

Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos

## EXCRECIÓN URINARIA DE LOS ENTRECRUZAMIENTOS DEL COLÁGENO EN LA DEFICIENCIA MODERADA DE VITAMINA C

Beatriz Basabe,<sup>1</sup> Laura Rossi,<sup>2</sup> Marika Ferrari<sup>3</sup> y Francesco Branca<sup>4</sup>

### RESUMEN

Con el objetivo de conocer si los entrecruzamientos del colágeno y el recambio óseo se afectan durante la carencia de vitamina C, se estudiaron 18 mujeres con signos clínicos de deficiencia de esta vitamina, con edades comprendidas entre los 18 y 60 años, pertenecientes a una población de refugiados del Sahara Occidental. El grupo control estuvo compuesto por 36 mujeres que fueron pareadas con los casos por edad, talla y peso. Se determinaron las concentraciones de los entrecruzamientos del colágeno (piridinolina y deoxipiridinolina) y creatinina en muestras de orina recolectadas en horas tempranas de la mañana. La excreción urinaria de ambos compuestos fue del 23 % superior en los casos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La proporción piridinolina/deoxipiridinolina fue la misma en ambos grupos (2,5:1), pero resultó inferior a la correspondiente a individuos saludables de Europa (3-4 :1). Es probable que el moderado incremento observado en el recambio óseo esté relacionado con la gran inestabilidad de la triple hélice del colágeno. También es posible que todos los individuos estudiados estuvieran de hecho, expuestos a una deficiencia moderada de vitamina C.

*Descriptores DeCS:* DEFICIENCIA DE ACIDO ASCORBICO/orina; HEMORRAGIA GINGIVAL/orina; COLAGENO/análisis; CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION/métodos; REFUGIADOS.

La vitamina C es un nutriente esencial de la dieta del hombre y otras pocas especies que carecen de la última enzima en la biosíntesis del ácido ascórbico a partir de la glucosa.<sup>1</sup> Está involucrada en la síntesis, las modificaciones postraduccionales,

la secreción y la maduración extracelular del colágeno.<sup>2-4</sup>

Existen 2 pasos fundamentales donde actúa la vitamina C como cofactor de enzimas en el proceso de formación del colágeno.<sup>5</sup> El primero es en la hidroxilación

---

<sup>1</sup> Master en Nutrición. Licenciada en Bioquímica.

<sup>2</sup> Doctora en Auxología. Instituto Nacional de Nutrición, Italia.

<sup>3</sup> Licenciada en Biología. Instituto Nacional de Nutrición, Italia.

<sup>4</sup> Doctor en Ciencias Médicas. Instituto Nacional de Nutrición, Italia.

de los residuos lisina y prolina.<sup>6,7</sup> Esta reacción es realizada por las enzimas prolil y lisil hidroxilasa que presentan un ión  $Fe^{2+}$  en su sitio catalítico. En este caso la función del ácido ascórbico es proveer electrones para mantener el hierro metálico en su forma reducida y de esta forma estimular a la enzima.<sup>8</sup>

El segundo paso es en la formación de las fibras de colágeno, las cuales se encuentran reforzadas por entrecruzamientos covalentes. Estas uniones se forman entre los residuos lisina e hidroxilisina, y la única enzima que participa en este proceso es la lisil oxidasa que presenta también como cofactor al ácido ascórbico.<sup>9</sup> La deficiencia de esta vitamina provoca entonces que las moléculas de colágeno que se obtienen sean menos estables a la temperatura corporal.

Estudios realizados en modelos animales han demostrado que cambios en los niveles de vitamina C afectan significativamente la proporción de los entrecruzamientos piridinolina (Pyd) y deoxipiridinolina (Dpd) en hueso, aunque para los entrecruzamientos excretados en la orina la diferencia resulte menos marcada.<sup>10</sup>

El objetivo de este estudio es conocer si los entrecruzamientos del colágeno y el recambio óseo están afectados en individuos con signos clínicos de deficiencia de vitamina C y si esta afectación provoca algún cambio en la proporción piridinolina deoxipiridinolina.

## MÉTODOS

Se estudiaron como casos 18 mujeres pertenecientes a una población de refugiados del Sahara Occidental, con edades comprendidas entre 18 y 60 años. Éstas presentaban sangramiento en las encías pro-

vocado por la fragilidad capilar, lo que constituye un signo clínico de deficiencia de vitamina C.

El grupo control estuvo compuesto por 36 mujeres de la misma población, y su selección se realizó mediante un pareamiento por edad, talla y peso con los casos.

Se midieron el peso, la talla y se calculó el índice de masa corporal (IMC).

Las muestras de orina fueron recolectadas en las primeras horas de la mañana y conservadas a  $-20^{\circ}C$  hasta su uso. Experimentos anteriores muestran que la conservación a  $-20^{\circ}C$  no afecta el análisis.<sup>11</sup>

La concentración de los entrecruzamientos del colágeno (piridinolina y deoxipiridinolina) se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), según la técnica de Black y otros<sup>12</sup> parcialmente modificada<sup>11</sup> y se corrigió con la excreción de creatinina.

Para la determinación de los entrecruzamientos del colágeno se hidrolizó la orina con igual volumen de ácido clorhídrico 12 M durante 12-18 h a  $109^{\circ}C$ . Posteriormente se mezcló el hidrolizado con ácido acético y butanol en una proporción 1:1:4 y se aplicó en una columna de celulosa microcristalina (CC31), con el fin de extraer los productos de excreción del colágeno de interés (Pyd y Dpd). El eluato obtenido se sometió a evaporación en una bomba de vacío y se diluyó en ácido heptafluorbutírico para su aplicación en HPLC.

Con el objetivo de minimizar los errores de pérdida de sustancias relacionados con la preparación de las muestras, análisis en el HPLC y de la técnica en sí, se utilizó un estándar interno de piridinolina acetilada.<sup>13</sup>

La concentración de creatinina en la orina se determinó según el método de Jaffé con desproteinización (reacción picrato-alcalino)

usando el Kit No. 124192 de Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania. La técnica se basa en una reacción colorimétrica donde se forma un complejo entre la creatinina y el picrato en solución alcalina. La concentración de creatinina es proporcional a la intensidad de color desarrollado, el cual es medido con un espectrofotómetro con una longitud de onda de 520 nm. Se realizó siempre el análisis por duplicado y se repitieron las determinaciones con un coeficiente de variación superior al 4 %.

Se calcularon las medias y las desviaciones estándar para la edad, talla y peso. Se compararon las concentraciones de piridinolina y deoxipiridinolina y la proporción de ambos compuestos (Pyd/Dpd) entre los casos y los controles mediante la prueba t de Student.

## RESULTADOS

La edad promedio de los casos y los controles fue 34 años. Cuatro mujeres del grupo deficiente de vitamina C (22 %) y 9 controles (25,6 %) eran mayores de 40 años.

Los valores de algunos indicadores antropométricos se presentan en la tabla. El 38,9 % de las mujeres que presentaban deficiencia vitamínica y el 25 % de los controles tenía valores de  $IMC < 20 \text{ kg/m}^2$ . En ninguna de las variables expuestas se aprecian diferencias significativas entre ambos grupos, lo que comprueba el correcto pareamiento realizado por talla y peso corporal.

En las figuras 1 y 2 se muestra el efecto de la deficiencia de vitamina C sobre las concentraciones urinarias de los metabolitos de excreción del colágeno: piridinolina y deoxipiridinolina. No se hallaron diferencias significativas entre el grupo con deficiencia moderada de vitamina C y el grupo control para ninguno de los compuestos piridínicos, pero se encontró un incremento del 23 % en la excreción de ambos metabolitos para las mujeres con deficiencia de vitamina con respecto a los controles.

La proporción piridinolina/deoxipiridinolina (fig.3) no varía de un grupo a otro. Para ambos grupos los valores encontrados resultan inferiores a los obtenidos en un estudio realizado en adultos saludables.<sup>3,4</sup>

TABLA. Algunas variables antropométricas en el grupo de mujeres con deficiencia de vitamina C y el grupo control. (Media  $\pm$  DE)

	Casos (n= 18)	Controles (n=36)	t	p
Talla (cm)	155,7 $\pm$ 5,8	154,8 $\pm$ 5,2	- 0,60	0,55
Peso (kg)	51,6 $\pm$ 9,5	53,2 $\pm$ 9,3	0,60	0,55
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	21,3 $\pm$ 3,7	22,2 $\pm$ 3,7	0,86	0,39

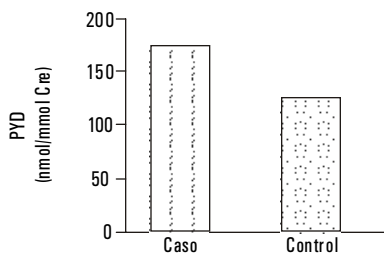


FIG. 1. Concentraciones urinarias de piridinolina en mujeres.

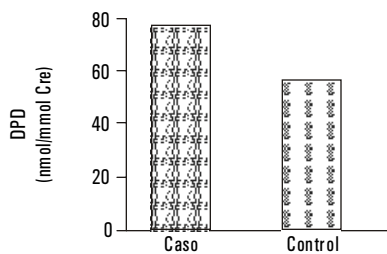


FIG. 2. Concentraciones urinarias de deoxipiridinolina en mujeres.

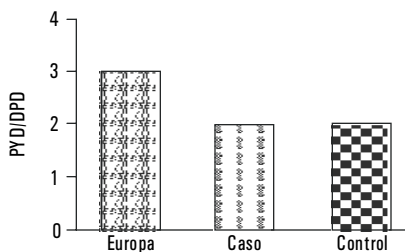


FIG. 3. Proporción piridinolina/deoxipiridinolina en orina.

## DISCUSIÓN

El análisis de los marcadores del metabolismo esquelético muestra que no existen diferencias significativas en la excreción urinaria de los entrecruzamientos del colágeno entre el grupo deficiente en vita-

mina C y el grupo control. No obstante, se aprecia un aumento (23 %) en las concentraciones de los compuestos piridínicos para los casos, provocado por una inestabilización en la triple hélice del colágeno que genera un incremento paulatino en el recambio óseo. Esta inestabilidad de la triple hélice se produce por la disminución en el contenido de residuos de hidroxiprolina en el colágeno que son los encargados de formar los puentes de hidrógeno que fortalecen la estructura de la molécula.<sup>14</sup>

Es importante señalar que la variabilidad en las concentraciones de piridinolina y deoxipiridinolina está dada por la incidencia de diferentes factores que afectan el metabolismo esquelético como: disponibilidad de calcio, vitamina D, realización de ejercicio físico, exposición a la luz solar, entre otras; las cuales se acentúan en las condiciones del grupo de estudio que se encuentra en un campo de refugiados.<sup>15</sup>

En diferentes estudios se ha analizado el efecto de la deficiencia de la vitamina C sobre el metabolismo del colágeno; la mayoría de ellos realizados en modelos experimentales. En uno de ellos se encontraron diferencias significativas en la excreción de deoxipiridinolina entre un grupo de deficiencia moderada de esta vitamina y un grupo con alta ingestión, pero no se utilizó ningún grupo control con consumo normal.<sup>16</sup>

Esto último unido al hecho de que el síntoma clínico que se tomó para la selección de los casos aparece en las primeras fases de la deficiencia del ácido ascórbico, significa que los primeros estadios en la deficiencia de la vitamina C no afectan significativamente el metabolismo del colágeno en el hombre, aunque comienzan a sufrir sus primeras alteraciones.

La proporción piridinolina/deoxipiridinolina es utilizada internacionalmente como

uno de los marcadores del recambio óseo más importantes, que indica la presencia de alteraciones en el metabolismo del colágeno.<sup>17</sup>

En este estudio esta proporción presenta valores iguales para ambos grupos (2,47), lo que demuestra que la deficiencia de vitamina C presente en los casos afectó de forma semejante a ambos metabolitos del colágeno en el proceso de

recambio óseo. Al comparar este valor con el obtenido en diferentes estudios para un grupo de adultos saludables en Europa (3-4)<sup>18</sup> e Irlanda (3,46-3,95),<sup>19,20</sup> encontramos que ambos grupos presentan un incremento del recambio óseo. Esto indica que toda la población de refugiados está bajo la influencia de otros factores que afectan el metabolismo esquelético mencionados con anterioridad.

## SUMMARY

To find out if collagen cross-links and bone turnover are affected by vitamin C shortage, 18 women aged 18-60 years, who had clinical signs of vitamin C shortage and belonged to a population of refugees in Western Sahara, were studied. The control group was made up by 36 women who were matched with case in terms of age, size and weight. The concentration of collagen (piridinoline and deoxypyridoline) and creatinine cross-links in urine samples collected very early in the morning were determined. Urinary excretion of both compounds was 23 % higher than that of the cases though the differences were not statistically significant. Piridinoline-deoxypyridoline ratio remained unchanged in both groups (2,5 : 1) but it was lower than that of healthy subjects in Europe (3-4 : 1). The observed moderate increase in bone turnover is likely to be related to the great instability of collagen's triple helix; also it is possible that all studied subjects were really exposed to a moderate vitamin C shortage.

*Subject headings:* ASCORBIC ACID DEFICIENCY/urine; GINGIVAL HEMORRHAGE/urine; COLLAGEN/analysis; CHROMATOGRAPHY HIGH PRESSURE LIQUID/methods; REFUGEES.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chatterjee IB. Ascorbic acid metabolism. *World Rev Nutr Diet* 1978;30:69-87.
2. Kipp DE, McElvain M, Kimmel DB, Akhter MP, Robinson RG, Lukert BP. Scurvy results in decreased collagen synthesis and bone density in the guinea pig animal model. *Bone* 1996;18(3):281-8.
3. Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 1991;54:1135S-40S.
4. Houglum KP, Brenner DA, Chojkier M. Ascorbic acid stimulation of collagen biosynthesis independent of hydroxylation. *Am J Clin Nutr* 1991;54:1141S-3S.
5. Kivirikko KI, Myllylä R. Posttranslational enzymes in the biosynthesis of collagen: intracellular enzymes. *Methods Enzymol* 1982;82:245-304.
6. Bates CJ, Pryne CJ, Levene CI. Ascorbate-dependent difference in the hydroxylation of proline and lysine in collagen synthesized by 3T6 fibroblast in culture. *Biochim Biophys Acta* 1972;278:610-6.
7. Ronchetti IP, Quaglino D Jr, Bergamini G. Ascorbic acid and connective tissue. *Subcell Biochem* 1996;25:249-64.
8. Harish P. Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. *Nutr Rev* 1991;49(3):65-70.
9. Rucker RB, Romero-Chapman N, Wong T, Lee J, Steinberg FM, Mc Gee C, et al. Modulation of lysyl oxidase by dietary copper in rats. *J Nutr* 1996;126:51-60.
10. Tsuchiya H, Bates CJ. Vitamin C and copper interactions in guinea-pigs and a study of collagen cross-links. *Br J Nutr* 1997;77:315-25.
11. Robins SP, Black D, Paterson CR, Reid DM, Duncan A, Seibel MJ. Evaluation of urinary hydroxypyridinium crosslink measurements as resorption markers in metabolic bone diseases. *Eur J Clin Invest* 1991;21:310-5.
12. Black D, Duncan A, Robins SP. Quantitative analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in urine using ion paired reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1988;169:197-203.

13. Calabresi E, Lasagni L, Franceschelli F, Bartolini L, Serio M, Brandi ML. Use of an internal standard to measure pyridinoline and deoxypyridinoline in urine. *Clin Chem* 1994;40(2):336-7.
14. Stryer L. Connective-tissue proteins. *Biochemistry* 1975:261-81.
15. Robins SP, New SA. Markers of bone turnover in relation to bone health. *Proc Nutr Soc* 1997;56:903-14.
16. Tsuchiya H, Bates CJ. Vitamin C and copper interactions in guinea-pigs and a study of collagen cross-links. *Br J Nutr* 1997;77:315-25.
17. Robins SP. Biochemical markers for assessing skeletal growth. *Eur J Clin Nutr* 1994;48:S199-S209.
18. Seibel MJ, Duncan A, Robins SP. Urinary hydroxy-pyridinium crosslinks provide indices of cartilage and bone involvement in arthritic diseases. *J Rheumatol* 1989;16:964-70.
19. Shapses SA, Robins SP, Schwartz EI, Chowdhury H. Short-term changes in calcium but not protein intake alter the rate of bone resorption in healthy subject as assessed by urinary pyridinium cross-link excretion. *J Nutr* 1995;125:2814-21.
20. Ginty F, Flynn A, Cashman KD. The effect of short-term calcium supplementation on biochemical markers of bone metabolism in healthy young adults. *Br J Nutr* 1998;80(5):437-43.

Recibido: 2 de marzo de 1999. Aprobado: 8 de abril de 1999.

Lic. *Beatriz Basabe*. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Infanta No. 1158, municipio Centro Habana, Ciudad de La Habana 10300, Cuba.