

Utilità dei marcatori biochimici di rimodellamento osseo in pazienti con morbo celiaco in età adulta

G. Bonetti^a, F. Pagani^a, F. Lanzarotto^b, M. Panteghini^c

^aU.O. Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, ^bU.D. di Gastroenterologia, A.O. Spedali Civili, Brescia, ^cDipartimento di Scienze Cliniche "Luigi Sacco", Università degli Studi di Milano

Riassunto

Scopo del lavoro. L'alterazione del rimodellamento fisiologico del tessuto osseo si presenta con elevata frequenza nei pazienti con diagnosi di morbo celiaco in età adulta. Scopo di questo studio è stato di valutare in un gruppo di questi pazienti l'utilizzo dei marcatori biochimici di rimodellamento osseo (MBRO).

Materiali e metodi. I marcatori di osteoformazione, fosfatasi alcalina ossea (BALP) e osteocalcina (OC), e di riassorbimento osseo, desossipiridinolina libera urinaria (U-DPD) e telopeptide N-terminale del collagene I urinario (U-NTX-I), sono stati determinati al momento della diagnosi di celiachia e dopo un anno di dieta priva di glutine. Sono stati inclusi 139 pazienti, 37 maschi (età 20-58 anni) e 102 femmine (età 17-72 anni). Al momento della diagnosi di celiachia, 53 pazienti sono stati sottoposti a mineralometria ossea computerizzata (MOC) a livello del collo del femore. Il valore di densitometria ossea (BMD) era espresso come T score (numero di DS di cui il BMD del soggetto differisce dalla media di una popolazione di soggetti giovani sani, corrispondente al picco di massa ossea, paragonabile per sesso e razza).

Risultati. In base ai criteri densitometrici dell'Or-

ganizzazione Mondiale della Sanità, tre pazienti venivano identificati alla MOC come osteoporotici, 26 osteopenici e 24 presentavano normale massa ossea. Tutti i pazienti osteoporotici avevano valori dei MBRO superiori al limite superiore di riferimento (LSR); nei pazienti osteopenici e nei pazienti senza alterazioni ossee alla MOC si evidenziavano valori elevati di BALP nel 27% e 33%, di OC nel 69% e 71%, di U-DPD nel 72% e 58%, di U-NTX-I nel 50% e 30% dei casi, rispettivamente. Nel gruppo di pazienti sottoposti a dieta priva di glutine per un anno (n=126) si evidenziavano significative ($p<0.001$) riduzioni delle concentrazioni di tutti i MBRO misurati rispetto ai valori basali, tuttavia, 43 (34%) pazienti dimostravano valori dei MBRO ancora superiori al LSR.

Discussione e conclusioni. La determinazione dei MBRO al momento della diagnosi di celiachia può suggerire la presenza di un alterato rimodellamento osseo anche in pazienti con MOC negativa. La significativa riduzione delle concentrazioni di MBRO dopo un anno di dieta aglutinata indica l'efficacia della stessa nel controllare la patologia ossea. D'altra parte la persistenza di valori elevati di MBRO dopo la dieta suggerisce la necessità di una rivalutazione al fine di un'eventuale terapia farmacologica anti-riassorbitiva.

Summary

Utility of biochemical markers of bone remodeling in adult patients with celiac disease

Objective. Modification of physiological bone remodeling is present with high frequency in adult patients with celiac disease. Aim of this study was to evaluate biochemical markers of bone remodeling (BMBR) in a

group of adult patients with celiac disease.

Materials and methods. Markers of bone formation as bone specific alkaline phosphatase (BALP) and osteocalcin (OC) and markers of bone resorption as urinary free deoxypyridinoline (U-DPD) and urinary N-telopeptide of type I collagen (U-NTX-I), were determined at diagnosis and after 1-year on gluten-free

diet. 139 patients, 37 males (20-58 years old) and 102 females (17-72 years old) were included. Bone mineral density (BMD) was evaluated in 53 newly diagnosed patients by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) at femoral neck. BMD was expressed as T score (i.e., number of SDs from the mean of young adult healthy population, corresponding to peak bone mass, comparable for gender and race).

Results. Using World Health Organization criteria for bone densitometry, 3 patients were classified as having osteoporosis, 26 patients osteopenia and 24 patients normal bone mass. All osteoporotic patients had BMBR above the upper reference limits (URL); in osteopenic patients and in those without any densitometry abnormality high values of BALP in 27% and 33%, of OC in 69% and 71%, of U-DPD in 72% and 58%, of U-NTX-I in 50% and 30% were found,

respectively. A significant reduction ($p < 0.001$) of all BMBR was noted in patients ($n=126$) after 1-year on gluten-free diet, however, in 43 patients (34%) BMBR remained above the URL.

Discussion and conclusions. The evaluation of BMBR in newly diagnosed celiac patients can show the presence of changes in bone remodeling even without any modification of bone densitometry. The statistically significant reduction of BMBR after 1-year of gluten-free diet demonstrates that diet is good to control bone disease. Otherwise the presence of high values of BMBR after the diet can indicate the need of a reevaluation to begin therapy with inhibitors of bone resorption.

Key words: Celiac disease; Bone mineral density; Bone formation markers; Bone resorption markers.

Introduzione

Il morbo celiaco è una patologia cronica intestinale caratterizzata da un'enteropatia immuno-mediata, associata a maldigestione e malassorbimento dei principali nutrienti e vitamine, causata da un'intolleranza al glutine e può presentarsi ad ogni età. In soggetti predisposti, l'ingestione di cibo contenente glutine induce un assottigliamento della mucosa digiunale con infiltrazione linfocitaria. E' noto come il morbo celiaco in età adulta porti ad un'alterazione del rimodellamento del tessuto osseo^{1,2}. Grazie alla disponibilità della densitometria ossea, che fornisce una misura accurata della massa ossea, è stato evidenziato in vari studi come nella popolazione celiaca adulta vi sia una ridotta massa ossea³. Il meccanismo che sottende la perdita di massa ossea nel morbo celiaco, anche se non completamente chiarito, viene ritenuto multifattoriale ed è stato attribuito sia ad un ridotto apporto ed assorbimento di calcio⁴, di vitamina D⁵, al sesso, a deficienza di magnesio ed oligoelementi⁶, nonché ad una ridotta attività fisica⁷ ed ad effetti negativi delle citochine rilasciate dalla flogosi intestinale^{8,9}. In questi pazienti si può valutare il grado di rimodellamento osseo, cioè l'attività combinata di osteoblasti ed osteoclasti, mediante la determinazione, nel sangue e nell'urina, dei prodotti biochimici derivanti dall'attività di queste cellule^{10,11}. I marcatori biochimici di rimodellamento osseo possono essere classificati secondo il processo che sta alla base, come marcatori di osteoformazione, prodotti dell'attività osteoblastica, e marcatori di riassorbimento osseo, prodotti dell'attività osteoclastica. Scopo di questo studio è stato valutare in un gruppo di pazienti con morbo celiaco in età adulta l'utilizzo di tali marcatori.

Materiali e metodi

Pazienti

Sono stati studiati 139 pazienti, 37 maschi (età me-

diana: 32 anni, intervallo: 20-58 anni) e 102 femmine (età mediana: 30 anni, intervallo: 17-72 anni) afferenti all'ambulatorio di Gastroenterologia del nostro ospedale. In questi pazienti la diagnosi di celiachia è stata posta dopo biopsia duodenale perendoscopica, con dimostrazione istologica di atrofia dei villi intestinali ed infiltrato linfocitario nell'epitelio e nella lamina propria, secondo la classificazione di Marsh-Oberhuber^{12,13}, dopo un sospetto diagnostico derivato dalla determinazione degli anticorpi antiendomisio o anticorpi anti-transglutaminasi. Nei pazienti reclutati è stata esclusa la presenza di altre patologie ossee o l'uso di terapie che possano alterare il metabolismo osseo.

Al momento della diagnosi 53 pazienti, 17 maschi (età mediana: 29 anni, intervallo: 20-60 anni) e 36 femmine (età mediana: 31 anni, intervallo: 22-58 anni) sono stati sottoposti a mineralometria ossea computerizzata.

In un gruppo di 126 pazienti, 29 maschi (età mediana: 34 anni, intervallo 21-59 anni) e 97 femmine (età mediana: 31 anni, intervallo 18-74 anni) i marcatori di rimodellamento osseo sono stati determinati alla diagnosi e dopo 1 anno di dieta priva di glutine.

Mineralometria ossea

La mineralometria ossea computerizzata a doppio fotone, tecnica DEXA¹⁴ (dual-energy X-ray absorptiometry), è stata effettuata mediante lo strumento HOLOGIC, modello QDR-100/W (Hologic Inc., Waltham, MA, USA) ed è stata determinata la densità minerale ossea a livello del collo del femore. Tale metodica radiologica presenta un'elevata accuratezza ed è considerata il gold standard per la misurazione della densità ossea. Il valore di densitometria ossea (BMD) era espresso come T score, cioè numero di deviazioni standard di cui la BMD del paziente differisce dalla media di una popolazione di soggetti giovani sani, corrispondente al picco di massa ossea, paragonabile per

Tabella I. Classificazione secondo i criteri OMS dei 53 pazienti sottoposti a mineralometria ossea computerizzata (MOC).

• OSTEOPOROSI (T-score <-2.5)	3 pazienti (5.7%)
• OSTEOPENIA (T-score tra -1 e -2.5)	26 pazienti (49.0%)
• NORMALE MASSA OSSEA (T-score >-1)	24 pazienti (45.3%)

T score: numero di deviazioni standard di cui la densità minerale ossea del paziente differisce dalla media di una popolazione di soggetti giovani sani.

sesto e razza. Secondo i criteri dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) del 1994¹⁵ un T score inferiore a -2.5 è indicativo di osteoporosi, un T score compreso tra -1 e -2.5 è indicativo di osteopenia, mentre superiore a -1 la massa ossea viene considerata normale.

Marcatori biochimici di rimodellamento osseo

Marcatori di osteoformazione. La fosfatasi alcalina ossea sierica (BALP, intervallo di riferimento per popolazione adulta 10-50 U/L), è stata determinata mediante metodo elettroforetico su acetato di cellulosa ISO-ALP (Longlac, Rozzano, Italia) dopo trattamento, per 15 minuti a 37 °C, con neuraminidasi da vibrio cholerae e lettura densitometrica a 450 nm su REP™ (Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA)¹⁶.

L'osteocalcina sierica (OC, intervallo di riferimento 11-32 mg/L) è stata determinata mediante metodo elettrochemiluminometrico, N-MID Osteocalcin, su analizzatore Elecsys®2010 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germania).

Marcatori di riassorbimento osseo. La desossipiridinolina libera urinaria (U-DPD, intervallo di riferimento per maschi e femmine, <5.3 e <7.0 mM/Mcrea, rispettivamente) è stata determinata mediante metodo immunofluorimetrico DPD ACS:180 su analizzatore ACS:180 (Bayer Diagnostics Europe, Saint Vulbas, Francia).

Il telopeptide N-terminale del collagene I urinario (U-NTX-I, intervallo di riferimento <70 µM BCE/Mcrea) è stato determinato mediante metodo immunoenzimatico Osteomark (Wampole Laboratories®, Princeton, NJ, USA) e lettura mediante lettore di micropiastre ELx800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Il campione di urina utilizzato è stato quello della prima minzione del mattino¹⁷.

Analisi statistica

Analisi statistica e grafici sono stato effettuati mediante MedCalc® (MedCalc Software, Mariakerke, Belgio). I risultati per le variabili continue sono stati espressi come mediana [intervallo di confidenza al 95% (95%CI)] e intervallo. La distribuzione delle variabili è stata valutata mediante il test di Kolmogorov-Smirnov. Per il confronto tra gruppi è stato impiegato il test di Wilcoxon per dati non appaiati. I pazienti seguiti longitudinalmente prima e dopo dieta aglutinata sono stati confrontati mediante il test di Wilcoxon per dati appaiati. Un valore di P <0.05 è stato considerato significativo.

Risultati

I 53 pazienti sottoposti a mineralometria ossea sono stati stratificati mediante l'utilizzo del T score al collo del femore secondo i criteri OMS (Tab. I). I tre gruppi di pazienti sono stati confrontati in base ai valori dei marcatori di osteoformazione (Fig. 1) e di riassorbimento osseo (Fig. 2). Il confronto ha evidenziato come esista una differenza statisticamente significativa tra i pazienti celiaci classificati come osteoporotici ed i pazienti con normale massa ossea, sia per quanto riguarda i marcatori di osteoformazione (BALP, p=0.0083 e OC, p=0.0461, rispettivamente) che per quelli di riassorbimento osseo (U-DPD, p=0.0118, U-NTX-I, p<0.0001), mentre il confronto tra il gruppo di soggetti celiaci osteopenici ed il gruppo con normale massa ossea ha raggiunto la significatività statistica solo nel caso del marcatore di riassorbimento osseo U-NTX-I (p=0.0162). Il confronto tra pazienti celiaci con alterazioni del contenuto minerale osseo, cioè con osteoporosi ed osteopenia, ha portato ad evidenziare una differenza statisticamente significativa in un solo marcatore di osteoformazione (BALP, p=0.0314) ed in uno di riassorbimento osseo (U-NTX-I, p=0.0114). Tutti i pazienti osteoporotici avevano valori di marcatori biochimici di rimodellamento osseo superiori al limite superiore di riferimento. Nel gruppo di pazienti osteopenici ed in quello senza alterazioni ossee alla MOC si evidenziavano valori elevati di BALP nel 27 e 33%, di OC nel 69 e 71%, di U-DPD nel 72 e 58% e di U-NTX-I nel 50 e 30% dei casi, rispettivamente. L'analisi dei marcatori biochimici di rimodellamento osseo dopo 1 anno di dieta aglutinata ha evidenziato come questa abbia condotto ad una significativa riduzione sia dei marcatori di osteoformazione (Fig. 3) BALP [mediana (95% CI), intervallo: basale 34 (30-38) U/L, 9-119 U/L; post-dieta 25 (22-27) U/L, 9-72 U/L] ed OC [basale 31 (28-35) µg/L, 8-117 µg/L; post-dieta 23 (21-25) µg/L, 9-71 µg/L], sia dei marcatori di riassorbimento osseo (Fig. 4), U-DPD [basale 6.5 (5.8-7.0) µM/Mcrea, 1.2-29.4 µM/Mcrea; post-dieta 5.3 (4.7-5.6) µM/Mcrea, 1.9-9.8 µM/Mcrea] ed U-NTX-I [basale 54 (45-60) µM BCE/Mcrea, 10-260 µM BCE/Mcrea; post-dieta 32 (28-37) µM BCE/Mcrea, 9-189 µM BCE/Mcrea]. 43 pazienti (34%) mostrano dopo un anno di dieta ancora valori elevati di uno o più marcatori.

Discussione

In questo studio è stato evidenziato come nel mor-

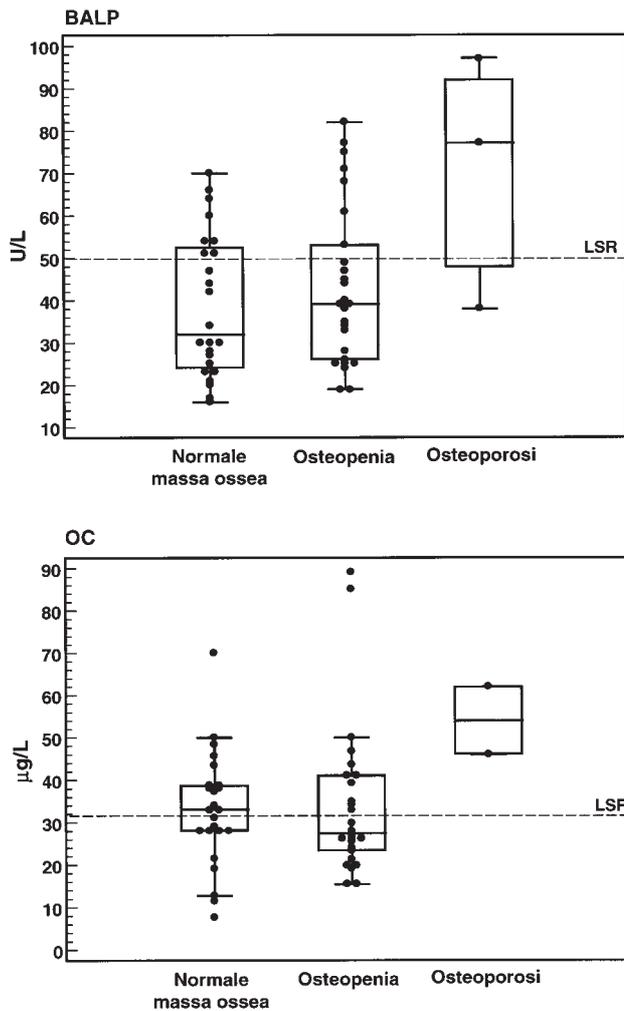


Figura 1. Marcatori di osteoformazione nei diversi gruppi di pazienti adulti con morbo celiaco classificati mediante MOC. BALP, fosfatasi alcalina ossea; OC, osteocalcina; LSR, limite superiore di riferimento.

bo celiaco in età adulta vi sia una riduzione della massa ossea in circa il 55% dei soggetti, dato sovrapponibile a quanto riscontrato in precedenti studi¹⁸⁻²². In letteratura vi sono dati in cui viene classificata come affetta da osteoporosi una percentuale superiore al 50% della popolazione celiaca adulta, mentre nell'analisi da noi condotta solo il 6% del gruppo studiato mediante MOC è stato classificato come affetto da osteoporosi. Quanto riscontrato nel presente studio conferma quanto trovato dal gruppo di Kempainen nel 1999 in una popolazione finlandese adulta affetta da morbo celiaco, in cui la percentuale di pazienti classificati come osteoporotici mediante DEXA alla testa del femore in base ai criteri OMS era solo del 3%¹⁸. [I nostri dati potrebbero risentire del numero relativamente ridotto dei soggetti studiati mediante MOC (n=53)]. Nella recente revisione dell'American Gastroenterology Association (AGA) sull'osteoporosi nelle patologie gastrointe-

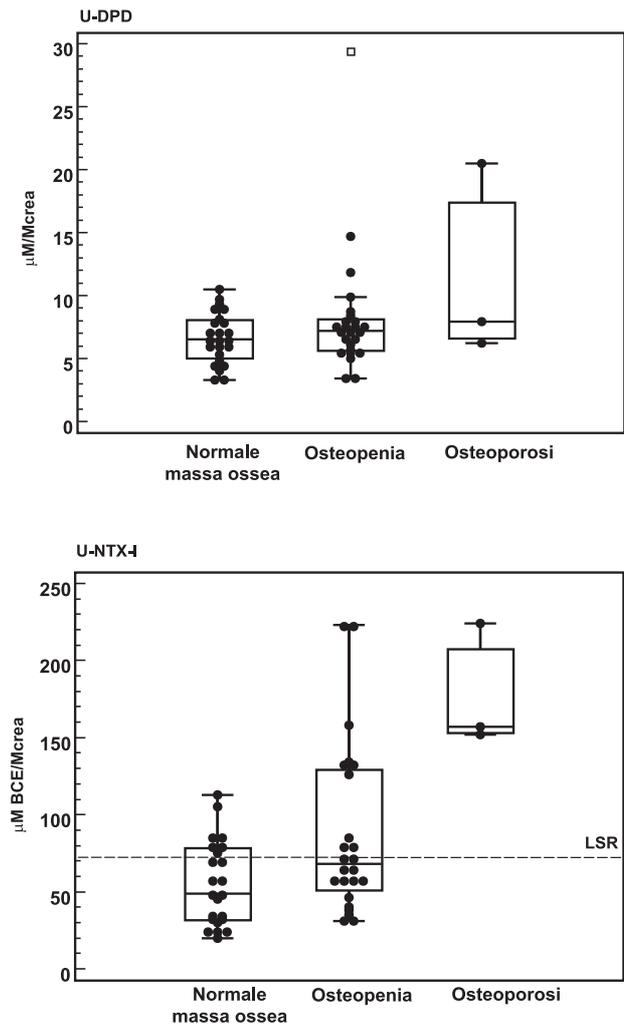


Figura 2. Marcatori di riassorbimento osseo nei diversi gruppi di pazienti adulti con morbo celiaco classificati mediante MOC; (LSR per U-DPD diverso per maschi e femmine come indicato nel testo).

U-DPD, desossipiridinolina libera urinaria; U-NTX-I, telopeptide N-terminale del collagene I urinario; LSR, limite superiore di riferimento.

stinali³ emerge come negli studi presenti in letteratura siano quanto mai vari i criteri impiegati nella definizione di osteoporosi nella popolazione celiaca adulta, andando dalla DEXA, alla QCT (quantitative computed tomography) ed alla SPA (single-photon absorptiometry), ed impiegando indifferentemente come criteri Z o T score in diverse localizzazioni corporee ed in solo pochi casi a livello della testa del femore, come indicato dall'OMS. Tutto ciò conduce ad una difficile comparabilità dei dati.

Nel nostro studio si è evidenziato come nei 126 pazienti adulti affetti da morbo celiaco la dieta aglutinata condotta per un anno sia stata efficace nel ridurre in modo significativo i marcatori biochimici di rimodellamento osseo, sia di osteosintesi come BALP e OC, che di riassorbimento osseo come U-DPD ed U-NTX-I. In un lavoro condotto dal gruppo di Santegna Gui-

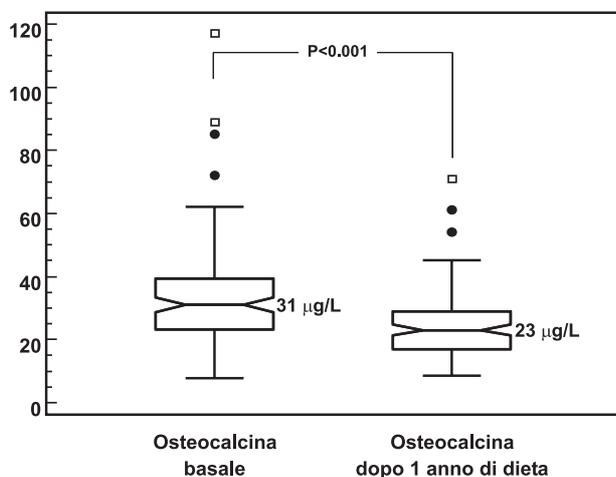
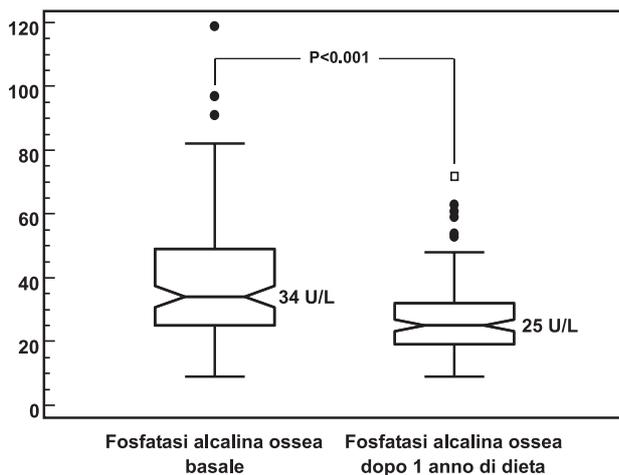


Figura 3. Marcatori di osteoformazione prima e dopo 1 anno di dieta aglutinata.

detti nell'anno 2000 su 86 soggetti celiaci adulti in cui venivano presi in considerazione vari tipi di marcatori biochimici di rimodellamento osseo tra cui BALP, OC ed U-DPD, veniva dimostrata una significativa riduzione dopo un anno di dieta aglutinata per le sole BALP e OC, mentre la riduzione di U-DPD non raggiungeva la significatività statistica²³. Il nostro studio e quello sopra citato sono gli unici in letteratura che analizzano il comportamento dei marcatori biochimici di rimodellamento osseo in una popolazione celiaca adulta alla diagnosi e dopo un anno di terapia dietetica senza glutine. E' verosimile che la dieta aglutinata abbia condotto ad un miglioramento del quadro istologico con ripristino della funzione assorbitiva dell'intestino tenue e, conseguentemente, ad un miglioramento del quadro osseo dei pazienti. La persistenza in alcuni soggetti di valori elevati anche dopo la dieta potrebbe essere imputabile alla non completa compliance di questi pazienti alla dieta, alla non completa restitutio ad integrum della mucosa,

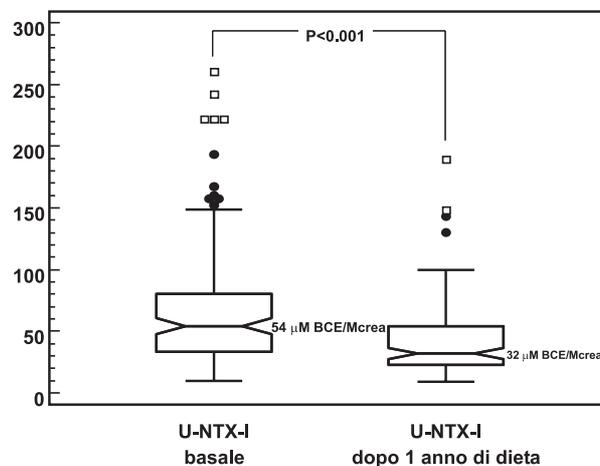
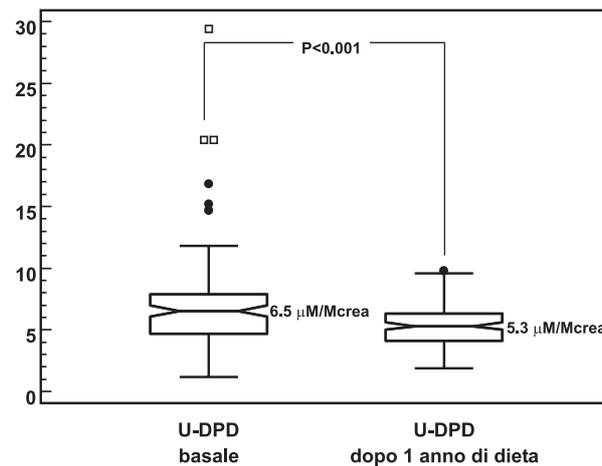


Figura 4. Marcatori di riassorbimento osseo prima e dopo 1 anno di dieta aglutinata.

U-DPD, desossipiridinolina libera urinaria; U-NTX-I, telopeptide N-terminale del collagene I urinario.

oppure a fattori di natura ormonale od altro.

I pazienti con indicatori di rimodellamento osseo ancora elevati dopo la dieta potrebbero trarre beneficio da terapie diverse dalla sola dieta, soprattutto se in età avanzata in cui il rischio di fratture potrebbe essere maggiore, come alte dosi di vitamina D³ ed altri agenti quali i bisfosfonati, potenti agenti antirassorbitivi, oppure terapia sostitutiva ormonale nei soggetti di sesso femminile. Va comunque ricordato che la DEXA è un indice di ridotta massa ossea ma non è provata la sua correlazione con il rischio di frattura nei pazienti con morbo celiaco^{24,25}. I marcatori biochimici di rimodellamento osseo riflettono il turnover osseo, ma non sono utili nel predire la BMD. E' stato mostrato come alti livelli di marcatori siano in grado di predire il rischio di frattura indipendentemente dalla BMD^{10,26,27}. Da tutto ciò deriva l'importanza che nello studio della popolazione adulta con morbo celiaco vengano impiegati contemporaneamente la determinazione statica della

densitometria ossea mediante DEXA e gli indicatori biochimici di rimodellamento che valutano la dinamica scheletrica, poiché tali indagini offrono informazioni non simili ma complementari. I nostri dati, seppur su un numero ridotto di pazienti, sembrano indirizzare verso l'utilizzo di BALP e U-NTX-I, nella popolazione con morbo celiaco in età adulta, in quanto dotati di una maggior efficienza diagnostica nella differenziazione tra pazienti con normale o alterata densità minerale ossea. Ogni laboratorio, tuttavia, dovrebbe impiegare sempre nello studio del rimodellamento osseo, qualsiasi sia la popolazione da valutare, almeno un marcatore di osteoformazione ed almeno uno di riassorbimento osseo.

Conclusioni

In conclusione, i risultati del nostro studio mostrano che la determinazione dei marcatori biochimici di rimodellamento osseo al momento della diagnosi di celiachia in una popolazione adulta può suggerire la presenza di un rimodellamento osseo alterato anche in pazienti con normale massa ossea alla mineralometria ossea. I marcatori biochimici di rimodellamento osseo, seppur dotati di elevata variabilità biologica che è sempre da tener presente nell'interpretazione dei risultati nel singolo paziente, presentano una significativa riduzione dopo un anno di dieta senza glutine ad indicare l'efficacia della stessa nel controllare la patologia. D'altra parte la persistenza di valori elevati dopo la dieta suggerisce la necessità di una rivalutazione al fine di un'eventuale terapia farmacologica anti-riassorbitiva.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano la signora Stefani Francesca per l'assistenza tecnica prestata nell'esecuzione delle determinazioni di laboratorio.

Bibliografia

- Walters JR. Bone mineral density in coeliac disease. *Gut* 1994; 35:150-1.
- Corazza GR, Di Stefano M, Maurino E, Boi JC. Bones in coeliac disease: diagnosis and treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19:453-65.
- Bernstein CN, Leslie WD, Leboff MS. AGA Technical Review on Osteoporosis in Gastrointestinal Diseases. *Gastroenterology* 2003; 124:795-841.
- Molteni N, Bardella MT, Vezzoli G, Pozzoli E, Bianchi P. Intestinal calcium absorption as shown by stable strontium test in celiac disease before and after gluten-free diet. *Am J Gastroenterol* 1995; 90:2025-8.
- Keaveny AP, Freaney R, McKenna MJ, Masterson J, O'Donoghue DP. Bone remodeling indices and secondary hyperparathyroidism in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:1226-31.
- Jameson S. Coeliac disease, insulin-like growth factor, bone mineral density, and zinc. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35:894-6.
- Di Stefano M, Veneto G, Corrao G, Corazza GR. Role of lifestyle factors in the pathogenesis of osteopenia in adult coeliac disease: a multivariate analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12:1195-9.
- Fornari MC, Pedreira S, Niveloni S, Gonzalez D, Diez RA, Vazquez H, et al. Pre- and post-treatment serum level of cytokines IL-1 beta, IL-6, and IL-1 receptor antagonist in celiac disease. Are they related to the associated osteopenia? *Am J Gastroenterol* 1998; 93:413-8.
- Moreno ML, Crusius JB, Chernavsky A, Sugai E, Sambuelli A, Vazquez H, et al. The IL-1 gene family and bone involvement in celiac disease. *Immunogenetics* 2005; 57: 618-20.
- Looker AC, Bauer DC, Chesnut CH III, Gundberg CM, Hochberg MC, Klee G, et al. Clinical use of biochemical markers of bone remodeling: current status and future directions. *Osteoporos Int* 2000; 11:467-80.
- Seibel MJ. Biochemical markers of bone remodelling. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2003; 32:83-113.
- Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 1992; 102:330-54.
- Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11:1185-94.
- Hansen MA, Hassager C, Overgaard K, Marslew U, Riis BJ, Christiansen C. Dual-energy x-ray absorptiometry: a precise method of measuring bone mineral density in the lumbar spine. *J Nucl Med* 1990; 31:1156-62.
- WHO Study Group on Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: Report of a WHO study group. (Technical Report Series, No 843). Geneva: WHO; 1994.
- Moss DW, Edwards RK. Improved electrophoretic resolution of bone and liver alkaline phosphatases resulting from partial digestion with neuraminidase. *Clin Chim Acta* 1984; 143:177-82.
- Panteghini M, Pagani F. Biological variation in urinary excretion of pyridinium crosslinks: recommendations for optimum specimen. *Ann Clin Biochem* 1996; 33:36-42.
- Kemppainen T, Kröger H, Janatuinen E, Arnala I, Kosma VM, Pikkarainen P, et al. Osteoporosis in adult patients with celiac disease. *Bone* 1999; 24:249-55.
- Pistorius LR, Sweidan WH, Purdie DW, Steel SA, Howey S, Bennett JR, et al. Coeliac disease and bone mineral density in adult female patients. *Gut* 1995; 37:639-42.
- Valdimarsson T, Toss G, Ross I, Løfman O, Ström M. Bone mineral density in coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29:457-61.
- Gonzalez D, Mazure R, Mautalen C, Vazquez H, Bai J. Body composition and bone mineral density in untreated and treated patients with celiac disease. *Bone* 1995; 16: 231-4.
- Meyer D, Stavropoulos S, Diamond B, Shane E, Green PHR. Osteoporosis in a North American adult population with celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 112-9.
- Santegna-Guidetti C, Grosso SB, Grosso S, Mengozzi G, Aimò G, Zaccaria T, et al. The effects of 1-year gluten withdrawal on bone mass, bone metabolism and nutri-

- tional status in newly-diagnosed adult celiac disease patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14:35-43.
24. Vazquez H, Mazure R, Gonzalez D, Flores D, Pedreira S, Niveloni S, et al. Risk of fractures in celiac disease patients: a cross-sectional, case-control study. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:183-9.
 25. Moreno ML, Vazquez H, Mazure R, Smecuol E, Niveloni S, Pedreira S, et al. Stratification of bone fracture risk in patients with celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2:127-34.
 26. Bauer DC, Sklarin PM, Stone KL, Black DM, Nevitt MC, Ensrud KE, et al. Biochemical markers of bone turnover and prediction of hip bone loss in older women: the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 1999; 14:1404-10.
 27. Melton LJ III, Khosia S, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL. Relationship of bone turnover to bone density and fractures. *J Bone Miner Res* 1997; 12:1083-91.