

## MARCADORES DEL REMODELAMIENTO OSEO EN SALIVA Y SU CORRELACION CON LOS NIVELES SANGUINEOS EN RATAS

GRETEL PELLEGRINI<sup>1</sup>, MACARENA GONZALES CHAVES<sup>1</sup>, JULIA SOMOZA<sup>2</sup>,  
SILVIA FRIEDMAN<sup>1</sup>, SUSANA N. ZENI<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Bioquímica General y Bucal, Facultad de Odontología, <sup>2</sup>Sección Osteopatías Médicas, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

**Resumen** Si bien es conocida la utilidad de marcadores óseos en suero u orina para determinar cambios en el remodelamiento óseo, la misma no ha sido totalmente estudiada en saliva. Este trabajo evalúa la correlación entre dos marcadores del recambio óseo: la fosfatasa alcalina ósea (isoforma ósea, FAO) y el telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (CTX), medidos simultáneamente en suero y saliva de ratas Wistar (250 a 300 g), SHAM (n=12) y ovariectomizadas (OVX) (n=12). Luego de una semana de la cirugía se extrajo sangre en ayunas y saliva total estimulada donde se evaluó CTX (ELISA, *RatLabs*, *Osteometer Bio Tech*, Dinamarca) y FAO (*Wiener*, colorimetría). En el suero, tanto CTX (ng/ml) como FAO (UI/l) en ratas OVX fueron significativamente mayores que en ratas SHAM (15.3±4.0 vs. 21.8±6.4, p<0.05 y 71±29 vs. 104±23; p<0.01, respectivamente). En saliva se observó el mismo comportamiento (3.6±0.5 vs. 6.4±2.9; p<0.02 y 73±29 vs. 90±8; p<0.003, respectivamente). Las concentraciones de CTX y FAO en saliva se correlacionaron positivamente con los respectivos niveles sanguíneos (r= 0.58, p<0.05 y r= 0.59, p<0.05, respectivamente). Los resultados del presente estudio preliminar y la sencillez en la obtención de la saliva total ofrecerían una alternativa no invasiva al suero para la medición del remodelamiento óseo. Sin embargo, la aplicación de esta metodología a la clínica humana requiere extensas investigaciones adicionales.

**Palabras clave:** ratas, saliva, marcadores óseos, remodelamiento óseo

**Abstract** *Bone remodeling markers in saliva as compared to serum in rats.* Bone markers are useful tools to measure bone remodeling; currently they are assessed in serum and urinary samples; however there is little information concerning their measurement in saliva. The present experimental study evaluates the possibility to measure collagen type I carboxiterminal telopeptide (CTX) and bone alkaline phosphatase (b-AP) in saliva, its correlation with serum samples in normal conditions and in the increase of the bone remodeling due to estrogen deficiency. Twenty four normal adult Wistar rats (300±20 g) [12 SHAM and 12 rats after 1 week of bilateral ovariectomy (OVX)] were studied. Fasting serum and total saliva after stimulation with pilocarpine were collected. In both samples were measured: CTX (ng/ml) by ELISA (*RatLabs*, *Osteometer Bio Tech*, Denmark) and b-AP (IU/L) (*Wiener*, colorimetrically). Both CTX and b-AL in serum samples were significantly higher in OVX than in SHAM rats (15.3±4.0 vs. 21.8±6.4, p<0.05 y 71±29 vs. 104±23; p<0.01, respectively). Saliva presented the same behaviour (3.6±0.5 vs. 6.4±2.9; p<0.02 y 73±29 vs. 90±8; p<0.003, respectively). When saliva CTX and b-AP were plotted against serum concentration significant positive correlations were obtained: r=0.58, p<0.05 and r=0.59; p<0.05, respectively. In conclusion, the present results are promisory in the sense of the potential use of a salivary-based test for evaluating bone remodeling. However, the use of this methodology for clinical practice needs extensive additional investigations.

**Key words:** rats, saliva, bone markers, bone remodeling

El hueso es un tejido dinámico que se encuentra en un recambio continuo denominado remodelamiento, por el cual el tejido viejo es reemplazado por nuevo. Este proceso ocurre en pequeños paquetes celulares denominados unidades de remodelamiento y es el resultado

de la acción de las células óseas; los osteoclastos (derivados de células del tejido hematopoyético de la línea monocítica/macrófaga) son los encargados del catabolismo, y los osteoblastos (células de origen mesenquimatoso) los encargados del anabolismo óseo<sup>1</sup>. En el adulto normal este proceso se encuentra acoplado, en el sentido de que la formación ocurre donde previamente se produjo la resorción; debido a ello no existe ganancia ni pérdida de masa ósea. Durante el crecimiento, en cambio, puede formarse hueso en un sitio donde no ha ocurrido previamente la resorción. Este fenómeno se deno-

Recibido: 7-XI-2005

Aceptado: 27-III-2006

**Dirección Postal:** Dra. Susana N. Zeni, Sección Osteopatías Médicas, Hospital de Clínicas, Córdoba 2351, 8 Piso, 1120 Buenos Aires  
Fax: (54-11) 595-08972 e-mail: szeni@hospitaldeclinicas.uba.ar

mina modelamiento y es el responsable de la ganancia de masa ósea y modificación del tamaño corporal que continúa hasta aproximadamente la tercer década de vida en que se logra el pico de masa ósea<sup>2</sup>. Este último constituye la máxima cantidad de hueso con que un individuo cuenta para hacer frente a las pérdidas de masa ósea que ocurrirán más adelante, cuando a partir de los 40 años aproximadamente, comience una lenta pero paulatina pérdida de masa ósea que se acelera, en la mujer, durante los primeros años de la menopausia, para igualarse luego, en la edad añosa, entre hombres y mujeres.

La actividad de las células óseas se mide indirectamente por medio de los marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo. Los de formación provienen de la actividad osteoblástica y entre los actualmente disponibles se encuentran la fosfatasa alcalina isoforma ósea, osteocalcina, propéptido del colágeno tipo I amino y carboxilo terminal (P1NP y PICP, respectivamente). Los de resorción provienen de la actividad osteoclástica y entre ellos, con distinta sensibilidad, se encuentran la hidroxiprolinuria, fosfatasa ácida tartrato resistente 5b, piridinolina y deoxipiridinolina, telopéptidos del colágeno tipo I aminoterminal (NTX), carboxiterminal (CTX) y carboxilotermino del producto de entrecruzamiento (ICTP)<sup>3</sup>.

Si bien la mayoría de los métodos de diagnóstico se basan en la determinación de distintos constituyentes de la sangre u orina (por ejemplo hormonas, proteínas, drogas de abuso, etc), otros fluidos biológicos como la saliva pueden utilizarse con fines diagnósticos<sup>4,5</sup>. La utilidad de los marcadores óseos en suero u orina para determinar cambios en remodelamiento óseo es conocida<sup>6</sup>; hasta el momento la variación en los niveles salivares en respuesta a modificaciones en la actividad de las células óseas no ha sido evaluada. La presencia de marcadores del metabolismo óseo en saliva y su correlación con los niveles sanguíneos, en condiciones normales como en estados patológicos o en la respuesta al tratamiento específico, sugiere que la misma podría utilizarse como método no invasivo para la determinación del recambio óseo.

La rata ovariectomizada (OVX) es un modelo experimental reconocido de pérdida de masa ósea por deficiencia estrogénica, reproduciendo las alteraciones que llevan a la osteoporosis postmenopáusica. La utilización de este modelo experimental en el diseño del presente estudio permite contar con un grupo homogéneo, evitando el sesgo por otros factores (cierto grado de periodontitis, inflamación, tiempo transcurrido desde la menopausia, ejercicio, dieta, etc.) que pudieran influir en los resultados finales.

Sobre estos antecedentes, los objetivos del presente estudio experimental fueron determinar la posibilidad de medir en saliva un marcador de formación como la FAO y uno de resorción tan sensible y específico como el CTX. Asimismo, evaluar su correlación con los niveles sanguí-

neos y comparar la respuesta en ambos tipos de muestras frente a condiciones que aumenten el remodelamiento óseo como ocurre con la deficiencia estrogénica.

Se estudiaron 24 ratas normales adultas de la cepa Wistar (250 a 300 g) de las cuales 12 fueron sometidas a una operación simulada (SHAM) y 12 a una ovariectomía bilateral (OVX). Las mismas se mantuvieron en condiciones controladas de humedad (55±10%), temperatura (21±1 °C) con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad y fueron alimentadas con una dieta comercial (*Granave SA*, Argentina) y con libre acceso a agua. Los animales fueron mantenidos de acuerdo a las normas de la Guía de Salud de Institutos Nacionales para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio<sup>7</sup>. A los cinco días de la cirugía se extrajo sangre de la vena de la cola y saliva total durante 45 segundos bajo anestesia leve con éter etílico, previa estimulación con 20 µl de clorhidrato de pilocarpina al 1% por 100g de rata (isoptocarpina). Las muestras se guardaron a -20 °C hasta su análisis, el cual se realizó en un único ensayo para evitar variaciones interesasyo.

Tanto en sangre como en saliva se realizó la determinación de CTX mediante un ensayo de competición proteica basado en la inmovilización de péptidos sintéticos, con una secuencia aminoacídica específica para el telopéptido C de la cadena α del colágeno tipo I (glu-lis-ala-his-asp-gli-gli-arg = péptido CTX). Para ambas muestras se utilizó la metodología ELISA (*RatLabs, Osteometer Bio Tech, Dinamarca*)<sup>8,9</sup>. El límite de detección fue de 2.5 ng/ml y el coeficiente de variación intraensayo fue de 6% en suero y de 8% en saliva. La FAO (UI/l) se midió por espectrofotometría previa precipitación específica de la isoforma ósea con lectina de germen de trigo<sup>9</sup>. Los datos fueron expresados como media ± error estándar de la media. La estadística fue realizada utilizando el paquete estadístico SPSS (*SPSS Inc, Chicago, IL*). Las diferencias entre las medias de cada uno de los grupos fueron evaluadas utilizando el test de Student para mues-

TABLA 1.- Niveles de los marcadores óseos en sangre y saliva total

	CTX (ng/ml)		FAO (UI/l)	
	Saliva	Sangre	Saliva	Sangre
SHAM	3.6 ± 0.5	15.3 ± 4.0	73 ± 29	71 ± 29
OVX	6.4 ± 2.9**	21.8 ± 6.4*	90 ± 8***	104 ± 23#

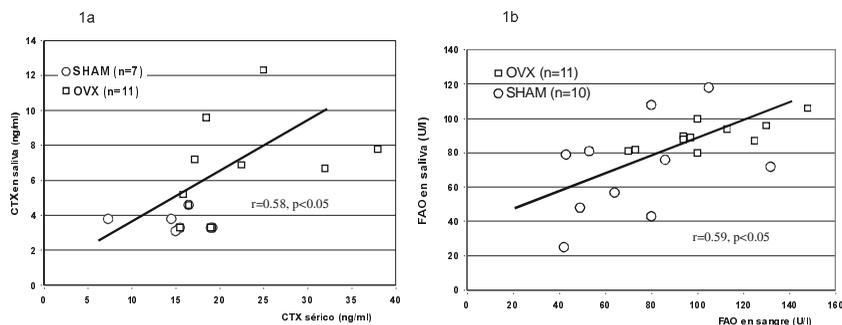
Resultados expresados como media ± DS. Los distintos grados de significancia entre ratas SHAM y OVX fueron los siguientes: (\*) p<0.05, (\*\*) p<0.02, (\*\*\*) p<0.003 y (#) p<0.01.

CTX: telopéptido C-terminal del colágeno tipo I

FAO: fosfatasa alcalina isoforma ósea

SHAM: operación simulada

OVX: ovariectomizada



Figs. 1a y 1b.- Correlación entre los niveles de marcadores óseos en sangre y saliva total.

CTX: telopéptido C-terminal del colágeno tipo I

FAO: fosfatasa alcalina isoforma ósea

SHAM: operación simulada

OVX: ovariectomizada

tras no apareadas. Un  $p<0.05$  fue considerado como significativo. Los resultados obtenidos muestran que, como se esperaba, tanto el CTX como la FAO fueron significativamente mayores en suero de ratas OVX que SHAM ( $p<0.05$  y  $p<0.01$ , respectivamente). Los niveles en saliva presentaron el mismo comportamiento ( $p<0.02$  y  $p<0.003$ , respectivamente) (Tabla 1). Los niveles de CTX y FAO en saliva correlacionaron positivamente con los respectivos niveles sanguíneos ( $r=0.58, p<0.05$  y  $r=0.59, p<0.05$ , respectivamente) (Figuras 1a y 1b, respectivamente).

## Discusión

La rata ovariectomizada ha sido ampliamente utilizada como modelo experimental en el estudio de los efectos de la deficiencia estrogénica sobre el esqueleto. Durante los primeros años de la menopausia se produce un aumento en el remodelamiento debido a la disminución de los niveles estrogénicos que lleva a una rápida velocidad de pérdida de masa ósea. Tanto ésta como otras anomalías esqueléticas se producen por desequilibrios o desacoples entre los procesos de formación y resorción ósea que pueden ser el resultado de una mayor actividad osteoclástica, una menor actividad osteoblástica o ambos procesos al mismo tiempo<sup>10, 11</sup>. La actividad de las células óseas puede evaluarse por medio de los marcadores del remodelamiento óseo en orina o suero, cuya determinación bioquímica constituye parte de los estudios complementarios muy utilizados para el control de las distintas osteopatías metabólicas. Las investigaciones en este sentido están dirigidas al mejoramiento en la precisión de métodos de diagnóstico y el desarrollo de métodos alternativos capaces de detectar tempranamente la pérdida de masa ósea o controlar la respuesta al tratamiento.

De acuerdo a nuestro conocimiento, no existen datos en la literatura tanto médica como odontológica sobre la medición en saliva de rata de un marcador de formación de fácil realización como la FAO y un marcador de resorción como el CTX, al que en la actualidad se lo considera como uno de los más sensibles y específicos. En el presente estudio, si bien en forma preliminar, ambos marcadores en saliva presentaron el mismo comportamiento que aquellos evaluados en sangre en cuanto a diferenciar un aumento en el remodelamiento óseo debido a la deficiencia estrogénica. Asimismo, aunque los coeficientes de correlación hallados fueron bajos, posiblemente por la escasa población evaluada, existió una correlación significativamente positiva entre los niveles en sangre y saliva. Si bien estos coeficientes determinarían la utilidad de la saliva para comparar grupos experimentales, su valor en estudios prospectivos requiere ampliar el número de animales.

La saliva es una muestra biológica que presenta ciertas ventajas en el sentido de que su obtención es sencilla, no invasiva, y no requiere de personal altamente capacitado para su extracción. Este hecho hace que, si las futuras investigaciones así lo determinan, pueda ser utilizada como método alternativo para la determinación de los marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo en estudios de campo<sup>4</sup>. Asimismo, dado que en general los individuos concurren periódicamente al odontólogo para control, su medición en forma sencilla, dentro de los controles dentales de rutina, posibilitaría el diagnóstico precoz de osteopatías metabólicas. Además, en niños, la medición en saliva de marcadores aportaría una herramienta útil ya que, tanto los pediatras como las madres son reticentes a la extracción sanguínea, y la recolección de orina presenta varios inconvenientes como la expresión de los resultados (por mg de creatinina, por kg de peso corporal, por  $m^2$ ) y el tipo de orina (al acecho, basal, de 24 h).

En conclusión, a pesar de que estos estudios son de naturaleza preliminar, abren la posibilidad de disponer de una muestra biológica que tendría ciertos beneficios sobre las determinaciones sanguíneas o urinarias. En este sentido, la sencillez en la obtención de la saliva total ofrecería una alternativa no invasiva al suero para la medición del remodelamiento óseo. Sin embargo, la aplicación de esta metodología a la clínica humana requiere extensas investigaciones adicionales.

**Agradecimientos:** Este estudio fue parcialmente financiado por el subsidio UBA M033, otorgado por la Universidad de Buenos Aires.

## Bibliografía

1. Mundy GR, Chen D, Oyajobi BO. Bone remodeling, In: Favus MJ (eds). Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 5<sup>th</sup> ed. Washington: ASMBR, 2003, p 46-56.
2. Manjón Llorente G, Fernández Espuelas C, González López JM, Ruiz-Echarri MO, Baldellou Vásquez A. Valores normales de los marcadores de recambio óseo durante la infancia. *An Pediatr (Barc)* 2004; 60: 330-6.
3. Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM. Molecular basis and clinical applications of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev* 1996; 17: 333-68.
4. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva. A review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 197-212.
5. Malamud D, Tabak LA (eds). Saliva as diagnostic fluid. *Ann NY Acad Sciences*. 1993; 694.
6. Garnero P, Delmas PD. Measurements of biochemical markers: methods and limitations, In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds). Principles of bone biology, New York: Academic Press 1996, p 1277-9.
7. Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences. Guide for the care and use of laboratory animals. National Research Council. Washington, D.C.: National Academy Press 1996.
8. Garnero R, Borel O, Delmas PD: Evaluation of a fully automated serum assay for C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen in osteoporosis. *Clin Chem* 2001; 47: 694-702.
9. Zeni S, Wittich C, Di Gregorio S, et al. Utilidad clínica de los marcadores de formación y resorción ósea. *Acta Bioq Clín Latinoam* 2001; 35: 3-36.
10. Souberbielle JC, Cormier C, Kindermans C. Bone markers in clinical practice. *Curr Op Rheumatol* 1999; 11: 312-9.
11. Melton LJ, Khosla S, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL. Relationship of bone turnover to bone density and fractures. *J Bone Miner Res* 1994; 12: 1083-91.

----

*Perhaps someday the television networks and major publishers, in a fit of moral courage, will realize that when they give invaluable free publicity to medical quacks they are playing with the lives of the innocent and poorly informed. The tragedies occur when the seriously ill, swayed by the glowing testimonial of famous personalities and irresponsible journalists, forgo reputable medical aid until it is too late.*

Tal vez algún día las redes de televisión y las grandes editoriales, en un ataque de coraje moral, comprendan que cuando dan invaluable publicidad gratis a médicos curanderos están jugando con las vidas de inocentes y mal informados. Las tragedias ocurren cuando los seriamente enfermos, influenciados por los testimonios de personalidades famosas y periodistas irresponsables, renuncian a la ayuda médica acreditada hasta que es demasiado tarde.

Martin Gardner

*Psychic Surgery*. En: *The New Age. Notes of a fringe watcher*. Buffalo, NY: Prometheus, 1988, p 168