

ACTUALIZACIÓN

Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos.

FUNCIONES DE LA VITAMINA C EN EL METABOLISMO DEL COLÁGENO

*Beatriz Basabe Tuero*¹

RESUMEN

La mayoría de los mamíferos son capaces de sintetizar vitamina C, pero algunas especies como el hombre son dependientes de fuentes exógenas de esta vitamina porque carecen de la última enzima en la biosíntesis del ácido ascórbico a partir de la glucosa. Su principal función es como agente reductor en diferentes reacciones en el metabolismo del colágeno. Su deficiencia se asocia fundamentalmente con una disminución en la síntesis de procolágeno y con una reducida hidroxilación de los residuos prolina y lisina, obteniéndose una molécula menos estable a la temperatura corporal. En animales de laboratorio con carencia de esta vitamina se observó una disminución en la formación de residuos hidroxilisina en hueso, y por tanto, una reducción en la proporción piridinolina (Pyd)/deoxypyridinolina (Dpd) en hueso y orina. Recientemente se han encontrado afectaciones similares en humanos.

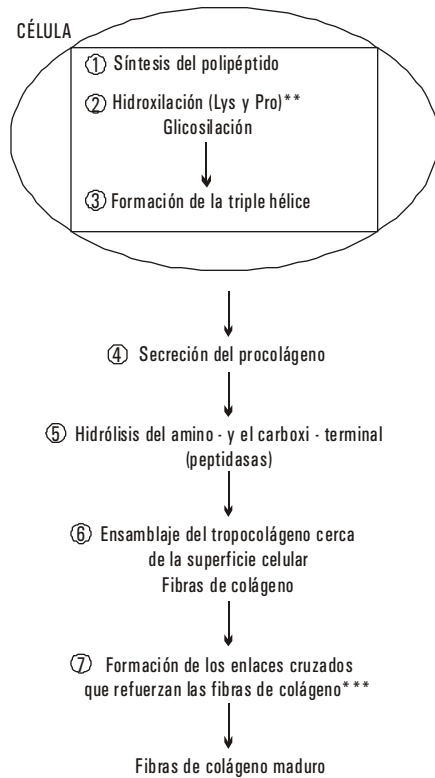
Descriptor DeCS: COLAGENO/metabolismo; ACIDO ASCORBICO/fisiología.

La vitamina C (ácido ascórbico) es un nutriente esencial de la dieta del hombre y otras pocas especies que carecen de la enzima L-glucono-g lactanoa oxidasa (EC 1.1.3.8), que es la última enzima en la biosíntesis del ácido ascórbico a partir de la glucosa.¹ La deficiencia de esta vitamina está

asociada fundamentalmente con la carencia de tejido conectivo.

La síntesis de colágeno es un proceso complejo de síntesis de proteína, modificaciones postraduccionales, secreción de proteínas y formación de la matriz extracelular. Muchos de estos pasos se afectan con las variaciones de vitamina C en la dieta (fig. 1).²

¹ Licenciada en Química.



* Regulación genética.

** Lisil y proil hidroxilasas.

** Lisil oxidasa.

Fig. 1. Etapas de formación del colágeno maduro y los puntos donde actúa la vitamina C.*

SÍNTESIS

Si se examina la función del ascorbato en el metabolismo del colágeno encontramos que en una variedad de tipos celulares la vitamina C provoca un incremento de la transcripción, traducción y estabilidad del ARNm del procolágeno.³⁻⁷ Además, en estudios realizados en curieles se ha visto que la hidroxilación de la prolina en el cartílago articular era especialmente resistente a la deficiencia de ascorbato,⁸ con sólo el 15 % de disminución después de 3 semanas bajo una dieta libre de ascorbato;

mientras que la síntesis de colágeno disminuyó al 50 % de los valores controles. Por otra parte, en el cartílago de los curieles escorbóticos la síntesis de proteoglicanos disminuyó al mismo tiempo que la síntesis de colágeno y existe una correlación directa entre las velocidades de síntesis de ambos compuestos y la velocidad de pérdida de peso.⁹ Similares correlaciones se encuentran en el cartílago de curieles con ayuno agudo pero suplementados con vitamina C.⁹ Estos resultados apoyan la hipótesis de que el efecto de la deficiencia de la vitamina C en la síntesis del colágeno es independiente de la función que ésta desempeña en la hidroxilación de la prolina. En el cartílago de los curieles escorbóticos esta disminución de la síntesis del colágeno está acompañada por una disminución en la concentración del ARNm del procolágeno tipo II,⁸ mientras que en el hueso la afectación ocurre en el ARNm del procolágeno tipo I.¹⁰

También han sido analizadas diferentes hormonas (cortisol, hormona del crecimiento y tiroxina) y factores de crecimiento (IGF-I y II, EGF) en el suero de los curieles escorbóticos y en ayuno (suplementados con vitamina C), encontrándose aumentadas las concentraciones de cortisol y GH y disminuidas las de tiroxina e IGF-I para ambos grupos. En los animales con escorbuto la agudeza de los cambios fue dependiente del nivel de pérdida de peso.¹¹ La exposición de cultivos de fibroblastos humanos al suero de los curieles escorbóticos o en ayuno reduce la síntesis de colágeno al 40-50 % de los valores obtenidos con cultivos celulares en suero de curieles normales.^{12,13} La disminución de la síntesis no fue debida tanto a la pérdida de un factor estimulante como a la presencia de un inhibidor.¹³ En todos los casos la inhibición pudo revertirse con la adición de IGF-I.^{11,13}

El IGF-I es un factor de crecimiento secretado por el hígado y los tejidos periféricos, el cual posee propiedades anabólicas y de promoción del crecimiento que median los efectos de la hormona

del crecimiento *in vivo*.¹⁴ Éste se requiere para la síntesis de ADN y estimula la síntesis del colágeno y los proteoglicanos.¹⁵ Casi todo el IGF circulante está unido a un complejo constituido por una subunidad de unión y otra de no unión con una masa total aproximada de 150 kDa.¹⁶ Existen también en el suero pequeñas proteínas de unión al IGF con sitios de enlace desocupados.

El inhibidor de la actividad del IGF-I en el suero de los curieles escorbúticos o en ayuno parece consistir en 2 proteínas de unión al IGF-I de bajo peso molecular (LMW IGF I-BP) con sitios de unión insaturados. El mecanismo mediante el cual se explica cómo las proteínas de unión al IGF pueden inhibir las funciones dependientes de IGF-I en cultivos celulares se detalla a continuación.

En el cultivo de células con suero de curieles normales, el IGF-I puede separarse del complejo de proteínas de unión de alto peso molecular (HMW complex) por medio de un equilibrio entre las formas libres y las unidas. El IGF-I libre se une al receptor celular estimulando la proliferación celular y algunas funciones específicas de la célula, como la síntesis de colágeno y proteoglicanos.¹⁷

La concentración de las proteínas de unión de bajo peso molecular (LMW IGF-BP) en el suero normal es baja, pero se incrementa al menos 10 veces en el suero de los curieles escorbúticos y en ayuno.¹⁸ Cuando el suero fue fraccionado en una columna de filtración en gel, la actividad de las proteínas de unión coincidía con la capacidad de las fracciones de inhibir la unión del [¹²⁵I] IGF-I a su receptor en las células 3T3.¹⁸ Como las proteínas de unión tienen desocupados sus sitios de enlace al IGF-I pueden competir con el receptor celular por el IGF-I libre, inhibiendo sus funciones. Los resultados de estos trabajos apoyan el concepto de que la disminución en la síntesis de colágeno y proteoglicanos en el tejido conectivo está dado por el estado de ayuno inducido por

la deficiencia de vitamina C más que por la función de esta vitamina en la hidroxilación de la prolina.

Existe otro estudio que aporta una explicación alternativa para la función del ácido ascórbico en la expresión génica del colágeno en cultivos celulares. Se plantea que el ácido ascórbico en presencia de hierro puede inducir la peroxidación lipídica con la formación de aldehídos reactivos.¹⁹ Por otra parte, el acetaldehído y el malondialdehído exógeno que son productos de la peroxidación lipídica, estimulan la transcripción del colágeno en cultivo de fibroblastos humanos. Se ha encontrado también que el α -tocoferol, un antioxidante lipofílico, y otros antioxidantes previenen la peroxidación lipídica, así como la estimulación por parte del ácido ascórbico de la expresión génica del colágeno y su producción en cultivo de fibroblastos. Estos datos sugieren con fuerza que los productos de la peroxidación lipídica inducida por el ácido ascórbico, median la estimulación de la expresión génica del colágeno.²⁰

Los mecanismos por los cuales el ácido ascórbico y el malondialdehído exógeno estimulan la transcripción génica del colágeno aún no se conocen. Pero se piensa que los complejos que forman los aldehídos con las proteínas pueden desempeñar una función en el incremento de la transcripción del colágeno. De hecho en este estudio se encontraron 2 ó 3 veces más de complejos proteicos con malondialdehído entre las proteínas nucleares extraídas de las células incubadas con ácido ascórbico que en las células controles.²⁰ Sin embargo, la importancia de estos complejos proteicos en la regulación génica aún no se conoce. Alternativamente es posible un efecto directo de los productos de la peroxidación lipídica sobre la vía regulatoria citosólica de la síntesis del colágeno o del gen del colágeno. No está claro aún si la modulación de la síntesis del colágeno por el ácido ascórbico en cultivo de células ocurre también *in vivo*.

HIDROXILACIÓN

Diferentes dioxigenasas que contienen Fe^{2+} son estimuladas por el ácido ascórbico, como la prolil y la lisil hidroxilasa. Muchos otros agentes reductores pueden reemplazar al ácido ascórbico, al menos en cierto grado, de hecho se ha detectado una actividad parcial para unos pocos ciclos catalíticos en ausencia de vitamina C. Sin embargo, se ha visto que el ácido ascórbico es el antioxidante que produce

una mayor estimulación de estas actividades enzimáticas. La función del ácido ascórbico es proveer electrones para mantener al hierro metálico en su forma reducida y de esta forma estimular a la enzima.²¹ Estas observaciones implican que el ácido ascórbico no se requiere para la hidroxilación como tal, pero sí para mantener en su estado ferroso al hierro que se encuentra en el sitio catalítico de las hidroxilasas. Estas enzimas convierten a la prolina en 4-hidroxi prolina (o 3-Hyp) y a la lisina en 5-hidroxislisina (fig. 2).

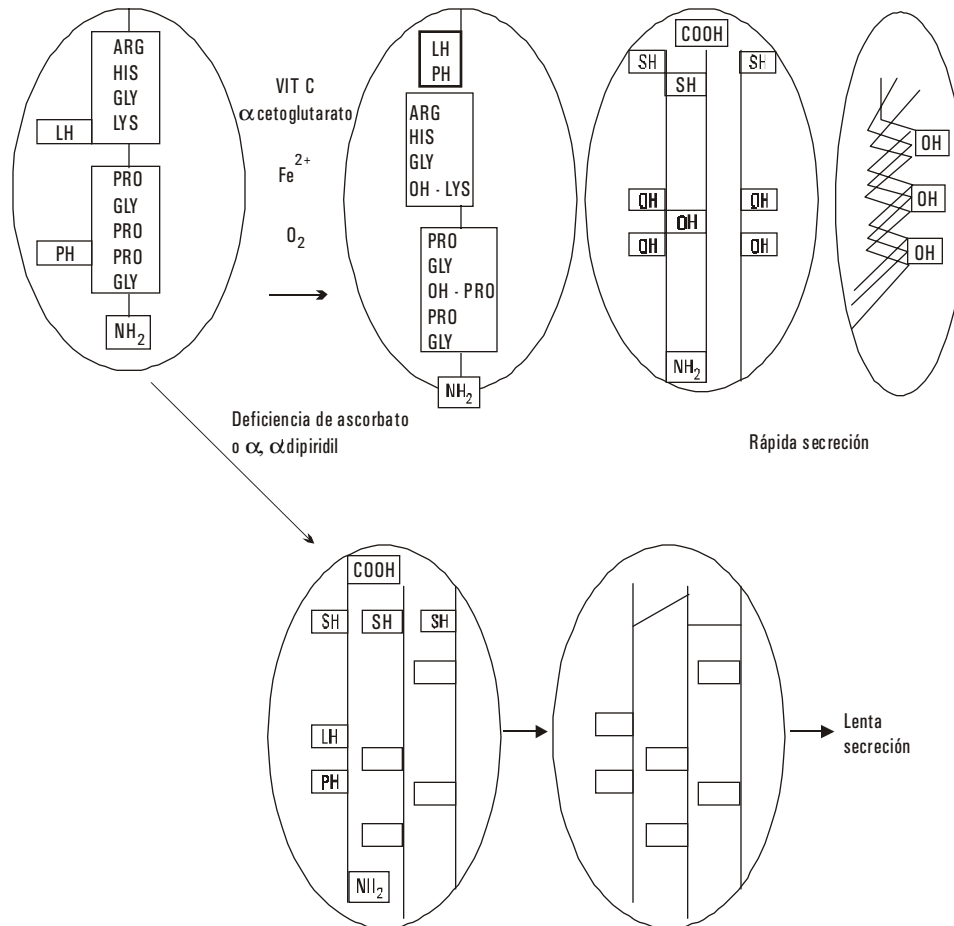


Fig. 2. Hidroxilación postraduccional del colágeno. PH, LH: prolil y lisil hidroxilasas.

La sensibilidad relativa de la lisil hidroxilasa a la deficiencia de vitamina C en diferentes modelos experimentales es un tema complejo. Estudios en cultivos de tejidos de fibroblastos 3T6 revelan pequeña o ninguna evidencia del efecto de la disminución del ascorbato sobre la hidroxilación de la lisina en el colágeno, no obstante se observa un mayor efecto en el mismo modelo sobre la hidroxilación de la prolina en el colágeno.²²⁻²⁴ Por otra parte, en el estudio realizado por *Tsuchiya y Bates* en curieles se encontró que sólo en el grupo que presentaba una deficiencia severa de vitamina C existía una reducción significativa de los niveles de hidroxiprolina.²⁵ Por todo esto se piensa que el ascorbato desempeña una función protectora bastante sutil en el mantenimiento de la máxima actividad de las enzimas de función mixta como: la lisil y la prolil-hidroxilasa y parece posible que otros efectores redox puedan modular la respuesta del ascorbato, quizás de manera diferente en los diferentes sistemas.²⁶

FORMACIÓN DE LA TRIPLE HÉLICE

Una vez terminados los procesos postraduccionales de hidroxilación y glicosilación ocurre la formación de la triple hélice de procolágeno. La estabilización de ésta se logra mediante los diferentes puentes de hidrógeno que se forman entre las 3 cadenas. Los que se pueden establecer entre los grupos amino peptídicos de los residuos glicina y los grupos carbonilos peptídicos de los residuos de la otra cadena, o bien entre los grupos hidroxilos de los residuos de Hyp y las moléculas de agua. De esta forma aparecen las interacciones cooperativas, ya que cada puente de hidrógeno es débil por sí solo, pero unidos logran la estabilización de la triple hélice (fig. 2).

Debido a esta función de los residuos hidroxiprolina es que la diferencia en la estabilidad térmica de la triple hélice está correlacionada con el contenido de

aminoácidos (Pro e Hyp) en el colágeno. A mayor contenido de aminoácidos mayor estabilidad tendrá la hélice. La temperatura de fusión del colágeno es aquélla en la cual se pierde la mitad de la estructura helicoidal y por tanto constituye un criterio de estabilidad de la estructura helicoidal. Se ha visto que la Tf de un polipéptido con secuencia poli-(Pro-Pro-Gly) es de 24 °C, mientras que la del poli-(Pro-Hyp-Gly) es de 58 °C, lo cual demuestra que la triple hélice está marcadamente estabilizada por la hidroxilación.²⁷

SECRECIÓN

En condiciones normales luego de ocurrir la hidroxilación se forma la hélice y tiene lugar una rápida secreción del procolágeno. La inhibición de la formación de la Hyp, ya sea por la omisión del ascorbato o por la adición de α, α dipiridil (sustancia que forma quelatos con el hierro) al cultivo celular o de órganos conlleva a una baja secreción (fig. 2).^{28,29} Un ejemplo de los efectos del ascorbato en la secreción del procolágeno se muestran en los estudios de *Peterkofsky* en fibroblastos de piel humana.¹⁷ Estas células son marcadas con prolina radiactiva y fueron medidas las velocidades de síntesis y secreción del colágeno.

La velocidad de síntesis del colágeno relativa a la síntesis de proteínas totales no se afectó por el ascorbato, pero sin ascorbato la velocidad inicial de secreción fue mucho más baja posiblemente debido a la inestabilidad de la triple hélice. Con el tiempo, sin embargo, la velocidad de secreción del procolágeno sin hidroxilar aumentó. Además se comprobó que el efecto del ascorbato en la secreción del procolágeno es específica, ya que la secreción de proteínas no colágenas no se afecta. Por otra parte, se ha visto que la acumulación de procolágeno en el retículo endoplasmático rugoso, con un bajo nivel de hidroxilación y sin haber alcanzado la

forma helicoidal en células incubadas sin ácido ascórbico, puede inhibir la síntesis del colágeno³⁰ y este bloqueo puede superarse con la adición de ácido ascórbico.^{31,32}

FORMACIÓN DE LAS FIBRAS DE COLÁGENO

Luego de ser secretado, el tropocolágeno se ensambla cerca de la superficie celular para formar las fibras, las cuales se encuentran reforzadas por la formación

de los entrecruzamientos covalentes. Estas uniones se forman con los residuos lisina e hidroxilisina y la única enzima que participa en este proceso es la lisil oxidasa, que contiene un ion cobre en su sitio activo (fig. 3). No obstante, se ha encontrado que en roedores de laboratorio se necesitan prolongadas y severas deficiencias de este metal para que se afecte suficientemente la actividad de la lisil oxidasa de forma tal que cause efectos significativos en los entrecruzamientos del colágeno óseo.³³

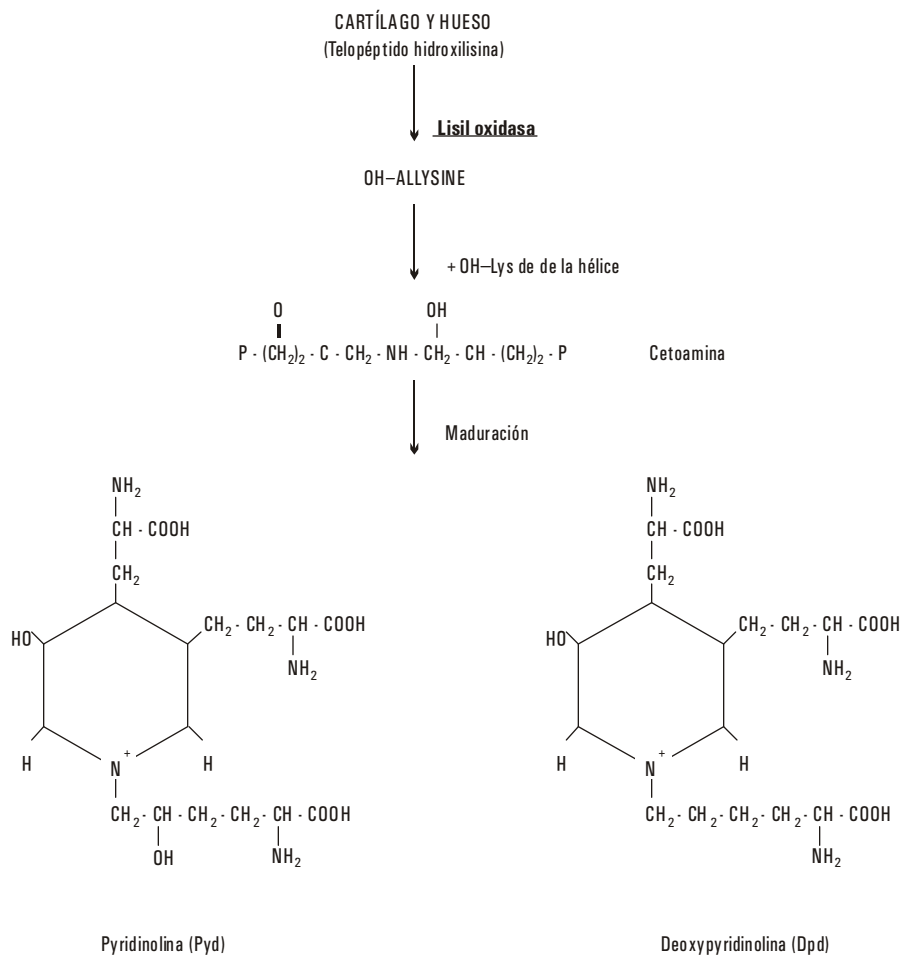


Figura 3. Formación de los crosslinks covalentes en el colágeno de hueso y cartilago.

En los estudios realizados por *Tsuchiya y Bates* sobre posibles interacciones entre la vitamina C y el cobre, se encontró que ninguno de los 2 nutrientes presenta un efecto medible sobre el contenido de hidroxiprolina por unidad de peso óseo en el fémur ni por unidad de creatinina en la orina.³⁴ Tampoco se aprecia un efecto significativo sobre la proporción Pyd/creatinina en orina. Sin embargo, moderados cambios en los niveles de vitamina C afectan significativamente la proporción de los entrecruzamientos piridinolina (Pyd) y deoxipiridinolina (Dpd), al menos en hueso, sin afectar el número total de entrecruzamientos presentes por unidad de hidroxiprolina (Hyp). La Dpd urinaria sufre un incremento ante una deficiencia subclínica de ascorbato al igual que la observada en el hueso aunque en menor extensión, lo que se muestra en la proporción Dpd/entrecruzamientos totales. Este efecto, es decir, un relativo incremento de la Dpd y una correspondiente disminución de la Pyd en los animales con bajo consumo de vitamina C se corresponde con los hechos siguientes: 1) que los entrecruzamientos de Pyd son más dependientes de los residuos hidroxilisina en la molécula del colágeno que los crosslinks de Dpd y 2) que el ácido ascórbico es un cofactor esencial en la conversión postraduccional del lisil-colágeno a residuos hidroxilisina.³⁵ Las observaciones de este estudio concuerdan con la hipótesis de que una deficiencia relativa de ácido ascórbico en los sitios críticos de formación del colágeno como el hueso, provoca una deficiencia relativa de los residuos hidroxilisina, lo cual gira el balance hacia la formación de Dpd con preferencia a la Pyd.

En este mismo estudio se aprecia una diferencia marcada con respecto al colágeno óseo entre los grupos con alto y bajo consumo de vitamina C y una diferencia detectable aunque menos marcada para los entrecruzamientos urinarios.³⁴ Esto

puede ser debido a que los productos urinarios derivan de varios tejidos, algunos de los cuales se encuentran menos afectados por las variaciones en la disponibilidad del ascorbato que en el caso del fémur. Un estudio anterior indica que el colágeno óseo es más sensible a los efectos de la deficiencia de vitamina C (síntesis de Hyp total) que el colágeno de muchos otros sitios del cuerpo.³⁶

El consumo de calcio tiene una influencia similar sobre los marcadores del recambio óseo. En estudios de suplementación realizados en los últimos años se evidencia una reducción del 14-33 % en la excreción de los entrecruzamientos del colágeno para los grupos suplementados con respecto a aquéllos que mantenían un consumo normal (800 mg/d).^{37,38} Sin embargo, para el sodio no se han encontrado cambios en la resorción ósea entre individuos con consumo bajo (80 mmol/d) y alto (180 mmol/d).³⁹

Recientemente se realizó el primer estudio de caso-control en humanos, donde se tomaron como casos 22 mujeres con signos clínicos de deficiencia de vitamina C que pertenecían a un grupo de refugiados. En él se analizó el recambio óseo a través de la determinación de los entrecruzamientos del colágeno (Pyridinolina y deoxipiridinolina) en orina y se encontró que la excreción de estos compuestos era un 30 % superior en los casos que en los controles, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. (Basabe B, Rossi L, Ferrari M, Branca F. The urinary excretion of collagen crosslinks in mild vitamin C deficiency. XXX Reunione Generale Societa Italiana di Nutrizione Umana. 1998). Por otra parte, la proporción Pyd/Dpd fue la misma en ambos grupos (2,5:1); pero resulta importante señalar que los valores reportados resultan inferiores a los valores normales reportados en la literatura (3-4:1).⁴⁰

SUMMARY

Most mammals are able to synthesize vitamin C, but some species as man depend on exogenous sources of this vitamin because they do not have the last enzyme in the biosynthesis of ascorbic acid starting from glucose. Its main function is as a reducing agent in different reactions in the collagen metabolism. Its deficiency is mostly associated with a decrease in the procollagen synthesis and with a reduced hydroxylation of the proline and lysine residues, leading to the obtention of a molecule that is less stable at body temperature. Among experimental animals lacking this vitamin it was observed a reduction in the formation of hydroxylysine residues in bone and, therefore, a reduction in the pyridinoline (Pyd)/deoxypyridinoline (Dpd) proportion in bone and urine. Similar affections have been found in humans recently.

Subject headings: ASCORBIC ACID/physiology.

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. Schwarz RI, Kleinman P, Owens N. Ascorbate can act as an inducer of the collagen pathway because most steps are tightly coupled. *Ann NY Acad Sci* 1987;498:172-85.
4. Chung JH, Youn SH, Kwon OS, Cho KH, Youn JI, Eun HC. Regulations of collagen synthesis by ascorbic acid, transforming growth factor-beta and interferon gamma in human dermal fibroblast cultures in three-dimensional collagen gel are photoaging independent. *J Dermatol Sci* 1997;15(3):188-200.
5. Davidson JM, Lu Valle PA, Zoia O, Quaglino D Jr, Giro M. Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblast by pretranslational mechanism. *J Biol Chem* 1997;272(1):345-52.
6. Hitomi K, Tsukagoshi N. Role of ascorbic acid in modulation of gene expression. *Subcell Biochem* 1996;25:41-56.
7. Tajima S, Pinnell SR. Ascorbic acid preferentially enhances type I and III collagen gene transcription in human skin fibroblast. *J Dermatol Sci* 1996;11 (3):250-3.
8. Spanheimer RG, Bird TA, Peterkofsky B. Regulation of collagen synthesis and mRNA levels in articular cartilage of scorbutic guinea pigs. *Arch Biochem Biophys* 1986;246:33-41.
9. Bird TA, Spanheimer RG, Peterkofsky B. Coordinate regulation of collagen and proteoglycan synthesis in costal cartilage of scorbutic and acutely fasted, vitamin C- supplemented guinea pigs. *Arch Biochem Biophys* 1986;246:42-51.
10. Mahmoodian F, Gosiewska A, Peterkofsky B. Regulation and properties of bone alkaline phosphatase during vitamin C deficiency in guinea pigs. *Arch Biochem Biophys* 1996;336(1):86-96.
11. Palka J, Bird TA, Oyamada I, Peterkofsky B. Similar hormonal changes in sera from scorbutic and fasted (vitamin C- supplemented) guinea pigs, including decreased IGF-I and appearance of an IGF-I reversible mitogenic inhibitor. *Growth Factors* 1989;1:147-56.
12. Oyamada I, Bird TA, Peterkofsky B. Decreased extracellular matrix production in scurvy involves a humoral factor other than ascorbate. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;152:1490-6.
13. Oyamada I, Bird TA, Peterkofsky B. Scorbutic and fasted guinea pigs sera contain an insulinlike growth factor I- reversible inhibitor of proteoglycan and collagen synthesis in chick embryo chondrocytes and adult human skin fibroblast. *Arch Biochem Biophys* 1990;276:85-93.
14. Phillips LS, Vassilopoulou-Sellin R. Somatomedins. *N Engl J Med* 1980;302:371-80.
15. Humbel RE. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 1980;190:445-62.
16. Baxter RC. Binding proteins for the insulin-like growth factors: structure, regulation and function. *Prog Growth Factor Res* 1989;1:49-68.
17. 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.
18. Peterkofsky B, Palka J, Wilson S, Takeda K, Shah V. Elevated activity of low molecular weight insulin-like growth factor-binding proteins in sera of vitamin C-deficient and fasted guinea pigs. *Endocrinology* 1991;128:1769-79.

19. Minotti G, Aust SD. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1986;262:1098-104.
20. Houglum KP, Brenner DA, Chojkier M. Ascorbic acid stimulation of collagen biosynthesis independent of hydroxylation. *Am J Clin Nutr* 1991;54:1141S-3S.
21. Harish P. Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. *Nutr Rev* 1991;49(3):65-70.
22. Bates CJ, Prynne 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.
23. Ganta DR, McCarthy MB, Gronowicz GA. Ascorbic acid alters collagen integrins in bone culture. *Endocrinology* 1997;138(9):3606-12.
24. Ronchetti IP, Quaglino D Jr, Bergamini G. Ascorbic acid and connective tissue. *Subcell Biochem* 1996;25:249-64.
25. Tsuchiya H, Bates CJ. Ascorbic acid deficiency in guinea pigs: contrasting effects of tissue ascorbic acid depletion and of associated inanition on status indices related to collagen and vitamin D. *Br J Nutr* 1994;72:745-52.
26. Kivirikko KI, Myllylä R. Posttranslational enzymes in the biosynthesis of collagen: intracellular enzymes. *Methods Enzymol* 1982;82:245-304.
27. Stryer L. *Connective-tissue proteins*. Biochemistry. San Francisco: WH Freeman;1975:206-26.
28. Blanck TJJ, Peterkofsky B. The stimulation of collagen secretion by ascorbate as a result of increased proline hydroxylation in chick embryo fibroblast. *Arch Biochem Biophys* 1975, 171:259-67.
29. Eleftheriades EG, Ferguson AG, Spragia ML, Samarel AM. Prolyl hydroxylation regulates intracellular procollagen degradation in cultured rat cardiac fibroblast. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27(8):1459-73.
30. Pacifici M, Iozzo RV. Remodeling of the rough endoplasmic reticulum during stimulation of procollagen secretion by ascorbic acid in cultured chondrocytes. A biochemical and morphological study. *J Biol Chem* 1988;263:2483-92.
31. Schwarz RI. Procollagen secretion meets the minimum requirements for the rate-controlling steps in the ascorbate induction of procollagen synthesis. *J Biol Chem* 1985;260:3045-9.
32. Dumas M, Chaudagne C, Bonte F, Meybeck A. Age-related response of human dermal fibroblast to L-ascorbic acid: study of type I and III collagen synthesis. *CR Acad Sci III* 1996;319(12):1127-32.
33. 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.
34. 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.
35. Robins SP. Biochemical markers for assessing skeletal growth. *Eur J Clin Nutr* 1994;48:S199-S209.
36. Bates CJ. Vitamin C deficiency in guinea pigs: variable sensitivity of collagen at different sites. *Int J Vitamin Nutr Res* 1979;49:77-86.
37. Shapses SA, Robins SP, Schwartz EI, Chowdhury H. Short-term changes in calcium but not protein intake alter the rate of bone reabsorption in healthy subject as assessed by urinary pyridinium cross-link excretion. *J Nutr* 1995;125:2814-21.
38. 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.
39. Ginty F, Flynn A, Cashman KD. The effect of dietary sodium intake on biochemical markers of bone metabolism in young women. *Br J Nutr* 1998;79(4):343-50.
40. Seibel MJ, Duncan A, Robins SP. Urinary hydroxy-pyridinium crosslinks provide indices of cartilage and bone involvement in arthritic diseases. *J Rheumatol* 1989;964-70.

Recibido: 26 de octubre de 1999. Aprobado: 30 de noviembre de 1999.

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