( $p = 0,105$ ) (Tabla 2).

En los chicos se observó el pico de concentración en la osteocalcina y  $\beta$ -CTX (suero y orina) en el estadio de Tanner IV; mientras que en chicas fue sólo la osteocalcina y el  $\beta$ -CTX (orina). En el caso de P1NP, tanto chicos como chicas alcanzaron el pico de concentración en el estadio de Tanner III, además del  $\beta$ -CTX (suero) sólo en chicas.



**Tabla 1.** Osteocalcina, P1NP y  $\beta$ -CTX (suero y orina) en chicos y chicas según grupos de edad

Grupos de edad		12,5-13,99	14-14,99	15-15,99	16-17,5	
Chicos	N					p
<b>Formación</b>						
Osteocalcina	44	141,3 (109,19-164,5) c *	114,45 (86,91-157,42) *	123,6 (74,08-163,45) *	71,5 (46,45-132,8) *	0,264
P1NP	39	887,35 (534,6-1487,1) c *	911,2 (401,6-1137,2) d *	568,9 (321,25-807,67)*	263,4 (133,32-472,25)	0,015
<b>Resorción</b>						
$\beta$ -CTX (orina)	97	100,2 (80,7-118,8) c *	77,7 (58,12-131,02)	80,55 (69,22-129,52) *	80,25 (50,47-106,87) *	0,2
$\beta$ -CTX (suero)	28	1,58 (1,13-1,98)	1,67 (1,24-1,85) *	1,33 (0,84-2)	1,56 (0,99-2,15) *	0,968
Chicas						
<b>Formación</b>						
Osteocalcina	51	78,09 (59,74-107,82) a b	44,51 (38-56,8)	41,18 (33,26-50,5)	38,02 (37,36-42,14)	0,016
P1NP	48	496,5 (299,5-601,8) a b c	187,9 (137,8-236,6)	160,5 (117,5-204)	131,7 (116,2-160)	0,000
<b>Resorción</b>						
$\beta$ -CTX (orina)	112	72,9 (39,6-96,37)	66,9 (35,4-103,8)	46,8 (23,88-78,9)	50,4 (38,25-66,52)	0,174
$\beta$ -CTX (suero)	36	1,26 (0,86-1,32) a b c	0,77 (0,63-1,92)	0,74 (0,67-0,92)	0,67 (0,63-0,84)	0,067

Todos los valores son medianas e intervalos intercuartiles.

\*  $p \leq 0,05$  entre sexos; a  $p \leq 0,05$  entre grupos de edad 12,5-13,99 y 14-14,99; b  $p \leq 0,05$  entre grupos de edad 12-13,99 y 15-15,99; c  $p \leq 0,05$  entre grupos de edad 12,5-13,99 y 16-17,5; d  $p \leq 0,05$  entre grupos de edad 14-14,99 y 16-17,5.

**Tabla 2.** Osteocalcina, P1NP y  $\beta$ -CTX (suero y orina) en chicos y chicas según Estadio de Tanner

Estadio		Tanner III	Tanner IV	Tanner V	
Chicos	n				p
<b>Formación</b>					
Osteocalcina	44	133,2 (129,2-167,4) a *	151,2 (70,36-177,8)	93,31 (63,18-133,5) *	0,029
P1NP	39	1095,5 (951,42-1391,2) a *	838,25 (631,37-1087,35) b	411,1 (294,4-662,4) *	0,002
<b>Resorción</b>					
$\beta$ -CTX (orina)	97	114,9 (76,5-141,3)	117,6 (64,57-136,8)	84 (62,1-112,12) *	0,105
$\beta$ -CTX (suero)	29	1,84 (1,59-1,94)	2,14 (1,74-2,43) b	1,33 (1-1,76) *	0,005
Chicas					
<b>Formación</b>					
Osteocalcina	51	98,16 (74,29-126) a	104,2 (50,5-135,6) b	44,51 (37,29-63,09)	0,014
P1NP	48	612 (601,8-643,8) a	564,5 (232,72-726,77)	185,4 (137,8-290)	0,006
<b>Resorción</b>					
$\beta$ -CTX (orina)	112	74,1 (56,4-90,9)	99 (87,15-115,65) b	52 (33-81)	0,002
$\beta$ -CTX (suero)	36	1,35 (1,29-1,65) a	0,98 (0,52-1,43)	0,79 (0,67-0,9)	0,052

Todos los valores son medianas e intervalos intercuartiles.

\*  $p \leq 0,05$  entre sexos; a  $p \leq 0,05$  entre Tanner III y V; b  $p \leq 0,05$  entre Tanner IV y V.

## Discusión

Los principales resultados de este estudio son que los chicos tienen un mayor remodelado óseo que las chicas durante la adolescencia y que tanto los chicos como las chicas tienen un descenso significativo en los marcadores de formación al aumentar la edad y maduración sexual.

Los datos que hemos obtenido son de utilidad para los profesionales preocupados por la osteoporosis y la detec-

ción temprana de problemas de mineralización que podrían terminar en el desarrollo de enfermedades de fragilidad ósea como la osteopenia y la osteoporosis. Detectar aquellos adolescentes con un metabolismo óseo deteriorado podría ayudar a tomar las medidas oportunas para prevenir la aparición temprana de problemas de fragilidad ósea y reducir así el riesgo de fracturas traumáticas de los huesos de esas personas.



Nuestro estudio no incluye sujetos de todos los estadios de Tanner, por lo que está limitado de Tanner III a V.

En relación con los marcadores bioquímicos, existen varios factores que puedan variar la concentración de los mismos, entre otros: el ritmo circadiano, la dieta, edad, sexo, ciclo menstrual, funciones hepáticas, la filtración de los riñones, temperatura estable, etc. Para intentar controlar estos efectos, todos los adolescentes fueron medidos en las mismas condiciones. Las muestras de sangre y orina fueron recogidas y almacenadas a la misma hora por la mañana. Todos los adolescentes fueron medidos desde octubre de 2006 a junio de 2007 en la misma habitación a temperatura estable.

Nuestros resultados han mostrado que las concentraciones de los marcadores de formación (Osteocalcina y P1NP) y resorción ( $\beta$ -CTX en suero y orina) disminuyen en ambos sexos conforme avanza la pubertad. Se encontraron resultados similares en un estudio en Holanda con chicos de 8-15 años, los cuales mostraron que una vez alcanzado el pico máximo y hasta el final de la pubertad, los marcadores de formación [fosfatasa alcalina en suero (AP), osteocalcina, fosfatasa alcalina específica en suero (BAP) y P1NP] y resorción [telopeptido carboxiterminal del suero (ICTP) y deoxipiridolina en orina (DPD)] disminuyeron de forma significativa en chicas, excepto DPD/Creatinina (DPD/Cr). Sin embargo, en chicos sólo disminuyó el ICTP [24]. De una forma similar, nuestro estudio también coincide, al menos para las chicas, con el estudio de Lehtonen-Veromaa et al [8] con chicas caucásicas de 9-15 años para los marcadores de formación (osteocalcina, BAP y P1NP) y resorción ( $\beta$ -CTX en suero). Nuestros datos muestran un descenso en todos los marcadores de actividad metabólica del hueso en las chicas. Sin embargo, en los chicos sólo disminuyó el P1NP y los  $\beta$ -CTX (en suero). Esto podría ser debido a que los chicos tienen el pico de velocidad de crecimiento en la etapa gonadal 4, mientras que las chicas en la etapa 3, debido a su maduración sexual más temprana, lo cual puede explicar que se produzca un descenso significativo en las chicas dicha etapa.

El periodo de la pubertad está asociado con las mayores concentraciones de marcadores del remodelado óseo [25-27]. El presente estudio muestra que durante el estadio de Tanner IV se alcanzan los picos máximos de osteocalcina y  $\beta$ -CTX (suero y orina) en ambos sexos, excepto los  $\beta$ -CTX (en suero) en chicos que se alcanzaron en el estadio de Tanner III. Del mismo modo, el pico de P1NP coincide con el estadio de Tanner III en ambos sexos. Estos resultados muestran algunas diferencias con el estudio de Van Coeverden et al. [24], quienes comunicaron que durante la etapa gonadal 4 en chicos se alcanzaron los picos máximos de AP, BAP, osteocalcina, P1NP, ICTP y DPD/Cr mientras que en

chicas se alcanzaron en la etapa 3, excepto la DPD/Cr. Igualmente hay diferencias con el estudio de Yilmaz et al. [28] quienes encontraron los valores máximos de osteocalcina en el estadio de Tanner III.

Las diferencias entre estudios pueden ser debidas a diferencias en la metodología, el proceso de análisis de las muestras orgánicas y el instrumento de análisis, tamaño de la muestra, variaciones diurnas y estacionales y la menstruación en las chicas. Estos factores podrían influenciar la concentración de cada marcador y deben ser tomados en cuenta en futuros estudios.

Sería interesante que los estudios futuros tengan en cuenta el mayor número posible de factores que puedan influenciar las concentraciones de los mismos. ■

### Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por una de las Ayudas a la Investigación 2007 de FUNDACIÓN MAPFRE.

El estudio HELENA se ha desarrollado con el apoyo económico de la Comunidad Europea en su 6º Programa Macro (Contrato FOOD-CT-2005-007034). El estudio fue también respaldado económicamente por una beca del Ministerio español de salud: Red para el desarrollo y la salud del niño (número RD08/0072).

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rizzoli R, Bonjour JP. Determinants of peak bone mass and mechanisms of bone loss. *Osteoporos Int* 1999; 9(suppl 2):S17-23.
2. Bailey DA, McKay HA, Mirwald RL, Crocker PR, Faulkner RA. A six-year longitudinal study of the relationship of physical activity to bone mineral accrual in growing children: the university of Saskatchewan bone mineral accrual study. *J Bone Miner Res* 1999; 14:1672-9.
3. Gordon CL, Halton JM, Atkinson SA, Webber CE. The contributions of growth and puberty to peak bone mass. *Growth Dev Aging* 1991; 55:257-62.
4. MacKelvie KJ, Khan KM, McKay HA. Is there a critical period for bone response to weight-bearing exercise in children and adolescents? a systematic review. *Br J Sports Med* 2002; 36:250-7.
5. Bailey DA, Faulkner RA, McKay HA. Growth, physical activity, and bone mineral acquisition. *Exerc Sport Sci Rev* 1996; 24:233-66.
6. Seeman E. Reduced bone density in women with fractures: contribution of low peak bone density and rapid bone loss. *Osteoporos Int* 1994; 4(suppl 1):15-25.



7. Chesnut CH, 3rd. Theoretical overview: bone development, peak bone mass, bone loss, and fracture risk. *Am J Med* 1991; 91:2S-4S.
8. Lehtonen-Veromaa M, Mottonen T, Irjala K, Nuotio I, Leino A, Viikari J. A 1-year prospective study on the relationship between physical activity, markers of bone metabolism, and bone acquisition in peripubertal girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3726-32.
9. Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover. *Acta Orthop Scand* 1995; 266(suppl):176-82.
10. Burgeson RE. New collagens, new concepts. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4:551-77.
11. Fledelius C, Johnsen AH, Cloos PA, Bonde M, Qvist P. Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. Identification of a beta-isomerized Asp-Gly sequence within the C-terminal telopeptide (alpha1) region. *J Biol Chem* 1997; 272:9755-63.
12. Garnero P, Fledelius C, Gineyts E, Serre CM, Vignot E, Delmas PD. Decreased beta-isomerization of the C-terminal telopeptide of type I collagen alpha 1 chain in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 1997; 12:1407-15.
13. Kraenzlin ME, Seibel MJ. Measurement of biochemical markers of bone resorption. En: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP (eds). *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. San Diego, Ca: Academic Press; 1999. p. 411-26.
14. Campion JM, Maricic MJ. Osteoporosis in men. *Am Fam Physician*. 2003; 67:1521-6.
15. De Henauw S, Gottrand F, De Bourdeaudhuij I, Gonzalez-Gross M, Leclercq C, Kafatos A, et al. Nutritional status and lifestyles of adolescents in a public health perspective. The HELENA Project - Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence. *J Publ Health* 2007; 15:187-97.
16. Moreno LA, Gonzalez-Gross M, Kersting M, Molnar D, de Henauw S, Beghin L, et al. Assessing, understanding and modifying nutritional status, eating habits and physical activity in European adolescents: the HELENA (Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence) Study. *Public Health Nutr* 2008; 11:288-99.
17. Moreno LA, De Henauw S, Gonzalez-Gross M, Kersting M, Molnar D, Gottrand F, et al. Design and implementation of the Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence Cross-Sectional Study. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32(suppl 5):S4-11.
18. Beghin L, Castera M, Manios Y, Gilbert CC, Kersting M, De Henauw S, et al. Quality assurance of ethical issues and regulatory aspects relating to good clinical practices in the HELENA Cross-Sectional Study. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32(suppl 5):S12-8.
19. Lohman TM. Assessment of body composition in children. *Pediatr Exerc Sci* 1989; 1:19-30.
20. Moreno LA, Rodriguez G, Guillen J, Rabanaque MJ, Leon JF, Arino A. Anthropometric measurements in both sides of the body in the assessment of nutritional status in prepubertal children. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56:1208-15.
21. Moreno LA, Joyanes M, Mesana MI, Gonzalez-Gross M, Gil CM, Sarria A, et al. Harmonization of anthropometric measurements for a multicenter nutrition survey in Spanish adolescents. *Nutrition* 2003; 19:481-6.
22. Slaughter MH, Lohman TG, Boileau RA, Horswill CA, Stillman RJ, Van Loan MD, et al. Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth. *Hum Biol* 1988; 60:709-23.
23. Tanner JM, Whitehouse RH. Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity, weight velocity, and stages of puberty. *Arch Dis Child* 1976; 51:170-9.
24. van Coeverden SC, Netelenbos JC, de Ridder CM, Roos JC, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA. Bone metabolism markers and bone mass in healthy pubertal boys and girls. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 57:107-16.
25. Blumsohn A, Hannon RA, Wrate R, Barton J, Al-Dehaimi AW, Colwell A, et al. Biochemical markers of bone turnover in girls during puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994; 40:663-70.
26. Mora S, Prinster C, Proverbio MC, Bellini A, de Poli SC, Weber G, et al. Urinary markers of bone turnover in healthy children and adolescents: age-related changes and effect of puberty. *Calcif Tissue Int* 1998; 63:369-74.
27. Mora S, Pitukcheewanont P, Kaufman FR, Nelson JC, Gilsanz V. Biochemical markers of bone turnover and the volume and the density of bone in children at different stages of sexual development. *J Bone Miner Res* 1999; 14:1664-71.
28. Yilmaz D, Ersoy B, Bilgin E, Gumuser G, Onur E, Pinar ED. Bone mineral density in girls and boys at different pubertal stages: relation with gonadal steroids, bone formation markers, and growth parameters. *J Bone Miner Metab* 2005; 23:476-82.

#### Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este trabajo. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.