



Universitat de les Illes Balears
Laboratori d'Investigació en Litiasi Renal
Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la
Salut
Departament de Química

**ESTUDIO DE LOS PROCESOS
PATOLÓGICOS DE CRISTALIZACIÓN:
LITIASIS RENAL, CALCIFICACIONES
CARDIOVASCULARES Y OSTEOPOROSIS**

Tesis Doctoral
Pilar Sanchis Cortés
Febrero, 2008

Director de la Tesis Doctoral,

Dr. Félix Grases Freixedas

Catedrático de Química Analítica

Universitat de les Illes Balears

Memoria presentada por

Pilar Sanchis Cortés,

Licenciada en Química,

Para aspirar al grado de Doctor por la UIB en

Ciencias Experimentales y Tecnología

(Ciencia y Tecnología Química)

El Dr. Félix Grases Freixedas, catedrático de Química Analítica de la Universitat de les Illes Balears.

Certifica:

Que el presente trabajo de investigación, titulado **Estudio de los procesos patológicos de cristalización: litiasis renal, calcificaciones cardiovasculares y osteoporosis**, ha sido realizado bajo su dirección y constituye la Tesis Doctoral presentada por Pilar Sanchis Cortés.

Palma de Mallorca, febrero de 2008

Dr. Félix Grases Freixedas

A mis padres

Sin lugar a duda, el desarrollo de este trabajo de investigación no hubiera sido posible sin la ayuda, colaboración, asesoramiento y apoyo de toda una serie de personas. Por ello, quiero agradecer muy especialmente:

Al Dr. Félix Grases, por la magnífica dirección de esta tesis doctoral, la cual sin sus conocimientos, intuición, capacidad inventiva y experiencia no hubiera sido posible. También quiero agradecerle el gran apoyo y el inmejorable trato que he recibido por su parte.

A la Dra. Antonia Costa-Bauzá y al Dr. Rafael Prieto por su ayuda, asesoramiento y disponibilidad; así como por compartir conmigo conocimientos y experiencia. También quiero dar las gracias a la Dra. Margalida Ramis y al Dr. Ferran Hierro por la ayuda prestada.

Al Dr. Joan Perelló y al Dr. Bernat Isern, compañeros de laboratorio y también amigos, con quien he compartido tantas mañanas y tardes de trabajo, por la ayuda, el asesoramiento y los buenos momentos.

A Isabel Gomila, quien se ha incorporado recientemente para realizar la tesis doctoral. A ella le deseo mucha suerte y que disfrute tanto o más que yo durante la elaboración de la tesis.

A todos los miembros del grupo de investigación agradecerles también el inmejorable ambiente de trabajo que ha habido en todo momento.

Al Dr. Pau Ballester, por su ayuda y comprensión.

Al Dr. Mateu Gual, quien fue compañero de laboratorio durante los primeros años, por el apoyo y los buenos momentos compartidos.

A las diferentes ayudas que he recibido durante la realización de este trabajo de investigación por parte del Dr. José Rodríguez (Serveis Científico-tècnics de la UIB), la Dra. Teresa de Francisco (Serveis Científico-tècnics de la UIB), el Dr. Carles Saus (Hospital Universitario de Son Dureta), el Dr. Oriol Bonnin (Hospital Universitario de Son Dureta), el Dr. José Juan Torres (Hospital Universitario de Son Dureta), el Dr. Carlos Fernández Palomeque (Hospital Universitario de Son Dureta), el Dr. Miguel Fiol (Hospital Universitario de Son Dureta) y el Dr. Arturo López (Servicio de Prevención de Riesgos Laborales, Gestión Sanitaria de Mallorca).

A mi familia y especialmente a mis padres, por el apoyo, por el cariño, por la formación y por ayudarme a ser quien soy.

A mis amigas, que siempre están, estuvieron y seguirán estando.

A Miquel, quien me conoce mejor que nadie y con quien he compartido tantos momentos tanto dentro como fuera de la UIB, por ser cómo es y formar parte de mi vida.

A todos aquellos que de una manera u otra han hecho posible el desarrollo de este trabajo de investigación, **MUCHAS GRACIAS**.

Índice

ÍNDICE

OBJETIVOS	1
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
1. EL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN EN EL ORGANISMO	7
2. EL CALCIO	7
2.1. Metabolismo del calcio	8
2.1.1. Parathormona o hormona paratiroidea	8
2.1.2. Calcitonina	9
2.1.3. Vitamina D	9
2.2. Hipercalcemia e hipercalcemia	10
3. FACTORES IMPLICADOS EN EL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN	11
3.1. Sobresaturación	11
3.2. Promotores de la cristalización o nucleantes heterogéneos	11
3.3. Inhibidores de la cristalización	12
4. ETAPAS IMPLICADAS EN EL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN	14
4.1. Nucleación	14
4.1.1. Nucleación homogénea	14
4.1.2. Nucleación heterogénea	15
4.2. Crecimiento cristalino	15
4.3. Agregación	16
4.3.1. Agregación primaria	16
4.3.2. Agregación secundaria	17
5. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN	18
5.1. Cristalizaciones patológicas	18
5.2. Patologías asociadas al proceso de remodelado óseo	18
6. BIBLIOGRAFÍA	20
CAPÍTULO 2. EL ÁCIDO ÚRICO COMO INDUCTOR DE LA LITIASIS OXALOCÁLCICA.....	23
Introducción	25
1. LITIASIS RENAL. TIPOS DE CÁLCULOS RENALES	27
1.1. Cálculos de oxalato cálcico	28
1.1.1. Cálculos de oxalato cálcico monohidrato (COM)	28
1.1.1.1. Cálculos de COM papilares	29
1.1.1.2. Cálculos de COM de cavidad	30
1.1.2. Cálculos de oxalato cálcico dihidrato (COD)	30
1.1.2.1. Cálculos de COD papilares	30
1.1.2.2. Cálculos de COD de cavidad	31
1.1.2.3. Cálculos mixtos de COD / hidroxapatita	31
1.2. Cálculos de fosfato	31
1.2.1. Cálculos de fosfato infecciosos	32
1.2.2. Cálculos de fosfato no infecciosos	33
1.2.2.1. Cálculos de hidroxapatita	33
1.2.2.2. Cálculos de brushita	33
1.3. Cálculos de ácido úrico	34
1.3.1. Cálculos de ácido úrico compactos	35
1.3.2. Cálculos de ácido úrico porosos	35
1.4. Cálculos de cistina	36
1.5. Cálculos poco frecuentes	36
2. FACTORES ETIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA LITIASIS RENAL	37
2.1. Factores relativos a la composición de la orina	37
2.1.1. Sobresaturación	37
2.1.2. Promotores de la cristalización o nucleantes heterogéneos	38
2.1.3. Inhibidores de la cristalización	38

2.1.3.1. Pirofosfato	39
2.1.3.2. Citrato	40
2.1.3.3. Glicosaminoglicanos	41
2.1.3.4. Glicoproteínas	41
2.1.3.5. Fitato	42
2.2. Factores relacionados con la morfoanatomía del sistema urinario	47
3. EL ÁCIDO ÚRICO	48
3.1. Metabolismo de las purinas	48
3.1.1. Síntesis de nucleótidos purínicos	49
3.1.2. Degradación de nucleótidos purínicos	50
3.1.3. Hiperuricemia e hiperuricuria	51
3.2. Patologías relacionadas con el ácido úrico	52
3.3. Tratamiento para la síntesis excesiva de ácido úrico: alopurinol	53
4. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO	54
4.1. Métodos colorimétricos	54
4.2. Métodos enzimáticos	55
4.3. Métodos por cromatografía líquida de alta resolución	56
4.4. Métodos basados en el uso de biosensores	56
5. LA LITIASIS ÚRICA	57
5.1. Factores de riesgo en la litiasis úrica	57
5.2. El ácido úrico como inductor de la litiasis oxalocálcica	57
6. BIBLIOGRAFÍA	58

Experimental, resultados y discusión **69**

ARTÍCULO ORIGINAL 2.1. Determinación de ácido úrico en orina, saliva y cálculos de oxalato cálcico por cromatografía líquida de alta resolución / espectrometría de masas	73
ARTÍCULO ORIGINAL 2.2. El ácido úrico como inductor de la litiasis renal oxalocálcica	81
ARTÍCULO ORIGINAL 2.3. Papel del ácido úrico en los diferentes tipos de cálculos renales de oxalato cálcico	89

Conclusiones **97**

CAPÍTULO 3. FACTORES IMPLICADOS EN LOS MECANISMOS DE FORMACIÓN DE LAS CALCIFICACIONES CARDIOVASCULARES..... 101

Introducción	103
1. CALCIFICACIONES CARDIOVASCULARES. INTRODUCCIÓN	105
2. CALCIFICACIÓN EN LOS VASOS SANGUÍNEOS	105
2.1. Estructura de los vasos sanguíneos	105
2.2 Tipos de calcificación	106
2.2.1. Calcificación en la túnica íntima	106
2.2.1.1. Mecanismo de formación de la placa aterosclerótica	106
2.2.1.2. La calcificación en la placa aterosclerótica	108
2.2.2. Calcificación en la túnica media	109
3. CALCIFICACIÓN EN LAS VÁLVULAS CARDÍACAS	110
3.1. Calcificación en las válvulas nativas	110
3.1.1. Calcificación en la válvula aórtica	110
3.1.2. Calcificación en la válvula mitral	112
3.2. Calcificación en las válvulas bioprostéticas	112
4. FACTORES ETIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LAS CALCIFICACIONES CARDIOVASCULARES	114
4.1. Sobresaturación	114
4.2. Promotores de la calcificación	114
4.3. Inhibidores de la calcificación	115
4.3.1. Pirofosfato	115
4.3.2. Bisfosfonatos	116
4.4. Proteínas implicadas en el proceso de la calcificación	118
4.4.1. Proteína Gla de matriz	118
4.4.2. Osteocalcina	119
4.4.3. Fetuina-A	120

4.4.4. Osteopontina	120
4.4.5. Osteoprotegerina	122
5. BIBLIOGRAFÍA	123

Experimental, resultados y discusión **129**

ARTÍCULO ORIGINAL 3.1. El fitato inhibe la calcificación de pericardio bovino "in vitro"	133
ARTÍCULO ORIGINAL 3.2. Papel del fitato y la osteopontina en el mecanismo de calcificación de tejidos blandos	143
ARTÍCULO ORIGINAL 3.3. El fitato inhibe las calcificaciones cardiovasculares en ratas	155
ARTÍCULO ORIGINAL 3.4. Efecto de los inhibidores de la cristalización sobre las calcificaciones cardiovasculares inducidas por vitamina D	165
ARTÍCULO ORIGINAL 3.5. El fitato y las calcificaciones cardiovasculares relacionadas con el envejecimiento en ratas	173

Conclusiones **187**

CAPÍTULO 4. INHIBIDORES DE LA CRISTALIZACIÓN Y OSTEOPOROSIS..... 193

Introducción **195**

1. EL HUESO. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN	197
1.1. Composición del hueso	197
1.1.1. Matriz ósea	197
1.1.2. Células óseas	197
1.1.2.1. Células osteoprogenitoras o preosteoblastos	198
1.1.2.2. Osteoblastos	198
1.1.2.3. Osteocitos	199
1.1.2.4. Células de revestimiento o tapizantes	199
1.1.2.5. Osteoclastos	199
1.2. Tipos de tejido óseo	200
1.2.1. Clasificación histológica	200
1.2.2. Clasificación macroscópica	200
2. REMODELACIÓN ÓSEA	202
2.1. Etapas de la remodelación ósea	202
2.1.1. Etapa de activación	202
2.1.2. Etapa de resorción	202
2.1.3. Etapa de acoplamiento	203
2.1.4. Etapa de formación	203
2.1.5. Etapa de mineralización	204
2.1.6. Etapa de reposo	205
2.2. Regulación del remodelado óseo	205
2.2.1. Control local	205
2.2.2. Control sistémico	206
2.3. Marcadores del remodelado óseo	207
2.3.1. Marcadores de resorción ósea	207
2.3.2. Marcadores de formación ósea	208
3. OSTEOPOROSIS	209
3.1. Criterio diagnóstico de la osteoporosis	209
3.2. Epidemiología	210
3.3. Clasificación de la osteoporosis	210
3.3.1. Osteoporosis primaria	210
3.3.2. Osteoporosis secundaria	211
3.4. Factores de riesgo de la osteoporosis	211
4. TRATAMIENTOS DE LA OSTEOPOROSIS	213
4.1. Tratamientos antirresortivos	213
4.1.1. Calcio y vitamina D	213
4.1.2. Calcitonina	214
4.1.3. Bisfosfonatos	214
4.1.4. Terapia hormonal sustitutiva	215
4.2. Tratamientos estimuladores de la formación ósea	215

4.2.1. Flúor	215
4.2.2. Parathormona	215
4.3. Otros	216
4.3.1. Ranelato de estroncio	216
5. BIBLIOGRAFÍA	217
Resultados y discusión	221
ARTÍCULO ORIGINAL 4.1. El fitato inhibe la disolución de hidroxapatita	225
ARTÍCULO ORIGINAL 4.2. Efecto del fitato sobre el hueso en ratas ovariectomizadas	235
Conclusiones	247
CONCLUSIONES GENERALES.....	251

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos de esta Tesis Doctoral se engloban dentro de los objetivos generales del Laboratorio de Investigación en Litiasis Renal de la UIB. Estos objetivos son profundizar en el conocimiento de aspectos moleculares, de cristalización en disolución, bioquímicos, analíticos y fisiológicos para poder establecer unas bases claras en el mecanismo de formación de los diferentes tipos de cristalizaciones en el organismo humano que permitan un diagnóstico y tratamiento efectivos en cada una de las patologías asociadas a este proceso.

En particular, los objetivos de esta Tesis Doctoral se centran en tres puntos claramente diferenciados:

- Estudio de la capacidad del ácido úrico para actuar como nucleante heterogéneo del oxalato cálcico así como el efecto de diferentes inhibidores de la cristalización sobre dicho proceso.
- Estudio de los mecanismos de formación de las calcificaciones cardiovasculares así como el efecto de diferentes inhibidores de la cristalización sobre dicho proceso.
- Estudio de los mecanismos involucrados en la osteoporosis así como el efecto de diferentes inhibidores de la cristalización sobre dicho proceso.

CAPÍTULO 1.
INTRODUCCIÓN GENERAL

1. EL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN EN EL ORGANISMO

La cristalización se define como el proceso por el cual se generan sólidos cristalinos y cuando estos sólidos son sales cálcicas hablamos de calcificación. En el organismo, bajo condiciones fisiológicas y controladas tiene lugar el proceso de cristalización en huesos, cartílagos y dientes en forma de fosfato cálcico. A este tipo de cristalización se le denomina **calcificación fisiológica**.

Si consideramos que la mayoría de fluidos extracelulares (como la orina o la sangre) se encuentran sobresaturados con respecto a alguna especie, es sorprendente que, en condiciones normales, el proceso de cristalización se halle restringido a determinadas matrices y que, una vez iniciado, éste no se propague por todo el organismo. Este hecho pone de manifiesto la importancia de los factores que regulan el proceso de cristalización y del equilibrio que existe entre ellos. De hecho, la modificación de algunos de estos factores, puede provocar la alteración del proceso normal de mineralización, dando lugar a toda una serie de patologías. Así, en algunas ocasiones, cuando se produce la alteración de algún parámetro bioquímico o fisiológico, tienen lugar cristalizaciones descontroladas en tejidos blandos como son el riñón, la piel, los vasos sanguíneos y las válvulas cardíacas. Este tipo de cristalización se llama **cristalización ectópica o patológica** y puede tener graves consecuencias en función de su extensión y tejido afectado [RUSSELL 1986].

Además de las cristalizaciones patológicas, existen otras patologías asociadas al proceso de cristalización: aquellas que afectan al proceso de calcificación fisiológica. El hueso es un tejido dinámico que sufre procesos de crecimiento, reparación, modelado y remodelado a lo largo de su vida. El remodelado consiste en la renovación del tejido óseo mediante la sucesión de las etapas de resorción y formación en diminutos focos por todo el esqueleto, denominados unidades de remodelación ósea. Éste es un proceso muy activo (en el adulto se renueva anualmente cerca del 8% del tejido óseo) y de gran relevancia debido a que la mayoría de patologías óseas son consecuencia de su alteración. Normalmente, las etapas de resorción y formación están en equilibrio y la cantidad de hueso que se forma es la misma que la que se destruye. Sin embargo, cuando este equilibrio se rompe, aparecen toda una serie de patologías como son la osteopetrosis (mayor formación que resorción ósea) y la osteoporosis (mayor resorción que formación ósea).

2. EL CALCIO

El calcio es el catión más abundante del organismo humano e interviene en todas las cristalizaciones fisiológicas (fosfatos cálcicos) y en una gran cantidad de cristalizaciones patológicas (fosfatos, oxalatos y carbonatos cálcicos). Generalmente, el 99% del calcio corporal total, se encuentra en el esqueleto formando cristales de hidroxapatita y el 1% restante en la sangre. En la sangre se encuentra en un 50% como calcio iónico libre, en un 10% ligado a iones (citrato, bicarbonato) y en un 40% ligado a proteínas (fundamentalmente albúmina). La concentración del calcio intracelular es del orden de 10^{-6} M frente a 10^{-3} M en el líquido extracelular [MANOLAGAS 1988].

2.1. METABOLISMO DEL CALCIO

En el metabolismo del calcio intervienen tres hormonas (parathormona, calcitonina y vitamina D) y tres órganos o tejidos (hueso, riñón e intestino) (Figura 1.1) [COSTANZO 1998; DEVLIN 1986; MANOLAGAS 1988].

Para mantener un equilibrio correcto en la homeostasis del calcio, la cantidad de calcio expulsada por los riñones debe ser igual a la absorción intestinal real. En estas condiciones, tiene lugar un intercambio con balance cero entre el calcio extracelular y el calcio óseo. Así, si consideramos que una persona adulta ingiere aproximadamente 1000 mg de calcio diariamente, de ésta cantidad:

- **El intestino** absorbe unos 300 mg de los cuales unos 125 mg son segregados por los jugos intestinales. Por las heces se eliminan unos 825 mg.
- **El hueso** en su proceso de remodelación constante en el que intervienen los osteoblastos (células formadoras del hueso) y los osteoclastos (células destructoras del hueso), vierte al torrente circulatorio unos 500 mg pero requiere otros 500 mg.
- **El riñón** filtra unos 10000 mg, de los cuales unos 9825 mg son reabsorbidos y unos 175 mg son eliminados.

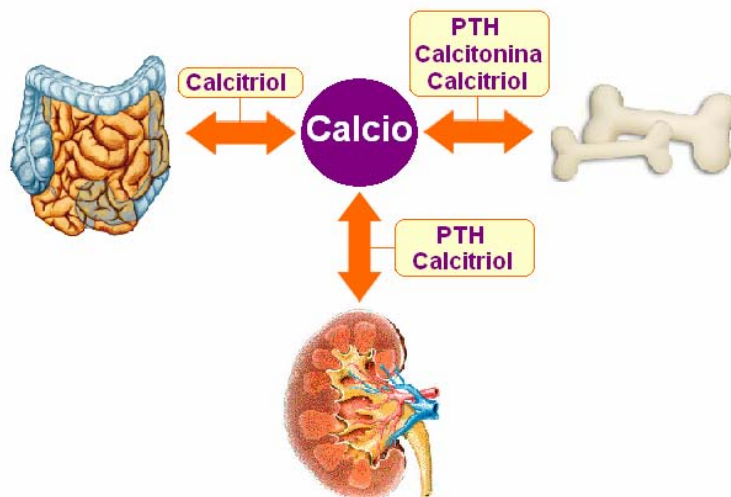


Figura 1.1. Ilustración del metabolismo del calcio donde se muestra el lugar de acción de las tres hormonas implicadas (parathormona (PTH), calcitonina y calcitriol (forma activa de la vitamina D)) sobre hueso, riñón e intestino.

2.1.1. Parathormona u hormona paratiroidea

➤ Características generales

La parathormona o hormona paratiroidea (PTH) es un péptido lineal con un peso molecular de 9500 Da formado por 84 aminoácidos. La PTH es sintetizada por las células de las glándulas paratiroides PTH y el principal estímulo para su secreción es la disminución de la concentración sanguínea de calcio libre. Cuando la concentración plasmática de calcio libre disminuye, los ribosomas de las cuatro glándulas paratiroides (situadas en el cuello por debajo de la tiroides) sintetizan y secretan PTH en forma de prepro-PTH (de 115 aminoácidos). Una secuencia de 25 aminoácidos se separa mientras se concluye la síntesis de la molécula sobre los ribosomas, quedando pro-PTH (de 90 aminoácidos). La pro-PTH se transporta al aparato de Golgi, donde se separan seis aminoácidos más y se produce la hormona final de 84 aminoácidos.

➤ Función en el metabolismo del calcio

La función de la PTH es la regulación de la concentración cálcica plasmática actuando de la siguiente forma [MANOLAGAS 1988; RAMASAMY 2005]:

- En el hueso, la acción continuada de la PTH estimula predominantemente la función de los osteoclastos aumentando la resorción ósea.
- En el intestino, la PTH no tiene ninguna acción directa aunque indirectamente estimula la absorción intestinal del calcio a través de la activación de la vitamina D, la cual aumenta la absorción intestinal.
- En el riñón, la PTH aumenta la reabsorción de calcio en el tubo contorneado distal.

Con todo ello, la acción global de la PTH es un aumento de la calcemia. También incrementa la calciuria ya que, a pesar de que incrementa la reabsorción renal, el riñón filtra más calcio debido al aumento de la calcemia provocada por la resorción ósea y la absorción intestinal.

Finalmente, cabe destacar que estudios recientes han demostrado que la administración intermitente de la PTH provoca un incremento de la formación ósea al estimular predominantemente la proliferación y actividad de los osteoblastos. De esta manera la PTH presenta un efecto catabólico sobre el hueso cuando actúa de manera continua y por el contrario, es anabólico cuando su acción es intermitente [LOTINUN 2002; PARTRIDGE 2006].

2.1.2. Calcitonina

➤ Características generales

La calcitonina es un péptido lineal con un peso molecular de 3600 Da formado por 32 aminoácidos que se forma en las células C de las glándulas tiroides. Inicialmente se sintetiza una molécula de mayor tamaño, la procalcitonina, la cual se fragmenta en varios segmentos, uno de los cuales es la calcitonina. El principal estímulo para su secreción es el aumento de la concentración extracelular de calcio.

➤ Función en el metabolismo del calcio

La acción global de la calcitonina es un descenso del calcio sanguíneo a través de la inhibición de la resorción ósea mediada por los osteoclastos [MANOLAGAS 1988; RAMASAMY 2005].

2.1.3. Vitamina D

➤ Características generales

La vitamina D (colecalférol) se puede obtener de dos maneras [DUSSO 2005; RAMASAMY 2005]: mediante la ingesta de alimentos que contengan esta vitamina (p.e., la leche y el huevo) y a través de la síntesis en la piel a partir de 7-dehidrocolesterol en presencia de luz ultravioleta.

Una vez en el organismo, el colecalfiferol se transfiere al hígado donde sufre una hidroxilación en el carbono 25 dando lugar a 25-hidroxicolecalciferol (una forma inactiva). Y, posteriormente, este compuesto sufre una 1α -hidroxilación formándose el 1,25-dihidroxicolecalciferol (calcitriol), forma activa de la vitamina D (Figura 1.2).

➤ Función en el metabolismo del calcio

La vitamina D estimula la absorción intestinal y la reabsorción renal de calcio. De esta manera, la vitamina D actúa aumentando la calcemia.

En el hueso, la acción de la vitamina D es menos conocida. Algunos autores han demostrado la presencia de receptores de vitamina D en los osteoblastos, donde promueve su diferenciación y regula la producción de proteínas tales como el colágeno, la fosfatasa alcalina y la osteocalcina. Aunque también induce en los osteoclastos la expresión de un ligando (RANKL) que se une a los preosteoclastos mediante un receptor específico (RANK) activándolos y diferenciándolos a osteoclastos. De esta manera, la vitamina D regula tanto la formación como la resorción ósea [VAN

LEEUWEN 2001].

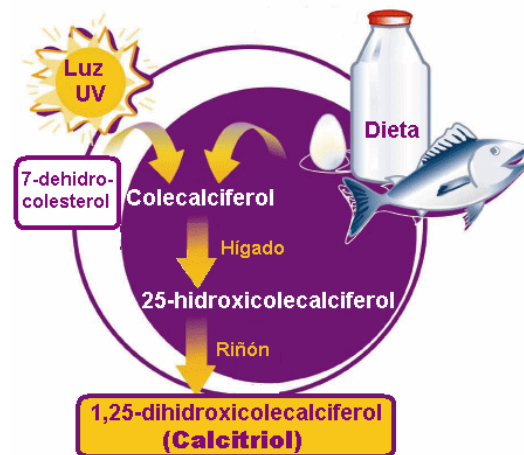


Figura 1.2. Ilustración de las etapas implicadas en la formación de 1,25-dihidroxicolecalciferol o calcitriol, forma activa de la vitamina D.

2.2. HIPERCALCEMIA E HIPERCALCIURIA

Los trastornos en el metabolismo del calcio pueden conducir a valores anormales de calcio en la sangre (calcemia) y en la orina (calciuria).

Los valores normales de **calcio en la sangre** están comprendidos entre 8.5 y 10.5 mg/dL. Cuando se detectan valores superiores hablamos de hipercalcemia. El 90% de los casos de hipercalcemia son debidos o bien a un aumento de la secreción de PTH o bien a una complicación frecuente del cáncer (hipercalcemia maligna). Sin embargo, otras causas de interés son el aumento de la actividad de la vitamina D, la ingesta excesiva de calcio y el aumento de la resorción ósea [ARRABAL 2001].

Los valores normales de **calcio en la orina** suelen estar comprendidos entre 75 y 200 mg/24 horas. Normalmente, valores superiores se consideran hipercalciuria. Cabe destacar que los valores de calciuria son muy variables y dependen de los hábitos dietéticos del individuo y de la sociedad donde se estudian. La hipercalciuria, según su etiología, puede clasificarse en dos tipos: la hipercalciuria dietética (debida a algún tipo de descontrol de la dieta) y la hipercalciuria idiopática (debida a algún tipo de trastorno en el metabolismo del calcio). Según la clasificación de Pak, la hipercalciuria idiopática puede dividirse en absorptiva (debida a un exceso de absorción cálcica intestinal), renal (debida a un exceso de pérdida renal de calcio) y resorptiva (debida a un exceso de resorción ósea) [PAK 1974].

3. FACTORES IMPLICADOS EN EL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN

En general, cualquier proceso de cristalización patológica es consecuencia del desequilibrio entre tres grupos de factores etiológicos: la sobresaturación, los promotores y los inhibidores de la cristalización. Además, estos tres grupos de factores han demostrado estar implicados también en las cristalizaciones fisiológicas [GRASES 1998; GRASES 2005A].

3.1. LA SOBRESATURACIÓN

Un sistema está sobresaturado con respecto a un soluto cuando lo contiene en cantidades superiores a la establecida por su producto de solubilidad.

Cuando una disolución se encuentra sobresaturada en relación a un determinado componente, desde el punto de vista termodinámico es inestable y tan sólo es cuestión de tiempo que termine precipitando. El período de tiempo que transcurre entre que la disolución es inestable y la precipitación se denomina período de inducción y la duración del mismo depende de toda una serie de factores de manera que éste puede ir desde segundos a años. Es precisamente este factor cinético el que provoca que, en condiciones normales, no se produzcan cristalizaciones indiscriminadas en el organismo a pesar de la sobresaturación que presentan algunos fluidos fisiológicos (como la sangre y la orina) en relación a determinadas especies.

La orina está siempre sobresaturada con respecto al oxalato cálcico y en función del pH, puede encontrarse sobresaturada con respecto al ácido úrico (pH inferior a 5.5) o con respecto al fosfato cálcico (pH superior a 6.0). En cuanto a la sangre, ésta se encuentra permanentemente sobresaturada con respecto al fosfato cálcico.

En el hueso, para que se produzca la mineralización ósea, las concentraciones locales de iones calcio y fósforo deben situarse por encima de un valor umbral y para ello, las células óseas segregan diversas sustancias (como la fosfatasa alcalina) que ayudan a aumentar la sobresaturación local con respecto al fosfato cálcico [STEVENS 1996].

3.2. PROMOTORES DE LA CRISTALIZACIÓN O NUCLEANTES HETEROGÉNEOS

Existen determinadas sustancias que facilitan la formación de cristales. Los promotores de la cristalización o nucleantes heterogéneos son sustancias con capacidad para actuar como núcleo sobre el cual pueda formarse el futuro cristal, disminuyendo así el período de inducción necesario para la formación del cristal.

En la litiasis oxalocálcica, los cristales de ácido úrico (a pH inferiores a 5.5), los de fosfato cálcico (a pH superiores a 6.0) y la materia orgánica son nucleantes heterogéneos a considerar [GRASES 1992A]. En las calcificaciones cardiovasculares, algunos autores han indicado que los productos de degradación tisular juegan un papel muy importante como nucleantes heterogéneos [TOMAZIC 2001].

En el remodelado óseo, los cristales de fosfato cálcico se forman sobre vesículas de matriz producidas previamente por los osteoblastos, las cuales actúan como nucleantes heterogéneos

[ANDERSON 2005; GRASES 2005B].

3.3. INHIBIDORES DE LA CRISTALIZACIÓN

Los inhibidores de la cristalización se pueden definir como todas aquellas sustancias que impiden o dificultan la formación de un determinado material cristalino por intervenir en una o varias de sus etapas de formación. El mecanismo de acción de los inhibidores de la cristalización es la unión o adsorción sobre la superficie del núcleo o cristal en desarrollo. Algunas sustancias que han demostrado actuar como inhibidores de la cristalización para sales cálcicas son el pirofosfato [FLEISCH 1962A; FLEISCH 1966], los bisfosfonatos [FLEISCH 1970; ROSENBLUM 1977] y el fitato [GRASES 1998; GRASES 2004]. Las propiedades inhibidoras del pirofosfato, los bisfosfonatos y el fitato se pueden explicar al observar sus estructuras (Figura 1.3), ya que presentan grupos fosfato con afinidad por los iones calcio de los cristales en formación. De esta manera, la adsorción de estos compuestos sobre la superficie de los núcleos y/o cristales cálcicos es capaz de impedir su posterior desarrollo.

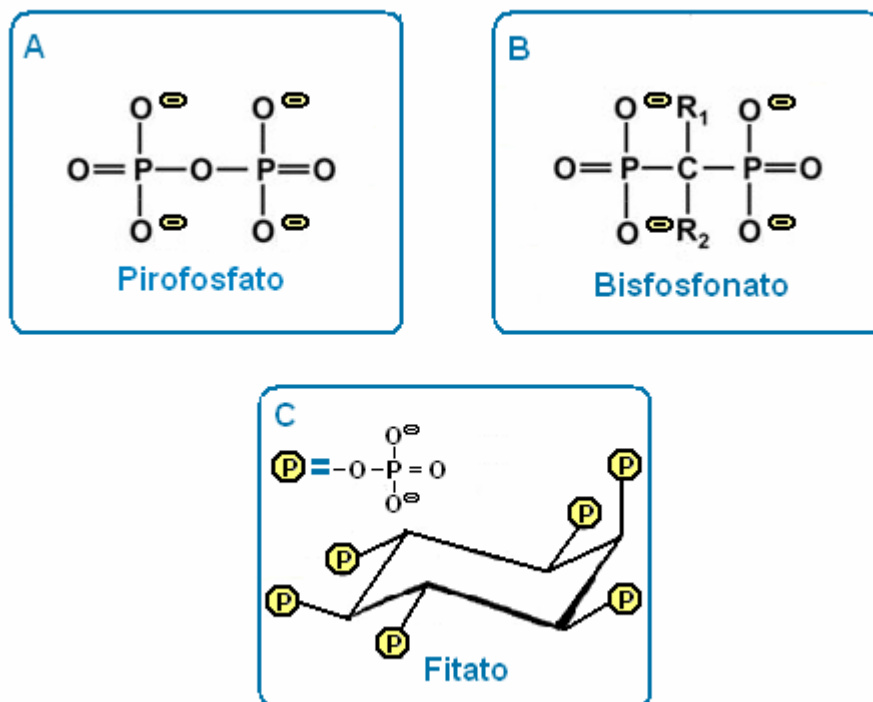


Figura 1.3. Estructura de inhibidores de la cristalización para sales cálcicas: **A.** Estructura del pirofosfato. **B.** Estructura de los bisfosfonatos. **C.** Estructura del fitato. Estos tres compuestos son sustancias con grupos fosfato que poseen propiedades inhibidoras de la calcificación. La estructura de los bisfosfonatos presenta dos grupos fosfonato unidos a un carbono central (geminal) y dos cadenas adicionales, R₁ y R₂. La disposición de las dos cadenas laterales permite numerosas sustituciones y posibilita el desarrollo de análogos con diferentes propiedades farmacológicas.

Los primeros estudios sobre los inhibidores de la cristalización se remontan a la década de los 60, aunque desde la década de los 30 se sabía que pequeñas cantidades de polifosfatos eran capaces de inhibir la cristalización de sales cálcicas, como el carbonato cálcico, en aguas duras. En 1961 Fleisch y Neuman, estudiando el mecanismo de calcificación inducido por colágeno, señalaron que

los fluidos fisiológicos como la sangre y la orina contenían determinadas sustancias (polifosfatos) que actuaban como inhibidoras de la calcificación y propusieron que compuestos de este tipo podían ser reguladores naturales del proceso de calcificación bajo condiciones fisiológicas [FLEISCH 1961].

Fleisch *et al.* demostraron que el pirofosfato inorgánico, un polifosfato natural producto de degradación de muchas reacciones fisiológicas, estaba presente en la sangre y la orina y que podía prevenir tanto la formación como la disolución de sales cálcicas adsorbiéndose sobre la superficie de los cristales recién formados [FLEISCH 1962B; FLEISCH 1966]. Por ello, postuló que el pirofosfato podía ser una sustancia que, bajo condiciones fisiológicas, previniera la calcificación ectópica y regulara la mineralización del hueso. En consecuencia a estos resultados, se estudió el efecto del pirofosfato sobre las calcificaciones ectópicas en tejidos cardiovasculares, piel y riñón y se observó que tan sólo tenía efecto cuando se inyectaba. La administración oral de pirofosfato era inactiva debido a que se hidrolizaba en el tracto gastrointestinal [FLEISCH 1970].

En consecuencia, aparecieron los bisfosfonatos que son compuestos sintéticos con propiedades inhibidoras de la calcificación análogas al pirofosfato y que además, son resistentes a la hidrólisis cuando son administrados por vía oral [FLEISCH 1970]. Sin embargo, el paso más importante hacia el futuro uso de estos compuestos en humanos tuvo lugar cuando, al igual que el pirofosfato, se demostró que eran capaces de inhibir la disolución de sales cálcicas [FLEISCH 1969; RUSSELL 1970]. Posteriormente, una multitud de estudios demostraron que los bisfosfonatos eran capaces de inhibir la resorción ósea mediada por los osteoclastos [FLEISCH 1969; RUSSELL 1970; SCHENK 1973; SCHENK 1986]. Actualmente, la aplicación clínica de los bisfosfonatos se basa casi exclusivamente en su capacidad para inhibir la resorción ósea y por ello, son tratamientos efectivos para patologías óseas caracterizadas por una excesiva actividad de los osteoclastos, como son la enfermedad de Paget y la osteoporosis [DELMAS 1997; RUSSELL 1970].

Todos estos hallazgos, ponen en evidencia que existen determinadas sustancias (como el pirofosfato y los bisfosfonatos, inicialmente clasificadas como inhibidores de la cristalización) que han demostrado poseer la capacidad de inhibir tanto la disolución como la formación de cristales cálcicos. Y que, en consecuencia, algunas de estas sustancias podrían actuar como reguladoras del proceso de calcificación en el organismo.

Recientemente, se ha demostrado que el fitato, una sustancia natural con seis grupos fosfato, presenta una capacidad inhibidora extraordinaria sobre las cristalizaciones patológicas de sales cálcicas. El fitato es una molécula de peso molecular relativamente bajo que se encuentra en las semillas utilizadas en nuestra alimentación (como son cereales, legumbres y frutos secos) y que está presente en fluidos fisiológicos (sangre, orina, fluidos intersticiales e intracelulares) y tejidos de mamíferos en bajas concentraciones que dependen de su aporte exógeno [BUNCE 1993; FRENCH 1991; GRASES 1996A; GRASES 2001]. El fitato ha demostrado tener un efecto inhibidor en la litiasis renal oxalocálcica [GRASES 1991; GRASES 1994] y fosfatocálcica [GRASES 1996B; GRASES 2000], en la sialolitiasis [GRASES 2003] y en las calcificaciones subcutáneas [GRASES 2004; GRASES 2005C].

4. ETAPAS IMPLICADAS EN EL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN

A fin de considerar con detalle el mecanismo de acción de los inhibidores de la cristalización, deben tenerse en cuenta las etapas fundamentales implicadas en cualquier proceso de cristalización: nucleación, crecimiento cristalino y agregación.

4.1. NUCLEACIÓN

La nucleación implica la formación de una masa cristalina mínima capaz de seguir creciendo (núcleo) y es, sin duda, la etapa inicial y la más importante en el proceso de cristalización. Cabe destacar que en el seno de la disolución, las micropartículas chocan entre ellas y se agregan de manera que aquellos agregados de tamaño inferior a cierto valor crítico son inestables y se desintegran, en cambio aquellos de tamaño superior al crítico son estables y precipitan, formándose así, la partícula mínima capaz de seguir creciendo. La nucleación puede ser básicamente de dos tipos: homogénea y heterogénea.

4.1.1. NUCLEACIÓN HOMOGÉNEA

En la nucleación homogénea, la partícula mínima está constituida por las mismas especies que van a constituir el futuro cristal. Este tipo de nucleación es un proceso difícil y poco probable que necesita una sobresaturación muy elevada. Los inhibidores de la nucleación homogénea serán aquellas sustancias capaces de unirse a las micropartículas de tamaño inferior al crítico, impidiendo que se forme la partícula mínima capaz de seguir creciendo (Figura 1.4B).

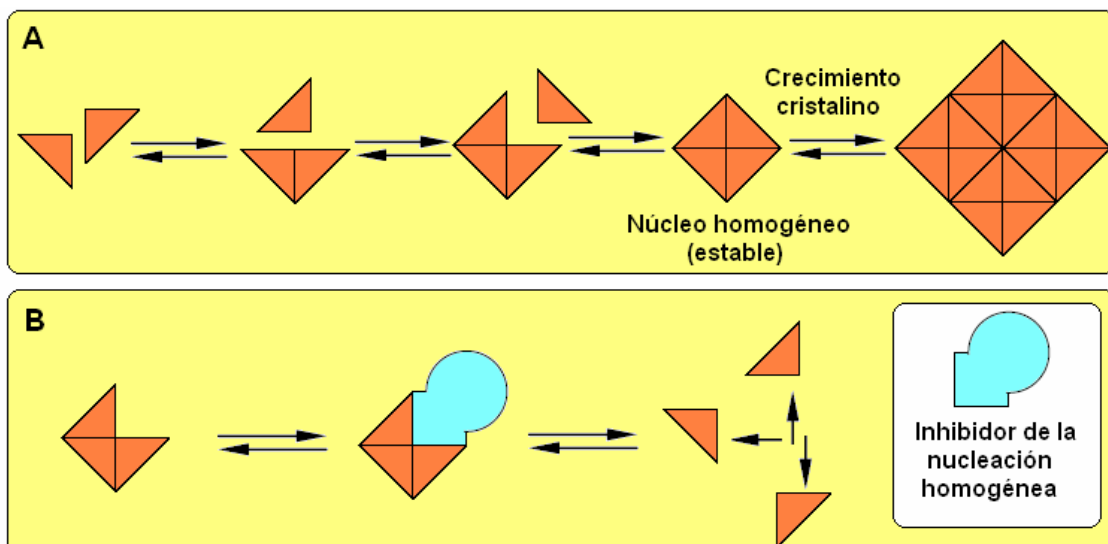


Figura 1.4. Ilustración de la nucleación homogénea: **A.** Etapas de formación de un núcleo homogéneo. **B.** Mecanismo de acción de un inhibidor de la nucleación homogénea.

4.1.2. NUCLEACIÓN HETEROGÉNEA

La nucleación heterogénea es mucho más sencilla que la homogénea, ya que exige únicamente la presencia de partículas sólidas que sean capaces de atraer y retener en su superficie las especies que van a constituir el futuro cristal (Figura 1.5A). En este caso, el núcleo presenta una composición diferente a la del resto del cristal. Los inhibidores de la nucleación heterogénea serán aquellas sustancias que evitan que los posibles núcleos heterogéneos actúen como tales, ya sea porque impiden su formación o bien porque dificultan la unión con las especies que constituirían el futuro nuevo cristal (Figura 1.5B).

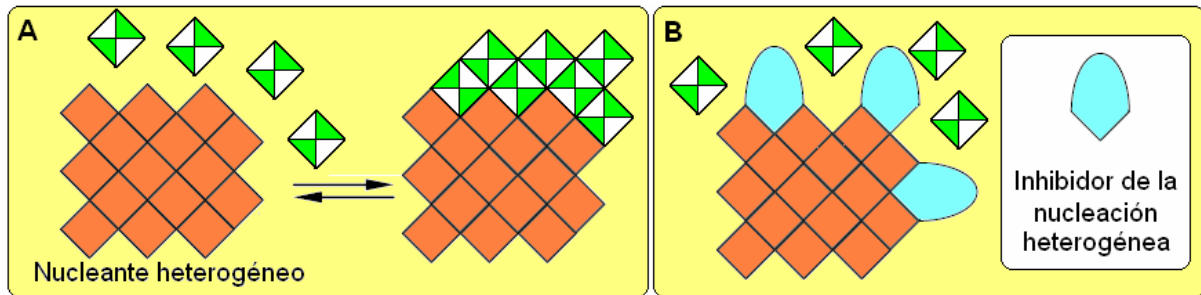


Figura 1.5. Ilustración de la nucleación heterogénea: **A.** Etapas de formación de un núcleo heterogéneo. **B.** Mecanismo de acción de un inhibidor de la nucleación heterogénea.

Una vez formado el núcleo, la posterior formación del cristal implica la combinación de dos procesos: el crecimiento cristalino y la agregación.

4.2. CRECIMIENTO CRISTALINO

El crecimiento cristalino supone la incorporación gradual de las unidades que van a constituir el futuro cristal sobre las caras del mismo en lugares especialmente favorecidos (Figura 1.6A). El crecimiento cristalino tiene lugar a través de tres procesos:

- **Transporte de materia**, desde la disolución sobresaturada hacia el cristal por difusión y/o convección.
- **Reacción superficial**, que supone la incorporación gradual de las unidades al cristal.
- **Evacuación del calor** de cristalización desde el cristal hasta el seno de la disolución.

En las disoluciones sobresaturadas este proceso es muy favorable y se da con facilidad. Los inhibidores del crecimiento cristalino son aquellas sustancias que se adsorben sobre la superficie del cristal ya formado, impidiendo o dificultando la incorporación de nuevas unidades cristalinas al mismo (Figura 1.6B).

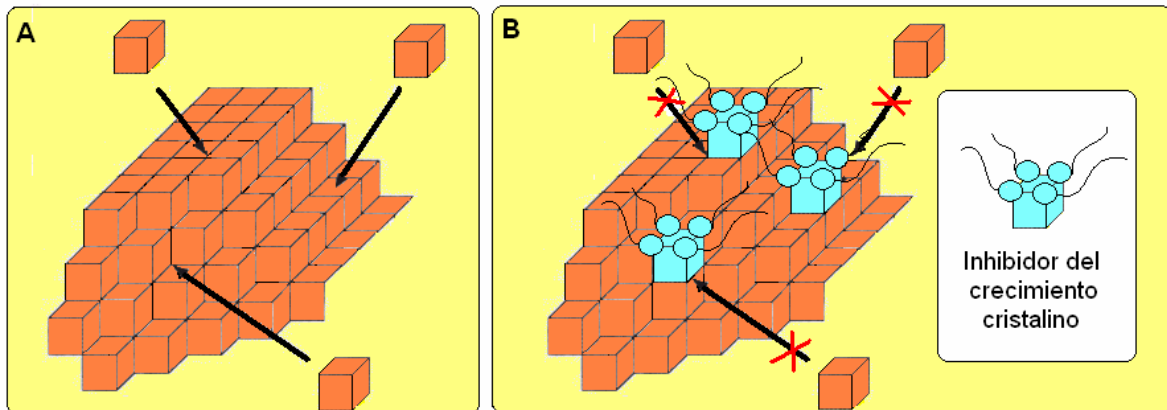


Figura 1.6. Ilustración del crecimiento cristalino: **A.** Esquema del crecimiento cristalino. **B.** Mecanismo de acción de un inhibidor del crecimiento cristalino.

4.3. AGREGACIÓN

La agregación puede ser de dos tipos: primaria y secundaria.

4.3.1. AGREGACIÓN PRIMARIA

La agregación primaria implica la formación de nuevos cristales (cristales hijos) sobre las caras de los ya existentes (cristales padres) [JONES 1989]. Este tipo de agregación se da con más o menos facilidad en función de la naturaleza de los cristales de manera que en el caso del oxalato cálcico éste es un proceso muy favorable (Figura 1.7) [MILLAN 1992; GRASES 1989; GRASES 1992b; GRASES 1992c]. En cuanto a los inhibidores de este tipo de agregación, no se tienen muchos datos pero, puesto que el mecanismo de este proceso es similar al del crecimiento cristalino, cabe esperar que los inhibidores del crecimiento cristalino lo sean también de la agregación primaria.

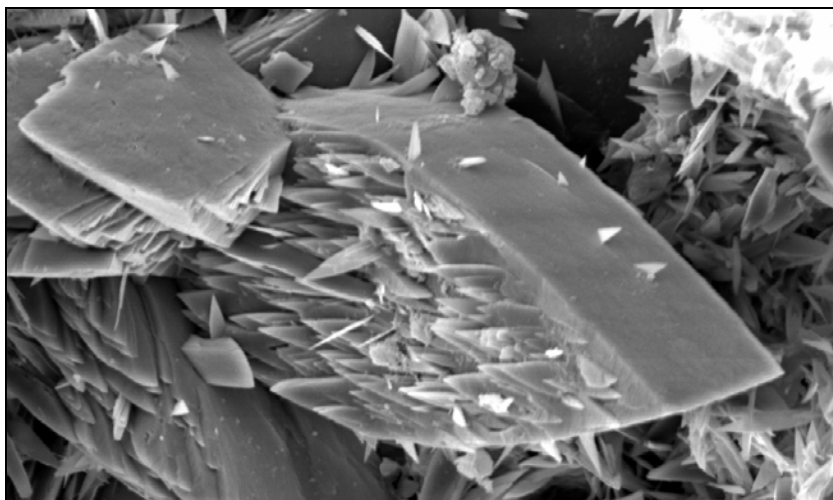


Figura 1.7. Imagen de un agregado primario de oxalato cálcico monohidratado.

4.3.2. AGREGACIÓN SECUNDARIA

La agregación secundaria consiste en la unión de cristales ya formados mediante enlaces débiles (Figura 1.8A). En ocasiones existen sustancias que actúan como puente de unión entre cristal y cristal favoreciendo dicha unión. La agregación secundaria tiene un papel importante en aquellos medios donde existe una gran cantidad de cristales (p.e., la litiasis infecciosa o de fosfatos cálcicos). Los inhibidores de la agregación secundaria son sustancias cargadas que se adsorben sobre las superficies de los cristales confiriéndoles carga eléctrica del mismo signo. De esta manera, se generan repulsiones entre los cristales y el proceso de unión para formar el agregado secundario se ve impedido o dificultado (Figura 1.8B).

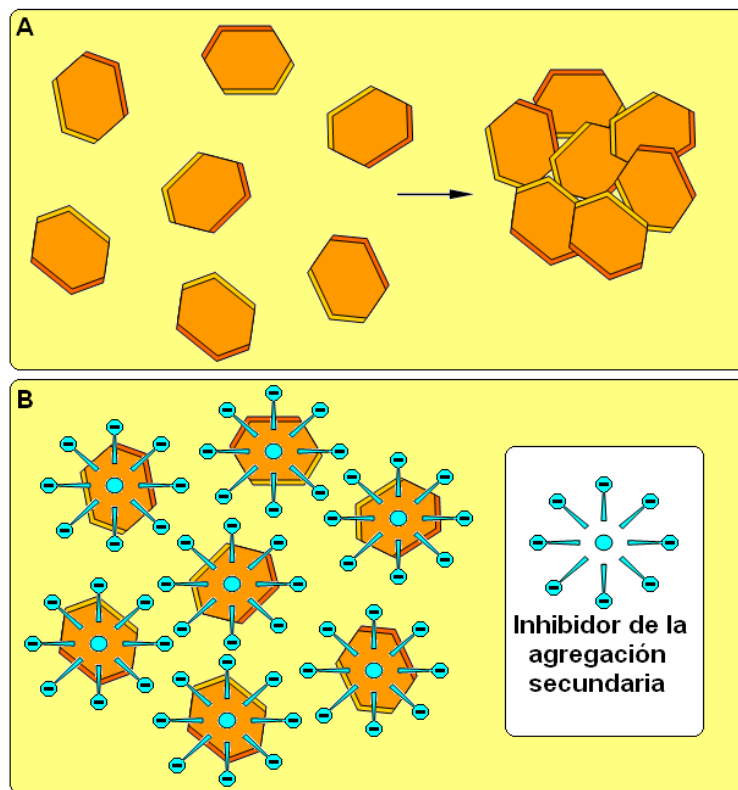


Figura 1.8. Ilustración de la agregación secundaria: **A.** Esquema de agregación secundaria. **B.** Mecanismo de acción de los inhibidores de la agregación secundaria.

5. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN

Cuando hablamos de patologías asociadas al proceso de cristalización podemos distinguir entre las cristalizaciones patológicas y las que afectan al proceso de remodelado óseo.

5.1. CRISTALIZACIONES PATOLÓGICAS

Las cristalizaciones patológicas son aquellas que se producen en otros tejidos que no sean hueso, cartílago y diente. En función del órgano o tejido afectado distinguimos entre:

- **Litiasis renal**, enfermedad causada por la presencia de cálculos en el interior de los riñones o de las vías urinarias. Los cálculos renales varían en su composición pudiéndose encontrar oxalato cálcico, fosfato cálcico, fosfato amónico magnésico, ácido úrico, cistina, etc.
- **Calcificaciones cardiovasculares**, patología caracterizada por la deposición de fosfato cálcico (hidroxiapatita) en tejidos cardiovasculares: vasos sanguíneos, miocardio y válvulas cardíacas.
- **Sialolitiasis**, enfermedad caracterizada por la formación de cálculos o depósitos cristalizados en glándulas o conductos salivales.
- **Formación de sarro**, patología caracterizada por la formación de cálculos o depósitos calcificados en los dientes que se forman por la mineralización de la placa. Podemos distinguir entre los cálculos que se forman por encima de la línea de encía y son amarillentos (cálculo supragingival) y los que se forman por debajo de la línea de encía y son de color marrón/negro (cálculo infragingival).
- **Condrocálcinosis**, enfermedad caracterizada por el depósito de sales de calcio, en concreto pirofosfato cálcico, dentro del cartílago articular.
- **Gota**, patología caracterizada por la deposición de ácido úrico, en forma de urato sódico, en estructuras articulares y periarticulares como consecuencia de altos niveles de ácido úrico en sangre (hiperuricemia).
- **Otros tipos** de cristalizaciones patológicas se desarrollan en los conductos biliares (cálculo biliar), estómago (gastrolito), intestino (enterolito), glándulas o cisterna mamarias (galactolito), etc.

5.2. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL PROCESO DE REMODELADO ÓSEO

El tejido óseo no es una estructura estática sino un tejido con una marcada capacidad de renovación. Este fenómeno de renovación se denomina remodelado óseo y tiene una doble finalidad: mantener la integridad mecánica del esqueleto y contribuir a la regulación homeostática del calcio. La remodelación tiene lugar mediante la sucesión temporal de los fenómenos de resorción ósea (osteoclastos) y de formación ósea (osteoblastos) que se establecen en zonas microscópicas que se denominan unidades de remodelación. El balance óseo de una unidad de remodelación se define como la diferencia entre la cantidad de hueso destruido y formado en dicha unidad [LAZNER 1999]. Normalmente, existe un equilibrio entre la formación y resorción ósea por lo que el

balance óseo es cero. Sin embargo, cuando se produce una alteración en el proceso de remodelado óseo aparecen toda una serie de patologías como son:

➤ **La picnodisostosis**, es una rara enfermedad congénita caracterizada por una malformación del cráneo, estatura corta, fragilidad del hueso y un aumento en la densidad ósea. La causa de esta enfermedad parece ser que es una deficiencia de catepsina K, una enzima crítica en la remodelación ósea [MOTYCKOVA 2002].

➤ **La osteopetrosis**, es una rara enfermedad congénita caracterizada por una mayor formación que resorción ósea en la que los huesos son demasiado densos. Hay varios tipos de osteopetrosis y los síntomas pueden incluir fracturas, infecciones frecuentes, ceguera, sordera, y roturas. Algunos autores indican que el origen de esta enfermedad es una deficiencia de TRAP, una importante enzima implicada en la remodelación ósea [LAZNER 1999].

➤ **La enfermedad de Paget**, es un trastorno crónico del esqueleto, frecuentemente hereditario, caracterizado por una renovación excesiva del tejido óseo junto a una formación defectuosa y, en consecuencia, algunas zonas del hueso se agrandan, se deforman y se hacen más frágiles. Este trastorno puede afectar a cualquier hueso, aunque se presenta con más frecuencia en la pelvis, el fémur, el cráneo, la tibia, la columna vertebral, la clavícula y el húmero [PAGET 1877; REDDY 2006]. La patogénesis de esta enfermedad aún no se conoce aunque se sabe que la predisposición genética y la infección viral por paramixovirus juegan un papel importante en su etiología. La enfermedad de Paget es la segunda patología del metabolismo óseo más frecuente afectando entre el 2 y el 3% de la población mayor de 60 años [REDDY 2006].

➤ **La osteoporosis**, es una enfermedad multifactorial caracterizada por una mayor resorción que formación ósea que actualmente se define como un trastorno esquelético donde se observa una disminución de la resistencia ósea y una mayor predisposición a las fracturas debido a una disminución de la masa ósea [NHI 2001]. En cuanto a su etiología, estudios epidemiológicos han descrito múltiples marcadores y factores de riesgo que conllevan a una mayor probabilidad de desarrollar esta enfermedad. De todos ellos, los factores de mayor peso son: más de diez años de menopausia, la edad, fracturas previas y antecedentes familiares de osteoporosis. Según criterios de la Organización Mundial de la Salud, la osteoporosis afecta a un 30% de las mujeres caucásicas y a un 8% de los varones caucásicos mayores de 50 años, y asciende hasta un 50% en mujeres caucásicas de más de 70 años [HERMOSO DE MENDOZA 2001]. Esta elevada incidencia convierte a la osteoporosis en la patología ósea más frecuente y en un problema de salud de primera magnitud.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [ANDERSON 2005] Anderson HC, Garimella R, Tague SE. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci* 2005;10:822-837.
- [ARRABAL 2001] Arrabal M, Gutiérrez F, Zuluaga A (2001) Síndrome hipercalcémico y enfermedades óseas. Litiasis Urinaria. En: *Enfermedades sistémicas y litiasis urinaria* (Lancina JA, Arrabal M, ed.), pp 16-49. Vision Net, Madrid.
- [BUNCE 1993] Bunce CM, French PJ, Allen P, Mountford JC, Moor B, Greaves MF, Michel RH, Brown G. Comparison of the levels of inositol metabolites in transformed haemopoietic cells and their normal counterparts. *Biochem J* 1993;289:667-673.
- [COSTANZO 1998] Costanzo LS (1998) *Fisiología*, pp 419-427. McGraw-Hill Interamericana, México.
- [DELMAS 1997] Delmas PD, Meunier PJ. The management of Paget's disease of bone. *N Engl J Med* 1997;336:558-566.
- [DEVLIN 1986] Devlin TM (1986) *Bioquímica*, pp 735-740. Reverté, Barcelona, España.
- [DUSO 2005] Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol* 2005;289:F8-F28.
- [FLEISCH 1961] Fleisch H, Neuman WF. Mechanisms of calcification: role of collagen, polyphosphates and phosphatase. *Am J Physiol* 1961;200:1296-1300.
- [FLEISCH 1962A] Fleisch H, Bisaz S. Mechanism of calcification: inhibitory role of pyrophosphate. *Nature* 1962;195:911.
- [FLEISCH 1962B] Fleisch H, Bisaz S. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am J Physiol* 1962;203:671-675.
- [FLEISCH 1966] Fleisch H, Russell RG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 1966;212:901-903.
- [FLEISCH 1969] Fleisch H, Russell RG, Francis MD. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science* 1969;165:1262-1264.
- [FLEISCH 1970] Fleisch H, Russell RG, Bisaz S, Muhlbauer RC, Williams DA. The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur J Clin Invest* 1970;1:12-18.
- [FRANCIS 1969] Francis MD, Russell RG, Fleisch H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science* 1969;165:1264-1266.
- [FRENCH 1991] French PJ, Bunce CM, Stephens LR, Lord JM, McConnell FM, Brown G, Creba JA, Michel RH. Changes in the levels of inositol lipids and phosphates during the differentiation of HL60 promyelocytic cells towards neutrophils or monocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1991;245:193-201.
- [GRASES 1991] Grases F, Costa-Bauzá A. Potentiometric study of nucleation of calcium oxalate in presence of several additives. *Clin Chem Enzym Comms* 1991;3:319-328.
- [GRASES 1992A] Grases F, Conte A. Urolithiasis, inhibitors and promoters. *Urol Res* 1992;20:86-88.
- [GRASES 1992B] Grases F, Millán A, Söhnle O. Role of agglomeration in calcium oxalate monohydrate urolith development. *Nephron* 1992;61:145-150.
- [GRASES 1992C] Grases F, Masárová L, Söhnle O, Costa-Bauzá A. Agglomeration of calcium oxalate monohydrate in synthetic urine. *Br J Urol* 1992;70:240-246.
- [GRASES 1994] Grases F, Kroupa M, Costa-Bauzá A. Studies on calcium oxalate monohydrate crystallization: influence of inhibitors. *Urol Res* 1994;22:39-43.
- [GRASES 1996A] Grases F, Llobera A. Determination of phytic acid in urine by ICP Atomic Emission Spectrometry. *Anal Letts* 1996;29:1193-1199.
- [GRASES 1996B] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A. Study of the early stages of renal formation: experimental model using urothelium of pig urinary bladder. *Urol Res* 1996;24:305-311.
- [GRASES 1998] Grases F, Costa-Bauzá A, García-Ferragut L. Biopathological crystallization: a general view about the mechanisms of stone formation. *Adv Colloid Interface Sci* 1998;74:169-194.
- [GRASES 2000] Grases F, Ramis M, Costa-Bauzá A. Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Comparison with the action of other polyphosphates. *Urol Res* 2000;28:136-140.
- [GRASES 2001] Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG. Variation of InsP_4 , InsP_5 and InsP_6 levels in tissues and biological fluids depending on dietary phytate. *J Nutr Biochem* 2001;12:595-601.
- [GRASES 2003] Grases F, Santiago C, Simonet BM, Costa-Bauzá A. Sialolithiasis: mechanism of calculi formation and etiologic factors. *Clin Chim Acta* 2003;334:131-136.

- [GRASES 2004] Grases F, Perelló J, Prieto RM, Simonet BM, Torres JJ. Dietary myo-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues: a pilot study in Wistar rats. *Life Sci* 2004;75:11-19.
- [GRASES 2005A] Grases F, Prieto RM, Costa-Bauzá A. Calcificaciones cardiovasculares: factores etiológicos implicados. *Cir Cardiovasc* 2005;12:291-297.
- [GRASES 2005B] Grases F, Isern B, Perelló J, Costa-Bauzá A. Role of the organic matter in calcium oxalate lithiasis. *Front Biosci* 2005;10:1534-1538.
- [GRASES 2005C] Grases F, Perelló J, Isern B, Prieto RM. Study of a myo-inositol hexaphosphate-based cream to prevent dystrophic calcinosis cutis. *Br J Dermatol* 2005;152:1022-1025.
- [HERMOSO DE MENDOZA 2003] Hermoso de Mendoza MT. Classification of osteoporosis. Risk factors. Clinical manifestations and differential diagnosis. *An Sist San Navar* 2003;26:29-52.
- [JONES 1989] Jones AG (1989) Agglomeration during crystallization and precipitation from solution. En: 5th Int Symp Agglomeration (Cross M, Oliver R, eds.), p 131. Inst Chem Eng, Rugby.
- [LAZNER 1999] Lazner F, Gowen M, Pavasovic D, Kola I. Osteopetrosis and osteoporosis: two sides of the same coin. *Hum Mol Genet* 1999;8:1839-1846.
- [LOTINUN 2002] Lotinun S, Sibonga JD, Turner RT. Differential effects of intermittent and continuous administration of parathyroid hormone on bone histomorphometry and gene expression. *Endocrine* 2002;17:29-36.
- [MANOLAGAS 1988] Manolagas SC, Olefski JM (1988) Metabolic bone and mineral disorders. En: Contemporary Issues in Endocrinology and metabolism, pp 13-33. Churchill Livingstone, New York, USA.
- [NIH 2001] NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference. *South MJ* 2001;94: 569-573.
- [MILLÁN 1992] Millán A, Grases F, Söhnel O, Krivánková I. Semi-batch precipitation of calcium oxalate monohydrate. *Cryst Res Technol* 1992;27:31-39.
- [MOTYCKOVA 2002] Motyckova G, Fisher DE. Pycnodysostosis: role and regulation of cathepsin K in osteoclast function and human disease. *Curr Mol Med* 2002;2:407-421.
- [PAGET 1877] Paget J. On a form of chronic inflammation of bones (osteitis deformans). *Med Chir Tr* 1877;60:37-63.
- [PAK 1974] Pak CY, Oata M, Lawrence EC, Snyder W. The hypercalciurias. Causes, parathyroid functions, and diagnostic criteria. *J Clin Invest* 1974;54:387-400.
- [PARTRIDGE 2006] Partridge NC, Li X, Qin L. Understanding parathyroid hormone action. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:187-193.
- [RAMASAMY 2006] Ramasamy I. Recent advances in physiological calcium homeostasis. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:237-273.
- [REDDY 2006] Reddy SV. Etiologic factors in Paget 's disease of bone. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:391-398.
- [ROSENBLUM 1977] Rosenblum IY, Black HE, Ferrell JF. The effects of various diphosphonates on a rat model of cardiac calciphylaxis. *Calcif Tissue Res* 1977;23:151-159.
- [RUSSELL 1970] Russell RG, Muhlbauer RC, Bisaz S, Williams DA, Fleisch H. The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calcif Tissue Res* 1970;6:183-196.
- [RUSSELL 1986] Russell RG, Caswell AM, Hearn PR, Sharrard RM. Calcium in mineralized tissues and pathological calcification. *Br Med Bull* 1986;42:435-446.
- [RUSSELL 2001] Russell G, Mueller G, Shipman C, Croucher P. Clinical disorders of bone resorption. Novartis Foundation symposium 2001;232:251-267.
- [SCHENK 1973] Schenk R, Merz WA, Muehlbauer R, Russell RGG, Fleisch H. Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate (Cl2MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of ratsage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats. *Calcif Tissue Res* 1973;11:196-214.
- [SCHENK 1986] Schenk R, Egli P, Fleisch H, Rosini S. Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. *Calcif Tissue Int* 1986;38:342-349.
- [STEVENS 1996] Stevens A, Lowe J (1996) Human Histology, pp 234-247. Mosby, New York.
- [TOMAZIC 2001] Tomazic BB. Physicochemical principles of cardiovascular calcification. *Z Kardiol* 2001;90:68-80.
- [VAN LEEUWEN 2001] Van Leeuwen JP, van Driel M, van den Bemd GJ, Pols HA. Vitamin D control of osteoblast function and bone extracellular matrix mineralization. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp* 2001;11:199-226.

CAPÍTULO 2.
EL ÁCIDO ÚRICO COMO INDUCTOR DE
LA LITIASIS OXALOCÁLCICA

Introducción



1. LITIASIS RENAL. TIPOS DE CÁLCULOS RENALES

La litiasis renal se define como una patología multifactorial que implica la formación de una estructura sólida, en la cual coexisten cristales y materia orgánica, en un complejo medio líquido (orina) en el interior del riñón.

Es una enfermedad muy frecuente que afecta entre un 1 y un 15% de la población mundial [KIM 2002; RAMELLO 1999; SCHNEIDER 1985; SCOUT 1985]. El porcentaje de incidencia de la litiasis renal difiere mucho en diferentes partes del mundo; así en Asia es del 1–5%, en Europa es del 5–9%, en Norte América es del 13–15% y en Arabia Saudí es del 18–20%, aproximadamente [HESS 2003; LEE 2002; SERIO 1999]. En España, el índice de prevalencia es superior al 4% [IBARZ 1999] y concretamente, éste asciende al 14.3% en las Islas Baleares [CONTE 1991].

La litiasis renal ha estado presente desde prácticamente los inicios de la humanidad, el cálculo más antiguo que se conoce data del año 4800 a.C. y fue encontrado en una tumba prehistórica de El Amrah, cerca de Abydos [DESNOES 1972].

El primer estudio sobre la composición de un cálculo renal fue realizado alrededor del año 1800 por Schellee (1742–1786) y Bergman (1734–1794) quienes identificaron un cálculo de ácido úrico. Sin embargo, a pesar del anticipado comienzo en el estudio de esta patología, hoy en día sigue siendo una enfermedad que posee un alto porcentaje de recidivas (del 75% en los diez años siguientes [URIBARRI 1989]) debido a que, en muchos casos, no se instaura un tratamiento terapéutico efectivo. La explicación a este hecho se debe a que se trata de una patología multifactorial que implica conocimientos de una serie de áreas diferentes: cristalización, fisiología renal, bioquímica y química analítica.

Actualmente, el análisis y el estudio de los cálculos urinarios son el paso inicial para poder establecer un diagnóstico y tratamiento terapéutico efectivo, ya que en función de la composición del cálculo, podemos establecer cuál ha sido su mecanismo de formación y los factores que han influido en dicho proceso. Esta información permite clasificar al paciente bajo una forma clínica determinada y poder, por tanto, establecer un tratamiento terapéutico efectivo basado en la modificación de dichos factores, como puedan ser pH, calciuria, uricuria, inhibidores de la cristalización, etc.

Los cálculos renales, atendiendo a su composición y mecanismo de formación, pueden agruparse en cinco grandes grupos: cálculos de oxalato cálcico, cálculos de fosfato, cálculos de ácido úrico, cálculos de cistina y cálculos poco frecuentes (Figura 2.1). Cada tipo de cálculo representa una determinada forma clínica de la litiasis renal y cada una de estas formas clínicas tiene una fisiopatología, evolución, pronóstico y tratamiento diferente.

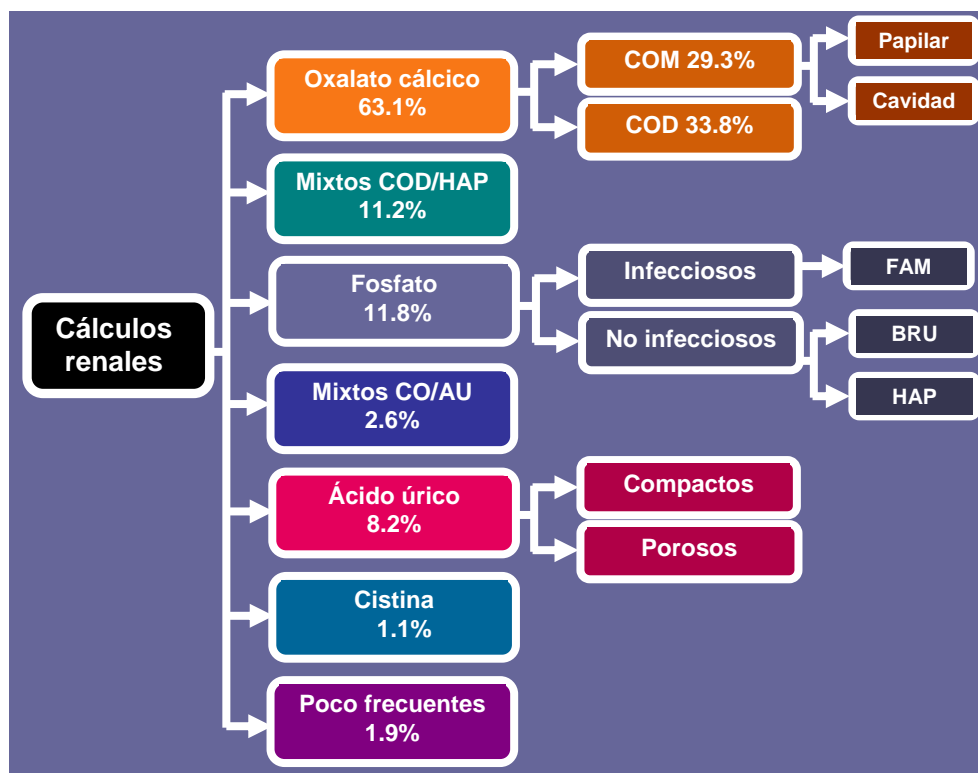


Figura 2.1. Esquema de los diferentes grupos de cálculos renales con su porcentaje aproximado de incidencia [GRASES 2002]. COM: oxalato cálcico monohidrato. COD: oxalato cálcico dihidrato. HAP: hidroxapatita. BRU: brushita. FAM: estruvita.

1.1. CÁLCULOS DE OXALATO CÁLCICO

Los cálculos de oxalato cálcico son los que tienen un mayor índice de incidencia representando, aproximadamente, el 70% del total.

En este tipo de cálculos es importante tener en cuenta que, a pesar de que cualquier orina está sobresaturada con respecto al oxalato cálcico, las concentraciones normales de estas sustancias no son suficientes para inducir, por sí mismas, la formación de cristales de oxalato cálcico. De manera que éstos cálculos necesitan de compuestos de composición diferente que sean capaces de formar un núcleo (nucleación heterogénea) sobre el cual los cristales de oxalato cálcico puedan crecer y desarrollarse [BROWN 1991; FINLAYSON 1978A; FINLAYSON 1978B].

Los cálculos de oxalato cálcico, en función de su composición, pueden dividirse en dos grandes grupos: cálculos de oxalato cálcico monohidrato (COM) y cálculos de oxalato cálcico dihidrato (COD) [KIM 1982].

1.1.1. CÁLCULOS DE OXALATO CÁLCICO MONOHIDRATO (COM)

Los cálculos de oxalato cálcico monohidrato (COM) suelen darse en aquellos casos donde se presenta una calciuria normal y una baja concentración de inhibidores [CONTE 1990; GALÁN 1996; PIERRATOS 1994]. Los cálculos de COM pueden dividirse en dos grupos: papilares y de cavidad.

1.1.1.1. Cálculos de COM papilares

Estructura. Un cálculo típico de COM papilar consta, básicamente, de tres zonas diferenciadas: un corazón de composición variable, una capa intermedia radialmente estriada y una capa periférica concéntrica con estructura laminada [IWATA 1985].

Mecanismo de formación. Se forman sobre la papila renal en aquella zona donde la capa antiadherente de glicosaminoglicanos (GAGs) se encuentra dañada debido a alguna disfunción celular, ataque externo o por la existencia de calcificaciones intrapapilares (placa de Randall) [SEE 1992]. Cuando la capa de GAGs se encuentra muy dañada es el propio detritus celular (resultante de esta agresión) que puede actuar como nucleante e inducir la formación y el crecimiento de cristales de COM sobre su superficie. En cambio, cuando la capa de GAGs no se encuentra muy dañada, pueden adherirse sobre esta zona determinadas sustancias que son capaces de actuar como nucleantes e inducir la formación y el crecimiento de cristales de oxalato cálcico sobre las mismas [GRASES 1993A; GRASES 1993B; GRASES 1994A; GRASES 1994B; SOHNEL 1993; SOHNEL 1995]. De esta manera se forma el corazón primario del cálculo, del cual se han observado básicamente cuatro estructuras diferentes [GRASES 1998A]:

- El corazón del cálculo es una formación esférica u ovalada de **cristales de COM** asociados y dispuestos libremente. La densidad del cálculo aumenta gradualmente a medida que nos acercamos a su superficie de manera que, frecuentemente, el corazón constituye la zona de menor densidad. En algunas ocasiones, se encuentran fragmentos de materia orgánica unidos a la superficie de los cristales aunque en mucha menor proporción que para el siguiente caso (Figura 2.2A).
- El corazón se encuentra constituido por **materia orgánica**. En este caso, cabe destacar que cuando la capa de GAGs se encuentra muy dañada es el propio detritus celular (resultante de esta agresión) que actúa como nucleante (Figura 2.2B) [GRASES 1992].
- El corazón presenta una estructura delgada y plana constituida por **materia orgánica calcificada por hidroxiapatita** y se encuentra en la zona de unión a la papila renal (Figura 2.2C).
- El corazón es una estructura esférica u ovalada que presenta estructuras esferulares de **hidroxiapatita** (Figura 2.2D).

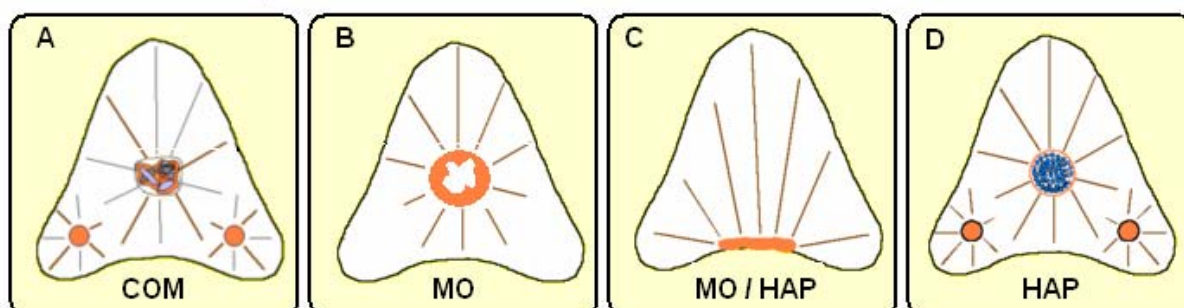


Figura 2.2. Ilustración de los cuatro tipos de cálculos de oxalato cálcico monohidrato en función de la composición del corazón primario: **A.** Corazón constituido por cristales de oxalato cálcico monohidrato (COM) asociados y dispuestos libremente. **B.** Corazón constituido por materia orgánica (MO). **C.** Corazón constituido por materia orgánica (MO) calcificada por hidroxiapatita (HAP). **D.** Corazón constituido por estructuras esferulares de hidroxiapatita (HAP).

1.1.1.2. Cálculos de COM de cavidad

Estructura. Un cálculo típico de COM de cavidad consta de dos zonas diferenciadas: una zona o corazón central de composición variable (que contiene el o los nucleantes heterogéneos responsables de la formación del cálculo) y una zona periférica constituida por cristales columnares de COM que han crecido perpendicularmente a la superficie del corazón (Figura 2.3) [GRASES



Figura 2.3. Ilustración de un cálculo de COM de cavidad.

1998A].

Mecanismo de formación. Se generan en determinadas zonas del riñón con alguna deficiencia urodinámica (cavidades de baja o reducida eficacia urodinámica) [CHANDHOKE 1996]. En este tipo de cavidades pueden depositarse determinadas partículas sólidas con capacidad para actuar como nucleantes e inducir la formación y el crecimiento de cristales de COM sobre su superficie [CIFUENTES 1984; ELLIOT 1973]. De esta manera se forma el corazón primario del cálculo, del cual se han observado básicamente tres composiciones diferentes:

- El corazón del cálculo se encuentra constituido por cristales de COM y materia orgánica.
- El corazón del cálculo se encuentra constituido por hidroxapatita y materia orgánica.
- El corazón del cálculo se encuentra constituido por ácido úrico.

1.1.2. CÁLCULOS DE OXALATO CÁLCICO DIHIDRATO (COD)

Cabe destacar que la forma dihidrato es la fase termodinámicamente inestable y cinéticamente favorable del oxalato cálcico, la fase termodinámicamente estable es la forma monohidrato [NAKAI 1996; SKRTIC 1987]. Así, la formación de oxalato cálcico dihidrato (COD) sólo se explica considerando los factores cinéticos. Suelen observarse cálculos de COD en aquellos casos donde existe una calciuria y/o oxaluria anormalmente elevada y valores de pH superiores a 6.0 [GRASES 1990]. Este tipo de cálculos pueden dividirse en tres grupos: cálculos de COD papilares, cálculos de COD de cavidad y cálculos mixtos de COD y hidroxapatita.

1.1.2.1. Cálculos de COD papilares

Estructura. Son muy poco frecuentes. Presentan dos zonas claramente diferenciadas: una zona central constituida o bien por un pequeño cálculo papilar de COM o bien por un depósito papilar de hidroxapatita. La otra zona periférica está constituida por grandes cristales bipiramidales de COD que se desarrollan sobre la zona anterior. Los cristales de COD, debido a su morfología bipiramidal, no pueden crecer en paralelo y se superponen unos a otros dando lugar a una estructura desordenada (Figura 2.4).

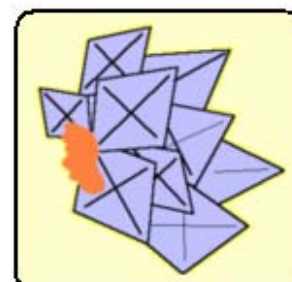


Figura 2.4. Ilustración de un cálculo de COD papilar.

Mecanismo de formación. Su mecanismo de formación es el mismo que el descrito para los cálculos papilares de COM. Sólo que, en este caso, una vez formado el pequeño cálculo papilar de COM, los cristales que se forman sobre su superficie son de COD debido a las condiciones urinarias (una calciuria y/o oxaluria anormalmente elevadas y valores de pH superiores a 6.0).

1.1.2.2. Cálculos de COD de cavidad

Estructura. Estos cálculos están formados por cristales bipiramidales de COD y cantidades variables de COM resultado de la transformación de COD a COM. Estos cálculos también contienen pequeñas cantidades de hidroxiapatita irregularmente distribuidas (Figura 2.5).

Mecanismo de formación. Este tipo de cálculo se forma en cavidades de baja eficacia urodinámica. La sedimentación de algunas partículas sólidas (principalmente materia orgánica y hidroxiapatita) en estas cavidades, induce a la formación sobre su superficie de cristales de oxalato cálcico dihidrato.

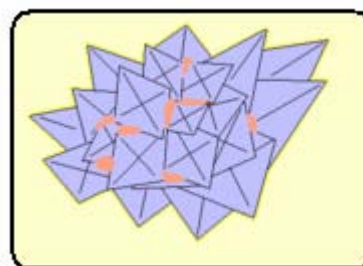


Figura 2.5. Ilustración de un cálculo de COD de cavidad formado principalmente por cristales piramidales de COD y pequeñas cantidades de hidroxiapatita.

1.1.2.3. Cálculos mixtos de COD / hidroxiapatita

Estructura. Estos cálculos están compuestos por cristales de COD, poseen ciertas cantidades de COM resultado de la transformación de COD e importantes cantidades de hidroxiapatita y materia orgánica que, frecuentemente pero no siempre, se disponen alternativamente formando capas diferenciadas (Figura 2.6).

Mecanismo de formación. Estos cálculos se presentan normalmente en pacientes hipercalciúricos (calcio urinario superior a 250–300 mg/24h) y se forman en cavidades de baja eficacia urodinámica. La sedimentación de materia orgánica y su calcificación por hidroxiapatita debida a la existencia de pH urinarios superiores a 6.0, induce el desarrollo de cristales de COD cuando la orina presenta altos niveles de calcio. La existencia de capas de hidroxiapatita y COD ha sido atribuida a cambios en la composición de la orina debida a modificaciones de la dieta [CIFUENTES 1984].

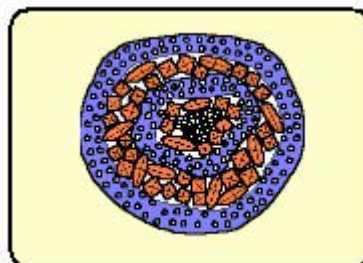


Figura 2.6. Ilustración de un cálculo de COD no papilar formado por la disposición alternativa de dos capas diferentes.

1.2. CÁLCULOS DE FOSFATO

Los tres tipos de cálculos renales de fosfato más frecuentes son: hidroxiapatita (HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$), brushita (BRU, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y estruvita o fosfato-amónico-magnésico (FAM, $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) [MURPHY 1962; PRIEN 1947].

La fase termodinámicamente estable en solución acuosa es la brushita para pH inferiores a 5.0 y la hidroxiapatita para pH superiores a 5.0 [KEMENADE 1987; NANCOLLAS 1980]. De esta manera, los fosfatos se transforman en hidroxiapatita o brushita en función del pH del medio.

Los cálculos de fosfato pueden dividirse en dos categorías: cálculos de fosfato no infecciosos (los cuales están formados básicamente de hidroxiapatita o brushita) y cálculos de fosfato infecciosos (que están formados por estruvita con cantidades variables de hidroxiapatita).

1.2.1. CÁLCULOS DE FOSFATO INFECCIOSOS

Estructura. Siempre contienen estruvita, la cual constituye entre un 20 y un 60% de la masa del cálculo de fosfato, y la parte restante consiste en hidroxiapatita y/o hidroxiapatita deficiente de calcio tal y como indica la relación Ca/P (entre 1.3 y 1.6).

Estos cálculos suelen tener un tamaño considerable y aunque no presentan una estructura interna regular, su superficie presenta una estructura en forma de Y muy característica (Figura 2.7).

En este tipo de cálculos encontramos cristales de estruvita (los cuales pueden llegar a medir 100 μm) diseminados a través de todo el cálculo junto con materia orgánica y esferas individuales de hidroxiapatita, frecuentemente acumuladas en las cavidades del cálculo.

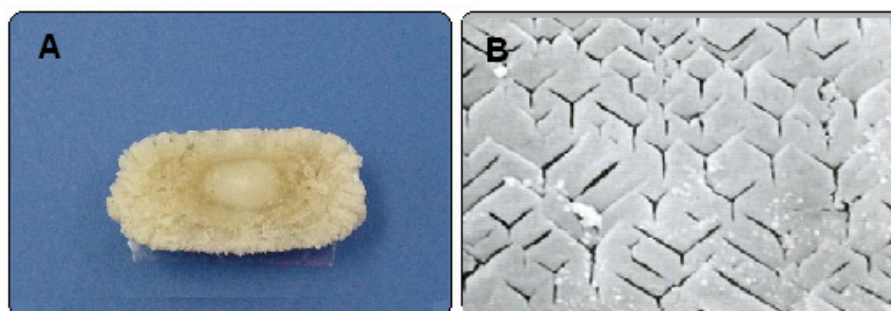


Figura 2.7. Imágenes de cálculos de estruvita: **A.** Imagen de un cálculo de estruvita. **B.** Imagen donde se aprecia la estructura en forma de Y muy característica de este tipo de cálculos.

Mecanismo de formación. La infección bacteriana del tracto urinario suele ser la causa más común de este tipo de litiasis. Los gérmenes ureolíticos (Proteus, Klebsiellas, Pseudomonas, Ureoplasma, etc.) provocan una notable elevación del pH urinario (pH superior a 7.0) y de la concentración urinaria de amonio favoreciendo la precipitación de estruvita e hidroxiapatita. La masa cristalina formada junto con el detritus orgánico (p.e., residuos celulares, bacterias, mucoproteínas) por simple sedimentación pueden originar importantes depósitos que, por pérdida de agua, acabarán convirtiéndose en cálculos.

Debe considerarse que la presencia de cálculos de oxalato cálcico, ácido úrico, fosfatos cálcicos, etc., pueden generar lesiones uroteliales, las cuales son capaces de provocar infecciones que generen un elevado pH urinario y favorezcan la precipitación de fosfato-amónico magnésico, formándose así, cálculos mixtos oxalato-fosfato-amónico-magnésico y/o ácido úrico-fosfato-amónico-magnésico.

1.2.2. CÁLCULOS DE FOSFATO NO INFECCIOSOS

En este tipo de litiasis diferenciamos entre cálculos de hidroxapatita y cálculos de brushita.

1.2.2.1. Cálculos de hidroxapatita

Estructura. Su estructura interna se caracteriza por una serie de capas de material amorfo conocidas como capas aspidínicas de hidroxapatita [CIFUENTES 1984] y caracterizadas porque, aunque macroscópicamente no presentan una estructura definida, microscópicamente se observan pequeñas esferas de aproximadamente $0.1 \mu\text{m}$ de material amorfo (Figura 2.8). Las esferas de hidroxapatita se acumulan en gran parte en las cavidades de baja eficacia urodinámica como entidades individuales o formando agregados de unos $50 \mu\text{m}$ de diámetro. Estos cálculos contienen una gran cantidad de materia orgánica.

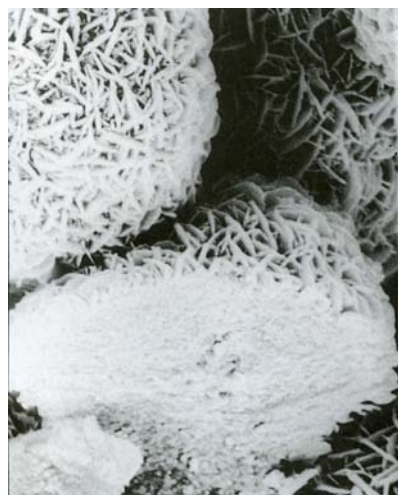


Figura 2.8. Detalle de la estructura esferular típica de la hidroxapatita.

Mecanismo de formación. Se requiere la existencia de cavidades renales de baja eficacia urodinámica, combinada con valores de pH urinario superiores a 6.0 e hipomagnesiuria. En estas condiciones se generan en la orina microcristales de hidroxapatita probablemente inducidos por la presencia de materia orgánica. La compactación por pérdida de agua de todo este material acaba por generar el cálculo.

1.2.2.2. Cálculos de brushita

Estructura. No son compactos, pero contienen numerosas cavidades parcialmente llenas con partículas esféricas de hidroxapatita y materia orgánica. Los cristales de brushita presentan un tamaño considerable y se disponen paralelos unos a otros formando unas estructuras en empalizada (Figura 2.9).



Figura 2.9. Imagen de un cálculo puro de brushita.

Mecanismo de formación. Su mecanismo de formación, al igual que el de los cálculos de hidroxapatita, requiere la existencia de cavidades renales de baja eficacia urodinámica.

En este caso los contenidos urinarios de magnesio suelen ser normales, el pH oscila entre 6–7 y es frecuente detectar un déficit de inhibidores [GRASES 1996A]. En este tipo de cálculos se combinan fenómenos de sedimentación y crecimiento cristalino.

1.3. CÁLCULOS DE ÁCIDO ÚRICO

Los cálculos compuestos mayoritariamente por ácido úrico representan aproximadamente entre el 8 y el 13% del total de los cálculos renales humanos [LEUSMANN 1991; GRASES 2002].

El ácido úrico en solución acuosa a pH inferiores a 5.5 puede cristalizar en forma anhidra, dihidratada o como mezcla de ambas en función de las condiciones de la disolución [BABIC-IVANCIC 1987]. Estudios "in vitro" demuestran que el ácido úrico anhidro (AUA) es la forma termodinámicamente estable y que el ácido úrico dihidrato (AUD), el cual se forma con sobresaturaciones muy elevadas, es una fase muy inestable que tiende a transformarse en AUA perdiendo agua y generando estructuras frágiles con grietas y fisuras [HESSE 1975; HESSE 1979].

Así, el ácido úrico presente en los cálculos renales se encuentra mayoritariamente como AUA aunque en ocasiones se ha detectado AUD y en muchos casos se detectan ambas formas. También es frecuente detectar cristales de oxalato cálcico, básicamente monohidrato, entre los cristales de ácido úrico, hecho que pone de manifiesto la capacidad que presentan los cristales de ácido úrico para actuar como nucleantes heterogéneos del oxalato cálcico.

Los cálculos de ácido úrico pueden ser clasificados en función de su estructura en dos tipos diferentes [GRASES 2000A]: compactos (Figuras 2.10A y B) y porosos (Figuras 2.10C y D).

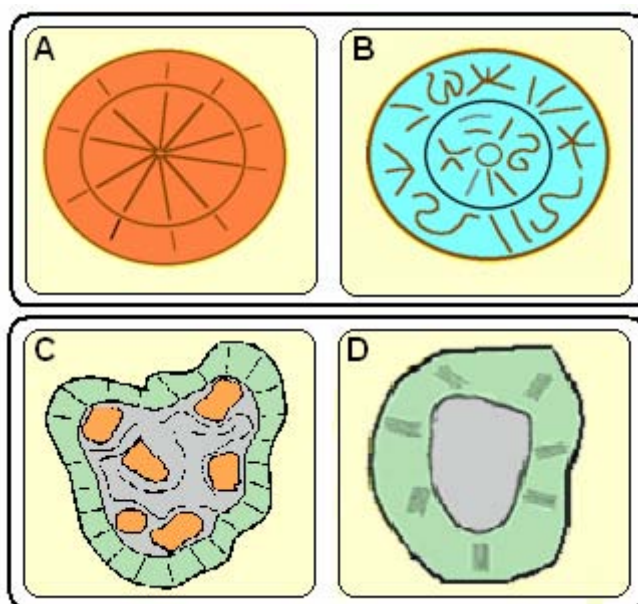


Figura 2.10. Ilustración de los cálculos de ácido úrico (AU): **A.** Cálculo de AU compacto formado por cristales ordenados columnares. **B.** Cálculo de AU compacto formado por cristales ordenados concéntricos pero no columnares. **C.** Cálculo de AU poroso formado en la parte interior por materia orgánica, cristales de AUA y COM. La parte más externa está formada por una delgada capa compacta de material cristalino. **D.** Cálculo de AU poroso compuesto por una capa externa formada por grandes bloques de AUD que se han transformado en AUA dando lugar a grietas. El interior del cálculo se encuentra lleno de partículas que se han depositado durante la calculogénesis.

1.3.1. CÁLCULOS DE ÁCIDO ÚRICO COMPACTOS

Estructura. Están principalmente constituidos por cristales de AUA generados por crecimiento cristalino lento (baja sobresaturación) o por recristalización. También pueden encontrarse deposiciones de pequeñas partículas que provienen de la orina. En función de la composición y estructura del núcleo, este tipo de cálculos pueden dividirse en dos grupos:

- Aquellos en los que el cálculo se desarrolla a partir de un corazón situado en el centro o la superficie por crecimiento cristalino. El corazón del cálculo consiste en **cristales de AUA bien desarrollados y conectados débilmente entre ellos o en una pequeña concreción de COM**. Desde el corazón del cálculo emergen cristales columnares que crecen radialmente hacia la superficie. En muchos casos, se observan láminas concéntricas (en el caso de que el corazón sea central) y ovaladas (cuando el corazón está en la superficie). Estas láminas (límites entre capas columnares adyacentes) están compuestas por cristales de AUA desorientados (Figura 2.10A).
- Aquellos en los que el corazón central está formado por **cristales relativamente grandes de AUA unidos sin ningún orden aparente**. El interior del cálculo es poroso y está compuesto por pequeños cristales de AUA. En su estructura se observa que se alternan capas no columnares densas y muy poco densas, dando una impresión de láminas concéntricas. Se observan cantidades considerables de materia orgánica y excepcionalmente, cristales de AUD y de AUA (Figura 2.10B).

Mecanismo de formación. Se generan a partir de la formación de un corazón formado por grandes cristales de AUA, concreciones de origen sedimentario relativamente grandes compuestas por numerosos cristales o pequeñas concreciones de COM. Así, este corazón es retenido en una cavidad abierta del riñón a la cual la orina fresca accede fácilmente. De esta manera, sobre el corazón, que está en continuo contacto con la orina fresca se desarrolla una capa cristalina compacta compuesta mayoritariamente por AUA. Los cristales columnares que constituyen esta capa forman la mayoría del interior del cálculo. Esto significa que una relativa baja sobresaturación con respecto al ácido úrico prevalece durante la generación del cálculo y que, consecuentemente, se da un lento crecimiento cristalino. Sin embargo, la presencia de láminas concéntricas compuestas por pequeños cristales desorientados implica la existencia de episodios con un aumento en la sobresaturación urinaria. Largos periodos con elevada sobresaturación provocan la formación de una gran cantidad de cristales nuevos de AUA y AUD los cuales pueden provocar la rotura de la estructura columnar.

1.3.2. CÁLCULOS DE ÁCIDO ÚRICO POROSOS

Estructura. El crecimiento cristalino junto con la sedimentación son importantes procesos en la formación de este tipo de cálculos. Pueden subdividirse en dos grupos diferentes en función de la estructura de la capa superficial:

- Aquellos que presentan una parte interna porosa formada por **material de origen orgánico, cristales de AUA y COM** de forma y tamaño características de partículas que aparecen en la orina durante la cristaluria. La parte más externa del cálculo está constituida por una delgada capa compacta de material cristalino. El principal constituyente de este tipo de cálculo, AUA, se encuentra

acompañado por partículas de COM diseminadas en la masa del cálculo y por grandes bloques originalmente de AUD que se han transformado en AUA dando lugar a las características grietas paralelas longitudinales (Figura 2.10C).

➤ Aquellos que están formados por una capa externa bien desarrollada compuesta mayoritariamente de *grandes bloques originalmente de AUD que se ha transformado en AUA dando lugar a las características grietas*. Esta capa crea una especie de cáscara. El interior del cálculo se encuentra lleno o parcialmente lleno de partículas que se han ido depositando durante la calculogénesis (Figura 2.10D).

Mecanismo de formación. Se generan a partir del desarrollo de un depósito cristalino en la pared de una cavidad de baja eficacia urodinámica. Las partículas presentes en la orina (cristales de ácido úrico, oxalato cálcico o detritus orgánico) se depositan bajo condiciones óptimas en la cavidad. Estas partículas permanecen en contacto con la orina y favorecen el crecimiento de cristales de AUA y AUD. La cavidad interior se llena de cristales de AUA, partículas de COM y materia orgánica. El interior del cálculo es poroso y posee una estructura desordenada. Cuando la cavidad está llena, la capa compacta que recubre la superficie del cálculo sigue creciendo hasta que recubre completamente toda la superficie del cálculo.

1.4. CÁLCULOS DE CISTINA

Estructura. Los cálculos de cistina son poco frecuentes (representan aproximadamente entre el 1 y el 2% [GRASES 2002]) y se caracterizan por su aspecto característico, su dureza y difícil fragmentación.

Mecanismo de formación. Este tipo de cálculos se dan en aquellas condiciones en las que tiene lugar una eliminación renal anormalmente elevada de cistina debida a una alteración genética y un pH urinario ácido (la cistina es un aminoácido que es muy poco soluble en medio ácido). Estos cálculos no suelen ser papilares y su formación se da básicamente por la combinación de los procesos de sedimentación y crecimiento cristalino.

1.5. CÁLCULOS POCO FRECUENTES

Los cálculos poco frecuentes representan entre el 1 y el 2% de los cálculos totales [GRASES 2002] y suelen ser debidos a una ingesta abundante y continuada de algunos productos, como por ejemplo fármacos. Entre este tipo de cálculos cabe citar los formados por triamterene, sílice, glefamina, sulfamidas, etc. Otros cálculos muy poco frecuentes de origen no farmacológico, son los de carbonato cálcico (frecuentes en rumiantes) y los de urato cálcico.

2. FACTORES ETIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA LITIASIS RENAL

Los factores etiológicos a considerar en el estudio de dicha patología pueden clasificarse en dos grandes grupos (Figura 2.11):

- **Factores relativos a la composición de la orina.** Éstos pueden clasificarse a su vez en tres grandes categorías: sobresaturación de los componentes de la orina, inhibidores de la cristalización y promotores de la cristalización o nucleantes heterogéneos.
- **Factores relacionados con la morfoanatomía del sistema urinario.** Entre ellos se deben considerar las alteraciones del epitelio de la papila renal y la existencia de cavidades de baja eficacia urodinámica.

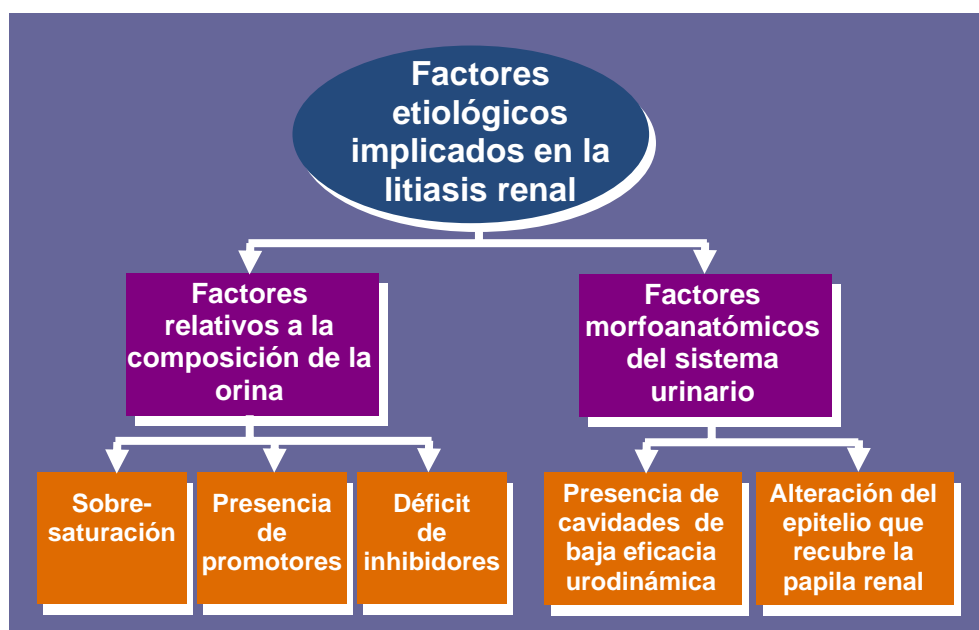


Figura 2.11. Esquema de los factores etiológicos implicados en la litiasis renal.

2.1. FACTORES RELATIVOS A LA COMPOSICIÓN DE LA ORINA

Los factores relativos a la orina que favorecen la litiasis renal son sobresaturación, déficit de inhibidores de la cristalización y presencia de promotores de la cristalización.

2.1.1. SOBRESATURACIÓN

La sobresaturación es la fuerza impulsora de la cristalización de manera que cuando una disolución se encuentra sobresaturada con respecto un determinado componente, desde el punto de vista termodinámico, es inestable y tan sólo es cuestión de tiempo que termine precipitando. En el caso de la orina, éste es un medio que se encuentra permanentemente sobresaturado con respecto al oxalato cálcico y en función del pH puede encontrarse sobresaturada con respecto al ácido úrico (pH inferiores a 5.5) o fosfato cálcico (pH superiores a 6.0).

2.1.2. PROMOTORES DE LA CRISTALIZACIÓN O NUCLEANTES HETEROGÉNEOS

Tal y como se ha indicado anteriormente, el proceso de formación de un cristal puede darse a partir de un núcleo de composición diferente a la del resto del cristal (nucleación heterogénea). Así, los promotores de la cristalización o nucleantes heterogéneos son todas aquellas partículas que pueden actuar como núcleo sobre el cual puedan formarse y desarrollarse los futuros cristales que constituirán el cálculo. Para la formación de los cálculos de oxalato cálcico, los nucleantes heterogéneos tienen una gran importancia ya que recordemos que, en condiciones normales, el oxalato cálcico no es capaz de formar un cristal por sí mismo (nucleación homogénea). Entre las sustancias que pueden actuar como nucleantes heterogéneos de la litiasis oxalocálcica cabe destacar los fosfatos cálcicos (brushita y hidroxiapatita), para valores de pH urinarios mayores de 6.0 y el ácido úrico para valores de pH urinario menores de 5.5. Otras sustancias de interés son las proteínas, el detritus celular, agregados de glicoproteínas, carbonato cálcico y fármacos.

2.1.3. INHIBIDORES DE LA CRISTALIZACIÓN

Los inhibidores de la cristalización son sustancias que dificultan o impiden el desarrollo de cristales. Pueden actuar tanto a nivel de nucleación (adsorbiéndose sobre el núcleo en formación), como de crecimiento cristalino (adsorbiéndose sobre las caras del cristal en formación) e incluso en ambos procesos a la vez.

Los primeros indicios de la existencia de inhibidores de la cristalización se remontan a los años 60. Bliznakov demostró que algunas moléculas podían reducir el grado de crecimiento de ciertas sustancias debido a que se adsorbían sobre la superficie en crecimiento [BLIZNAKOV 1965]. El primer inhibidor biológico reconocido fue el pirofosfato, el cual a concentraciones muy bajas inhibía la precipitación en orina de oxalato cálcico [FLEISCH 1962A; FLEISCH 1962B; FLEISCH 1964].

Después del pirofosfato otras moléculas que se encuentran de manera natural en la orina se han descrito como inhibidoras, algunas de ellas de bajo peso molecular como el magnesio o el citrato [LU 1985; MEYER 1985; RYALL 1981; PAK 1987] y otras de elevado peso molecular, como los glicosaminoglicanos y la glicoproteína de Tamm-Horsfall [CRAWFORD 1968; HESS 1991; HESS 1992; SHUM 1993]. Se aceptó que estas sustancias podían jugar un papel importante en la prevención de la litiasis renal.

A finales de los años 70 y durante los años 80 tomó fuerza la idea de que existía una sustancia presente en la orina con gran capacidad inhibidora, con propiedades ácidas y de peso molecular relativamente bajo. Al principio se pensaba que podía ser un pequeño péptido [BARKER 1970] o que se podía tratar de un fosfocitrato [SALLIS 1995], pero no se encontraron evidencias definitivas. En las dos últimas décadas se ha observado una tendencia a considerar las proteínas como los agentes inhibidores más importantes, pero la aparición de trabajos contradictorios (unos describiendo efectos inhibidores y otros apuntando propiedades claramente promotoras de la cristalización [RYALL 1997]) quita fuerza a esta idea, a pesar de que es clara su acción como sustancias antiadherentes (lubricantes) de partículas sólidas sobre el uroepitelio [SEE 1992; GRASES 1996B]. En cualquier caso, no se debe confundir el efecto lubricante con la capacidad inhibidora que pueda tener una sustancia.

Estudios recientes han demostrado que el fitato, una sustancia de peso molecular relativamente bajo que está presente de manera natural en fluidos fisiológicos de nuestro organismo (sangre, orina y fluidos intersticiales e intracelulares) [BUNCE 1993; FRENCH 1991; GRASES 1996c], presenta una capacidad inhibidora extraordinaria sobre la litiasis cálcica, siendo su efecto mil veces más importante que el del citrato [GRASES 1989; GRASES 1991A; GRASES 1994A; GRASES 1998B; GRASES 2000B].

En cuanto a la litiasis úrica, las sustancias con mejor acción inhibidora son principalmente las glicoproteínas, los glicosaminoglicanos y sustancias surfactantes (escina, ácido glicirrínico, lauril sulfato). Destacar que el fitato no tiene acción inhibidora alguna sobre este tipo de litiasis [GRASES 1999].

Así, se han estudiado y se continúan estudiando las propiedades inhibidoras de toda una serie de sustancias como puedan ser el pirofosfato, el citrato, los glicosaminoglicanos, las glicoproteínas y el fitato.

2.1.3.1. Pirofosfato

➤ Características generales

El pirofosfato es un constituyente natural de la sangre [FLEISCH 1962A] y la orina [FLEISCH 1962B] que a nivel celular, se genera como producto de numerosas reacciones metabólicas y se degrada a fosfato inorgánico por acción de enzimas específicas. Parece ser que la mayoría de pirofosfato extracelular proviene de la pirofosfólisis de fosforibonucleótidos (como el ATP) en la superficie celular por acción de nucleósido trifosfato pirofosfohidrolasas (NTPP-Pasas) [TERKELTAUB 2001]. En cuanto a su degradación, se ha descrito que la enzima más importante implicado en dicho proceso es la alcalina fosfatasa (ALP), la cual se encuentra también en la superficie celular y cuya distribución en los tejidos está restringida a hígado, cartilago y hueso (Figura 2.12) [RUSSELL 2006; TERKELTAUB 2001].

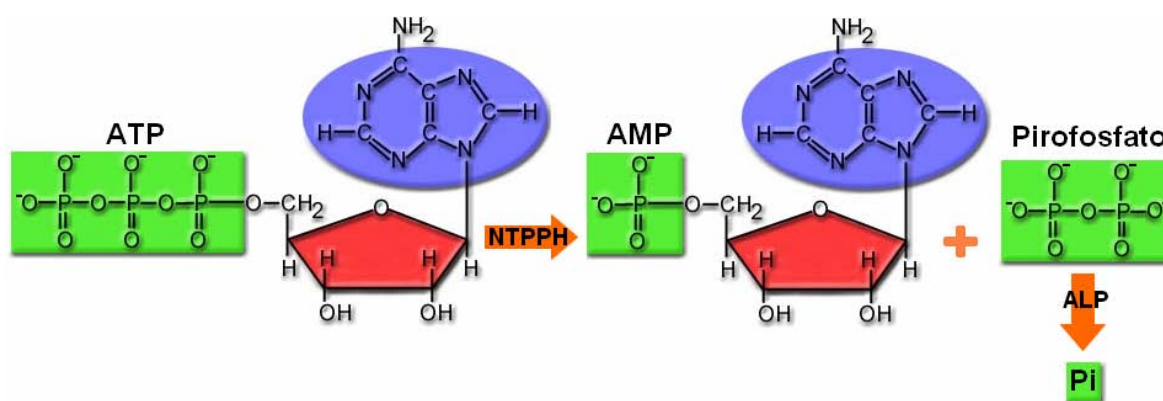


Figura 2.12. Reacción de pirofosfólisis de ATP a AMP. El ATP, por acción de la enzima nucleósido trifosfato pirofosfohidrolasa (NTPPH), forma AMP y pirofosfato. El pirofosfato es degradado a fosfato inorgánico (Pi) por acción de la enzima alcalina fosfatasa (ALP).

Existe también un tercer factor a considerar en la regulación del pirofosfato extracelular y es el transportador de membrana, denominado ANK, el cual transporta el pirofosfato desde el interior al exterior de las células [RUSSELL 2006; TERKELTAUB 2001].

➤ Acción como inhibidor de la cristalización

El pirofosfato fue el primer inhibidor identificado en la orina al cual se le asignó una potente acción inhibitoria sobre la litiasis oxalocálcica [FLEISCH 1964] y fosfatocálcica [FLEISCH 1962B; FLEISCH 1966]. Sin embargo no posee ningún efecto inhibitor sobre los cálculos de ácido úrico y los cálculos infecciosos de fosfato [FLEISCH 1967]. Finalmente, cabe destacar que el pirofosfato presenta un inconveniente para el tratamiento de la litiasis cálcica y es que cuando es administrado por vía oral no presenta efecto inhibitor de la cristalización debido a que es hidrolizado en el tracto gastrointestinal.

2.1.3.2. Citrato

➤ Características generales

El citrato (Figura 2.13) es uno de los inhibidores de la cristalización más estudiados [ROBERTSON 1985]. Sus orígenes como tratamiento de cálculos renales se remontan al siglo pasado, en 1826 Sir Astley Cooper ya prescribía un tratamiento a base de citrato potásico para el tratamiento de cálculos renales que probablemente eran de ácido úrico.

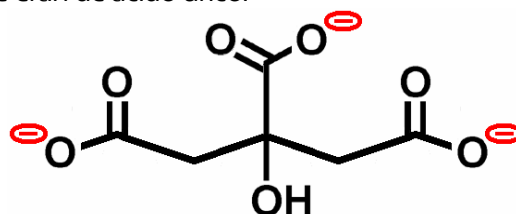


Figura 2.13. Estructura de la molécula de citrato.

➤ Acción como inhibidor de la cristalización

El efecto del citrato sobre la calculogénesis hay que atribuirlo a la combinación de tres aspectos diferentes:

- **Elevación del pH urinario.** El metabolismo celular del citrato conduce a la formación del ion bicarbonato, el cual, como consecuencia de sus características básicas, consume protones a nivel plasmático y, en consecuencia, provoca una elevación del pH urinario. El ácido úrico se insolubiliza para valores de pH urinario inferiores a 5.5 por lo que, un aumento del pH puede evitar la formación o, incluso, disolver los cálculos de ácido úrico. Este aumento del pH urinario por parte del citrato debe controlarse, ya que para pH próximos a 7.0, los fosfatos cálcicos (brushita e hidroxiapatita) pueden precipitar.
- **Capacidad para formar complejos solubles con el ion calcio.** La formación de estos complejos implica una disminución de la concentración de calcio libre en la orina y en consecuencia, una disminución de la sobresaturación de cualquier compuesto insoluble de dicho ion, sea oxalato o fosfato.
- **Efecto inhibitor de la cristalización de oxalatos y fosfatos cálcicos.** Esta acción inhibitoria no es muy enérgica pero puede llegar a ser importante en la nucleación homogénea de los fosfatos cálcicos y en la nucleación heterogénea del oxalato cálcico, ya que el citrato puede llegar a excretarse en concentraciones muy elevadas.

2.1.3.3. Glicosaminoglicanos (GAGs)

➤ Características generales

Los GAGs son cadenas de polisacáridos constituidas por la repetición de unidades idénticas de disacáridos (Figura 2.14). Normalmente se encuentran unidos a una proteína formando proteoglicanos.

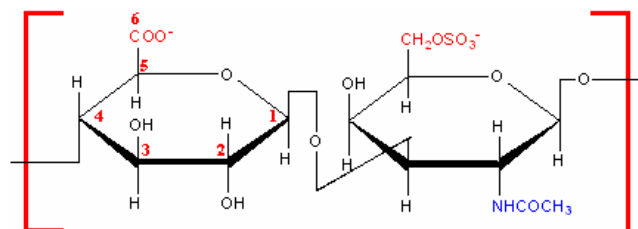


Figura 2.14. Estructura del disacárido que constituye el glicosaminoglicano condroitín sulfato.

➤ Acción como inhibidor de la cristalización

Existen numerosos estudios en los que se demuestra que los GAGs poseen cierta capacidad inhibidora en el crecimiento de cristales de oxalato cálcico [ANGELL 1989; FELLSTRÖM 1985A; FELLSTRÖM 1985B; MARTIN 1984; NORMAN 1984; ROBERTSON 1985; SUZUKI 1996] aunque en ningún caso esta acción es relevante [GRASES 1998A; GRASES 1998C]. Con respecto al ácido úrico, se ha demostrado que los GAGs estabilizan las disoluciones de ácido úrico impidiendo su nucleación homogénea [GRASES 1991B]. Así, si consideramos que el ácido úrico es un importante nucleante heterogéneo de la litiasis oxalocálcica, los GAGs pueden evitar la formación de aquellos cálculos de oxalato cálcico donde el ácido úrico actúa como nucleante heterogéneo. De acuerdo con lo dicho, los glicosaminoglicanos tiene cierta capacidad preventiva en la calculogénesis, ya que son sustancias antiadherentes que evitan que partículas sólidas puedan adherirse al uroepitelio e iniciar el proceso de nucleación [GILL 1979; GRASES 1993A; GRASES 1996B; GRENABO 1988; SEE 1992]. Sin embargo esta acción antiadherente es diferente a la acción de los inhibidores de la cristalización y, por tanto, no hay que confundir ambos términos.

2.1.3.4. Glicoproteínas

➤ Características generales

Las glicoproteínas (Figura 2.15) son proteínas con uniones covalentes a cadenas de carbohidratos (oligosacáridos) mediante enlaces glicosídicos. Entre ellas cabe destacar la glicoproteína de Tamm-Horsfall y la mucina.

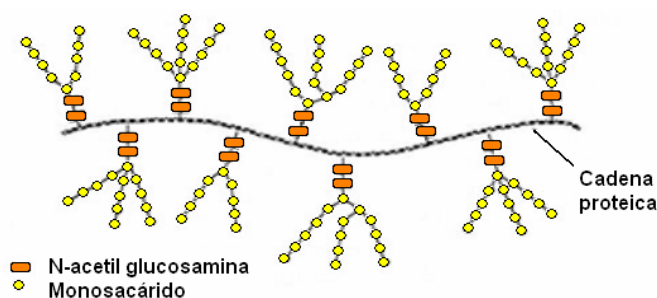


Figura 2.15. Estructura de las glicoproteínas.

➤ Acción como inhibidor de la cristalización

Diversos estudios parecen demostrar la capacidad inhibidora de las glicoproteínas sobre la calcilogénesis oxalocálcica [ASPLIN 1998; GROVER 1998; MEDETOGNON-BENISSAM 1999; MO 2004; ROMERO 1997; SCHEPERS 2002; TSUJIHATA 2001] aunque otros autores les asignan propiedades promotoras [CARVALHO 2002; GOVINDARAJ 2001; KHAN 2000; KONIA 2003; LIESKE 2001; YAMATE 1996]. Sin embargo, un estudio reciente indica que las glicoproteínas a bajas concentraciones urinarias pueden actuar como inhibidores de la cristalización de oxalato cálcico y de fosfato cálcico y que es a altas concentraciones donde forman aglomerados que pueden actuar como nucleantes heterogéneos [GRASES 2004A]. En cuanto a la litiasis úrica, se ha demostrado que la mucina presenta una destacable acción inhibidora en la cristalización de ácido úrico [GRASES 1999]. Finalmente, cabe destacar que al igual que los glicosaminoglicanos, la acción inhibidora de las glicoproteínas se debe fundamentalmente a su acción antiadherente, que es diferente al mecanismo de acción de los inhibidores de la cristalización, por lo que no se deben confundir ambos términos.

2.1.3.5. Fitato

➤ Características generales

El fitato (myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisdihidrogenofosfato) es una molécula de bajo peso molecular que fue descubierta en el año 1872 por Pfeffer en semillas de vegetales, donde se encontraba en forma de sal cálcico-magnésica (fitina). No obstante, no fue hasta 1914 cuando Anderson [ANDERSON 1914] estableció su estructura correcta (Figura 2.16) [ERDMAN 1979; HARLAND 1986; THOMPSON 1987].

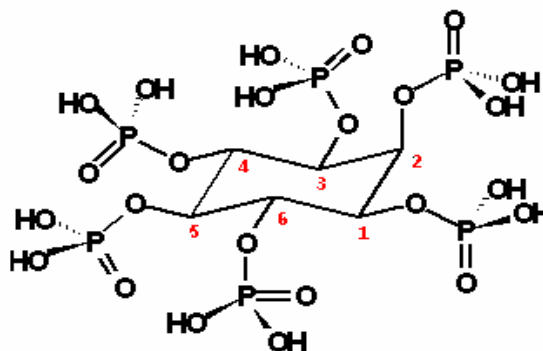


Figura 2.16. Estructura de una molécula de ácido fitico.

El ácido fitico es el inositol fosfato más abundante de la naturaleza. El fitato se encuentra en cantidades importantes en las semillas utilizadas en nuestra alimentación (concretamente en la zona del germen y en las cubiertas de estas semillas) como son cereales, legumbres y frutos secos. El contenido en fitato de diferentes semillas comprende valores de entre 0.4–6.4% [OGAWA 1975; REDDY 2002]. Además, el fitato está presente en fluidos fisiológicos (sangre, orina, fluidos intersticiales e intracelulares) y tejidos de mamíferos en bajas concentraciones que dependen de su aporte exógeno [BUNCE 1993; FRENCH 1991; GRASES 1996C; GRASES 2001A; GRASES 2001B; GRASES 2001C; MARCH 1998].

➤ Acción como inhibidor de la cristalización

El fitato es el inhibidor más efectivo para la litiasis cálcica siendo su efecto mil veces más importante que el que presenta el citrato [GRASES 1989; GRASES 1991A; GRASES 1994A; GRASES 2000B]. Ha demostrado ser un potente inhibidor de la nucleación heterogénea del oxalato cálcico [GRASES 1991A; GRASES 1994A; GRASES 1994B], de la nucleación homogénea y heterogénea de fosfato cálcico [GRASES 1996D; GRASES 2000B; GRASES 2007] y del

crecimiento cristalino del oxalato cálcico. Esta potente acción inhibitoria es consecuencia de la afinidad por el calcio de los seis grupos fosfato que presenta su estructura. De esta manera, las moléculas de fitato se adsorben sobre la superficie de núcleos y/o cristales cálcicos impidiendo su posterior crecimiento y/o desarrollo.

Los efectos que el fitato ejerce sobre las primeras etapas de formación de los cálculos de oxalato cálcico se estudiaron "in vitro" utilizando sistemas que simulan las condiciones de formación de los cálculos en el interior del riñón [GRASES 1994A; GRASES 1994B; GRASES 1996B; GRASES 1996D; GRASES 1998B; GRASES 1998C]. En estos sistemas se demostró claramente que el fitato a concentraciones similares a las encontradas normalmente en la orina actúa de un modo muy eficaz impidiendo la formación de cristales de oxalato cálcico mediante nucleación heterogénea, hecho que es de gran importancia si consideramos que la nucleación homogénea de oxalato cálcico es prácticamente imposible debido a las condiciones urinarias de sobresaturación [FINLAYSON 1978A].

También se ha estudiado el efecto del fitato en el desarrollo de depósitos cálcicos renales de la papila y de la junta corticomedular. Así dos estudios realizados en ratas sometidas a dos tratamientos diferentes inductores a la calcificación (uno con etilenglicol [GRASES 1998D] y el otro con vitamina D y nicotina [GRASES 2007]) indican que tanto el fitato administrado por vía oral (a través de la dieta) [GRASES 1998D] como por vía tópica (a través de un gel) [GRASES 2007] disminuye las calcificaciones en la papila renal. En otro estudio en ratas se observó que la alimentación con una dieta con un 1% de fitato previene de la aparición de depósitos minerales en la junta corticomedular [GRASES 2000C].

Además se ha demostrado que los valores de concentración urinaria de fitato son significativamente más pequeños en enfermos litiásicos que en individuos sanos [GRASES 2000D; GRIFFITH 1986] y que el aporte exógeno de fitato por vía oral disminuye notablemente la capacidad de la orina para formar cristales de sales cálcicas (oxalato y fosfato) sin alterar ningún otro parámetro urinario [CONTE 1999]. La ingesta de pequeñas dosis de fitato (50 -100 mg) conduce a una excreción urinaria de 1-10% de la dosis, porcentaje suficiente para causar la inhibición efectiva de la nucleación heterogénea de oxalato cálcico, así como de su crecimiento cristalino, y la ingesta de 80 mg de fitato puede incrementar entre un 50-100% la capacidad inhibitoria de la orina emitida en las horas siguientes a su toma [GRASES 1995]. De esta manera, el fitato impide la formación de cálculos cálcicos y, a diferencia del citrato, no provoca cambios de pH urinario.

Otro dato a considerar es que en Sudáfrica la incidencia de cálculos renales en la población de origen europeo es superior a la de origen africano, variación que se ha atribuido a una composición urinaria diferente debida a los distintos hábitos alimenticios (la población africana consume habitualmente más alimentos ricos en fitato con respecto a la europea) [MODLIN 1980]. De hecho, la incidencia de litiasis renal cálcica en los países con un consumo elevado en cereales no refinados (ricos en fitato), es inferior a la de los países más industrializados donde se consumen cereales refinados [ANDERSEN 1969; ANSARI 2003; CLEVELAND 2000; LANG 2003].

Más recientemente, Curhan ha llevado a cabo un estudio epidemiológico de 8 años de duración con una muestra de más de 96000 personas donde se confirma que una dieta rica en fitato se relaciona con una menor incidencia de litiasis renal [CURHAN 2004].

Finalmente, destacar que otros estudios realizados en animales de experimentación han demostrado que el fitato posee una potente acción inhibitoria en otros tipos de calcificaciones patológicas en tejidos blandos [GRASES 2004B; GRASES 2005A]. Así, el fitato inhibe considerablemente las calcificaciones de hidroxapatita inducidas a nivel subcutáneo tanto cuando es administrado por vía oral [GRASES 2004B] como por vía tópica [GRASES 2005A].

➤ **Absorción, excreción y distribución**

- Estudios en animales de experimentación

Estudios recientes demuestran que los niveles de fitato en el organismo se encuentran directamente relacionados con su aporte exógeno a través de la dieta [GRASES 2000E; GRASES 2001A; GRASES 2001B] y/o a través de la piel [GRASES 2005B; GRASES 2005C]. Así, la ingesta o aplicación tópica de pequeñas dosis de fitato conducen a una concentración urinaria del mismo suficiente para presentar una inhibición efectiva en la litiasis cálcica. Estudios realizados en ratas han demostrado que se alcanzan unos niveles plasmáticos máximos tanto con una dieta que contiene un 1% de fitato en forma de sal sódica, como con la misma dieta conteniendo un 0.12% de fitato en forma de sal cálcico-magnésica (fitina) procedente del germen de garrofin [GRASES 2001D]. Además, con un consumo de fitato de 20.9 mg por kg de peso corporal y por día se alcanza la máxima excreción urinaria (que corresponde al 2% de la cantidad ingerida) y dosis mayores de fitato no originan aumentos en su excreción urinaria [GRASES 2000E]. También se ha observado que la eliminación del fitato de la dieta reduce los valores urinarios a niveles indetectables después de 22 días [GRASES 2000E; GRASES 2001B].

Otros estudios han indicado que el fitato, una vez adsorbido, se distribuye desde la sangre hacia los órganos y tejidos, donde la cantidad presente depende claramente de su aporte exógeno. Así, la determinación de la concentración de fitato en animales de experimentación alimentados con una dieta sintética en la cual el fitato se añadió en forma de sal sódica, evidenció que las concentraciones de fitato varían según las características de los tejidos (desde valores de 0.2 mg/L en plasma hasta valores de 20 mg/g en el cerebro) y que al suministrar la misma dieta carente de fitato los valores se reducen drásticamente (a 0.02 mg/L en plasma y 0.9 mg/g en cerebro), atribuyéndolo a la disminución del fitato extracelular [GRASES 2001B].

Tabla 2.I. Distribución de fitato en órganos y fluidos corporales de ratas alimentadas con una dieta con un 1% de fitato sódico y dieta sin fitato [GRASES 2001B].

	CON FITATO	SIN FITATO
Orina (mg/L)	2.51	no detectable
Plasma (mg/L)	0.19	0.02
Riñón (mg/g tejido seco)	1.44	0.04
Hígado (mg/g tejido seco)	2.26	no detectable
Fémur (mg/g tejido seco)	1.40	no detectable
Cerebro (mg/g tejido seco)	20.16	0.90

Recientemente se ha conseguido la absorción del fitato por vía tópica mediante el uso de una crema o un gel, siendo sus niveles urinarios unas 10 veces superiores a las que se consiguen a través de la dieta y existiendo una relación entre la concentración excretada y la concentración de fitato utilizada en crema o gel [GRASES 2005B; GRASES 2005C]. Se ha observado que el fitato sódico al 2% (gracias a su mayor solubilidad) se absorbe por vía tópica en mayor cantidad que la sal cálcico-

magnésica (fitina) a la misma concentración [GRASES 2005B] y también que esta absorción es mayor cuando se utiliza gel en lugar de crema como matriz vehicular [GRASES 2005C]. No obstante, también existe un máximo de absorción para las dos sales por encima del cual no se excreta más fitato a través de la orina, obteniéndose unos valores urinarios de unos 45 y 15 mg/L, respectivamente [GRASES 2005E].

- Estudios en humanos

De los estudios realizados en humanos se obtienen conclusiones paralelas a las adquiridas en ratas. Así, se ha demostrado la presencia de manera natural del fitato en la orina en concentraciones que oscilan entre los 0.5 y 6 mg/L y que las concentraciones encontradas en litíasicos de oxalato cálcico son significativamente menores a las encontradas en individuos sanos [GRASES 1996C; GRASES 1998D; GRASES 2000D; GRASES 2001A].

Otros estudios en humanos han revelado que la eliminación total del fitato de la dieta produce una reducción de los niveles urinarios del 50% después de 36 horas [GRASES 2000D], mientras que si se mantiene la dieta pobre en fitato durante dos semanas, se produce una disminución del fitato urinario del 90% y una disminución del fitato plasmático del 74% [GRASES 2001A]. Por otra parte, al retomar un aporte exógeno normal de fitato (1.4 g/día) a través de la dieta o con algún complemento dietético se restablece la concentración basal de fitato, encontrándose el máximo de absorción a las cuatro horas de su ingesta. Además, al igual que con los animales de experimentación, existe una cantidad ingerida óptima de fitato, cuya absorción no depende de la sal utilizada (fitina o fitato sódico), por encima de la cual, no se absorbe más y no aumenta su excreción urinaria. También se ha demostrado que los valores de concentración plasmática de fitato se encuentran directamente relacionados con los de su excreción urinaria (orina acumulada durante las dos horas previas a la recogida de la muestra sanguínea), demostrando que el fitato en orina es un buen marcador de sus niveles en el organismo [GRASES 2001A].

Finalmente, se ha demostrado que la absorción por vía oral de fitato no depende de las condiciones del estómago (vacío, lleno o basificado y lleno) y no tiene lugar solamente a nivel estomacal (como se había creído hasta ahora), sino que también se da durante el tránsito intestinal, independientemente de la existencia o no de un transportador específico [GRASES 2006].

➤ Toxicidad

Estudios de toxicidad aguda de ácido fítico y del fitato sódico, administrados por vía oral, con ratas y ratones determinaron una DL50 situada entre 400 y 2750 mg/kg [FUJITANI 1987; ICHIKAWA 1987].

➤ Biodisponibilidad mineral

Los primeros estudios nutricionales sobre el ácido fítico [HARRISON 1939; MELLANBY 1925] parecían demostrar que podía llegar a provocar raquitismo en perros. A partir de este estudio, surgieron otros muchos que atribuían al fitato propiedades antinutrientes [DAVIES 1979; FORBES 1979; FORBES 1984; HURRELL 1992; KHOKHAR 1994; MANARY 2000; PALLAUF 1999; REDDY 1982; ZHOU 1992], hecho que hizo aconsejable eliminarlo de la dieta para evitar problemas de biodisponibilidad de determinados metales [HARLAND 1987; MAGA 1982; RICKARD 1997]. Estos estudios se basan en que el fitato, debido a que es una molécula con seis grupos fosfato que presenta

mucha afinidad con cationes divalentes y trivalentes, puede formar especies insolubles a nivel intestinal, reducir su absorción y disminuir la biodisponibilidad de estos elementos (calcio, hierro, zinc, magnesio y manganeso) [EVANS 1988; MARTIN 1986].

Por otra parte, y oponiéndose a estos estudios, se han publicado otros trabajos donde se demuestra que el consumo de cantidades moderadas de ácido fítico junto a dietas equilibradas desde el punto de vista mineral no provocan problemas de biodisponibilidad [CULLUMBINE 1950; DAVIDSSON 1997; GRAF 1984A; GRASES 2001B; GRASES 2004C; SANDSTRÖM 2000; SIOQUEIRA 2001; WALKER 1984]. Sólo en el caso de su consumo en grandes cantidades juntamente con dietas pobres en contenido mineral se pueden producir problemas de biodisponibilidad mineral [CULLUMBINE 1950; KELSAY 1987; SANDSTROM 2000; WALKER 1984]. Así, para inhibir la absorción de calcio en pacientes hipercalcémicos son necesarias dosis muy elevadas de fitato sódico, 8.8 g/día, [HENNEMAN 1958] siendo la ingesta de fitato en una dieta mediterránea equilibrada de 0.7-1.4 g/día [MIRALPEIX 1989].

➤ Acción en la hipercalcemia

Además del efecto inhibitor, se han descrito otros efectos beneficiosos del fitato, tales como el tratamiento de la hipercalcemia. Así, tal y como se ha indicado en el punto anterior, en 1958 Henneman trató enfermos litiasicos hipercalcémicos con dosis elevadas de fitato sódico (8.8 g/día) a fin de formar complejos insolubles de calcio en el tracto digestivo y disminuir su absorción intestinal [HENNEMAN 1958].

Más recientemente, en un estudio "in vivo" [GRASES 2004D] se ha observado como la administración oral de sales de fitato (sódica, potásica y magnésico-potásica) da lugar a una disminución en la excreción urinaria de calcio (gracias a que captura el calcio dietético a nivel intestinal e impide su absorción) que es más significativa a dosis mayores de calcio. El fitato potásico es la sal que provoca una mayor reducción, siendo ésta más elevada a medida que aumenta la concentración de fitato administrado por vía oral hasta un 1%. Así, el fitato podría considerarse una alternativa para el tratamiento de la hipercalcemia absorbiva (el aumento de absorción intestinal de calcio).

La fitina (fitato cálcico-magnésico), que es la sal natural de fitato, no presenta ningún efecto sobre el calcio urinario por la insolubilidad de la sal y por el hecho de llevar calcio ya incorporado en la molécula [GRASES 2004D].

➤ Acción antioxidante

Otro efecto beneficioso del fitato que ha sido descrito es su acción antioxidante. El hierro es capaz de catalizar la formación de radicales libres hidroxilo [GRAF 1984B]. Estos radicales libres son muy peligrosos siendo los responsables en muchas ocasiones de los procesos de iniciación tumoral. Algunos estudios defienden que el fitato posee propiedades antioxidantes ya que es capaz de formar quelatos con el hierro evitando así la acción catalizadora de éste [GRAF 1984B; GRAF 1987; GRAF 1990; HAWHINS 1993; MIDORIKAWA 2001].

2.2. FACTORES RELACIONADOS CON LA MORFOANATOMÍA DEL SISTEMA URINARIO

Los factores morfoanatómicos tienen un papel importante en la formación de los cálculos renales [SCHULZ 1989A; SCHULZ 1989B]. Considerando el mecanismo de formación de los cálculos renales, estos pueden ser clasificados en dos grupos (Figura 2.17):

- **Cálculos desarrollados sobre la papila renal (papilares).** Necesitan, a fin de iniciar su formación, que el epitelio de la papila renal se encuentre dañado (debido a alguna disfunción celular, ataque externo o calcificación intrapapilar) que permita la formación del corazón primario sobre el cual se formará el cálculo. Todos los cálculos papilares presentan un punto de unión a la papila claramente distinguible.
- **Cálculos desarrollados en cavidades de baja o reducida eficacia urodinámica (de cavidad).** Necesitan, a fin de iniciar su formación, de la existencia de cavidades de baja o reducida eficacia urodinámica. En estas cavidades, el alto tiempo de residencia de la orina favorece la acumulación y sedimentación de partículas sólidas permitiendo la formación del corazón primario sobre el cual se desarrollará el cálculo.

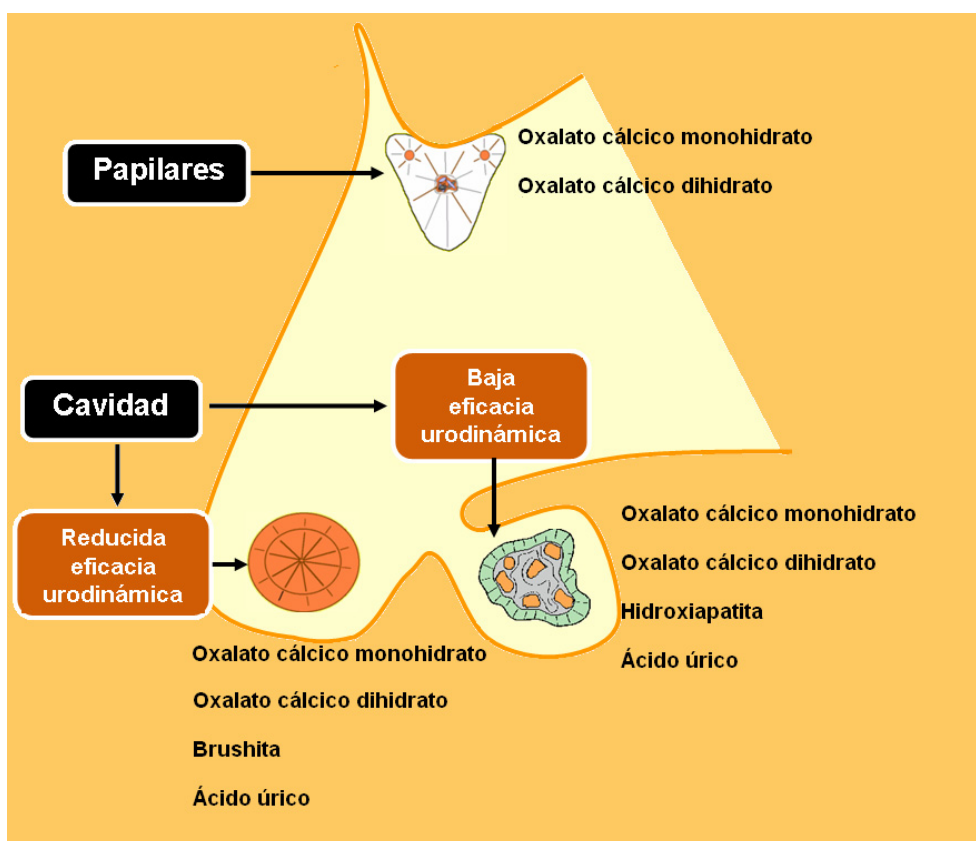


Figura 2.17. Ilustración de los tipos de cálculos renales en función de su lugar de formación en el sistema urinario. Se pueden dividir en dos tipos: los cálculos desarrollados sobre el epitelio de la papila renal y los cálculos desarrollados en cavidades. Los cálculos de cavidad, a su vez, pueden dividirse en aquellos que se forman en cavidades de reducida eficacia urodinámica y aquellos que se forman en cavidades de baja eficacia urodinámica.

De esta manera, los factores morfoanatómicos del sistema urinario a considerar en la litiasis renal son la existencia de cavidades de baja o reducida eficacia urodinámica y la alteración del epitelio que recubre la papila renal.

3. EL ÁCIDO ÚRICO. METABOLISMO Y PATOLOGÍAS

El ácido úrico (Figura 2.18) es el producto final del metabolismo de las purinas en el humano y otros primates ya que carecen de la enzima uricasa, la cual continúa la degradación de las purinas hasta alantoína en el resto de mamíferos (excepto en los dálmatas). Es por ello que el ser humano presenta una concentración plasmática de ácido úrico más de 10 veces superior a la encontrada en otros mamíferos [CUTLER 1984].

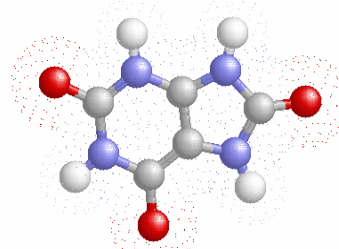


Figura 2.18. Estructura de una molécula de ácido úrico.

El ácido úrico está relacionado con toda una serie de procesos patológicos como son la gota [HOFFMAN 1954], algunos tipos de litiasis renal [GRASES 2000A], el síndrome de Lesch-Nyhan [LESCH 1964] y el síndrome Kelley-Seegmiller [MATEOS 1994]. Generalmente, estas enfermedades son debidas a un exceso de ácido úrico en el organismo consecuencia de una síntesis endógena excesiva, a una eliminación renal insuficiente y/o a un aporte exógeno excesivo de purinas.

3.1. METABOLISMO DE LAS PURINAS

Las purinas (adenina, guanina) junto con las pirimidinas (timina, citosina y uracilo) son compuestos nitrogenados, que combinados con una pentosa (ribosa o desoxirribosa) y una molécula de ácido fosfórico forman los nucleótidos (Figura 2.19). Los nucleótidos son parte integrante fundamental de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y participan como cofactores en muchas reacciones enzimáticas [GUYTON 1977; LEHNINGER 1993].

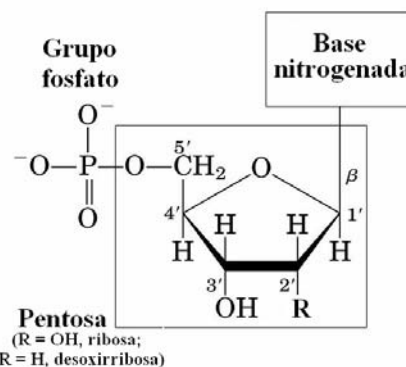


Figura 2.19. Estructura de un nucleótido.

El organismo tiene capacidad de sintetizar y degradar dichos compuestos de manera que las purinas presentes en el organismo proceden fundamentalmente de la síntesis endógena aunque también pueden proceder de la dieta. El eje central del metabolismo de las purinas está configurado por los nucleótidos purínicos ácido guanílico (GMP), ácido xantílico (XMP), ácido inosínico (IMP) y ácido adenílico (AMP). El metabolismo de las purinas es un proceso complejo cuya alteración da lugar a toda una serie de patologías donde está implicado el ácido úrico. Dichos procesos patológicos se generan ya sea por una elevada degradación de purinas con su correspondiente síntesis excesiva de ácido úrico (hiperuricemia) y excesiva eliminación renal (hiperuricosuria) o bien por una síntesis normal de ácido úrico con una baja excreción renal del mismo.

3.1.1. SÍNTESIS DE NUCLEÓTIDOS PURÍNICOS

La formación de nucleótidos se inicia con la formación del fosforribosilpirofosfato (PRPP). El PRPP es un compuesto con un alto contenido energético cuya síntesis tiene lugar a partir de la ribosa-5-P y el ATP mediante una reacción catalizada por la enzima fosforribosilpirofosfato sintetasa (PRPPs).

A partir del PRPP, la síntesis de nucleótidos puede darse por dos vías diferentes (Figura 2.20):

➤ **Síntesis de novo**, a partir de moléculas pequeñas. En este proceso, los distintos átomos del anillo purínico se van adicionando sobre la molécula de PRPP mediante una secuencia de diez reacciones que conducen a la formación del IMP. Esta síntesis tiene un alto coste energético, se consumen cinco moléculas de ATP. A partir del IMP se forman los demás nucleótidos purínicos (XMP, GMP y AMP).

➤ **Síntesis por vía de escape**, a partir de la reutilización de bases purínicas ya formadas. En este proceso las bases purínicas que se generan en la degradación de los nucleótidos son reutilizadas para formar nuevos nucleótidos. Esto es posible gracias a la existencia de dos enzimas específicas: adenín-fosforribosiltransferasa (APRT) para la adenina e hipoxantín-guanín-fosforribosiltransferasa (HGPRT) para la hipoxantina y la guanina. Este proceso tan sólo consume una molécula de ATP.

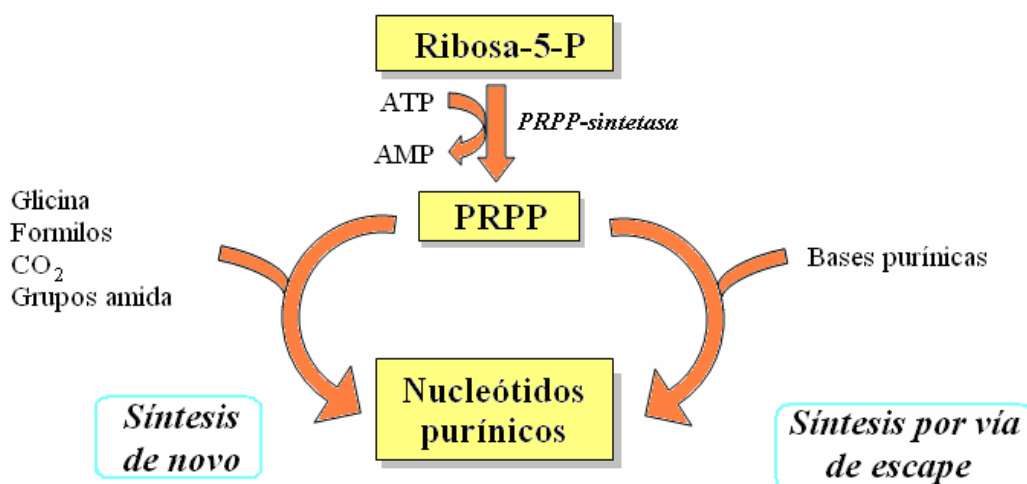


Figura 2.20. Esquema del origen de los nucleótidos purínicos: síntesis de novo y por vía de escape a partir de PRPP.

Todas las células del ser humano son capaces de sintetizar nucleótidos purínicos, pero en unos tejidos se produce primordialmente por síntesis de novo y en otros (como el cerebro) por vía de escape. Incluso hay tejidos (como la médula ósea) donde las células, en su diferenciación, pierden capacidad de sintetizar de novo los nucleótidos purínicos y su formación depende exclusivamente de la síntesis por vía de escape [WYNGAARDEN 1983].

3.1.2. DEGRADACIÓN DE NUCLEÓTIDOS PURÍNICOS

La degradación de nucleótidos (Figura 2.21) es una vía metabólica de compleja regulación que comienza con la defosforilación de los distintos nucleótidos a sus respectivos nucleósidos (guanosina, xantosina, inosina y adenosina) mediante la acción de la 5'-nucleotidasa y fosfatasas inespecíficas [FOX 1978].

Los nucleósidos por escisión de la ribosa, mediante la fosforilasa de nucleósidos purínicos, son metabolizados a las bases purínicas guanina e hipoxantina. Esta enzima tiene poca acción sobre la adenosina y la xantosina para formar la adenina y la xantina, respectivamente [KRENITSKY 1968]. La adenina del organismo proviene fundamentalmente del metabolismo de las poliaminas mientras que las fuentes principales de xantina son la hipoxantina y la guanina.

Las aminopurinas son degradadas por desaminación a metabolitos de la vía central de la degradación de purinas: la adenosina pasa a inosina y la guanina a xantina mediante la acción de la adenosin-desaminasa y la guanin-desaminasa, respectivamente. Finalmente las oxipurinas, hipoxantina y xantina, se oxidan a ácido úrico mediante la acción de una enzima común, la xantino-oxidasa.

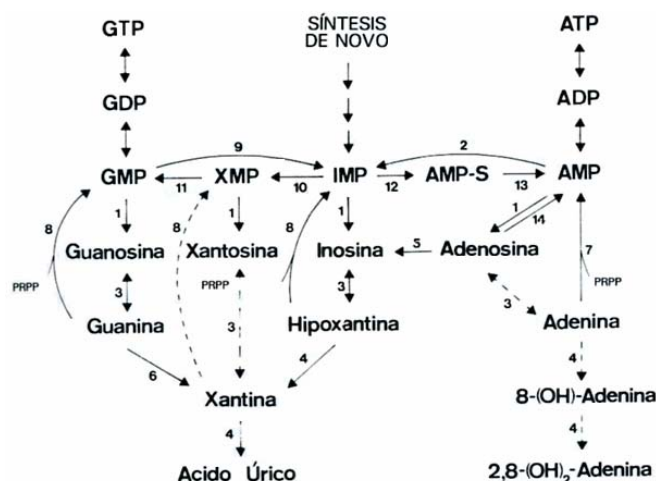


Figura 2.21. Ilustración de la degradación de nucleótidos purínicos y reutilización de bases purínicas. Las enzimas implicadas son: 1. 5'-nucleotidasa. 2. AMP-desaminasa. 3. Fosforilasa de nucleósidos purínicos. 4. xantino-oxidasa. 5. Adenosin-desaminasa. 6. Guanin-desaminasa. 7. Adenin-fosforribosiltransferasa. 8. Hipoxantín-guanin-fosforribosiltransferasa. 9. GMP-reductasa. 10. IMP-deshidrogenasa. 11. GMP-sintetasa. 12. Adenilosuccinato-sintetasa. 13. Adenilosuccinato-liasa. 14. Adenosincinasa. Las líneas discontinuas indican reacciones metabólicas de escasa trascendencia en condiciones normales.

La formación de ácido úrico ocurre sólo en los tejidos que poseen la enzima xantino-oxidasa de manera que en los tejidos que carecen de esta enzima, los productos finales del metabolismo de las purinas son hipoxantina y xantina. Así, en el ser humano la xantino-oxidasa se encuentra fundamentalmente en el hígado y en la mucosa del intestino delgado [WATTS 1965]. Hay trazas de actividad de esta enzima en el músculo esquelético, el corazón, el riñón y el bazo. En cambio, no se detecta actividad de xantino-oxidasa en el cerebro [AL-KHALIDI 1965; WATTS 1965]. De este modo, la síntesis de ácido úrico se produce principalmente en el hígado, y los productos de degradación de los nucleótidos purínicos de otros tejidos son transportados a este órgano para su oxidación.

Una vez formado, el ácido úrico pasa al torrente sanguíneo y desde ahí se distribuye a los tejidos estableciéndose un equilibrio entre su concentración en plasma y tejidos. En el plasma, la mayor parte del ácido úrico se encuentra libre en forma de urato sódico y alrededor de un 19% se encuentra unido a proteínas, fundamentalmente albúmina y globulinas alfa [ALVSAKER 1966].

Las purinas que encontramos en nuestro organismo provienen de su aporte exógeno a través de la dieta y de la degradación de nucleótidos purínicos. Estas purinas pueden ser convertidas a ácido úrico o ser utilizadas para formar nuevos nucleótidos. Las purinas se eliminan por la orina y en menor cuantía por el tubo digestivo. En cuanto a la eliminación del ácido úrico, gran parte (70–90%) es excretado por el riñón y una cierta cantidad por el intestino (Figura 2.22). Como término medio un hombre que ingiera una dieta exenta de purinas, elimina en 24 horas entre 600 y 800 mg de ácido úrico [CIFUENTES 1974; GARCÍA 1977] de los cuales alrededor de 450 mg se excretan por vía renal y 200 mg se pierden por secreciones intestinales [HERS 1979].

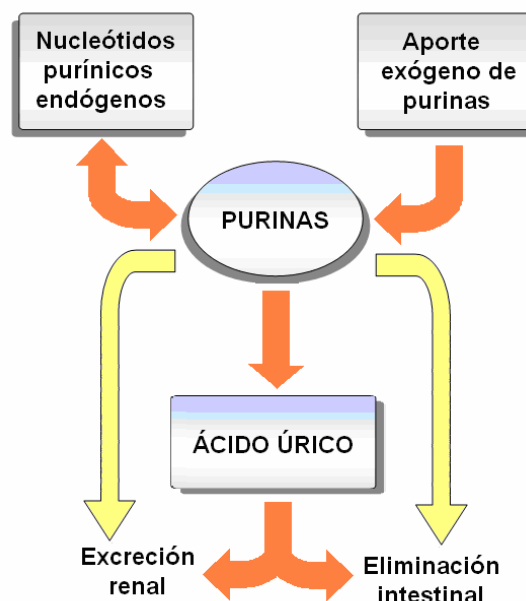


Figura 2.22. Esquema del metabolismo del ácido úrico.

3.1.3. HIPERURICEMIA E HIPERURICURIA

Tal y como se ha indicado, la hiperuricemia y la hiperuricuria poseen una relación directa con las patologías derivadas del ácido úrico. El origen de estas dos alteraciones puede ser diverso.

Los valores normales de **ácido úrico en sangre** son de 3.5–6 mg/dL en los hombres y de 2–5 mg/dL en mujeres. Se considera hiperuricemia valores de ácido úrico en sangre superiores a 7 mg/dL. Su presencia, sin ninguna otra alteración que la justifique (enfermedades hematológicas, insuficiencia renal, algunos medicamentos, etc.) suele ser indicativa de un aumento de la síntesis de ácido úrico que, normalmente, se debe a alguna alteración enzimática en el metabolismo de las purinas. Cabe destacar que las purinas de las que proviene el ácido úrico, proceden mayoritariamente de la síntesis endógena (2/3 partes aprox.) pero también de la dieta (1/3 parte aprox.). Alrededor del 50% de las purinas ingeridas son absorbidas y excretadas en forma de ácido úrico. Por lo que el aporte exógeno de las mismas es también un factor a considerar en la hiperuricemia [GRIEBSCH 1974].

Los niveles de **ácido úrico en orina** no están claramente definidos ya que dependen de muchos factores entre los cuales se señalan los hábitos dietéticos. Aunque los valores normales de eliminación renal de ácido úrico, suelen estar comprendidos entre 250–750 mg/24h. Se considera hiperuricuria la eliminación renal de cantidades superiores de ácido úrico a 600 mg/24h en mujeres y a 800 mg/24h en hombres. Esta alteración puede ser debida o bien a una excesiva síntesis de ácido úrico o bien a una alteración de los mecanismos renales de absorción y secreción.

Entre las alteraciones enzimáticas del metabolismo de las purinas que provocan un aumento de la síntesis de ácido úrico se encuentran:

- **Falta de control de la P-ribosil-PP-sintetasa.** Tiene lugar una actividad elevada de esta enzima de manera que se acumula una mayor cantidad de PRPP y en consecuencia, se sintetiza más ácido úrico [SPERLING 1972].

- **Ausencia de control alostérico de la P-ribosil-PP-sintetasa.** Esta enzima se encuentra formada por dos formas moleculares: una activa y la otra inactiva. Los nucleótidos purínicos transforman la forma activa en inactiva mientras que el PRPP realiza lo contrario. En este caso, la hiperuricemia se basa en la falta de inactivación de la enzima por los nucleótidos purínicos [HENDERSON 1968].

- **Descenso o ausencia de la hipoxantin-gaunín-fosforribosiltransferasa (HGPRT) o de la adenín-fosforribosiltransferasa (APRT).** El déficit de HGPRT o APRT se manifiesta con una excesiva producción de ácido úrico. La ausencia o descenso de HGPRT ocasiona dos trastornos con algunas características comunes: síndrome de Lesch-Nyhan y síndrome de Kelley-Seegmiller [SEEGMILLER 1980; STOUT 1989].

3.2. PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON EL ÁCIDO ÚRICO

El ácido úrico es un compuesto que posee una relación directa con toda una serie de enfermedades. Altos índices de ácido úrico en sangre (hiperuricemia) y/o en orina (hiperuricuria) pueden provocar que éste se deposite en órganos, sistemas y estructuras anatómicas dando lugar a toda una serie de alteraciones. Entre las patologías relacionadas con el ácido úrico cabe destacar:

➤ **La gota.** Se denomina gota a un conjunto de manifestaciones clínicas relacionadas con la deposición de ácido úrico, en forma de urato monosódico, en estructuras articulares y periarticulares como consecuencia de altos niveles de ácido úrico en sangre (hiperuricemia).

➤ **Litiasis renal úrica.** La litiasis renal úrica es una enfermedad que representa aproximadamente el 8–13% de la población afectada por litiasis [GRASES 2002; LEUSMANN 1991]. Esta puede ser consecuencia de altos niveles en orina (hiperuricuria) aunque hay que considerar también el efecto del pH urinario [GRASES 2000A].

➤ **Síndrome de Lesch-Nyhan y síndrome de Kelley-Seegmiller.** Estos síndromes son consecuencia de un defecto genético caracterizado por el déficit de la enzima hipoxantin-gaunín-fosforribosiltransferasa (HGPRT) con la consecuente síntesis excesiva de ácido úrico. En el síndrome de Lesch-Nyhan el déficit de la actividad enzimática de HGPRT es prácticamente total mientras que en el síndrome de Kelley-Seegmiller es parcial. Las manifestaciones clínicas relacionadas con estos síndromes son hiperuricuria e hiperuricemia, artritis gotosa, litiasis renal y problemas neurológicos [LEISCH 1964; KELLEY 1969].

3.3. TRATAMIENTO PARA LA SÍNTESIS EXCESIVA DE ÁCIDO ÚRICO: ALOPURINOL

La síntesis excesiva de ácido úrico puede controlarse con alopurinol. Este compuesto reduce la concentración sérica y la excreción renal de ácido úrico [RUNDLESS 1966; WYNGAARDEN 1965].

El empleo del alopurinol como fármaco para la síntesis excesiva de ácido úrico data de principios de los años sesenta. Los primeros estudios clínicos fueron realizados por el grupo de Rundles y Gutman [RUNDLES 1963; YU 1964]. El alopurinol es un análogo de la hipoxantina, mientras que su principal metabolito, el oxipurinol, es un análogo de la xantina. Su mecanismo de acción es la inhibición competitiva de la xantino-oxidasa impidiendo la transformación de hipoxantina a xantina y de ésta a ácido úrico (Figura 2.23) [SCOTT 1966; MASSEY 1970].

La administración de alopurinol en humanos provoca una reducción de los niveles de ácido úrico en las primeras 48 horas, alcanzándose niveles de uricemia estables en una o dos semanas. La inhibición de la xantino-oxidasa se acompaña con un aumento de xantina e hipoxantina en plasma y orina, que generalmente no es significativa, ya que no alcanza niveles de saturación de las mismas. Aunque, ocasionalmente, se ha descrito litiasis por xantina debida a xantinuria intensa en pacientes tratados con alopurinol.

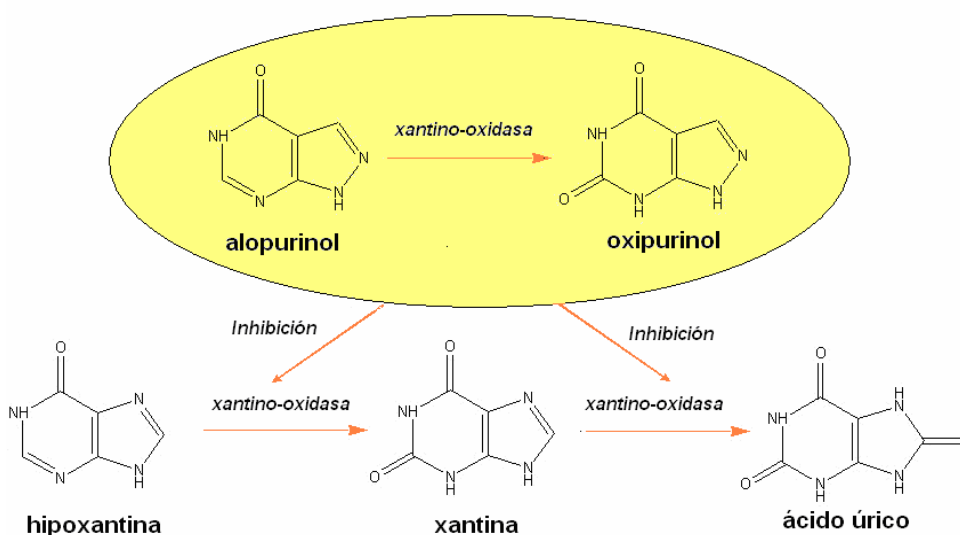


Figura 2.23. Mecanismo de inhibición del alopurinol mediante el cual disminuye la síntesis de ácido úrico.

El alopurinol es rápidamente absorbido por vía oral [ELION 1966], alcanzándose su pico máximo de concentración en la primera hora. Se metaboliza rápidamente, con una vida media plasmática de 2 a 3 horas, a oxipurinol [HANDE 1978]. El oxipurinol es eliminado principalmente por vía renal, siendo su vida media elevada (entre 14 y 28 horas) en pacientes con función renal normal [ELION 1966; HANDE 1978].

A su vez, los niveles de alopurinol se reducen con el empleo asociado de uricosúricos, que favorecen su eliminación renal.

Las dosis media habituales de alopurinol es de 300 mg al día, si bien se requieren dosis medias superiores (unos 400 mg al día) en pacientes con función renal normal, frente a una media de 200 mg al día en pacientes con disminución de función renal.

4. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO

Tal y como se ha indicado anteriormente niveles anormalmente elevados de ácido úrico en fluidos fisiológicos poseen una relación directa con ciertas patologías. Por ello, se han desarrollado toda una serie de métodos para su determinación, entre los cuales encontramos:

- **Métodos colorimétricos.** La mayoría de ellos se basan en la transformación del ácido úrico en alantoína bajo la acción del ácido fosfotúngstico, el cual se transforma en azul de tungsteno.
- **Métodos enzimáticos.** Se basan en la transformación del ácido úrico en alantoína bajo la acción de la enzima uricasa.
- **Métodos por cromatografía líquida de alta resolución.** Suelen presentar detección electroquímica o fotométrica.
- **Métodos basados en el uso de biosensores.** Se basan en el uso de electrodos enzimáticos.

4.1. METODOS COLORIMÉTRICOS

El primer método colorimétrico, descrito por Offer en 1894 [OFFER 1894], consistía en la oxidación del ácido úrico a alantoína en presencia de ácido fosfotúngstico, el cual se reduce a un compuesto coloreado detectable fotométricamente (azul de tungsteno) (Figura 2.24). Desde entonces, los métodos colorimétricos basados en esta misma reacción han ido evolucionando y ofreciendo distintas alternativas [HENRY 1974].

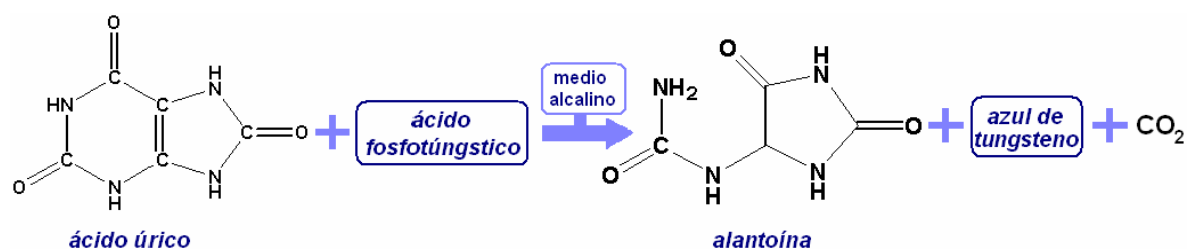


Figura 2.24. Reacción entre el ácido úrico y el ácido fosfotúngstico en solución alcalina con la posterior formación de un compuesto detectable fotométricamente.

El gran inconveniente de este tipo de métodos es que son poco selectivos y en muchas ocasiones tiene lugar la reducción de otras especies presentes en el medio originando valores erróneos por exceso en la determinación de ácido úrico [CARAWAY 1963; YOUNG 1972].

El límite de detección (LD) de los métodos colorimétricos es aproximadamente de 0.6 mg/L.

4.2. MÉTODOS ENZIMÁTICOS

El primer método enzimático data de 1941 y fue realizado por Bulguer y Johns [BULGUER 1941]. Estos métodos se basan en la oxidación catalítica de ácido úrico a alantoína en presencia de la enzima uricasa con la formación de peróxido de hidrógeno (reacción 1, Figura 2.25) [TIETZ 1986].

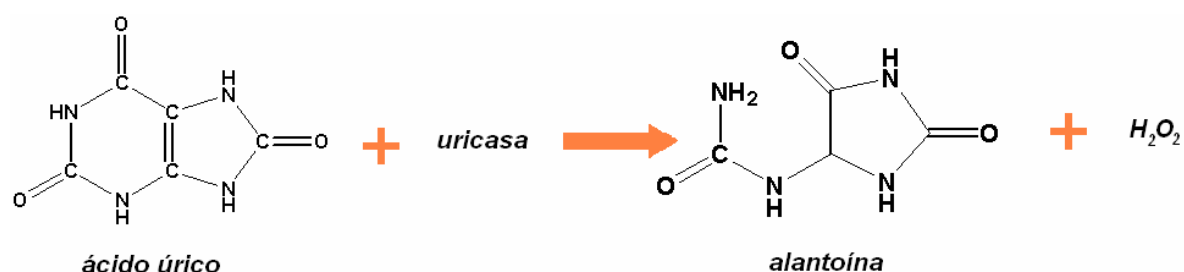


Figura 2.25. Reacción entre el ácido úrico y la enzima uricasa con la posterior formación de alantoína y peróxido de hidrógeno (reacción 1).

Estos métodos, al contrario que los colorimétricos, son selectivos pero tienen el inconveniente de que la presencia en el medio de determinadas sustancias (otros derivados purínicos distintos al úrico, metales, etc.) pueden dar lugar a una inhibición de la enzima dando lugar a errores negativos en la determinación [BYWATERS 1963].

Los métodos enzimáticos pueden ser clasificados en función del analito que se determina como:

➤ **Métodos enzimáticos basados en la detección de uno de los reactivos de la reacción 1.** En estos métodos encontramos distintos sistemas de detección:

- Sistemas de detección basados en la disminución de la absorbancia en presencia de ácido úrico. En estos métodos se determina la disminución de la absorbancia del ácido úrico durante la reacción 1 a 293 nm [ISHIHARA 1972; PRAETORIUS 1949].

- Sistemas de detección basados en la variación de la quimioluminiscencia de la uricasa durante la reacción 1. Existen métodos basados en la medida de la fluorescencia durante la reacción 1 (excitación a 280 nm y emisión a 330 nm) [GALBÁN 2001].

➤ **Métodos enzimáticos basados en la detección de un producto de una reacción o serie de reacciones acopladas a la reacción 1.** En estos métodos el peróxido de hidrógeno, en presencia de peroxidasa, actúa como oxidante en una reacción o serie de reacciones donde el producto final es un compuesto detectable fotométricamente [BHARGAVA 1999; GOCHMAN 1971; KABASAKALIAN 1973; KAYAMORI 1994; LORENTZ 1967].

Los límites de detección de los métodos enzimáticos son muy variados, se encuentran métodos con LD de 0.5 mg/L [GALBÁN 2001] y otros con LD de 80 mg/L [BHARGAVA 1999].

4.3. MÉTODOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Se han desarrollado una gran cantidad de métodos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación de ácido úrico. Encontramos métodos con columnas de intercambio iónico [BROWN 1979; ETOH 1992; MILNER 1978; PACHLA 1975; PACHLA 1979; SLAUNWHITE 1975], de par iónico [MÜLLER 1988; ROSS 1994], de fase reversa [KOJIMA 1986; SAKUMA 1987] y de exclusión por tamaño con sistemas de detección electroquímica o fotométrica.

En general, los métodos de cromatografía líquida de alta resolución presentan, en comparación con los enzimáticos y colorimétricos, un mayor precisión, recuperabilidad y linealidad (por detección espectrofotométrica, los métodos colorimétricos y enzimáticos presentan un rango lineal aproximado hasta 120 mg/L mientras que para los métodos por HPLC, éste es superior a 1g/L [SLAUNWHITE 1975]). Además, los métodos por HPLC no dan lugar a errores en los valores del ácido úrico en presencia de determinadas sustancias, tal y como ocurría para los enzimáticos y colorimétricos.

Los métodos de HPLC con detección fotométrica (ultravioleta) presentan un límite de detección aproximado de 0.75 mg/L [INOUE 2003; YANG 1989], mientras que los electroquímicos poseen unos límites de detección muchísimo más bajos. Así, los límites de detección de los métodos de HPLC con detección amperométrica y columbimétrica se aproximan a los 0.5 µg/L y 1 µg/L, respectivamente [INOUE 2003].

4.4. MÉTODOS BASADOS EN EL USO DE BIOSENSORES

Un biosensor es un sistema formado por un compuesto biológico, en este caso las enzimas uricasa y/o peroxidasa, inmovilizado sobre un soporte en contacto con un sistema transductor adecuado que convierte una señal bioquímica en una señal eléctrica cuantificable.

Desde que en 1962 Clark y Lyons desarrollaron el primer método basado en el uso de un biosensor para la determinación de glucosa [CLARK 1962], los métodos basados en biosensores han sido objeto de estudio. Uno de los aspectos más estudiados es la inmovilización de las enzimas sobre los electrodos, de manera que las técnicas convencionales para la inmovilización de las enzimas implican uniones covalentes sobre la superficie del electrodo [DEGANI 1988; NARASIMHAM 1986], atrapamiento por intercambio iónico con polímeros [FORTIER 1992; MIZUTANI 1993], utilización de polímeros conductores y polímeros no conductores [CASTILLO-ORTEGA 2002; COSNIER 1994; KHAN 1993; MU 1992; PANDEY 1988; WANG 1993; ZHANG 1994], sol-geles [LIU 2000; WANG 1999], etc. Recientemente se han desarrollado métodos basados en el uso de nanomateriales donde tiene lugar una transferencia electrónica directa entre la enzima y el electrodo [GHINDILIS 1997; GORTON 1999; JIA 2002; ZHANG 2004].

En función de la señal bioquímica que se detecta, se encuentran métodos para la determinación de ácido úrico con biosensores basados en el uso de: sensores de oxígeno [MEITES 1974; NANJO 1974], sensores de pH [LIAO 2004] y sensores de peróxido [GILMARTIN 1994].

Los límites de detección de este tipo de métodos son muy variados, desde 0.1–0.3 mg/L [LIAO 2004; ZHANG 2004] hasta 0.002–0.003 mg/L [MARTÍNEZ-PÉREZ 2003; POPA 2000].

5. LA LITIASIS ÚRICA

Los cálculos renales que presentan ácido úrico constituyen aproximadamente el 8–13% de todos los cálculos renales [LEUSMANN 1991; GRASES 2002]. Tal y como se ha indicado anteriormente, el ácido úrico puede cristalizar en forma anhidro (termodinámicamente estable) o dihidrato (cinéticamente favorable) o mezcla de ambas en función de las condiciones urinarias. A su vez, en función de su estructura, los cálculos de ácido úrico pueden ser clasificados en compactos y porosos.

5.1. FACTORES DE RIESGO EN LA LITIASIS ÚRICA

En la cristalización del ácido úrico, existen dos factores urinarios a tener en cuenta: la hipercalciuria y el pH urinario.

La **hiperuricuria** es uno de los factores a considerar en la litiasis úrica pero no es el determinante. Así, alrededor del 50% de pacientes con cálculos de ácido úrico no presentan hiperuricuria [MITTERMÜLLER 1996].

En cuanto al **pH urinario**, el ácido úrico se insolubiliza a pH menores de 5.5, por lo que valores de pH urinarios inferiores a 5.5 representan un claro factor de riesgo que favorece la formación de cálculos de ácido úrico. De hecho, el pH urinario medio de pacientes con cálculos de ácido úrico suele estar entre 5.2 y 5.6 y el pH de la primera orina de la mañana es menor a 5.7 en el 90% de los casos [GUTMAN 1968].

5.2. EL ÁCIDO ÚRICO COMO INDUCTOR DE LA LITIASIS OXALOCÁLCICA

En la litiasis oxalocálcica, la cual representa entre el 60 y el 80% de todos los casos de litiasis renal, existe un aspecto de interés que ha sido objeto de estudio de numerosos trabajos, se trata de la presencia de promotores de la cristalización. La formación de un núcleo heterogéneo sobre el cual los cristales de oxalato cálcico pueden crecer y desarrollarse representa la primera y más importante etapa en la litiasis oxalocálcica. Las sustancias estudiadas como nucleantes heterogéneos son de naturaleza diversa: fosfatos cálcicos (brushita e hidroxiapatita) [GRASES 1994A; GRASES 1996D; GRASES 1998A; GROVER 2002], ácido úrico [GRASES 1991B; MEYER 1976], carbonato cálcico [GEIDER 1996], fluoruro cálcico [GRASES, EN PRENSA; SINGH 2001], glicoproteínas [KHAN 2000; GRASES 2004A; GOVINDARAJ 2001; LIESKE 2001] proteínas y detritus celular [CERINI 1999; KAVANAGH 2000; GRASES 1996B; GRASES 1998C; LIESKE 2000], fármacos, cistina [GRASES 1991B; MARTINS 2002], etc.

Con respecto al ácido úrico, se han desarrollado numerosos estudios que establecen una relación directa entre la uricuria y la litiasis oxalocálcica [BRIEN 1997; FAVUS 1980; HOFBAUER 1988; PETIT 1984; SORENSEN 2002]. Sin embargo, con respecto a la capacidad del ácido úrico para actuar como nucleante heterogéneo oxalocálcico, existen estudios que le atribuyen una importante capacidad como nucleante heterogéneo debido a que los cristales de ácido úrico tienen características cristalográficas similares a los cristales de oxalato cálcico monohidrato [GRASES 1991B; MEYER 1976] mientras que otros establecen que el ácido úrico presenta una pobre o ausente capacidad como inductor y que es el urato el que actúa como nucleante heterogéneo oxalocálcico [PAK 1975].

6. BIBLIOGRAFÍA

- [AL-KHALIDI 1965] Al-Khalidi UAS, Chaglassian TH. The species distribution of xanthine oxidase. *Biochem J* 1965;97:318-320.
- [ALDERMAN 2004] Alderman M, Aiyer KJV. Uric acid: role in cardiovascular disease and effects of losartan. *Curr Med Res Opin* 2004;20:369-379.
- [ALVSAKER 1966] Alvsaker JO. Uric acid in human plasma. V. Isolation and identification of plasma proteins interacting with urate. *Scand J Clin Lab Invest* 1966;18:227-239.
- [ANDERSEN 1969] Andersen DA (1969) Historical and geographical differences in the pattern of incidence or urinary stones considered in relation to possible etiological factors. En: *Renal Stone Research* (Hodgkinson A; Nordin BEC, eds.), pp 7-16. Churchill, London.
- [ANDERSON 1914] Anderson RJ. The chemistry of phytin. *Bull* 1914;32:3-44.
- [ANGELL 1989] Angell AH, Resnick MI. Surface interaction between glycosaminoglycans and calcium oxalate. *J Urol* 1989;141:1255-1258.
- [ANSARI 2003] Ansari MS, Gupta NP. Impact of socioeconomic status in etiology and management of urinary stone disease. *Urol Int* 2003;70:255-261.
- [ASPLIN 1998] Asplin JR, Arsenault D, Parks JH, Coe FL, Hoyer JR. Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. *Kidney Int* 1998;53:194-199.
- [BABIC-IVANCIC 1987] Babic-Ivancic V, Furedi-Milhofer, Brown WE, Gregory TM. Precipitation diagrams and solubility of uric acid dihydrate. *J Cryst Growth* 1987;83:581-587.
- [BARKER 1970] Barker LM, McPhillips JJ, Lawrence GD, Doty SB, Pallante SL, Bills CE, Scott WWJr, Howard JE. Studies on mechanisms of calcification. I. Properties of urinary derivatives which inhibit cartilage calcification. II. Electron microscopic observations of the effect of inhibitors in crystal formation. *Johns Hopkins Med J* 1970;127:2-22.
- [BHARGAVA 1999] Bhargava AK, Lal H, Pundir CS. Discrete analysis of serum uric acid with immobilized uricase and peroxidase. *J Biochem Biophys Methods* 1999;39:125-136.
- [BLIZNAKOV 1965] Bliznakov G (1965) Sur le mecanisme de l'action des additifs adsorbants dans la croissance cristalline. En: *Adsorption et Croissance Cristalline*, pp 291-301. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- [BRIEN 1997] Brien G, Bick C. Allopurinol in the recurrence prevention of calcium oxalate lithiasis. *Eur Urol* 1997;3:35-36.
- [BROWN 1979] Brown ND, Kintzios JA, Koetitz SE. Determination of hypoxanthine, xanthine, and uric acid in biological fluids by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1979;177:170-173.
- [BROWN 1991] Brown CM, Ackerman DK, Purich DL, Finlayson B. Nucleation of calcium oxalate monohydrate: use of turbidity measurements and computer-assisted simulations in characterizing early events in crystal formation. *J Cryst Growth* 1991;108:455-464.
- [BULGER 1941] Bulger HA, John HE. The determination of plasma uric acid. *J Biol Chem* 1941;140:427-440.
- [BUNCE 1993] Bunce CM, French PJ, Allen P, Mountford JC, Moor B, Greaves MF, Michel RH, Brown G. Comparison of the levels of inositol metabolites in transformed haemopoietic cells and their normal counterparts. *Biochem J* 1993;289:667-673.
- [BYWATERS 1964] Bywaters, EGL, Holloway VP. Measurement of serum uric acid in Great Britain in 1963. *Ann Rheum Dis* 1964;23:236-239.
- [CARAWAY 1963] Caraway WT (1963) *Standard Methods of Clinical Chemistry* 4, p 239. Academic Press, New York.
- [CARVALHO 2002] Carvalho M, Mulinari RA, Nakawaga Y. Role of Tamm-Horsfall protein and uromodulin in calcium oxalate crystallization. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1165-1172.
- [CASTILLO-ORTEGA 2002] Castillo-Ortega MM, Rodríguez DE, Encinas JC, Plascencia M, Méndez-Velarde FA, Olayo R. Conductometric uric acid and urea biosensor prepared from electroconductive polyaniline-poly(n-butyl methacrylate) composites. *Sens Actuators B* 2002;85:19-25.
- [CERINI 1999] Cerini C, Geider S, Dussol B, Hennequin C, Daudon M, Veessler S, Nitsche S, Boistelle R, Berthezene P, Dupuy P, Vazi A, Berland Y, Dagorn JC, Verdier JM. Nucleation of calcium oxalate crystals by albumin: involvement in the prevention of stone formation. *Kidney Int* 1999;55:1776-1786.
- [CHANDHOKE 1996] Chandhoke PS, May DJ (1996) *Proc VII Int Symp Urol*, p 50. Dallas.
- [CLEVELAND 2000] Cleveland LE, Moshfegh AJ, Albertson AM, Goldman JD. Dietary intake of whole grains. *J Am Coll Nutr* 2000;19:331S-338S.

- [CIFUENTES 1974] Cifuentes L (1974) Ácido úrico y uratos. En: El laboratorio del urólogo, p 103. Salvat, Barcelona.
- [CIFUENTES 1984] Cifuentes LD (1984) Composición y estructura de los cálculos renales. Salvat, Barcelona.
- [CLARK 1962] Clark LC, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci* 1962;102:29-45.
- [CONTE 1990] Conte A, Genestar C, Grases F. Relation between calcium oxalate hydrate form found in renal calculi and some urinary parameters. *Urol Int* 1990;45:25-27.
- [CONTE 1991] Conte A, Genestar C, Grases F, March JG, Martín M, Vallescar R (1991) Epidemiología de la litiasis renal en la Comunidad Balear. *Conselleria Sanitat i Seguretat Social, Palma de Mallorca*.
- [CONTE 1999] Conte A, Piza P, Garcia-Raja A. Urinary lithogen risk test: usefulness in the evaluation of renal lithiasis treatment using crystallization inhibitors (citrate and phytate). *Arch Esp Urol* 1999;52:94-99.
- [COSNIER 1994] Cosnier S, Innocent C. Detection of galactose and lactose by a poly(amphiphilic pyrrole)-galactose oxidase electrode. *Anal Lett* 1994;27:1429-1442.
- [CULLUMBINE 1950] Cullumbine H, Basnayake V, Lemottee J, Wickramanayake TW. Mineral metabolism on rice diets. *Br J Nutr.* 1950;4:101-111.
- [CURHAN 2004] Curhan GC, Willett WC, Knight EL, Stampfer MJ. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in younger women: Nurses' Health Study II. *Arch Intern Med* 2004;164:885-891.
- [CUTLER 1984] Cutler RG. Antioxidants, aging and longevity. *Free Rad Biol* 1984;6:371-428.
- [DAVIDSSON 1997] Davidsson L, Galan P, Cherouvrier F, Kastenmayer P, Juillerat MA, Hercberg S, Hurrell RF. Bioavailability in infants of iron from infant cereals: effect of dephytinization. *Am J Clin Nutr.* 1997;65:916-920.
- [DAVIES 1979] Davies NT, Olpin SE. Studies on the phytate: zinc molar contents in diets as a determinant of Zn availability to young rats. *Br J Nutr* 1979;41:590-603.
- [DEGANI 1988] Degani Y, Heller A. Direct electrochemical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. 2. Methods for bonding electron-transfer relays to glucose oxidase and D-amino acid oxidase. *J Am Chem Soc* 1988;110:2615-2620.
- [DESNOS 1972] Desnos EC (1972) The history of urology up to the latter half of the nineteenth century. En: *The history of urology*. Murphy LJT, Springfield.
- [EBISUNO 1999] Ebisuno S, Nishihata M, Inagaki T, Umehara M, Kohjimoto Y. Bikunin prevents adhesion of calcium oxalate cristal to renal tubular cells in human urine. *J Am Soc Nephrol* 1999;14:436-440.
- [ELION 1966] Elion GB, Kovensky A, Hitchings GH. Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol* 1966;15:863-880.
- [ELLIOT 1973] Elliot JS. Structure and composition of urinary calculi. *J Urol* 1973;109:82-83.
- [ERDMAN 1979] Erdman JW Jr. Oilseed phytates: nutritional implications. *J Am Oil Chem Soc* 1979;56:736-741.
- [ETOH 1992] Etoh T, Iwatake M, Miyazaki M, Harada K, Nakayama M, Sugii A Uji Y, Okabe H. Simultaneous determination of creatinine and uric acid in serum by high performance ion exchange chromatography with direct injection. *J Liq Chromatogr* 1992;15:1565-1575.
- [EVANS 1988] Evans WJ, Martin CJ. Interactions of magnesium(II), cobalt(II), nickel(II), and zinc(II) with phytic acid. VIII. A calorimetric study. *J Inorg Biochem* 1988;32:259-268.
- [FAVUS 1980] Favus MJ, Coe FL. Clinical characteristics and pathogenetic mechanisms in hyperuricosuric calcium oxalate renal stones disease. *Scand J Urol Nephron Suppl* 1980;53:171-177.
- [FELLSTRÖM 1985A] Fellström B, Danielson BG, Ljunghall S, Wikström B (1985) En: *Urolithiasis and related clinical research* (Schwille PO, Smith LH, Robertson WG, Vahlensieck W, eds), p 810. Plenum Press, New York.
- [FELLSTRÖM 1985B] Fellström B, Danielson BG, Linsjö M, Ljunghall S, Wikström B. The mechanism of glycosaminoglycan inhibition of calcium oxalate crystal growth. *Forstchr Urol Nephrol* 1985;23:24-26.
- [FINLAYSON 1978A] Finlayson B. Physicochemical aspects of urolithiasis. *Kidney Int* 1978;13:344-360.
- [FINLAYSON 1978B] Finlayson B, Reid F. The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. *Invest Urol* 1978;15:442-448.
- [FLEISCH 1962A] Fleisch H, Bisaz S. Mechanism of calcification: inhibitory role of pyrophosphate. *Nature* 1962;195:911
- [FLEISCH 1962B] Fleisch H, Bisaz S. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am J Physiol* 1962;203:671-675.
- [FLEISCH 1964] Fleisch H, Bisaz S. The inhibitory effect of pyrophosphate on calcium oxalate precipitation and its relation to urolithiasis. *Experientia* 1964;20:276-280.

- [FLEISCH 1966] Fleisch H, Russell RG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 1966;212:901-903.
- [FLEISCH 1967] Fleisch H, Bisaz S, Russell RG. Influence of pyrophosphate on the crystallisation of uric acid and magnesium ammonium phosphate and its implications in phosphate therapy for urolithiasis. *Urol Int* 1967;22:483-491.
- [FORBES 1979] Forbes RM, Weingartner KE, Parker HM, Bell RR, Erdman JW Jr. Bioavailability to rats of zinc, magnesium and calcium in casein-, egg- and soy protein-containing diets. *J Nutr* 1979;109:1652-1660.
- [FORBES 1984] Forbes RM, Parker HM, Erdman JW Jr. Effects of dietary phytate, calcium and magnesium levels on zinc bioavailability to rats. *J Nutr* 1984;114:1421-1425.
- [FORTIER 1992] Fortier G, Vaillancourt M, Belanger D. Evaluation of nafion as media for glucose oxidase immobilization for the development of an amperometric glucose biosensor. *Electroanalysis* 1992;4:275-283.
- [FOX 1978] Fox IH (1978) Degradation of purine nucleotide. En: *Uric acid* (Kelley WN, Weiner IM, eds.), p 93. Springer, New York.
- [FRENCH 1991] French PJ, Bunce CM, Stephens LR, Lord JM, McConnell FM, Brown G, Creba JA, Michell RH. Changes in the levels of inositol lipids and phosphates during the differentiation of HL60 promyelocytic cells towards neutrophils or monocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1991;245:193-201.
- [FUJITANI 1987] Fujitani T, Yoneyama M, Kabashima J, Hosokawa N, Ichikawa H. Acute toxicity of phytic acid and sodium phytate in mice. *Kenkyu Nenpo-Tokyo-toristu Eisei Kenkyusho* 1987;38:368-370.
- [GALÁN 1996] Galán JA, Conte A, Llobera A, Costa-Bauzá A, Grases F. A comparative study between etiological factors of calcium oxalate monohydrate and calcium oxalate dihydrate urolithiasis. *Urol Int* 1996;56:79-85.
- [GALBÁN 2001] Galbán J, Andreu Y, Almenara MJ, De Marcos S, Castillo JR. Direct determination of uric acid in serum by a fluorimetric-enzymatic method based on uricase. *Talanta* 2001;54:847-854.
- [GARCÍA-PUIG 1977] García-Puig J (1977) Trastornos del metabolismo de las purinas y pirimidinas. En: *Medicina Interna* (Rodés-Teixedor J, Guardia-Massó J eds.), p 2747. Masson, Barcelona.
- [GEIDER 1996] Geider S, Dussol B, Nitsche S, Veessler S, Berthezene P, Dupuy P, Astier JP, Boistelle R, Berland Y, Dagorn JC, Verdier JM. Calcium carbonate crystals promote calcium oxalate crystallization by heterogeneous or epitaxial nucleation: possible involvement in the control of urinary lithogenesis. *Calcif Tissue Int* 1996;59:33-37.
- [GHINDILIS 1997] Ghindilis AL, Atanasov P, Wilkins P. Enzyme-catalyzed direct electron transfer. *Fundamentals and analytical applications. Electroanalysis* 1997;9:661-674.
- [GILL 1979] Gill WB, Ruggiero K, Straus FH. Crystallization studies in a urothelial-lined living test tube (the catheterized female rat bladder). I. Calcium oxalate crystal adhesion to the chemically injured rat bladder. *Inv Urol* 1979;17:257-261.
- [GILMARTIN 1994] Gilmartin MA, Hart JP, Birch BJ. Development of amperometric sensors for uric acid based on chemically modified graphite-epoxy resin and screen-printed electrodes containing cobalt phthalocyanine. *Analyst* 1994;119:243-252.
- [GOCHMAN 1971] Gochman N, Schmitz JM. Automated determination of uric acid, with use of a uricase-peroxidase system. *Clin Chem* 1971;17:1154-1159.
- [GORTON 1999] Gorton L, Lindgren A, Larsson T, Munteanu FD, Ruzgas T, Gazaryan I. Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. *Anal Chim Acta* 1999;400:91-108.
- [GOVINDARAJ 2001] Govindaraj A, Selvam R. Increased calcium oxalate crystal nucleation and aggregation by peroxidized protein of human kidney stone matrix and renal cells. *Urol Res* 2001;29:194-198.
- [GRASES 1989] Grases F, March P. A study about some phosphate derivatives as inhibitors of calcium oxalate crystal growth. *J Cryst Growth* 1989;96:993-995.
- [GRASES 1990] Grases F, Millán A, Conte A. Production of calcium oxalate monohydrate, dehydrate or trihydrate. A comparative study. *Urol Res* 1990;18:17-20.
- [GRASES 1991A] Grases F, Costa-Bauzá A. Potentiometric study of nucleation of calcium oxalate in presence of several additives. *Clin Chem Enzym Comms* 1991;3:319-328.
- [GRASES 1991B] Grases F, Costa-Bauzá A, March JG, Masárová L. Glycosaminoglycans, uric acid and calcium oxalate urolithiasis. *Urol Res* 1991;19:375-380.
- [GRASES 1992] Grases F, Millán A, Söhnel O. Role of agglomeration in calcium oxalate monohydrate urolith development. *Nephron* 1992;61:145-150.
- [GRASES 1993A] Grases F, Costa-Bauzá A, March JG, Söhnel O. Artificial simulation of renal stone formation. Influence of some urinary components. *Nephron* 1993;65:77-81.

- [GRASES 1993B] Grases F, Costa-Bauzá A, Conte A. Studies on structure of calcium oxalate monohydrate renal papillary calculi. Mechanism of formation. *Scanning Microsc* 1993;7:1067-1074.
- [GRASES 1994A] Grases F, Kroupa M, Costa-Bauzá A. Studies on calcium oxalate monohydrate crystallization: influence of inhibitors. *Urol Res* 1994;22:39-43.
- [GRASES 1994B] Grases F, Costa-Bauzá A, March JG, Söhnel O. Artificial simulation of renal stone formation. Study of the early stages. *Br J Urol* 1994;74:298-301.
- [GRASES 1995] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A. A new procedure to evaluate the inhibitory capacity of calcium oxalate crystallization in whole urine. *Int Urol Nephrol* 1995;27:653-661.
- [GRASES 1996A] Grases F, Söhnel O, Villacampa AI, March JG. Phosphates precipitating from artificial urine and fine structure of phosphate renal calculi. *Clin Chim Acta* 1996;244:45-67.
- [GRASES 1996B] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A. Study of the early stages of renal formation: experimental model using urothelium of pig urinary bladder. *Urol Res* 1996;24:305-311.
- [GRASES 1996C] Grases F, Llobera A. Determination of phytic acid in urine by ICP atomic emission spectrometry. *Anal Letts* 1996;29:1193-1199.
- [GRASES 1996D] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A, March JG. Study of the effects of different substances on the early stages of papillary stone formation. *Nephron* 1996;73:561-568.
- [GRASES 1998A] Grases F, Costa-Bauzá A, García-Ferragut L. Biopathological crystallization: a general view about the mechanisms of renal stone formation. *Adv Colloid Interface Sci* 1998;74:169-194.
- [GRASES 1998B] Grases F, Llobera A. Experimental model to study sedimentary kidney stones. *Micron* 1998;29:105-111.
- [GRASES 1998C] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A. Development of calcium oxalate crystals on urothelium: effect of free radicals. *Nephron* 1998;78:296-301.
- [GRASES 1998D] Grases F, García-González R, Torres JJ, Llobera A. Effects of phytic acid on renal stone formation in rats. *Scand J Urol Nephrol* 1998;32:261-265.
- [GRASES 1999] Grases F, Ramis M, Villacampa AI, Costa-Bauzá A. Uric acid urolithiasis crystallization inhibitors. *Urol Int* 1999;62:201-204.
- [GRASES 2000A] Grases F, Villacampa AI, Costa-Bauzá A, Söhnel O. Uric acid calculi: types, etiology and mechanisms of formation. *Clin Chim Acta* 2000;302:89-104.
- [GRASES 2000B] Grases F, Ramis M, Costa-Bauzá A. Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Comparison with the action of other polyphosphates. *Urol Res* 2000;28:136-140.
- [GRASES 2000C] Grases F, Prieto RM, Simonet BM, March JG. Phytate prevents tissue calcifications in female rats. *Biofactors* 2000;11:171-177.
- [GRASES 2000D] Grases F, March JG, Prieto RM, Simonet BM, Costa-Bauzá A, García-Raja A, Conte A. Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people. Dietary effects on phytate excretion. *Scand J Urol Nephrol* 2000;34:162-164.
- [GRASES 2000E] Grases F, Simonet BM, March JG, Prieto RM. Inositol hexakisphosphate in urine: the relationship between oral intake and urinary excretion. *BJU Int* 2000;85:138-142.
- [GRASES 2001A] Grases F, Simonet BM, Vucenik I, Prieto RM, Costa-Bauzá A, March JG, Shamsuddin AM. Absorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP6 or phytate) in humans. *Biofactors* 2001;15:53-61.
- [GRASES 2001B] Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG. Phytate levels in diverse rat tissues: influence of dietary phytate. *Brit J Nutr* 2001;86:225-231.
- [GRASES 2001C] Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG. Variation of InsP₄, InsP₅ and InsP₆ levels in tissues and biological fluids depending on dietary phytate. *J Nutr Biochem* 2001;12:595-601.
- [GRASES 2001D] Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG. Dietary phytate and mineral bioavailability. *J Trace Elem Med Biol* 2001;15:221-228.
- [GRASES 2002] Grases F, Costa-Bauzá A, Ramis M, Montesinos V, Conte A. Simple classification of renal calculi closely related to their micromorphology and etiology. *Clin Chim Acta* 2002;322:29-36.
- [GRASES 2004A] Grases F, Isern B, Perelló J, Costa-Bauzá A. The role of glycoproteins in calcium oxalate crystal development. *BJU Int* 2004;94:177-188.
- [GRASES 2004B] Grases F, Perelló J, Prieto RM, Simonet BM, Torres JJ. Dietary myo-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues: a pilot study in Wistar rats. *Life Sci* 2004;75:11-19.
- [GRASES 2004C] Grases F, Simonet BM, Perelló J, Costa-Bauzá A, Prieto RM. Effect of phytate on element bioavailability in the second generation of rats. *J Trace Elem Med Biol* 2004;17:229-234.
- [GRASES 2004D] Grases F, Perelló J, Simonet BM, Prieto RM, García-Raja A. Study of potassium phytate effects on decreasing urinary calcium in rats. *Urol Int* 2004;72:237-243.

- [GRASES 2005A] Grases F, Perelló J, Isern B, Prieto RM. Study of a myo-inositol hexaphosphate-based cream to prevent dystrophic calcinosis cutis. *Br J Dermatol* 2005;152:1022-1025.
- [GRASES 2005B] Grases F, Perelló J, Isern B, Prieto RM. Study of the absorption of myo-inositol hexakisphosphate (InsP₆) through the skin. *Biol Pharm Bull* 2005;28:764-767.
- [GRASES 2005C] Grases F, Isern B, Perelló J, Sanchis P, Prieto RM. Absorption of myo-inositol hexakisphosphate (InsP₆) through the skin: Study of the matrix effects. Mechanism of phytate topical absorption. *Front Biosci* 2005;10:799-802.
- [GRASES 2006] Grases F, Costa-Bauzá A, Perelló J, Isern B, Vucenik I, Valiente M, Muñoz JA, Prieto RM. Influence of concomitant food intake on the excretion of orally administered myo-Inositol hexaphosphate in humans. *J Med Food* 2006;9:72-76.
- [GRASES 2007] Grases F, Isern B, Sanchis P, Perello J, Torres JJ, Costa-Bauza A. Phytate acts as an inhibitor in formation of renal calculi. *Front Biosci* 2007;12: 2580-2587.
- [GRASES, EN PRENSA] Grases F, Perelló J, Isern B, Costa-Bauzá A. Study of the relation between high fluoride intake and nephrolithiasis. *Curr Urol*, en prensa.
- [GRAF 1984A] Graf E, Eaton JW. Effects of phytate on mineral bioavailability in mice. *J Nutr* 1984;114:1192-1198.
- [GRAF 1984B] Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton JW. Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *J Biol Chem* 1984;259:3620-3624.
- [GRAF 1987] Graf E, Empson KL, Eaton JW. Phytic acid. A natural antioxidant. *J Biol Chem* 1987;262:11647-11650.
- [GRAF 1990] Graf E, Eaton JW. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radic Biol Med.* 1990;8:61-69.
- [GRENABO 1988] Grenabo L, Hedelin H, Hugosson J, Pettersson S. Adherence of urease-induced crystals to rat bladder epithelium following acute infection with different uropathogenic microorganisms. *J Urol* 1988;140:428-430.
- [GRIEBSCH 1974] Griebisch A, Zöllner N (1974) Effect of ribonucleotides given orally on uric acid production in man. En: *Purine metabolism in man* (Sperling O, De Vries A, Wyngaarden JB, eds.), p 443. Plenum Press, New York.
- [GRIFFITH 1986] Griffith HM, O'Shea B, Keogh B, Kevany JP. A case-control study of dietary intake of renal stone patients. I. Preliminary analysis. *Urol Res* 1986;14:67-74.
- [GROVER 1998] Grover PK, Moritz RL, Simpson RJ, Ryall RL. Inhibition of growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro - a comparison of four human proteins. *Eur J Biochem* 1998;253:637-644.
- [GROVER 2002] Grover PK, Kim DS, Ryall RL. The effect of seed crystals of hydroxyapatite and brushite on the crystallization of calcium oxalate in undiluted human urine in vitro: implications for urinary stone pathogenesis. *Mol Med* 2002;8:200-209.
- [GUTMAN 1968] Gutman AB, Yu TF. Uric acid nephrolithiasis. *Am J Med* 1968;45:759-779.
- [GUYTON 1977] Guyton AC (1977) Control genético de la síntesis de proteínas, función celular y reproducción celular. En: *Tratado de fisiología médica*, p 28. Interamericana, Madrid.
- [HANDE 1978] Hande K, Reed E, Chabner B. Allopurinol kinetics. *Clin Pharmacol Ther* 1978;23:598-605.
- [HARLAND 1986] Harland BF, Oberleas D. Anion-exchange method for determination of phytate in foods: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 1986;69:667-670.
- [HARLAND 1987] Harland BF, Oberleas D. Phytate in foods. *World Rev Nutr Diet* 1987;52:235-259.
- [HARRISON 1939] Harrison DC, Mellanby E. Phytic acid and the rickets-producing action of cereals. *Biochem J* 1939;33:1660-1680.
- [HAWKINS 1993] Hawkins PT, Poyner DR, Jackson TR, Letcher AJ, Lander DA, Irvine RF. Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for myo-inositol hexakisphosphate. *Biochem J.* 1993;294:929-934.
- [HENDERSON 1968] Henderson JF, Rosenbloom FM, Kelley WN, Seegmiller JE. Variations in purine metabolism of cultured skin fibroblasts from patients with gout. *J Clin Invest* 1968;47:1511-1516.
- [HENNEMAN 1958] Henneman PH, Benedict PH, Forbes AP, Dudley HR. Idiopathic hypercalciuria. *N Eng J Med* 1958;17:802-807.
- [HENRY 1974] Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW (1974) *Clinical Chemistry Principles and Technics*. Harper & Row, Hagerstown.
- [HERS 1979] Hers HG, Van Den Berghe G. Enzyme defect in primary gout. *Lancet* 1979;1:585-586.
- [HESS 2003] Hess B. Pathophysiology, diagnosis and conservative therapy in calcium kidney calculi. *Ther Umsch* 2003;60:79-87.
- [HESSE 1975] Hesse A, Schneider HJ, Berg W, Hienzsch E. Uric acid dihydrate as urinary calculus component. *Invest Urol* 1975;12:405-409.

- [HESSE 1979] Hesse A, Berg W, Bothor C. Scanning electron microscopic investigations on the morphology and phase conversions of uroliths. *Int Urol Nephrol* 1979;11:11-20.
- [HOFBAUER 1988] Hofbauer J, Zechner O. Impact of allopurinol treatment on the prevention of hyperuricosuric calcium oxalate lithiasis. *Eur Urol* 1988;15:227-229.
- [HOFFMAN 1954] Hoffman WS. Metabolism of uric acid and its relation to gout. *J Am Med Assoc* 1954;154:213-217.
- [HURRELL 1992] Hurrell RF, Juillerat MA, Reddy MB, Lynch SR, Dassenko SA, Cook JD. Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 1992;56:573-578.
- [IBARZ 1999] Ibarz L, Ruíz FJ (1999) Historia y epidemiología de la litiasis renal. En: *Litiasis Urinaria*, p 5. Garsi, Madrid.
- [ICHIKAWA 1987] Ichikawa H, Ohishi S, Takahashi O, Kobayashi H, Yuzawa K, Hosokawa N, Hashimoto T. Acute oral toxicities of phytic acid and sodium phytate in rats. *Kenkyu Nenpo-Tokyo-toristu Eisei Kenkyusho* 1987;38:371-376.
- [INOUE 2003] Inoue K, Namiki T, Iwasaki Y, Yoshimura Y, Nakazawa H. Determination of uric acid in human saliva by high-performance liquid chromatography with amperometric electrochemical detection. *J Chromatogr B* 2003;785:57-63.
- [ISHIHARA 1972] Ishihara A, Kurahasi K, Uehara H. Enzymatic determination of ammonia in blood plasma. *Clin Chim Acta* 1972;41:255-261.
- [IWATA 1985] Iwata H, Nishio S, Wakatsuki A, Ochi K, Takeuchi M. Architecture of calcium oxalate monohydrate urinary calculi. *J Urol* 1985;133:334-338.
- [JIA 2002] Jia J, Wang B, Wu A, Cheng G, Li Z, Dong S. A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: Self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network *Anal Chem* 2002;74:2217-2223.
- [KABASAKALIAN 1973] Kabasakalian P, Kalliney S, Westcott A. Determination of uric acid in serum, with use of uricase and a tribromophenol-aminoantipyrine chromogen. *Clin Chem* 1973;19:522-524.
- [KAVANAGH 2000] Kavanagh JP, Jones L, Rao PN. Calcium oxalate crystallization kinetics studied by oxalate-induced turbidity in fresh human urine and artificial urine. *Clin Sci* 2000;98:151-158.
- [KELLEY 1969] Kelley WN, Greene ML, Rosenbloom FM, Henderson JF, Seegmiller JE. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency in gout. *Ann Intern Med* 1969;1:155-206.
- [KELSAY 1987] Kelsay JL. Effects of fiber, phytic acid, and oxalic acid in the diet on mineral bioavailability. *Am J Gastroenterol* 1987;82:983-986.
- [KEMENADE 1987] Kemenade MJJM van, Bruyn PL. A kinetic study of precipitation from supersaturated calcium phosphate solutions. *J Colloid Interface Sci* 1987;118:564-585.
- [KHAN 1993] Khan GF, Kobatake E, Ikariyama Y, Aizawa M. Amperometric biosensor with PQQ enzyme immobilized in a mediator-containing polypyrrole matrix. *Anal Chim Acta* 1993;281:527-533.
- [KHAN 2000] Khan SR, Maslamani SA, Atmani F, Glenton PA, Opalko FJ, Thamilselvan S, Hammett-Stabler C. Membranes and their constituents as promoters of calcium oxalate crystal formation in human urine. *Calcif Tissue Int* 2000;66:90-96.
- [KHOKHAR 1994] Khokhar S, Pushpanjali, Fenwick GR. Phytate content of Indian foods and intakes by vegetarian Indians of Hisar Region, Haryana State. *J Agric Food Chem* 1994;42:2440-2444.
- [KIM 1982] Kim MK. The stones. *Scanning Electron Microsc* 1982;4:1634-1660.
- [KIM 2002] Kim H, Jo MK, Kwak C, Park SK, Yoo KY, Kang D, Lee C. Prevalence and epidemiologic characteristics of urolithiasis in Seoul, Korea. *Urology* 2002;59:517-521.
- [KOJIMA 1986] Kojima T, Nishina T, Kitamura M, Kamatani N, Nishioka K. Reversed-phase liquid-chromatographic determination of purine compounds in serum applied to studies of hypouricemia. *Clin Chem* 1986;32:287-290.
- [KONYA 2003] Konya E, Umekawa T, Iguchi M, Kurita T. The role of osteopontin on calcium oxalate crystal formation. *Eur Urol* 2003;43:564-571.
- [KRENITSKY 1968] Krenitsky TA, Elion GB, Henderson AM, Hitchings GH. Inhibition of human purine nucleoside phosphorylase. Studies with intact erythrocytes and the purified enzyme. *J Biol Chem* 1968;243:2876-2881.
- [KUMAR 2003] Kumar C, Farrel G, Lieske JC. Whole urinary proteins coat calcium oxalate monohydrate crystals to greatly decrease their adhesion to renal cells. *J Urol* 2003;170:221-225.
- [LANG 2003] Lang R, Thane CW, Bolton-Smith C, Jebb SA. Consumption of whole-grain foods by British adults: findings from further analysis of two national dietary surveys. *Public Health Nutr* 2003;6:479-484.
- [LEE 2002] Lee YH, Huang WC, Tsai JY, Lu CM, Chen WC, Lee MH, Hsu HS, Huang JK, Chang LS. Epidemiological studies on the prevalence of upper urinary calculi in Taiwan. *Urol Int* 2002;68:172-177.

- [LEHNINGER 1984] Lehninger AL (1984) Principios de Bioquímica, p 615. Omega, Barcelona.
- [LEISCH 1964] Leisch M, Nyhan WL. A familiar disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am J Med* 1964;36:561-570.
- [LEUSMANN 1991] Leusmann DB. A classification of urinary calculi with respect to their composition and micromorphology. *Scand J Urol* 1991;25:141-150.
- [LI 1985] Li MK, Blacklock NJ, Garside J. Effects of magnesium on calcium oxalate crystallization. *J Urol* 1985;133:123-125.
- [LIAO 2004] Liao C, Chou J, Sun T, Hsiung S, Hsieh J. Study on the uric acid biosensor. *Chem Sens* 2004;20:62-63.
- [LIESKE 2000] Lieske JC, Toback FG. Renal cell - urinary crystal interactions. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9:349-355.
- [LIESKE 2001] Lieske JC, Toback FG, Deganello S. Sialic acid-containing glycoproteins on renal cells determine nucleation of calcium oxalate dihydrate crystals. *Kidney Int* 2001;60:1784-1791.
- [LIU 2000] Liu Z, Liu B, Kong J, Deng J. Probing trace phenols based on mediator-free alumina sol-gel-derived tyrosinase biosensor. *Anal Chem* 2000;72:4707-4712.
- [LORENTZ 1967] Lorentz K, Berndt W. Enzymic determination of uric acid by a colorimetric method. *Anal Biochem* 1967;18:58-63.
- [MAGA 1982] Maga JA. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *J Agric Food Chem* 1982;30:1-9.
- [MANARY 2000] Manary MJ, Hotz C, Krebs NF, Gibson RS, Westcott JE, Arnold T, Broadhead RL, Hambidge KM. Dietary phytate reduction improves zinc absorption in Malawian children recovering from tuberculosis but not in well children. *J Nutr* 2000;130:2959-2964.
- [MANDEL 1981] Mandel NS, Mandel GS (1981) Epitaxis between stone-forming crystals at the atomic level. En: *Urolithiasis: clinical and basic research* (Smith LH, Robertson WG, Finlayson B, eds.), p 469. Plenum Press, New York.
- [MARTIN 1984] Martin X, Werness PG, Bergert JH, Smith LH. Pentosan polysulphate as an inhibitor of calcium oxalate crystal growth. *J Urol* 1984;132:786-788.
- [MARTIN 1986] Martin CJ, Evans WJ. Phytic acid-zinc ion interactions: a calorimetric and titrimetric study. *J Inorg Biochem* 1986;26:169-183.
- [MARTÍNEZ-PÉREZ 2003] Martínez-Pérez D, Ferrer ML, Mateo CR. A reagent less fluorescent sol-gel biosensor for uric acid detection in biological fluids. *Anal Biochem* 2003;322:238-242.
- [MARTINS 2002] Martins MC, Meyers AA, Whalley NA, Rodgers AL. Cystine: a promoter of the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in normal and undiluted human urine. *J Urol* 2002;167:317-321.
- [MASSEY 1970] Massey V, Komai H, Palmer G, Elion GB. On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo[3,4-d]pyrimidines. *J Biol Chem* 1970;245:2837-2844.
- [MATEOS 1994] Mateos EA, Puig JG. Purine metabolism in Lesch-Nyhan syndrome versus Kelley-Seegmiller syndrome. *J Inherit Metab Dis* 1994;17:138-142.
- [MEDETOGNON-BENISSAM 1999] Medetognon-Benissam J, Tardivel S, Hennequin C, Daudon M, Druke T, Lacour B. Inhibitory effect of bikunin on calcium oxalate crystallization in vitro and urinary bikunin decrease in renal stone formers. *Urol Res* 1999;27:69-75.
- [MEITES 1974] Meites S, Thompson C, Roach RW. Two ultramicro-scale methods for plasma uric acid analysis with uricase. *Clin Chem* 1974;20:790-793.
- [MELLANBY 1925] Mellanby E. Experimental rickets. Effect of cereals and their interaction with other factors of diet and environment in producing rickets. *Med Res Counc* 1925;93:2-65.
- [MEYER 1976] Meyer JL, Bergert JH, Smith LH. The epitaxially induced crystal growth of calcium oxalate by crystalline uric acid. *Invest Urol* 1976;14:115-119.
- [MEYER 1985] Meyer JL (1985) Relative importance of calcium phosphate urinary inhibitors. En: *Urolithiasis and related clinical research* (Schiville PO, Smith LH, Robertson WG, Vahlensieck W, eds.), p 811. Plenum Press, New York.
- [MIDORIKAWA 2001] Midorikawa K, Murata M, Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi S. Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:552-557.
- [MILNER 1978] Milner JA, Perkins EG. Determination of uric acid in biological fluids by high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* 1978;88:560-565.
- [MIRALPEIX 1989] Miralpeix A, Quer J (1989) *Gastronomia i dietètica per a collectivitats*. EUMO, Barcelona.
- [MITTERMÜLLER 1996] Mittermüller B, Bichler KH, Strohmaier WL, Eipper E, Lahme S (1996) Excretion of uromucoid in patients with uric acid stones. En: *Proc 8th Int Symp Urol* (Pack CY, Resnick MI, Preminger GM, eds.), p 247. Millet the Printer, Dallas.

- [MIZUTANI 1993] Mizutani F, Yabuki S, Katsura T. Amperometric enzyme electrode with fast response to glucose using a layer of lipid-modified glucose oxidase and Nafion anionic polymer. *Anal Chim Acta* 1993;274:201-207.
- [MO 2004] Mo L, Huang HY, Zhu XH, Shapiro E, Hasty DL, Wu XR. Tamm-Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney Int* 2004;66:1159-1166.
- [MODLIN 1980] Modlin M. Urinary phosphorylated inositols and renal stone. *Lancet* 1980;2:1113-1114.
- [MU 1992] Mu S, Kan J, Zhou J. Bioelectrochemical responses of the polyaniline uricase electrode. *J Electroanal Chem* 1992;334:121-132.
- [MÜLLER 1988] Müller H. HPLC method for the simultaneous determination of urea, creatinine, and uric acid in serum and urine. *Z Anal Chem* 1988;332:464-467.
- [MURPHY 1962] Murphy BT, Pyrah LN. The composition, structure, and mechanism of the formation of urinary calculi. *Br J Urol* 1962;34:129-159.
- [NAKAI 1996] Nakai H, Yanagawa M, Kameda K, Ogura Y, Kawamura J (1996) *Proc VIII Int Symp Urol*. Dallas.
- [NANCOLLAS 1980] Nancollas GH, Koutsoukos PG. Calcium phosphate nucleation and growth in solution. *Prog Cryst Growth Charact* 1980;3:77-102.
- [NANJO 1974] Nanjo M, Guilbault GG. Enzyme electrode sensing oxygen for uric acid in serum and urine. *Anal Chem* 1974;46:1769-1772.
- [NARASIMHAN 1986] Narasimhan K, Wingard LB. Enhanced direct electron transport with glucose oxidase immobilized on (aminophenyl)boronic acid modified glassy carbon electrode. *Anal Chem* 1986;58:2984-2987.
- [NORMAN 1984] Norman RW, Scurr DS, Robertson WG, Peacock. Inhibition of calcium oxalate crystallization by pentosan polysulphate in control subjects and stone formers. *Br J Urol* 1984;56:594-598.
- [OFFER 1894] Offer TR. *Centr Physiol* 1894;8:801.
- [OWEN 1996] Owen RW, Weisgerber UM, Spiegelhalter B, Bartsch H. Faecal phytic acid and its relation to other putative markers of risk for colorectal cancer. *Gut* 1996;38:591-597.
- [PACHLA 1975] Pachla LA, Kissinger PT. Estimation of serum uric acid by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Clin Chim Acta* 1975;59:309-312.
- [PACHLA 1979] Pachla LA, Kissinger PT. Measurement of serum uric acid by liquid chromatography. *Clin Chem* 1979;25:1847-1852.
- [PAK 1975] Pak CY, Arnold LH. Heterogeneous nucleation of calcium oxalate by seeds of monosodium urate. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975;149:930-932.
- [PAK 1987] Pak CY. Citrate and renal calculi. *Miner Electrolyte Metab* 1987;13:257-266.
- [PALLAUF 1999] Pallauf J, Pippig S, Most E, Rimbach G. Supplemental sodium phytate and microbial phytase influence iron availability in growing rats. *J Trace Elem Med Biol* 1999;13:134-140.
- [PANDEY 1988] Pandey PC. A new conducting polymer-coated glucose sensor. *J Chem Soc Faraday Trans* 1988;84:2259-2265.
- [PETIT 1984] Petit C. Calcium lithiasis: uric acid under question. *Nephrologie* 1984;5:192-194.
- [PIERRATOS 1994] Pierratos AE, Khalaff H, Cheng PT, Psihramis K, Jewett MA. Clinical and biochemical differences in patients with pure calcium oxalate monohydrate and calcium oxalate dihydrate kidney stones. *J Urol* 1994;151:571-574.
- [PINTO 1993] Pinto B (1993) *Litiasis Renal*, p 129. Masson, Barcelona.
- [POPA 2000] Popa E, Kubota Y, Tryk DA, Fujishima A. Selective voltammetric and amperometric detection of uric acid with oxidized diamond film electrodes. *Anal Chem* 2000;72:1724-1727.
- [PRAETORIUS 1949] Praetorius E. An enzymatic method for the determination of uric acid by ultraviolet spectrophotometry. *Scand J Clin Lab Invest* 1949;1:222-230.
- [PRIEN 1947] Prien EL, Frondel C. Studies in urolithiasis. I. The composition of urinary calculi. *J Urol* 1947;57:949-994.
- [RAMELLO 2000] Ramello A, Vitale C, Marangella M. Epidemiology of nephrolithiasis. *J Nephrol* 2000;3:45-50.
- [REDDY 1982] Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK. Phytates in legumes and cereals. *Adv Food Res* 1982;28:1-92.
- [REDDY 2002] Reddy NR (2002) Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. En: *Food phytates* (Reddy NR, Sathe SK eds.), pp 25-51. CRC Press, Boca Raton.
- [RICKARD 1997] Rickard SE, Thompson LU. Interactions and biological effects of phytic acid. *ACS Symp Ser* 1997;662:294-312.

- [ROBERTSON 1985] Robertson WG, Peacock M (1985) Pathogenesis of urolithiasis. En: Urolithiasis: etiology. Diagnosis (Schneider HJ, Peacock M, Robertson WG, Vahlensieck W, eds.), p 185. Springer Verlag, Berlin.
- [ROMERO 1997] Romero MC, Nocera S, Nesse AB. Decreased Tamm-Horsfall protein in lithiasic patients. Clin Biochem 1997;30:63-67.
- [ROSS 1994] Ross MA. Determination of ascorbic acid and uric acid in plasma by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B 1994;657:197-200.
- [RUNDLES 1963] Rundles RW, Wyngaarden JB, Hitchings GH, Elion GB, Silberman HR. Effects of xanthine oxidase inhibitor on thiopurine metabolism, hyperuricaemia and gout. Trans Assoc Am Physician 1963;76:126-140.
- [RUNDLES 1966] Rundles RW. Metabolic effects of allopurinol and allo-xanthine. Ann Rheum Dis 1966;25:615-620.
- [RUSSELL 2006] Russell R, Graham G. Bisphosphonates: From Bench to Bedside. Ann NY Acad Sci 2006;1068:367-401.
- [RYALL 1981] Ryall RL, Harnett RM, Marshall V R. The effect of urine, pyrophosphate, citrate, magnesium and glycosaminoglycans on the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. Clin Chim Acta 1981;112:349-156.
- [RYALL 1997] Ryall RL. Urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and their potential role in stone formation. World J Urol 1997;15:155-164.
- [SAKUMA 1987] Sakuma R, Nishina T, Kitamura M. Deproteinizing methods evaluated for determination of uric acid in serum by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection. Clin Chem 1987;33:1427-1430.
- [SALLIS 1995] Sallis JD, Parry N F, Meehan JD, Kamperman H, Anderson ME. Controlling influence of phosphocitrate in vitro and in vivo on calcium oxalate crystal formation and growth. Scanning Microsc 1995;9:127-136.
- [SANDSTRÖM 2000] Sandström B, Bügel S, McGaw BA, Price J, Reid MD. A high oat-bran intake does not impair zinc absorption in humans when added to a low-fiber animal protein-based diet. J Nutr 2000;130:594-599.
- [SCHEPERS 2002] Schepers MS, van der Boom BG, Romjin JC, Schroder FH, Verkoelen CF. Urinary crystallization inhibitors do not prevent crystal binding. J Urol 2002;167:1844-1847.
- [SCHNEIDER 1985] Schneider HJ (1985) Epidemiology of urolithiasis. En: Urolithiasis: Etiology, Diagnosis (Schneider HJ, Peacock M, Robertson WG, Vahlensieck W, eds.), p 185. Springer Verlag, Berlin.
- [SCHULZ 1989A] Schulz E, Börner R, Brundig P, Mäurer F. Influence of different factors on the formation of calcium oxalate stones. I. Discriminant analytical computations of morphological parameters of the pelvic-calycela systems of calcium oxalate stone formers and controls. Eur Urol 1989;16:212-217.
- [SCHULZ 1989B] Schulz E, Börner R, Brundig P, Mäurer F. Influence of different factors on the formation of calcium oxalate stones. II. Discriminant analytical computations of morphological parameters of pelvic-calyceal systems and clinicochemical urine parameters of control and calcium oxalate stone formers. Eur Urol 1989;16:218-222.
- [SCOTT 1966] Scott JT, Hall AP, Grahame R. Allopurinol in treatment of gout. Br Med J 1966;2:321-327.
- [SCOTT 1985] Scott R. Epidemiology of stone disease. Br J Urol 1985;57:491-497.
- [SEE 1992] See WA, Williams RD. Urothelial injury and clotting cascade activation: common denominators in particulate adherence to urothelial surfaces. J Urol 1992;147: 541-548.
- [SEEGMILLER 1980] Seegmiller JE (1980) Diseases of purine and pyrimidine metabolism. En: Metabolic control and diseases (Bondy PK, Rosenberg LE, eds.), p 777. WB Saunders, Philadelphia.
- [SERIO 1999] Serio A, Fraioli A. Epidemiology of Nephrolithiasis. Nephron 1999;81:26-30.
- [SINGH 2001] Singh PP, Barjatiya MK, Dhing S, Bhatnagar R, Kothari S, Dhar V. Evidence suggesting that high intake of fluoride provokes nephrolithiasis in tribal populations. Urol Res 2001;29:238-244.
- [SIQUIERA 2001] Siqueira EM, Arruda SF, de Sousa LM, de Souza EM. Phytate from an alternative dietary supplement has no effect on the calcium, iron and zinc status in undernourished rats. Arch Latinoam Nutr 2001;51:250-257.
- [SKRTCIC 1987] Skrtic D, Fürdi-Nilhofer H, Markovic M. Precipitation of calcium oxalates from high ionic strength solutions. V. The influence of precipitation conditions and some additives on the nucleating phase. J Cryst Growth 1987;80:113-120.
- [SLAUNWHITE 1975] Slaunwhite WD, Pachla LA, Wenke DC, Kissinger PT. Colorimetric, enzymatic and liquid-chromatography methods for serum uric acid compared. Clin Chem 1975;21:1427-1429.
- [SÖHNEL 1993] Söhnel O, Grases F, March JG. Experimental technique simulating oxalocalcic renal stone generation. Urol Res 1993;21:95-99.

- [SÖHNEL 1995] Söhnel O, Grases F. Calcium oxalate monohydrate renal calculi. Formation and development mechanism. *Adv Colloid Interface Sci* 1995;59:1-17.
- [SORENSEN 2002] Sorensen CM, Chandhoke PS. Hyperuricosuric calcium nephrolithiasis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2002;31:915-925.
- [SPERLING 1972] Sperling O, Eilam G, Sara-Persky-Brosh, De Vries A. Accelerated erythrocyte 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate synthesis. A familial abnormality associated with excessive uric acid production and gout. *Biochem Med* 1972;6:310-316.
- [STOUT 1989] Stout JT, Caskey CT (1989) Hypoxanthine phosphoribosyltransferase deficiency: The Lesch-Nyhan syndrome and gout arthritis. En: *The metabolic basis of inherited disease* (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds.), p 1007. McGraw-Hill, New York.
- [SUZUKI 1996] Suzuki K, Ryall RL. The effect of heparan sulphate on the crystallization of calcium oxalate in undiluted, ultrafiltered human urine. *Br J Urol* 1996;78:15-21.
- [TERKELTAUB 2001] Terkeltaub RA. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: 1-11.
- [THOMPSON 1987] Thompson LU. Reduction of phytic acid concentration in protein isolates by acylation techniques. *J. Am. Oil Chem. Soc* 1987;64:1712-1717.
- [TSUJIHATA 2000] Tsujihata M, Miyake O, Yoshimura K, Kakimoto KI, Takahara S, Okuyama A. Fibronectin as a potent inhibitor of calcium oxalate urolithiasis. *J Urol* 2000; 164:1718-1723.
- [TSUJIHATA 2001] Tsujihata M, Miyake O, Yoshimura K, Kakimoto KI, Takahara S, Okuyama A. Comparison of fibronectin content in urinary macromolecules between normal subjects and recurrent stone formers. *Eur Urol* 2001;40:458-462.
- [URIBARRI 1989] Uribarri J, Oh M, Carrol HJ. The first kidney stone. *Ann Int Med* 1989;111:1006-1009.
- [WALKER 1948] Walker AR, Fox FW, Irving JT. Studies in human mineral metabolism: 1. The effect of bread rich in phytate phosphorus on the metabolism of certain mineral salts with special reference to calcium. *Biochem J* 1948;42:452-62.
- [WANG 1993] Wang J, Wu H (1993) Permselective lipid-poly(o-phenylenediamine) coatings for amperometric biosensing of glucose. *Anal Chim Acta* 283: 683-688.
- [WANG 1999] Wang B, Li B, Wang Z, Xu G, Wang Q, Dong S. Sol-gel thin-film immobilized soybean peroxidase biosensor for the amperometric determination of hydrogen peroxide in acid medium. *Anal Chem* 1999;71:1935-1939.
- [WATTS 1965] Watts RW, Watts JE, Seegmiller JE. Xanthine oxidase activity in human tissues and its inhibition by allopurinol (4-hydroxypyrazolo [3,4-d] pyrimidine). *J Lab Clin Med* 1965;66:688-697.
- [WYNGAARDEN 1965] Wyngaarden JB, Rundles RW, Metz EN. Allopurinol in the treatment of gout. *Ann Int Med* 1965;62:842-847.
- [WYNGAARDEN 1983] Wyngaarden JB, Kelley WN (1983) Gout. En: *The metabolic basis of inherent diseases* (Stanbury JB, Wyngaarden JB, Frederickson DS, eds.), p 1043. McGraw-Hill, New York.
- [YAMATE 1996] Yamate T, Kohri K, Umekawa T, Amasaki N, Amasaki N, Isikawa Y, Iguchi M, Kurita T. The effect of osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals to Madin-Darby canine kidney cells. *Eur Urol* 1996;30:388-393.
- [YANG 1989] Yang SD, Xu JM, Yang L, Ma YN, Bai F. Simultaneous determination of uric acid and creatinine in human serum or plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr* 1989;12:1791-1807.
- [YOUNG 1972] Young DS, Thomas DW, Friedman RB, Pestaner LC. Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Clin Chem* 1972;18:1041-1303.
- [YUE 1964] Yue TF, Gutman AB. Effect of allopurinol (4-hydroxypyrazolo-[3,4-d]pyrimidine) on serum and urinary uric acid in primary and secondary gout. *Am J Med* 1964;37: 885-898.
- [ZHANG 1994] Zhang Z, Bao W, Liu C. Electrochemical properties of benzoquinone and ferrocene monocarboxylic acid at a polyaniline coated platinum electrode for glucose sensing. *Talanta* 1994;41:875-879.
- [ZHANG 2004] Zhang F, Wang X, Ai S, Sun Z, Wan Q, Zhu Z, Xian Y, Jin L, Yamamoto K. Immobilization of uricase on ZnO nanorods for a reagentless uric acid biosensor. *Anal Chim Acta* 2004;519:155-160.
- [ZHOU 1992] Zhou JR, Fordyce EJ, Raboy V, Dickinson DB, Wong MS, Burns RA, Erdman JW Jr. Reduction of phytic acid in soybean products improves zinc bioavailability in rats. *J Nutr* 1992;122:2466-2473.

Experimental, resultados y discusión



En este capítulo de la tesis se ha estudiado la capacidad del ácido úrico para actuar como nucleante heterogéneo de la litiasis oxalocálcica así como el efecto de diferentes inhibidores de la cristalización sobre dicho proceso a través de tres trabajos diferentes:

ARTÍCULO ORIGINAL 2.1. El desarrollo de un método por cromatografía líquida de alta resolución con detección por espectrometría de masas (HPLC/MS) lo suficientemente sensible para la determinación de ácido úrico en el corazón de cálculos de oxalato cálcico.

ARTÍCULO ORIGINAL 2.2. Un trabajo "in vitro" donde se utilizaron dos sistemas en flujo utilizando fragmentos de cálculos o cristales de ácido úrico los cuales están en contacto directo con una orina sintética de composición iónica similar a la orina real. El primer sistema en flujo simula el comportamiento de ciertas cavidades del riñón con baja eficacia urodinámica y permite el estudio de la capacidad de cristales de ácido úrico para inducir la formación y crecimiento de cristales de COM sobre los mismos y el efecto de diferentes inhibidores sobre dicho proceso. El segundo sistema en flujo permite estudiar y comparar la capacidad para actuar como nucleantes heterogéneos de la litiasis oxalocálcica de fragmentos de diferentes tipos de cálculos de ácido úrico.

ARTÍCULO ORIGINAL 2.3. Un trabajo donde, mediante el método por HPLC/MS anterior, se determinó el ácido úrico presente en el corazón o fragmento de diferentes tipos de cálculos de oxalato cálcico a fin de comparar y evaluar el papel del ácido úrico en la formación de diferentes tipos de cálculos de oxalato cálcico.

Artículo original 2.1.

***Determinación de ácido úrico en orina,
saliva y cálculos de oxalato cálcico por
HPLC/MS***

Determination of uric acid in urine, saliva and calcium oxalate renal calculi by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry

Joan Perelló, Pilar Sanchis, Félix Grases*

Laboratory of Renal Lithiasis Research, Faculty of Sciences, University Institute of Health Sciences Research (IUNICS),
University of Balearic Islands, Ctra. Valldemossa, Km 7.5, 07122 Palma of Mallorca, Spain

Received 12 November 2004; accepted 17 July 2005
Available online 2 August 2005

Abstract

A very simple and direct method for determination of uric acid, in various biological matrices, based on high-performance liquid chromatography and mass spectrometry is described. Chromatographic separations were performed with a stationary phase Zorbax Sax Column, an anion exchange resin, with 50% sodium citrate 1 mM at pH 6.5 and 50% acetonitrile as mobile phase delivered at a flow rate of 1 ml/min. The detector counted negative ions by monitoring m/z 167.1, which corresponds to the urate anion. The method does not use an internal standard but quality control samples were used. Intra-day precision ranged between 1.1 and 1.5%, whereas inter-day precision was between 1.3 and 2.8% ($n = 5$) working with some selected standards. Recovery tests of added standard have been successfully performed in urine and saliva samples, thus showing an appropriate accuracy of the method. The limit of quantitation found was 70 $\mu\text{g/l}$. Different urine and saliva samples were analyzed using an alternative analytical methodology based on an enzymatic reaction and photometric detection at 520 nm, resulting both methods comparable at a 95% confidence level. The method has been also applied to the determination of trace amounts of uric acid in the core of some selected calcium oxalate renal calculi.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Uric acid; Liquid chromatography; Mass spectrometry; Renal calculi

1. Introduction

Uric acid (2,6,8-trihydroxypurine, UA) is the major nitrogenous compound in urine, but it is also found in other biological fluids such as serum, blood and saliva. UA is the main final product of purine metabolism [1,2], and its determination in urine is a powerful indicator of metabolic alterations or disease appearance [3]. Likewise, excessive production of UA may lead to its precipitation in the kidney at low pH values [4]. Around 8% of renal calculi are formed by UA [5] and there are two main causes to explain this undesirable crystallization: the supersaturation of urine with UA [6] and low pH values (<5.5). It has also been

demonstrated that a group of calcium oxalate monohydrate renal calculi have a core formed by important amounts of UA, which acts as heterogeneous nucleant [5]. In some cases due to the little size of the core or due to the presence of abundant organic matter, the presence of uric acid can not be confirmed, in spite of its importance to establish the calculus ethiology and as a consequence the appropriate pharmacologic and/or dietetic treatment [5]. Furthermore, one of the biggest problems about the UA metabolism is Gout [4], which can be caused by an increase in UA production and a decrease in elimination of UA by the kidneys, or by an increase of intake of foods containing purines (which are also metabolized to UA). Elevated levels of UA can be caused by many factors, including increased alcohol consumption, obesity, diabetes, high cholesterol, high blood pressure, kidney disease, and heart disease. UA has been reported to act as an antioxidant

* Corresponding author. Tel.: +34 971173257; fax: +34 971173426.
E-mail address: fgrases@uib.es (F. Grases).

[7]. As a consequence, determination of UA for diagnosis and treatment of various disorders is very important.

The concentration of UA in urine is about 250–750 mg/l for healthy adult people [8].

Analytical methods for the determination of UA can be classified into four main groups: colorimetric methods, enzymatic methods, high-performance liquid chromatographic (HPLC) methods and methods based on the use of biosensors. The first analytical method described to determine UA dates from 1894, when Offer used the antioxidant properties of UA to determine it via the reduction of phosphotungstate complexes and colorimetric detection [9]. In 1895 other methods appeared with the same principle, but all of them presented numerous stages of sample pre-treatment.

The first enzymatic methods appeared in 1941, when UA was determined employing the enzyme uricase [10] and performing absorbance measurements at 293 nm. Other methods have been described using the same principles, but their main drawback is the need of protein disruption for each sample. Using the same reaction, H_2O_2 generated can be used, in the presence of peroxidase, to oxidize a chromogenic dye, originating a red complex that absorbs at 520 nm [11–14]. Clinical laboratories use this sequence of reactions as routine method for UA determination [8].

However, chemical methods give higher values due to the presence of endogenous and exogenous substances that reduce phosphotungstate [15]. Enzymatic assays (in spite of being very selective) still suffer from interference by various substances (such as metals) that lead to negative errors. To avoid these interferences, many HPLC methods were developed. Ion-exchange [16–18], ion-pair [19,20], reversed phase [21,22] and size-exclusion chromatography [23] were used for UA determination. The main problem of most of these methods is the need of deproteination of serum samples before analysis. This can be achieved following either the procedure of Somogyi [24] or the procedure of Haden [25]. It can also be performed by adding trichloroacetic acid, perchlorate or acetonitrile [15], but in all cases samples need centrifugation and further treatment with a phosphate buffer. Also, ultrafiltration has been used to perform deproteination.

A recent method for the determination of UA in human saliva using electrochemical detection has been developed [26].

Also, several methods have been developed for UA determination using biosensors [27–32]. These methods are based on the enzymatic reaction or similar reactions described above. In this case, an enzyme suspension is immobilized on the surface of a membrane.

In a recent paper [33], several organic acids have been determined in urine by ion-pair chromatography and capillary zone electrophoresis, with detection limits of 0.11 and 0.87 mg/l UA, respectively.

In this paper, a very simple, sensitive and selective (due to the characteristics of the detection) HPLC–MS methodology for UA determination is described and applied to real urine and calcium oxalate renal calculi.

2. Experimental

2.1. Quantitation method

Analysis of UA was performed with an Agilent 1100 Series HPLC–MS system. Chromatographic separations were performed at 25 °C on a Zorbax Sax Column (150 mm × 4.6 mm i.d.), an anion exchange resin, 5 µm particle size (supplied by Agilent Technologies, Madrid, Spain) with a 12.5 mm × 4.6 mm i.d. guard column (supplied by Agilent Technologies, Madrid, Spain). The mobile phase (50% sodium citrate 1 mM at pH 6.5, 50% acetonitrile) was delivered at a flow rate of 1 ml/min. Mass spectral identification of UA was carried out with an electrospray ionization interface and a quadrupole mass analyzer. The mobile phase was nebulized by nitrogen gas at 350 °C, with a flow rate of 13 l/min, into an electrospray mass analyzer. The detector counted negative ions with selected ion monitor (SIM) mode, by monitoring m/z 167.1 Th, which corresponds to the urate anion, the most abundant ion. The nebulization pressure used was 60 psi and the fragmentor voltage 80 V. Capillary voltage was 3000 V. As no internal standard was used, quality control samples were used in all analysis to monitor possible deviations of the instrument.

2.2. Reagents

All chemicals were of analytical-reagent grade. UA was purchased from Fluka (CH, Switzerland), sodium citrate and acetonitrile from Panreac (Barcelona, Spain), methanol and tetrahydrofuran from Scharlau (Barcelona, Spain). Solutions were prepared with Milli-Q (18.2 MΩ cm) distilled-deionised water and filtered through 0.45 µm pore filters from Sugelabor S.A. (Madrid, Spain).

2.3. Sample treatment

2.3.1. Treatment for urine

Urine samples containing UA within the 250–750 mg/l range were 100-fold diluted with Milli-Q water and the resultant solution was filtered through 0.45 µm pore filters.

2.3.2. Treatment for saliva

Saliva samples containing UA within the 5–30 mg/l range were 20-fold diluted with Milli-Q water and the resultant solution was filtered through 0.45 µm pore filters.

2.3.3. Treatment for renal calculi

The core of some selected cavity calcium oxalate monohydrate renal calculi was detached, pulverized and uric acid extracted with 5 ml of NaOH at pH 11 and the extracts were filtered through 0.45 µm pore filters.

In all cases, 10 µl of the solution were injected in the HPLC–MS system.

Standards were prepared from aqueous solutions of UA and the analytical determination was carried out using the corresponding calibration curve.

3. Results and discussion

Most of the described methods for UA determination suffer from interferences coming from other substances present in the matrix of the sample. Due to the characteristics of mass detection, high selectivity is obtained in UA determination. Also, the high sensitivity of the detection allows a 100- and 20-fold dilution of urine and saliva samples, respectively, which avoids matrix effects (as is demonstrated with tests of standard addition) and sample pre-treatment (see Fig. 1a). Furthermore, the high sensitivity of the proposed methodology (LOD = 0.21 ng UA) allows the quantification of trace amounts of UA in the core of calcium oxalate monohydrate renal calculi (see Table 4).

All these reasons make this methodology one of the simplest described for UA determination.

Negative ion mode was selected due to the higher sensitivity. In the positive ion mode, the most abundant peaks in the mass spectrum were 169.1 and 191.1, that corresponded to UA adducts with H^+ and Na^+ , respectively. Although sensitivity was sufficient to quantify UA present in urine and

saliva samples, the negative ion mode would permit further UA determination in other samples, such as trace amounts of UA in the core of cavity calcium oxalate monohydrate renal calculi.

3.1. Study of variables

3.1.1. Mobile phase composition

Sodium citrate in aqueous solution was selected as mobile phase because it allowed a successful separation and was suitable for mass detection.

Three different organic solvents were tested as organic modifiers (tetrahydrofuran, acetonitrile and methanol). As can be seen in Fig. 1b, retention times were similar in all cases, but a higher sensitivity was obtained with acetonitrile.

Then, different acetonitrile proportions were studied to perform the separation. A higher sensitivity was obtained using 50% of acetonitrile and a decrease of analytical signal was observed at higher organic percentages.

Working under such conditions, joint to SIM mode, no peaks apart from UA were found during the first 5 min of analysis with the three types of assayed samples (urine, saliva and renal calculi), thus demonstrating the specificity of the method.

3.1.2. Instrumental variables

Five variables corresponding to the mass detector were optimized in order to improve sensitivity.

The fragmentor voltage was the most critical variable because at low voltages, adducts formed in the mobile phase could not be fragmented, whereas at high voltage values, the analyte was fragmented and decreased the relative abundance of the molecular ion.

Drying gas flow, nebulization pressure, gas temperature and capillary voltage were also optimized. Conditions of maximum sensitivity (described in the material and methods section) were selected in all cases except for capillary voltage, where 3000 V were chosen to lengthen mass detector lifetime.

3.2. Characteristics of the analytical method and application

3.2.1. Linearity

There was a linear relationship between detector response and amount of UA over a range of 0.7–100 ng of UA (0.07–10 mg/l, taking into account the sample volume injected).

3.2.2. Limit of detection

The limit of detection of UA (calculated as $3s_{y/x}$ /sensitivity) was 0.21 ng, while the limit of quantification (calculated as $10s_{y/x}$ /sensitivity) was 0.70 ng. Thus, taking into account the injected volume (10 μ l) the limit of detection and the limit of quantification would be, respectively, 21 and 70 μ g/l, corresponding to the injected solution. These are

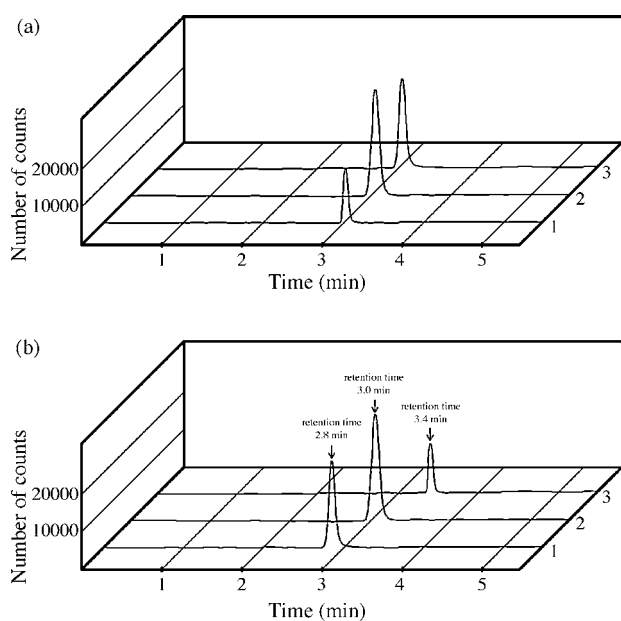


Fig. 1. (a) SIM chromatograms obtained by injection of 10 μ l of (1) standard solution of 2.5 mg/l UA; (2) standard solution of 5 mg/l UA and (3) urine sample containing 420.5 mg/l UA and working as described in Section 2. Mobile phase: 50% sodium citrate 1 mM at pH 6.5, 50% acetonitrile. (b) SIM chromatograms obtained by injection of 10 μ l of a standard solution of 5 mg/l UA and working as described in Section 2. Mobile phases assayed: (1) 50% sodium citrate 1 mM at pH 6.5, 50% tetrahydrofuran; (2) 50% sodium citrate 1 mM at pH 6.5, 50% acetonitrile and (3) 50% sodium citrate 1 mM at pH 6.5, 50% methanol.

Table 1
Study of the accuracy of the proposed methodology in urine samples

Sample	Uric acid		
	Added (mg/l)	Found (mg/l)	Recovery (%)
Urine 1	–	667.4	–
	25	691.7	97.2
Urine 2	–	292.0	–
	25	318.8	107.2
Urine 3	–	132.1	–
	25	157.6	102.0
Urine 4	–	346.4	–
	25	370.4	96.0
Urine 5	–	279.3	–
	25	303.5	96.8
Urine 6	–	153.5	–
	25	179.2	102.8
Urine 7	–	420.5	–
	25	444.3	95.2
Urine 8	–	256.5	–
	25	282.8	105.2
Urine 9	–	247.5	–
	25	271.5	96.0
Urine 10	–	253.5	–
	25	277.6	96.4
Urine 11	–	340.5	–
	25	364.7	96.8

very reduced amounts compared with those normally found in urine and saliva samples and they permit an important sample dilution that avoids matrix effects; moreover, the high sensitivity supplies an analytical methodology which is unique for the quantification of UA that acts as heterogeneous nucleant in the core of cavity calcium oxalate monohydrate renal calculi, and this fact could have important implications in the diagnosis and treatment of these patients.

3.2.3. Accuracy and precision

The proposed HPLC–MS method has been used for the analysis of several urine and saliva samples, and recovery tests of added standard have been carried out to test the accuracy of the method. Results are summarized in Tables 1 and 2. The regression line *UA in natural samples* (Y) versus *UA found in spiked samples* (X , corrected for the *UA added in the spike*) was compared with the theoretic line $Y=X$. Slope and intercept of the regression lines obtained with urine ($Y=(1.003 \pm 0.002)X + (-0.694 \pm 0.762)$) ($s_{y/x} = 1.031$, $n = 11$, $R^2 = 0.999$) and saliva samples ($Y=(1.014 \pm 0.031)X + (-0.081 \pm 0.746)$) ($s_{y/x} = 0.539$, $n = 8$, $R^2 = 0.994$) were statistically comparable (at a 95% confidence level) to 1 and 0, respectively, thus demonstrating that standard addition is not needed for UA quantification in urine and saliva samples.

Following, the method was also validated at a lower concentration range, working with renal calculi samples. As can

Table 2
Study of the accuracy of the proposed methodology in saliva samples

Sample	Uric acid		
	Added (mg/l)	Found (mg/l)	Recovery (%)
Saliva 1	–	16.3	–
	3	19.4	103.4
	6	22.3	100.1
Saliva 2	–	29.8	–
	3	32.7	98.6
	6	36.0	103.8
Saliva 3	–	25.5	–
	3	28.8	108.2
	6	31.4	98.2
Saliva 4	–	35.4	98.4
	3	38.7	109.6
	6	41.9	118.3
Saliva 5	–	26.8	–
	3	29.9	104.2
	6	33.2	107.0
Saliva 6	–	37.4	106.9
	3	40.7	108.8
	6	44.0	117.6
Saliva 7	–	13.7	–
	3	16.8	102.5
	6	19.5	96.2
Saliva 8	–	24.1	103.5
	3	26.8	95.8
	6	29.6	95.4
	–	36.3	95.2
	3	39.0	107.4
	6	41.7	114.9

be seen in Fig. 2, different calibration lines were obtained working with standards and with samples to which different amounts of UA standard were added. In all cases, the slopes obtained working with sample matrices were statisti-

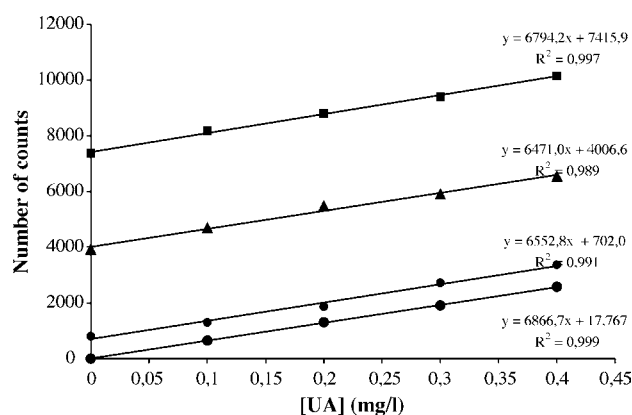


Fig. 2. Study of standard addition to renal calculi sample matrices.

cally comparable at a 95% confidence level with the slope obtained working with UA standards.

The relative standard deviations of some selected standards (0.5–1 mg/l UA) ranged between 1.1 and 1.5% ($n=5$) when analyzed on the same day, and between 1.3 and 2.8% ($n=5$) when analyzed at different days, thus showing a good repeatability and reproducibility.

The precision of the methodology was also studied at two different levels of UA concentration, working with renal calculi, urine and saliva samples, respectively. The relative standard deviations of five different renal calculi samples with concentrations in the 0.18–0.27 mg/l range oscillated between 0.9 and 1.2% ($n=5$) when analyzed on the same day, and between 1.2 and 3.0% ($n=5$) when analyzed at different days. The values for urine samples with an injected concentration ranging from 1.5 to 8.1 mg/l UA were 1.0–1.9% for intra-day precision ($n=5$) and 1.5–2.7% ($n=5$) for inter-day precision. With saliva samples, the intra-day precision ($n=5$) ranged from 1.3 to 1.8% and the inter-day precision ($n=5$) between 1.7 and 3.0%.

3.2.4. Comparison with an alternative analytical procedure

Several samples were also analysed according to an alternative procedure, based upon the methods of Trivedi et al. [12] and Kabasakalian et al. [13] with a modified Trinder [14] peroxide assay using 2,4,6-tribromo-2-hydroxy benzoic acid. The method is based on the enzymatic conversion of UA into allantoin with the production of H_2O_2 . The peroxide reacts with 4-aminoantipyrine and 2,4,6-tribromo-3-hydroxy benzoic acid in the presence of peroxidase to yield a quinoneimine dye. The resulting change in absorbance at 520 nm is proportional to UA concentration in the sample. The results of these determinations are shown in Table 3. Both methods were comparable with a 95% confidence level. In this way, the obtained regression graphs for 18 urine samples ($y=1.019x+10.912$, $R^2=0.992$) and 8 saliva samples ($y=0.969x+0.923$, $R^2=0.967$) (where y represents obtained concentration by the present method and x concentration by the enzymatic-photometric) were statistically comparable to the graph $Y=X$ at a 95% confidence level, thus showing a good agreement between the two methods and demonstrating the suitability of the proposed procedure. It must be taken

Table 3

UA content (mg/l \pm %CV) of human urine and saliva samples applying two different analytical methods ($n=3$)

Sample	Method enzymatic-photometric [10]	Method HPLC-MS (this paper)
Urine 1	633 \pm 20	637 \pm 8
Urine 2	359 \pm 12	406 \pm 6
Urine 3	758 \pm 18	812 \pm 11
Urine 4	532 \pm 15	569 \pm 8
Urine 5	595 \pm 13	619 \pm 9
Urine 6	157 \pm 8	162 \pm 3
Urine 7	418 \pm 12	429 \pm 5
Urine 8	401 \pm 8	406 \pm 4
Urine 9	631 \pm 22	642 \pm 8
Urine 10	575 \pm 15	581 \pm 6
Urine 11	426 \pm 15	426 \pm 7
Urine 12	294 \pm 10	300 \pm 4
Urine 13	705 \pm 18	717 \pm 8
Urine 14	327 \pm 12	350 \pm 4
Urine 15	398 \pm 11	429 \pm 5
Urine 16	134 \pm 10	150 \pm 2
Urine 17	740 \pm 16	753 \pm 9
Urine 18	549 \pm 16	603 \pm 9
Saliva 1	16.6 \pm 0.9	16.3 \pm 0.2
Saliva 2	31.2 \pm 1.2	29.8 \pm 0.3
Saliva 3	24.3 \pm 1.3	25.5 \pm 0.3
Saliva 4	16.9 \pm 1.0	16.2 \pm 0.2
Saliva 5	28.6 \pm 1.5	29.2 \pm 0.3
Saliva 6	27.5 \pm 1.5	26.8 \pm 0.3
Saliva 7	12.8 \pm 1.4	13.7 \pm 0.2
Saliva 8	24.6 \pm 1.4	26.8 \pm 0.2

Both methods were comparable with a 95% confidence level.

into account that the comparison of both methodologies has been performed using urine and saliva samples due to the lower sensibility of the photometric method that could not allow UA determination in renal calculi.

3.2.5. Application to calcium oxalate renal calculi

The proposed analytical methodology has been applied to the determination of UA in the core of two different types of calcium oxalate renal calculi. Five of them, which were cavity calcium oxalate monohydrate renal calculi, had UA as important component in the core. Seven of them were calcium oxalate monohydrate renal calculi with a very little size core formed by unidentified organic matter. In these latter (see Table 4) UA would be unquantifiable with conventional

Table 4

UA content (mg UA/g core \pm %CV) in the core of some selected calcium oxalate monohydrate renal calculi ($n=3$)

Calcium oxalate renal calculi with a core formed by UA as an important component			Calcium oxalate renal calculi with a very little size core formed by unidentified organic matter		
Sample number	mg UA/g core \pm % CV	Sample weight (mg)	Sample number	mg UA/g core \pm % CV	Sample weight (mg)
1	113 \pm 2	1.3	1'	0.18 \pm 0.01	2.9
2	40 \pm 1	0.5	2'	6.21 \pm 0.08	0.9
3	284 \pm 3	0.6	3'	7.49 \pm 0.08	0.3
4	818 \pm 11	0.1	4'	0.80 \pm 0.01	1.9
5	27 \pm 1	2	5'	3.28 \pm 0.03	1.3
			6'	0.042 \pm 0.001	9.7
			7'	0.69 \pm 0.01	1.7

photometric and enzymatic methodologies [12–14,34–36]. Even some recent methods have limits of detection in the 0.1–1 mg/1 UA range [33,37,38].

Obviously, in the case of renal calculi there are no matrix effects because at pH 11 calcium oxalate is insoluble and only UA is extracted. The results of these analysis are shown in Table 4.

3.2.6. Quality control samples

As no internal standard was used, the method was monitored using quality control samples. Method blanks, replicates, duplicates, knowns and spikes were used.

Method blanks were introduced and were considered as acceptable if they were inferior to the detection limit.

Replicates and duplicates were considered acceptable if precision did not exceed 2 and 3%, respectively.

Knowns were accepted as correct if their accuracy was inferior to 5% and in spikes, recoveries ranging from 90 to 110% were considered as acceptable.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselleria d'Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears (Grant PROIB-2002GC1-04) and by the project BQU 2003-01659 of the Spanish Ministry of Science and Technology. J.P. and P.S. express their appreciation to the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport for a fellowship of the FPU program.

References

- [1] E. Popa, Y. Kubota, D.A. Tryk, A. Fujishima, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1724.
- [2] G. Dryhurst, *Electrochemistry of Biological Molecules*, Academic Press, New York, 1977.
- [3] V.S.E. Dutt, H.A. Mottola, *Anal. Chem.* 46 (1974) 1777.
- [4] P. Ellerbe, A. Cohen, M.J. Welch, E.V. White, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2173.
- [5] F. Grases, A. Costa-Bauzá, M. Ramis, V. Montesinos, A. Conte, *Clin. Chim. Acta* 322 (2002) 29.
- [6] B. Finlayson, L. Buboia, *Clin. Chem.* 84 (1978) 203.
- [7] O. Lux, D. Naidoo, C. Salonikas, *Ann. Clin. Biochem.* 29 (1992) 674.
- [8] R.J. Henry, D.C. Cannon, J.W. Winkelman, *Clinical Chemistry Principles and Technics*, second ed., Harper & Row, Hagerstown, 1974.
- [9] T.R. Offer, *Centr. Physiol.* 8 (1894) 801, apud [10].
- [10] H.A. Bulger, H.E. Johns, *J. Biol. Chem.* 140 (1941) 427.
- [11] K. Lorentz, W. Berndt, *Anal. Biochem.* 18 (1967) 58.
- [12] R. Trivedi, E. Berta, L. Rebar, *Clin. Chem.* 22 (1976) 1223.
- [13] P. Kabasakalian, S. Kalliney, A. Wescott, *Clin. Chem.* 19 (1973) 522.
- [14] P. Trinder, *J. Clin. Pathol.* 22 (1949) 246.
- [15] R. Sakuma, T. Nishina, M. Kitamura, *Clin. Chem.* 33 (1987) 1427.
- [16] J.A. Milner, E.G. Perkins, *Anal. Biochem.* 88 (1978) 560.
- [17] T. Düllfer, E. Hägele, M.H. Town, J. Ziegenhorn, *Z. Anal. Chem.* 324 (1986) 333.
- [18] T. Etoh, M. Iwatake, M. Miyazaki, K. Harada, M. Nakayama, A. Sugii, Y. Uji, H. Okabe, *J. Liq. Chromatogr.* 15 (1992) 1656.
- [19] H. Müller, *Z. Anal. Chem.* 332 (1988) 464.
- [20] M.A. Ross, *J. Chromatogr. B* 657 (1994) 197.
- [21] T. Kojima, T. Nishina, M. Kitamura, N. Kamatani, K. Nishioka, *Clin. Chem.* 32 (1986) 287.
- [22] R. Sakuma, T. Nishina, M. Kitamura, *Clin. Chem.* 33 (1987) 1427.
- [23] M. Yoshiura, K. Iriyama, *J. Liq. Chromatogr.* 9 (1986) 177.
- [24] M. Somogyi, *J. Biol. Chem.* 32 (1945) 69.
- [25] R.L. Haden, *J. Biol. Chem.* 56 (1923) 469.
- [26] K. Inoue, T. Namiki, Y. Iwasaki, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B* 785 (2003) 57.
- [27] Y.Q. Zhang, W.D. Shen, R.A. Gu, J. Zhu, R.Y. Xue, *Anal. Chim. Acta* 369 (1998) 123.
- [28] M.A.T. Gilmartin, J.P. Hart, *Analyst* 119 (1994) 833.
- [29] S. Uchiyama, S. Suzuki, T. Sato, *Electroanalysis* 2 (1990) 559.
- [30] F.H. Keedy, P. Vadgama, *Biosens. Bioelectron.* 6 (1991) 491.
- [31] J. Motonaka, K. Miyata, L.R. Faulkner, *Anal. Lett.* 27 (1994) 1.
- [32] E. Miland, A.J.M. Ordieres, P.T. Blanco, M.R. Smyth, C.O. Fagain, *Talanta* 43 (1996) 785.
- [33] W. Shu-Ping, L. Chiou-Shyi, *J. Chromatogr. A* 1051 (2004) 213.
- [34] Z. Gong, Z. Zhang, *Anal. Lett.* 29 (1996) 695.
- [35] R.R. Marquardt, A.T. Ward, L.D. Campbell, *Poult. Sci.* 62 (1983) 2099.
- [36] S.D. Yang, J.M. Xu, L. Yang, Y.N. Ma, F. Bai, *J. Liq. Chromatogr.* 12 (1989) 1791.
- [37] H.H. Cho, Z.U. Bae, *Anal. Sci.* 17 (2001) a89.
- [38] M. Jelkic-Stankov, P. Djurdjevic, D. Stankov, *J. Serbian Chem. Soc.* 68 (2003) 691.

Artículo original 2.2.

***El ácido úrico como inductor de la litiasis
renal oxalocálcica***

ORIGINAL ARTICLE

Uric acid as inducer of calcium oxalate crystal development

FÉLIX GRASES, PILAR SANCHIS, BERNAT ISERN, JOAN PERELLÓ & ANTONIA COSTA-BAUZÀ

Laboratory of Renal Lithiasis Research, University Institute of Health Sciences Research (IUNICS), University of Balearic Islands, Palma de Mallorca, Spain

Abstract

Objective. This paper deals with the mechanism by which uric acid affects calcium oxalate crystallization and the role of crystallization inhibitors in this process. **Material and methods.** Pure uric acid crystals and fragments of uric acid renal calculi were used to induce calcium oxalate crystal formation and development. These studies were performed in flow systems, using synthetic urine and similar conditions to those found in real renal situations. The type and size of the developed crystals were evaluated by scanning electron microscopy and the amount of calcium oxalate crystallized was quantitated by means of inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. **Results.** The presence of uric acid crystals in a flow system provoked calcium oxalate monohydrate (COM) crystallization at a rate of 3.3 $\mu\text{g/h/mg}$ uric acid. When uric acid renal calculi fragments were used, the amount of COM crystallized varied between 0.048 and 0.161 $\mu\text{g/h/mg}$ of renal calculi depending on the porosity of the calculus. At particular concentrations (3.03 μM phytate, 28.75 μM pyrophosphate, 40 mg/l chondroitin sulphate) the crystallization inhibitors assayed produced a maximum decrease of $\approx 50\%$ in the amount of COM crystallized on uric acid crystals. Mucin (a glycoprotein) caused only slight effects. **Conclusion.** Uric acid crystals can clearly induce the development of COM crystals on them through a heterogeneous nucleation process and some crystallization inhibitors can notably delay such a process.

Key Words: Uric acid, calcium oxalate, renal lithiasis, phytate, pyrophosphate, glycosaminoglycan, mucin

Introduction

The relation between calcium oxalate renal lithiasis and urinary uric acid has been known for a long time. Thus, a number of important clinical and epidemiologic studies [1,2] have related hyperuricuria to calcium stone formation, and the role of allopurinol in decreasing the recurrence of calcium oxalate lithiasis has been clearly demonstrated [3–5]. In spite of this, only a few papers have dealt with the exact physicochemical mechanism by which uric acid affects calcium oxalate crystallization and the role of crystallization inhibitors in this process. Thus, whereas some authors [6,7] seemed to demonstrate the ability of uric acid to act as a heterogeneous nucleant of calcium oxalate, others [8] postulated that seeds of uric acid had a slight or no effect on heterogeneous nucleation of calcium oxalate and attributed such a capacity to sodium urate. It must also be considered that some authors

[9–11] postulated that uric acid acts as an anti-inhibitor by reducing levels of free urinary glycosaminoglycans and thereby blocking their inhibitory effect on calcium oxalate crystallization. Finally, it has also been postulated [12–15] that the effect of urate on calcium oxalate crystallization is due to its ability to salt out calcium oxalate from solution.

In this paper, the role of uric acid in calcium oxalate crystallization was evaluated using pure uric acid crystals and fragments of uric acid renal calculi. The action of crystallization inhibitors on this process was also assessed.

Material and methods

Synthetic urine

Synthetic urine supersaturated for calcium oxalate ($[\text{Ca}^{2+}] = 3.5 \text{ mM}$, $[\text{oxalate}] = 0.45 \text{ mM}$) was prepared by mixing equal volumes of solutions A and B

of the compositions shown in Table I. The pH of both solutions was adjusted to 5.0. Solutions were stored for a maximum of 1 week at 4°C. Chemicals of reagent-grade purity were dissolved in deionized, re-distilled water. All solutions were filtered through a 0.45- μm pore filter before being used. The calcium oxalate ion activity product was $8.20 \times 10^{-8} \text{ M}^2$ (calculated as the product of the free ion activities of calcium and oxalate).

Synthesis of uric acid crystals

One g of uric acid (Sigma) was weighed and dissolved in 1 l of aqueous NaOH solution at pH 11. Precipitation of uric acid in uric acid solutions was induced by a sudden decrease of pH to 5.0 by the addition of HCl. After 48 h the suspension of uric acid crystals was filtered and dried to constant weight in a desiccator. Only uric acid dihydrate crystals (thin plates) were detected immediately after formation of the suspension, but 48 h later X-ray diffraction analysis confirmed that the solid phase consisted only of anhydrous uric acid [16].

Crystallization studies

The different agglomeration states and sizes of the uric acid substrates used to study the induction of calcium oxalate monohydrate (COM) crystal development (uric acid crystals, size of the order of microns; uric acid calculi fragments, size of the order of millimeters) required the use of the two different experimental systems described below to ensure the permanence of the substrates and in order to better reproduce the urinary conditions.

Crystallization studies using uric acid crystals. In order to study calcium oxalate crystal formation on pure uric acid crystals under flowing conditions, a $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$ methacrylate cuvette was placed in a

Table I. Composition of synthetic urine^a.

Constituent	Concentration (mM)
Solution A	
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$	19.34
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	5.93
NH_4Cl	86.73
KCl	162.60
Solution B	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	15.45
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	15.64
NaCl	223.08
$\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	0.91

^aA corresponding volume of 1 M calcium solution (prepared by dissolving calcium carbonate with hydrochloric acid) was added to solution A to obtain a calcium concentration of 7 mM (the final concentration in synthetic urine after mixing solutions A and B was 3.5 mM).

temperature-controlled chamber (Figure 1) and 15 mg of uric acid crystals placed at the bottom of the cuvette. Synthetic urine (pH 5.0) was introduced 3 mm from the bottom of the cuvette by means of a multichannel peristaltic pump at a flow rate of 1.5 l/day, so that it overflowed constantly. The system was operated continuously for 48 h. Then, the substrate was removed from the system, rinsed with distilled water and dried at room temperature in a desiccator. The amount of calcium oxalate crystallized on the substrate was evaluated by dissolving the precipitate in 0.1 M HCl and determining total calcium by means of inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (Perkin-Elmer P2000 spectrometer). This methodology is similar to that previously described by Chow et al. [17,18].

The effects of phytate (sodium salt; Sigma) at 1.51–7.57 μM , pyrophosphate (sodium salt; Merck) at 5.75–40.24 μM , chondroitin sulphate (sodium salt; Serva) at 5–40 mg/l and mucin (Sigma) at 1–30 mg/l were assayed by adding different amounts of the substances to synthetic urine in the presence of uric acid crystals under flowing conditions. Each

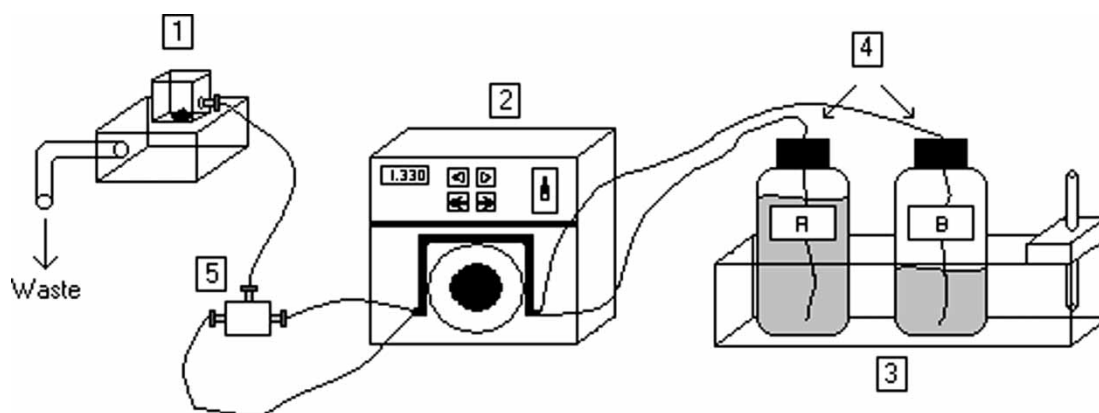


Figure 1. Diagram of the experimental flow system device used for crystallization studies with uric acid crystals: (1) cuvette; (2) peristaltic pump; (3) thermostatic bath; (4) solutions A and B for artificial urine; (5) three-way T-shaped mixing chamber for solutions A and B.

experiment was repeated three times to check the reproducibility of the results.

A Hitachi S-530 scanning electron microscope equipped with an energy-dispersive X-ray microanalysis system was used to examine and evaluate the presence of COM crystals in all experiments.

Crystallization studies using uric acid renal calculi fragments. A collection of 16 spontaneously passed uric acid renal calculi from 12 stone-formers were selected to study their capacity to induce calcium oxalate crystal growth. Four of these calculi corresponded to compact calculi constituted by anhydrous uric acid crystals, four to porous calculi constituted by anhydrous uric acid, four to compact calculi constituted by dihydrate uric acid (exhibiting the typical cracks due to the loss of water of crystallization in these crystals) and four to porous calculi constituted by dihydrate uric acid, the porosity of which was considerably superior to that of the porous calculi constituted by anhydrous uric acid. Each calculus was fragmented into five frag-

ments (fragment weight 3–36 mg). Three fragments of each calculus were placed in a temperature-controlled (37°C) polypropylene chamber with a diameter of 3 cm and a height of 4 cm (Figure 2). Synthetic urine was introduced, freshly mixed, by means of a multichannel peristaltic pump at a flow rate of 0.75 l/day through the bottom of the chamber (Figure 2). The system was operated continuously for 48 h. After this period the three fragments were removed from the system, rinsed with distilled water and dried at room temperature in a desiccator. The amount of calcium oxalate crystallized on the calculi fragment during the experiment was evaluated by dissolving the calcium deposits in 0.1 M HCl, determining total calcium by means of inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy and subtracting the amount of calcium found in the two remaining fragments that were not introduced into the system.

The type and size of crystals that developed on the fragments were evaluated by means of a Hitachi S-530 scanning electron microscope equipped with an energy-dispersive X-ray microanalysis system.

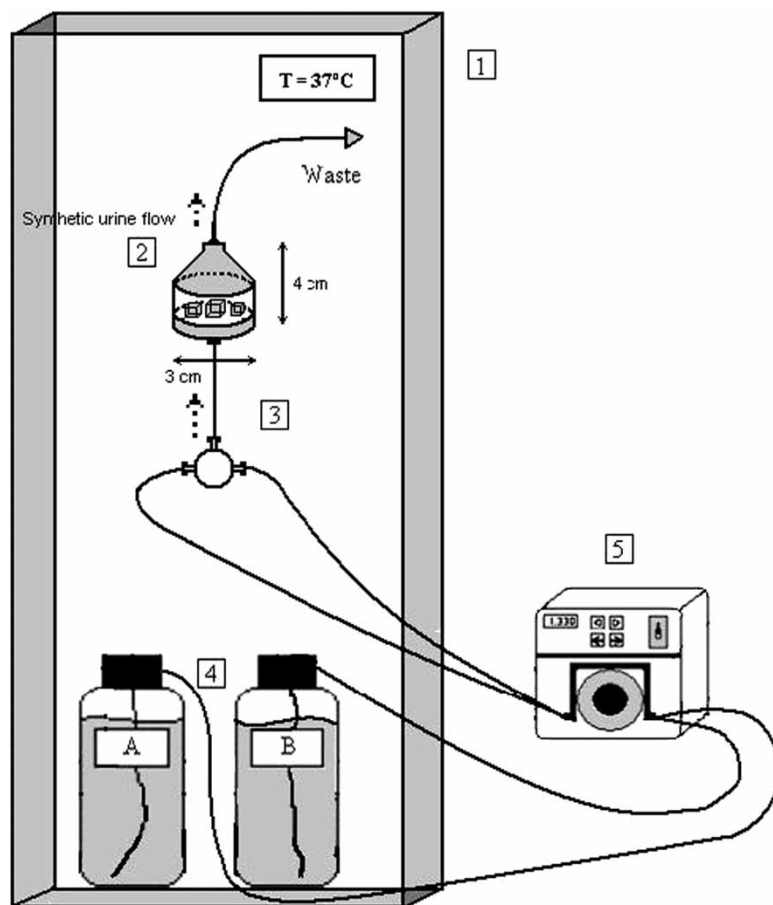


Figure 2. Diagram of the experimental flow system device used for crystallization studies with fragments of uric acid renal calculi: (1) temperature-controlled chamber; (2) chamber containing calculi fragments; (3) three-way T-shaped mixing chamber for solutions A and B; (4) solutions A and B for artificial urine; (5) peristaltic pump.

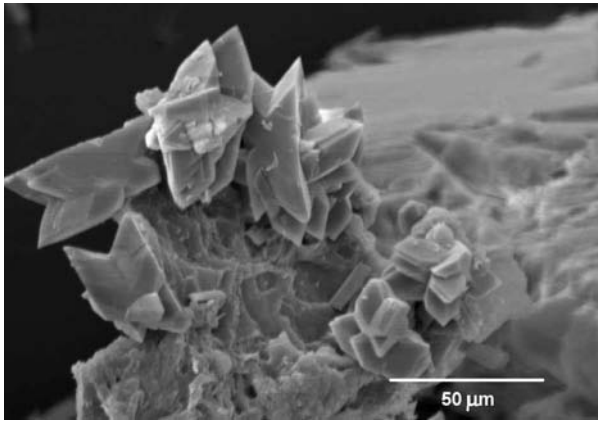


Figure 3. SEM image of COM crystals formed on uric acid crystals when working with synthetic urine (3.5 mM calcium, 0.45 mM oxalate, pH 5.0) using the flow system.

Results

The presence of uric acid crystals in the flow system provoked COM crystallization at a rate of 3.3 μg/h/mg uric acid. The COM crystals formed under such conditions are shown in Figure 3. No COM crystals developed in the liquid or on the chamber walls during the experiments. The effects of several crystallization inhibitors under these conditions are shown in Figure 4. No inhibitor achieved total prevention of calcium oxalate crystallization at the assayed concentrations (which were similar to those normally found in real human urine). Thus, phytate (3.03 μM), pyrophosphate (28.75 μM) and chondroitin sulphate (40 mg/l) caused a maximum decrease of ≈50% in the amount of calcium oxalate

crystallized on uric acid crystals, and mucin caused only slight effects.

The results of calcium oxalate crystallization on uric acid calculi fragments in the flow system are shown in Table II. As can be observed, the amounts varied between 0.048 and 0.075 μg COM/h/mg of uric acid renal calculus, except in the case of fragments of porous dihydrate uric acid calculi, where 0.161 ± 0.040 μg COM/h/mg of uric acid renal calculus was crystallized. The COM crystals that developed on these fragments are shown in Figure 5. Similar to the situation in the presence of pure uric acid crystals, no COM crystals developed in the liquid or on the chamber walls during the experiments.

Discussion

A sudden change in uric acid supersaturation occurs at urinary pH values of <5.5 due to an increase in the proportion of the protonated form of uric acid and as a consequence uric acid crystals are formed [16]. The number and size of the crystals formed depend on the attained degree of supersaturation, the presence of heterogeneous nucleants (mainly organic matter) and the retention time in the cavities of the upper urinary tract (mainly renal calices). Depending on the relevance of these factors, these crystals will either be eliminated in the form of asymptomatic crystalluria, will induce uric acid calculi or, as can be deduced from the results presented herein, will induce the development of calcium oxalate crystals on them through a

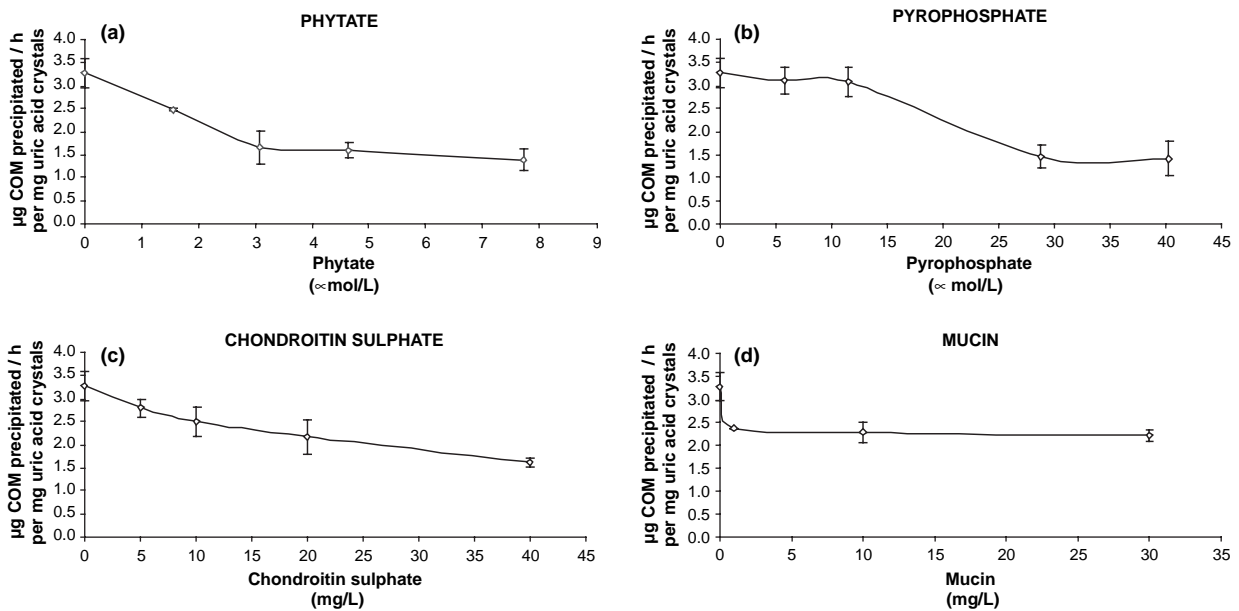


Figure 4. Effects of different inhibitors on the amount of COM crystallized on uric acid crystals: (a) phytate; (b) pyrophosphate; (c) chondroitin sulphate; (d) mucin. The results are expressed as mean ± SE (n = 12) for the control experiment (without any inhibitor) and as mean ± SE (n = 3) for the rest of the experiments. The control corresponds to the zero concentration of each inhibitor (X-axis).

Table II. Capacity of different uric acid calculi fragments as inducers of COM crystal development (μg COM precipitated/h/mg uric acid renal calculus; mean \pm SE).

Anhydrous uric acid compact calculi ($n=9$)	Anhydrous uric acid porous calculi ($n=9$)	Dihydrate uric acid compact calculi ($n=9$)	Dihydrate uric acid porous calculi ($n=9$)
0.048 \pm 0.013*	0.067 \pm 0.016*	0.075 \pm 0.011*	0.161 \pm 0.040

* $p < 0.05$ versus dihydrate uric acid porous calculi.

heterogeneous nucleation process. This last mechanism would lead to the formation of mixed calcium oxalate/uric acid renal calculi; in fact, these are relatively common renal stones (2.6% of the total) [19], with a high recurrence rate [1].

If we compare the calcium oxalate heterogeneous nucleant capacity of different substrates with identical systems and conditions (Table III), it can clearly be seen that the capacity of uric acid is superior to that exhibited by mucin (a glycoprotein) or cellular detritus, but inferior to that manifested by a calcium salt such as calcium fluoride. This means that the capacity of uric acid as a heterogeneous nucleant of COM is notable and this must be attributed to the structural similarities between the crystalline lattices of both solids. The different capacities of uric acid calculi fragments as inducers of COM crystal development (Table II) seem to be related to the total uric acid crystal area in contact with the liquid (artificial urine). Thus, when the porosity of calculi increases the capacity of COM formation also increases. In fact, pure uric acid crystals (in the form of a fine powder) manifested a higher capacity to induce COM crystal development than any uric acid calculi fragment and obviously this must be related to the higher surface area of the former in contact with the liquid. Nevertheless, in spite of the low growth rate of the uric acid calculi fragments, it must be considered that a 3-mg residual fragment that grew at a rate of 0.161 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{mg}$ over a period of 3 years

could generate a 15.7 mg stone (without considering the incorporation of organic matter).

This capacity of uric acid crystals to induce COM crystal development is evidenced not only in the above-mentioned formation of calcium oxalate/uric acid mixed calculi. Thus, uric acid was detected in the core of unattached COM renal calculi, with the core being mainly formed by COM crystals and organic matter [23] (these calculi constitute 10.8% of all calculi [19]). Uric acid probably played an important role as a heterogeneous nucleant of COM crystals which generated the core of such calculi and consequently was in fact responsible for its formation.

Finally, as occurs in other types of renal lithiasis, it can be appreciated that crystallization inhibitors can play an important role in delaying or preventing crystal development. Thus, phytate, pyrophosphate and chondroitin sulphate, at similar concentrations to those normally found in human urine, caused an important decrease ($\approx 50\%$) in the amount of crystallized COM. Nevertheless, it must be observed that in no case was it possible to totally stop the development of COM on uric acid crystals using such concentrations. This is in good agreement with the high degree of recurrence that is observed in patients with mixed uric acid/calcium oxalate renal calculi. It is also interesting to observe the selectivity of crystallization inhibitors. Thus, whereas mucin was found to be a very effective inhibitor of the

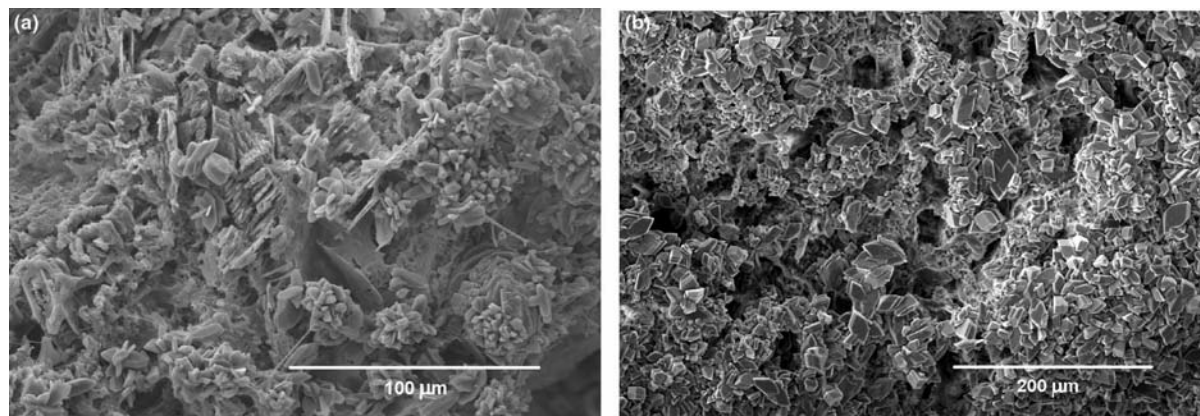


Figure 5. SEM images of COM crystals formed on fragments of uric acid renal calculi when working with synthetic urine (3.5 mM calcium, 0.45 mM oxalate, pH 5.0) using the flow system: (a) crystals formed on a fragment of dihydrate uric acid porous calculus; (b) crystals formed on a fragment of anhydrous uric acid porous calculus.

Table III. Comparison of the calcium oxalate heterogeneous nucleant capacities of different substrates using the same flow system.

Nucleant	µg COM precipitated/h/mg of nucleant	Reference
Mucin	0.7	20
Cellular detritus	2.8	21
Calcium fluoride	11.3	22
Uric acid	3.3	This paper

crystallization of uric acid crystals [24], it manifested only slight effects on the crystallization of COM on uric acid crystals. However, chondroitin sulphate, which exhibited important inhibitory effects on the crystallization of COM on uric acid crystals, had very weak effects on the crystallization of uric acid crystals.

Acknowledgements

P. S. and B. I. express their appreciation for fellowships to the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport and the Conselleria d'Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears, respectively. Financial support from Conselleria d'Innovació i Energia, Govern Balear (Grant No. PROIB-2002GC1-04) and from the Spanish Ministry of Science and Technology (project No. BQU 2003-01659) is gratefully acknowledged.

References

- [1] Favus MJ, Coe FL. Clinical characteristics and pathogenetic mechanisms in hyperuricosuric calcium oxalate renal stones disease. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1980;53:171–7.
- [2] Sorensen CM, Chandhoke PS. Hyperuricosuric calcium nephrolithiasis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2002; 31:915–25.
- [3] Brien G, Bick C. Allopurinol in the recurrence prevention of calcium oxalate lithiasis. *Eur Urol* 1977;3:35–6.
- [4] Petit C. Calcium lithiasis: uric acid under question. *Nephrologie* 1984;5:192–4.
- [5] Hofbauer J, Zechner O. Impact of allopurinol treatment on the prevention of hyperuricosuric calcium oxalate lithiasis. *Eur Urol* 1988;15:227–9.
- [6] Meyer JL, Bergert JH, Smith LH. The epitaxially induced crystal growth of calcium oxalate by crystalline uric acid. *Invest Urol* 1976;14:115–9.
- [7] Grases F, Costa-Bauzá A, March JG, Masárová L. Glycosaminoglycans, uric acid and calcium oxalate urolithiasis. *Urol Res* 1991;19:375–80.
- [8] Pak CYC, Arnold LH. Heterogeneous nucleation of calcium oxalate by seeds of monosodium urate. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975;149:930–2.
- [9] Fällström B, Lindsjö M, Danielson BG, Ljunghall S, Wikström B. Binding of glycosaminoglycans to sodium urate and uric acid crystals. *Clin Sci* 1986;71:61–4.
- [10] Hesse A, Wurzel H, Krampitz G, Vahlensieck W. Experimental determination of the kinetics of calcium-binding with chondroitin sulphate and effects of uric acid on this process. *Urol Res* 1989;15:93–7.
- [11] Zerwekh JE, Holt K, Pak CYC. Natural urinary macromolecular inhibitors: attenuation of inhibitory activity by urate salts. *Kidney Int* 1983;23:838–41.
- [12] Grover PK, Marshall VR, Ryall RL. Dissolved urate salts out calcium oxalate in undiluted human urine in vitro: implications for calcium oxalate stone genesis. *Chem Biol* 2003;10: 271–8.
- [13] Grover PK, Ryall RL, Marshall VR. Dissolved urate promotes calcium oxalate crystallization: epitaxy is not the cause. *Clin Sci* 1993;85:303–7.
- [14] Ryall RL, Grover PK, Marshall VR. Urate and calcium stones—picking up a drop of mercury with one's fingers? *Am J Kidney Dis* 1991;17:426–30.
- [15] Grover PK, Ryall RL. The effect of preincubation of seed crystals of uric acid and monosodium urate with undiluted human urine to induce precipitation of calcium oxalate in vitro: implications for urinary stone formation. *Mol Med* 2002;8:525–35.
- [16] Grases F, Villacampa AI, Costa-Bauzá A, Söhnle O. Uric acid calculi: types, etiology and mechanism of formation. *Clin Chim Acta* 2000;302:89–104.
- [17] Chow K, Dixon J, Gilpin S, Kavanagh JP, Rao PN. A stone farm: development of a method for simultaneous production of multiple calcium oxalate stones in vitro. *Urol Res* 2004; 32:55–60.
- [18] Chow K, Dixon J, Gilpin S, Kavanagh JP, Rao PN. Citrate inhibits growth of residual fragments in an in vitro model of calcium oxalate renal stones. *Kidney Int* 2004;65:1724–30.
- [19] Grases F, Costa-Bauzá A, Ramis M, Montesinos V, Conte A. Simple classification of renal calculi closely related to their micromorphology and etiology. *Clin Chim Acta* 2002;322: 29–36.
- [20] Grases F, Isern B, Perelló J, Costa-Bauzá A. The role of glycoproteins in calcium oxalate crystal development. *BJU Int* 2004;94:177–81.
- [21] Grases F, Isern B, Perelló J, Costa-Bauzá A. Role of the organic matter in calcium oxalate lithiasis. *Front Biosci* 2005;10:1534–8.
- [22] Grases F, Perelló J, Isern B, Costa-Bauzá A. Study of the relation between high fluoride intake and nephrolithiasis. *Int Urol Nephrol* 2006; In press.
- [23] Grases F, Sanchis P, Perelló J, Costa-Bauzá A. Role of uric acid in different types of calcium oxalate renal calculi. *Int J Urol* 2006;13:252–6.
- [24] Grases F, Ramis M, Villacampa AI, Costa-Bauzá A. Uric acid urolithiasis and crystallization inhibitors. *Urol Int* 1999; 62:201–4.

Artículo original 2.3.

***Papel del ácido úrico en los diferentes tipos
de cálculos renales de oxalato cálcico***

Original Article

Role of uric acid in different types of calcium oxalate renal calculi

FÉLIX GRASES, PILAR SANCHIS, JOAN PERELLÓ AND ANTONIA COSTA-BAUZÁ

Laboratory of Renal Lithiasis Research, Institute of Health Sciences Research (IUNICS), University of Balearic Islands, Mallorca, Spain

Aim: The presence of uric acid in the beginning zone of different types of ‘pure’ calcium oxalate renal calculi was evaluated with the aim of establishing the degree of participation of uric acid crystals in the formation of such calculi.

Methods: The core or fragment of different types of ‘pure’ calcium oxalate renal calculi was detached, pulverized and uric acid extracted. Uric acid was determined using a high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method.

Results: In calcium oxalate monohydrate (COM) papillary calculi with a core constituted by COM crystals and organic matter, $0.030 \pm 0.007\%$ uric acid was found in the core. In COM papillary calculi with a core constituted by hydroxyapatite, $0.031 \pm 0.008\%$ uric acid was found in the core. In COM unattached calculi (formed in renal cavities) with the core mainly formed by COM crystals and organic matter, $0.24 \pm 0.09\%$ uric acid was found in the core. In COM unattached calculi with the core formed by uric acid identifiable by scanning electron microscopy (SEM) coupled to X-ray microanalysis, $20.8 \pm 7.8\%$ uric acid was found in the core. In calcium oxalate dihydrate (COD) unattached calculi containing little amounts of organic matter, $0.012 \pm 0.004\%$ uric acid was found. In COD unattached calculi containing little amounts of organic matter and hydroxyapatite, $0.0030 \pm 0.0004\%$ of uric acid was found.

Conclusions: From these results it can be deduced that uric acid can play an important role as inducer (heterogeneous nucleant) of COM unattached calculi with the core formed by uric acid identifiable by SEM coupled to X-ray microanalysis (these calculi constitute the 1.2% of all calculi) and in COM unattached calculi with the core mainly formed by COM crystals and organic matter (these calculi constitute the 10.8% of all calculi).

Key words calcium oxalate, crystallization inducer, liquid chromatography/mass spectrometry, renal calculi, uric acid.

Introduction

An important number of clinical and epidemiological studies relate hyperuricosuria to calcium oxalate stone formation.^{1–3} In fact, allopurinol has clearly demonstrated positive effects on decreasing the recurrence of calcium oxalate renal lithiasis.^{4–6}

Uric acid crystals have crystallographic features similar to calcium oxalate monohydrate (COM) crystals, and for this reason they act on them as active inducers of COM heterogeneous nucleation.^{7,8} Consequently, this fact would explain the physicochemical mechanism by which uric acid affects calcium oxalate crystallization.

In spite of these facts, calcium oxalate/uric acid mixed calculi are not very common, corresponding to only 2.6% of all renal calculi.⁹ The aim of this paper is to study the presence of uric acid in the beginning zone of different types of ‘pure’ calcium oxalate renal calculi, to evaluate the degree of participation of uric acid crystals in the formation of such calculi.

Correspondence: Félix Grases PhD, Laboratory of Renal Lithiasis Research, Faculty of Sciences, University of Balearic Islands, 07122, Palma de Mallorca, Spain.

Email: fgrases@uib.es

Received 14 April 2005; accepted 13 July 2005.

Materials and methods

Urinary calculi

Fifty-nine ‘pure’ calcium oxalate renal calculi (calcium oxalate was the main component) were selected, belonging to six groups of our renal calculi classification:⁹

- Group 1: COM papillary calculi with the core constituted by COM crystals and organic matter ($n = 9$; Fig. 1a)
- Group 2: COM papillary calculi with the core constituted by hydroxyapatite ($n = 11$; Fig. 1b)
- Group 3: COM unattached calculi (formed in renal cavities) with the core formed by COM crystals and organic matter ($n = 9$; Fig. 1c)
- Group 4: COM unattached calculi with the core formed by uric acid identifiable by scanning electron microscopy (SEM) coupled to X-ray microanalysis ($n = 10$; Fig. 1d)
- Group 5: Calcium oxalate dihydrate (COD) unattached calculi containing little amounts of organic matter ($n = 10$; Fig. 1e)
- Group 6: COD unattached calculi containing little amounts of organic matter and hydroxyapatite ($n = 10$; Fig. 1f)

Stones classified as ‘pure’ calcium oxalate were selected among the non-fragmented calculi from our stone

collection containing over 5000 specimens. The procedure used to analyse and study renal calculi requires an appropriate combination of observation by means of macroscopic and microscopic conventional techniques (stereoscopic microscope; Optomic, Madrid, Spain) with physical techniques as infrared spectrometry (infrared spectroscope Bruker IFS 66; Bruker, Ettlingen, Germany) and scanning electron microscopy (Hitachi S-530; Hitachi, Tokyo, Japan) coupled to X-ray microanalysis (Oxford Link Isis; Oxford, UK).¹⁰

The study of COM calculi (papillary or unattached) begins through the direct observation of its external aspect, using a stereoscopic microscope. Afterwards, each calculus is sectioned into two parts along a plane as near as possible to its geometric center, in order to be able to establish the internal structure and to identify the core of the calculus. Afterwards, using a slender metallic needle, the core is separated from the rest of the calculus and the amount of uric acid in it was evaluated as it is explained below.

Calcium oxalate dihydrate calculi were characterized by the absence of established core and they were mainly constituted by interconnected bipyramidal COD crystals and little amounts of hydroxyapatite and/or organic matter between them (they can also contain variable amounts of COM, but it comes from the transformation of COD). Due to these types of structure, a representative fragment of each calculus was selected afterwards to evaluate the amount of uric acid in them, using the methodology explained below.

Uric acid analysis

Apparatus

Due to the necessity of a highly sensitive and selective method of uric acid analysis, a high-performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MSD) method was selected.¹¹ This analysis was performed with an Agilent 1100 Series LC/MSD system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Chromatographic separations were performed at 25°C on a Zorbax Sax Column (150 mm × 4.6 mm i.d.), an anion exchange resin, 5 µm particle size (Agilent Technologies) with a 12.5 cm × 4.6 mm i.d. guard column (Agilent Technologies). The mobile phase (50% sodium citrate 1 mmol/L at pH = 6.5, 50% acetonitrile) was delivered at a flow rate of 1 mL/min. Mass spectral identification of uric acid was carried out with an electrospray ionization interface and a quadrupole mass analyser. The mobile phase was nebulized by nitrogen gas at 350°C, with a flow rate of 13 L/min, into an electrospray mass analyser. The detector counted negative ions with selected ion monitor (SIM) mode, by monitoring $m/z = 167.1$, which corresponds to the urate anion, the most abundant ion. The nebulization pressure used was 60 psi and the fragmentor voltage 80 V. Capillary voltage was 3000 V.

Treatment for renal calculi

The core or fragment of each calculus was detached, pulverized and uric acid extracted with 1 mL of NaOH at

pH = 11. The extracts were filtered through 0.45 µm pore filters.

Samples of group 4 were 50-fold diluted due to the high amount of uric acid found in them.

In all cases, 10 µL of the solution was injected in the LC/MSD system.

Standards were prepared from aqueous solutions of uric acid and the analytical determination was carried out using the corresponding calibration curve.

Analysis of urinary samples

The urines of the stone-formers that generated the selected calculi were studied according to the following protocol. All subjects were on free diet at the time of urine collection and none of the stone-formers were undergoing pharmacological treatment of any kind. Twenty-four hour urine samples were collected in sterile flasks containing thymol as a preservative, and refrigerated immediately. After collection, the volume was recorded, the pH was measured immediately with a Crison pH meter (Crison, Barcelona, Spain), and the samples stored at -20°C until they were assayed. Normally, urine was collected 1–2 months after stone passage. Calcium, magnesium and phosphorus were determined by inductively coupled plasma atomic spectroscopy. Uric acid and creatinine were determined by means of a Roche Modular Analytics kit (Roche, Basel, Switzerland) with 11875426216 and 11875663216 reagents, respectively. Citrate and oxalate were determined by means of the R-Biopharm enzymatic test kits N°10139076035 and 10755699035, respectively (R-Biopharm, Darmstadt, Germany).

Statistics

Values in the table and figures are expressed as mean ± SE. One-way ANOVA was used to calculate significance of difference between groups. The Student *t*-test was used to assess differences between means. Conventional Windows software was used for statistical computations. A value of $P < 0.05$ was considered to assess statistical significance.

Results

The uric acid amounts found in the six categories of 'pure' calcium oxalate renal calculi are shown in Table 1. As can be observed, as expected, the maximum amount was found in COM unattached calculi with the core formed by uric acid identifiable by SEM coupled to X-ray microanalysis ($20.8 \pm 7.8\%$ of uric acid in core). When the rest of calculi were compared it can be seen that only the COM unattached calculi with the core mainly formed by COM crystals and organic matter contained significantly higher amounts of uric acid ($0.24 \pm 0.09\%$). In fact, the rest of calcium oxalate renal calculi showed similar amounts of uric acid, around 10 times inferior to the former ($0.003\text{--}0.031\%$).

The common urinary biochemical data (mean ± SE) of all six groups are shown in Table 2. As can be expected, hypercalciuria was observed only in the group of stone formers that generated COD calculi. It is interesting to observe that urinary pH of the group of stone-formers that

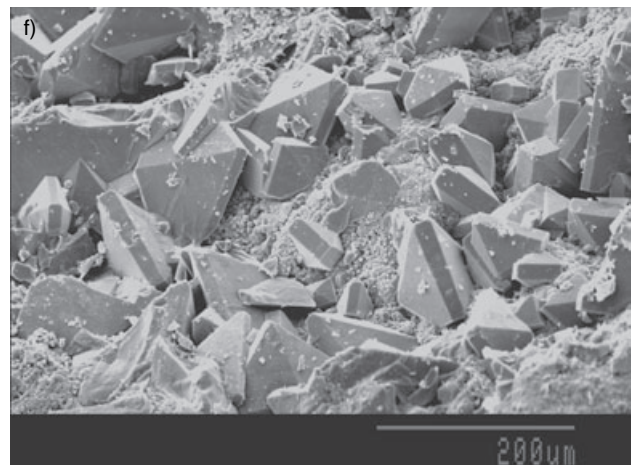
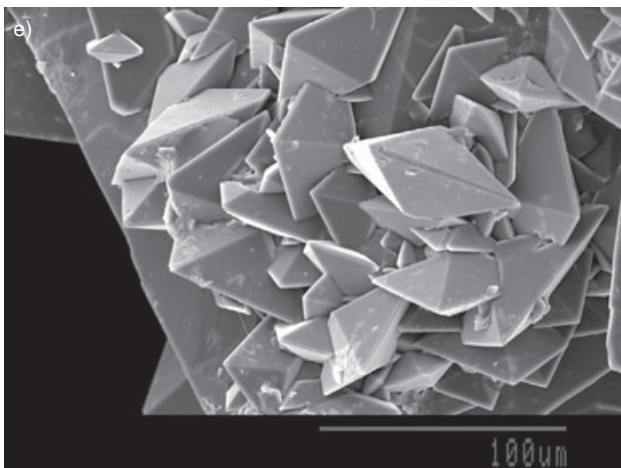
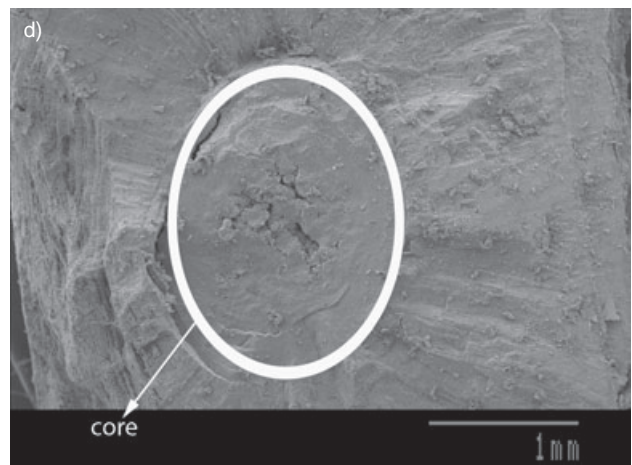
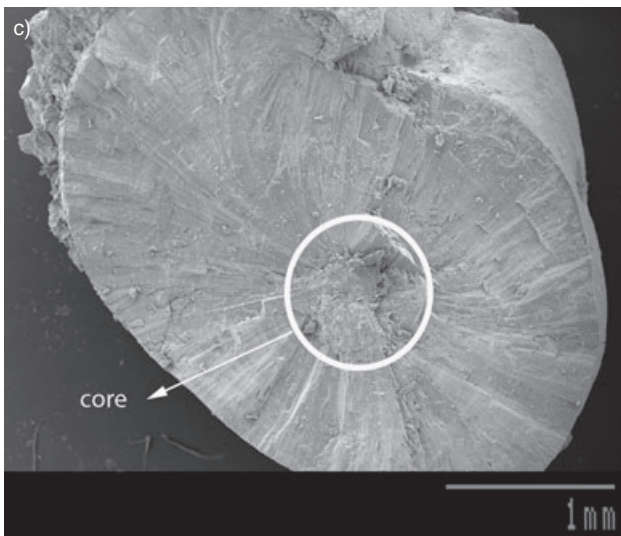
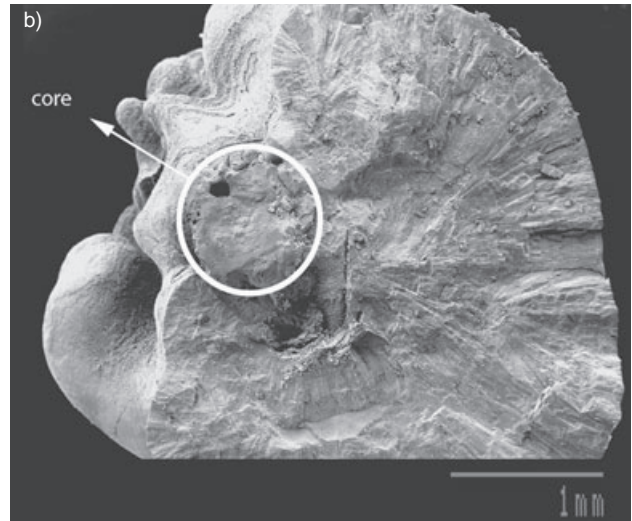
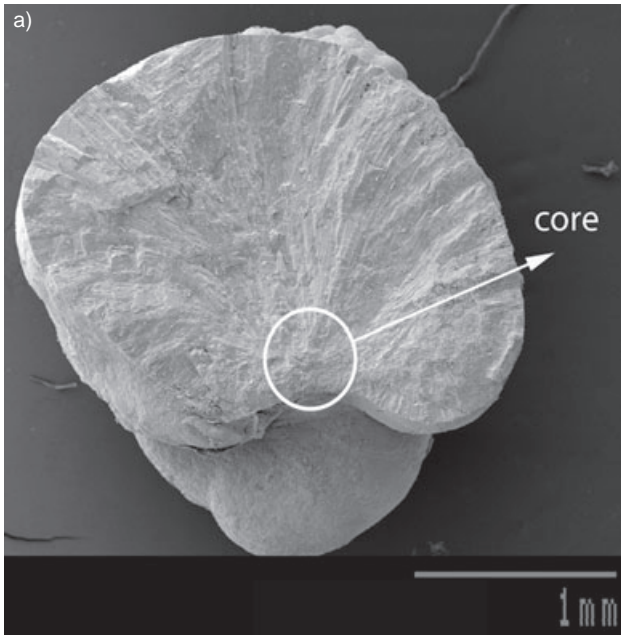


Table 1 Percentage of uric acid (expressed as mean ± SE) found in the core (groups 1–4) or a fragment (groups 5, 6) of different types of selected ‘pure’ calcium oxalate renal calculi

Group	Type of calculi	% of uric acid (weight of uric acid [g]/weight of core or fragment [g]) × 100
1	COM papillary calculi with the core constituted by COM crystals and organic matter (<i>n</i> = 9; Fig. 1a)	0.030 ± 0.007
2	COM papillary calculi with the core constituted by hydroxyapatite (<i>n</i> = 11; Fig. 1b)	0.031 ± 0.008
3	COM unattached calculi (formed in renal cavities) with the core formed by COM crystals and organic matter (<i>n</i> = 9; Fig. 1c)	0.24 ± 0.09 ^{a,b}
4	COM unattached calculi with the core formed by uric acid identifiable by SEM coupled to X-ray microanalysis (<i>n</i> = 10; Fig. 1d)	20.8 ± 7.8 ^{c,d,e}
5	COD unattached calculi containing little amounts of organic matter (<i>n</i> = 10; Fig. 1e)	0.012 ± 0.004 ^{f,g,h,i}
6	COD unattached calculi containing little amounts of organic matter and hydroxyapatite (<i>n</i> = 10; Fig. 1f)	0.0030 ± 0.0004 ^{j,k,l,m,n}

^a*P* = 0.0333 vs group 1; ^b*P* = 0.0191 vs group 2; ^c*P* = 0.0216 vs group 1; ^d*P* = 0.0111 vs group 2; ^e*P* = 0.0228 vs group 3; ^f*P* = 0.0339 vs group 1; ^g*P* = 0.0470 vs group 2; ^h*P* = 0.0160 vs group 3; ⁱ*P* = 0.0154 vs group 4; ^j*P* = 0.0007 vs group 1; ^k*P* = 0.0023 vs group 2; ^l*P* = 0.0126 vs group 3; ^m*P* = 0.0154 vs group 4; ⁿ*P* = 0.0273 vs group 5. COD, calcium oxalate dihydrate; COM, calcium oxalate monohydrate; SE, standard error; SEM, scanning electron microscopy.

Table 2 Urinary biochemical parameters (expressed as mean ± SE) for the stone-formers that generated the different types of selected ‘pure’ calcium oxalate renal calculi

	Groups					
	1	2	3	4	5	6
Diuresis (mL)	1800 ± 180	1670 ± 112	1853 ± 140	1679 ± 117	1430 ± 90	1630 ± 116
pH	5.7 ± 0.1	6.2 ± 0.3	5.5 ± 0.1	5.6 ± 0.2	5.6 ± 0.1	5.7 ± 0.2
Creatinine (mg/L)	1011 ± 97	849 ± 73	843 ± 64	890 ± 94	1019 ± 135	1033 ± 90
Calcium (mg/L)	108 ± 11	155 ± 12	86 ± 8	106 ± 8	197 ± 18	234 ± 15
Magnesium (mg/L)	59 ± 5	56 ± 4	51 ± 5	55 ± 4	66 ± 9	62 ± 4
Phosphorous (mg/L)	544 ± 57	526 ± 75	481 ± 48	553 ± 65	620 ± 69	672 ± 68
Oxalate (mg/L)	18 ± 2	16 ± 2	18 ± 1	19 ± 2	21 ± 8	18 ± 2
Uric acid (mg/L)	430 ± 42	386 ± 38	381 ± 40	420 ± 34	485 ± 62	421 ± 43
Citrate (mg/L)	377 ± 41	491 ± 31	418 ± 39	379 ± 56	405 ± 67	432 ± 47

Group 1: stone-formers that generated COM papillary calculi with the core constituted by COM crystals and organic matter (*n* = 9); Group 2: stone-formers that generated COM papillary calculi with the core constituted by hydroxyapatite (*n* = 11); Group 3: stone-formers that generated COM unattached calculi (formed in renal cavities) with the core formed by COM crystals and organic matter (*n* = 9); Group 4: stone-formers that generated COM unattached calculi with the core formed by uric acid identifiable by SEM coupled to X-ray microanalysis (*n* = 10); Group 5: stone-formers that generated COD unattached calculi containing little amounts of organic matter (*n* = 10); Group 6: stone-formers that generated COD unattached calculi containing little amounts of organic matter and hydroxyapatite (*n* = 10). COD, calcium oxalate dihydrate; COM, calcium oxalate monohydrate; SE, standard error; SEM, scanning electron microscopy.

Fig. 1 Images by scanning electron microscopy of the different types of calculi used: (a) Calcium oxalate monohydrate (COM) papillary calculi with the core constituted by COM crystals and organic matter. (b) COM papillary calculi with the core constituted by hydroxyapatite. (c) COM unattached calculi (formed in renal cavities) with the core formed by COM crystals and organic matter. (d) COM unattached calculi with the core formed by uric acid identifiable by scanning electron microscopy coupled to X-ray microanalysis. (e) Calcium oxalate dihydrate (COD) unattached calculi containing little amounts of organic matter. (f) COD unattached calculi containing little amounts of organic matter and hydroxyapatite.

generated COM unattached calculi with the core formed by COM crystals and organic matter was 5.5 ± 0.1 and the urinary pH of the group of stone-formers that generated COM unattached calculi with the core formed by uric acid identifiable by SEM coupled to X-ray microanalysis was 5.6 ± 0.2 .

Discussion

Undoubtedly, uric acid has an important contribution to the formation of calcium oxalate/uric acid mixed calculi. Nevertheless, this group of renal calculi constitutes only 2.6% of all renal calculi,⁹ and this is in clear disagreement with epidemiologic studies that relate a high incidence of hyperuricosuria to calcium oxalate stone formation.¹⁻³ Nevertheless, from the results presented in this paper, it can be deduced that in a significant number of COM unattached calculi, uric acid can also play an important role as an inducer (heterogeneous nucleant) of COM crystal development. Thus, the contribution of uric acid crystals to the calculi formation for COM unattached calculi with the core formed by uric acid identifiable by SEM coupled to X-ray microanalysis is obvious. However, it must be emphasized that when applying conventional infrared spectrometry analysis to these calculi, uric acid is not detected in the majority of occasions. On the other hand, it is clear that in COM unattached calculi with the core mainly formed by COM crystals and organic matter, the significantly high amounts of uric acid found in the core in comparison to the other types of 'pure' calcium oxalate renal calculi also allows us to attribute to these crystals an important role in the generation of this type of calculi. Thus, considering that in some of these calculi uric acid is clearly not implied in their formation, like COD unattached calculi containing little amounts of organic matter and hydroxyapatite (in which hydroxyapatite acts as a heterogeneous nucleant¹²), it can be assumed that in the other types in which it is present at similar amounts, uric acid also does not exert any important action. Hence, the formation of little amounts of uric acid crystals would induce the heterogeneous nucleation of COM crystals on them when they are retained in renal cavities with urodynamic deficiency (intrapelvic spaces or renal pelvis). In this case, the formation of uric acid crystals is justified considering the urinary pH found in these patients (Table 2), since uric acid solubility decreases abruptly at urinary pH < 5.5. These uric acid crystals (acting as heterogeneous nucleants of COM crystals) represent the first and main stage of these uric acid-induced COM unattached calculi, and the regular growth of new COM crystals on the surface of the already formed objects generate the core of the calculus. The formation of the core is the first and perhaps the most important step in COM unattached calculus development. This core serves later as a substrate for the growth of columnar COM crystals constituting the compact striated layer of the

COM stone. Taking into account that COM unattached calculi with the core mainly formed by COM crystals and organic matter constitute the 10.8% of all calculi, the COM unattached calculi with the core formed by uric acid identifiable by SEM coupled to X-ray microanalysis constitute the 1.2% of all calculi⁹ and if 2.6% of calcium oxalate/uric acid mixed calculi is also considered, it can be deduced that uric acid would be implied in approximately 15% of all calculi.

Acknowledgments

J.P. and P.S. express their appreciation to the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport for a fellowship of the FPU program. The financial support from Conselleria d'Innovació i Energia, Govern Balear (Grant PROIB-2002GC1-04) and (project BQU 2003-01659) from the Spanish Ministry of Science and Technology is gratefully acknowledged.

References

- 1 Favus MJ, Coe FL. Clinical characteristics and pathogenetic mechanisms in hyperuricosuric calcium oxalate renal stones disease. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* 1980; **53**: 171-7.
- 2 Sorensen CM, Chandhoke PS. Hyperuricosuric calcium nephrolithiasis. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2002; **31**: 915-25.
- 3 Koide T. Hyperuricosuria and urolithiasis. *Nippon Rinsho* 1996; **54**: 3273-6.
- 4 Brien G, Bick C. Allopurinol in the recurrence prevention of calcium oxalate lithiasis. *Eur. Urol.* 1977; **3**: 35-6.
- 5 Petit C. Calcium lithiasis: uric acid under question. *Nephrologie* 1984; **5**: 192-4. (In French.)
- 6 Hofbauer J, Zechner O. Impact of allopurinol treatment on the prevention of hyperuricosuric calcium oxalate lithiasis. *Eur. Urol.* 1988; **15**: 227-9.
- 7 Meyer JL, Bergert JH, Smith LH. The epitaxially induced crystal growth of calcium oxalate by crystalline uric acid. *Invest. Urol.* 1976; **14**: 115-19.
- 8 Grases F, Costa-Bauzá A, March JG, Masarova L. Glycosaminoglycans, uric acid and calcium oxalate urolithiasis. *Urol. Res.* 1991; **19**: 375-80.
- 9 Grases F, Costa-Bauzá A, Ramis M, Montesinos V, Conte A. Simple classification of renal calculi closely related to their micromorphology and etiology. *Clin. Chim. Acta* 2002; **322**: 29-36.
- 10 Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A. Analytical study of renal calculi. A new insight. *Recent Res. Dev. Pure Appl. Anal. Chem.* 1998; **1**: 187-206.
- 11 Perelló J, Sanchis P, Grases F. Determination of uric acid in urine, saliva and calcium oxalate renal calculi by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005; **824**: 175-80.
- 12 Grases F, Costa-Bauzá A, García-Ferragut L. Biopathological crystallization: a general view about the mechanisms of renal stone formation. *Adv. Colloid Interface Sci.* 1998; **74**: 169-94.

Conclusiones



ARTÍCULO ORIGINAL 2.1. Determinación de ácido úrico en orina, saliva y cálculos de oxalato cálcico por HPLC / MS

- Se ha desarrollado un método rápido, sencillo, sensible y selectivo por cromatografía líquida de alta resolución con detección por espectrometría de masas para la determinación de ácido úrico (AU) en orina, saliva y corazón de cálculos de oxalato cálcico.
- La elevada sensibilidad de la interfase APIES (*atmospheric pressure ionization electrospray*) permite realizar una importante dilución de la muestra, evitando así los efectos interferentes de la matriz.
- La alta sensibilidad de este método permite cuantificar la cantidad de AU presente en el corazón de los cálculos renales de oxalato cálcico y establecer cuál es el papel del AU en la etiología de este tipo de cálculos.
- La concordancia de los resultados obtenidos entre el nuevo método propuesto y otro con fundamento químico totalmente diferente (enzimático), demuestra la aplicabilidad de este método.

ARTÍCULO ORIGINAL 2.2. El ácido úrico como inductor de la litiasis renal oxalocálcica

- La capacidad del ácido úrico (AU) para actuar como nucleante heterogéneo en los cálculos de oxalato cálcico monohidrato (COM) es muy notable y puede ser atribuida a que sus cristales presentan una estructura similar a los cristales de COM. En las mismas condiciones, esta capacidad es superior a la que presentan la mucina (glicoproteína) o el detritus celular pero inferior a la que presenta el fluoruro cálcico.
- La capacidad de los fragmentos de cálculos renales de AU para actuar como nucleantes heterogéneos en la litiasis renal oxalocálcica aumenta con la porosidad de los mismos. Los fragmentos de cálculos de AU dihidrato poroso son los que provocan un mayor crecimiento de cristales de COM sobre su superficie, seguidos por los de AU dihidrato compacto, los de AU anhidro poroso y los de AU anhidro compacto, por este orden.
- El fitato, el pirofosfato y el condroitín sulfato provocan una importante disminución en la formación y el crecimiento de cristales de oxalato cálcico sobre cristales de AU (alrededor del 50%), mientras que la mucina sólo presenta un ligero efecto inhibitorio.
- Las concentraciones de fitato, pirofosfato y condroitín sulfato que provocan una inhibición del 50% en la formación y el crecimiento de cristales de COM sobre cristales de AU corresponden a valores de concentración que se encuentran normalmente en orina (3.03 μM , 28.75 μM y 40 mg/L, respectivamente).

ARTÍCULO ORIGINAL 2.3. Papel del ácido úrico en los diferentes tipos de cálculos renales de oxalato cálcico

- Los bajos porcentajes de ácido úrico (AU) encontrados en los corazones o los fragmentos de cálculos de oxalato cálcico monohidrato (COM) papilares con el corazón constituido por COM y materia orgánica ($0.030 \pm 0.007\%$), de cálculos de COM papilares con el corazón constituido por hidroxiapatita ($0.031 \pm 0.008\%$), de cálculos de oxalato cálcico dihidrato (COD) con pequeñas cantidades de materia orgánica ($0.012 \pm 0.004\%$) y de cálculos de COD con pequeñas cantidades de materia orgánica e hidroxiapatita ($0.0030 \pm 0.0004\%$), demuestran que el AU no está implicado en el mecanismo de formación de este tipo de cálculos.
- El alto porcentaje de AU encontrado en el corazón de cálculos de COM de cavidad cuyo corazón está constituido por COM y materia orgánica (en los que el AU es indetectable por microscopía electrónica de barrido acoplada a microanálisis de energía dispersiva de rayos X) ($0.24 \pm 0.09\%$) sugiere que el ácido úrico está implicado en el mecanismo de formación de este tipo de cálculos.
- Si se considera que un pH inferior a 5.5 disminuye drásticamente la solubilidad del AU, los bajos valores de pH (entre 5.2 y 5.6) encontrados en los pacientes que generaron cálculos de COM de cavidad con el corazón constituido fundamentalmente por COM y materia orgánica indican que la formación de cristales de AU con capacidad para actuar como nucleantes heterogéneos de cristales de COM puede estar implicada en el inicio de la formación de este tipo de cálculos.
- La formación de pequeñas cantidades de cristales de AU y su retención en cavidades renales de baja eficacia urodinámica puede representar el primer paso en la génesis de los cálculos de COM de cavidad con el corazón constituido por COM y materia orgánica. El siguiente paso es el desarrollo y el crecimiento de los cristales de COM sobre los cristales ya formados de AU constituyendo el corazón del cálculo. Posteriormente, se inicia el crecimiento columnar de los cristales de COM sobre las paredes externas del corazón que acabarán constituyendo el cuerpo del cálculo.
- Si se consideran los porcentajes de incidencia de los cálculos mixtos de oxalato cálcico/AU (2.6%), los cálculos de COM de cavidad con el corazón formado por AU detectable por microscopía electrónica de barrido acoplado a microanálisis de energía dispersiva de rayos X (1.2%) y los cálculos de COM de cavidad con el corazón constituido por COM y materia orgánica (10.8%), se concluye que los cálculos de oxalato cálcico donde el AU está implicado en su mecanismo de formación pueden constituir aproximadamente el 15% de todos los cálculos renales.

CAPÍTULO 3.
FACTORES IMPLICADOS EN LOS
MECANISMOS DE FORMACIÓN DE LAS
CALCIFICACIONES CARDIOVASCULARES

Introducción



1. CALCIFICACIONES CARDIOVASCULARES. INTRODUCCIÓN

Las calcificaciones cardiovasculares son un conjunto de patologías multifactoriales caracterizadas por la deposición de fosfato cálcico (hidroxiapatita) en tejidos cardiovasculares: vasos sanguíneos, miocardio y válvulas cardíacas.

La calcificación cardiovascular es un proceso muy común que afecta al 50% de las personas entre 40-49 años y al 80% entre 60-69 años y que puede llegar a tener graves consecuencias en función de su extensión y del órgano o tejido afectado [TINTUT 2001; WEXLER 1996].

Sin embargo, a pesar de su elevada incidencia y de que el conocimiento de esta patología se remonta a hace más de 200 años [WALLIN 2001], el mecanismo de este desorden todavía no ha sido elucidado.

2. CALCIFICACIÓN EN LOS VASOS SANGUÍNEOS

2.1. ESTRUCTURA DE LOS VASOS SANGUÍNEOS

Los vasos sanguíneos se clasifican en tres grupos: arterias, venas y capilares. Su estructura es repetitiva y consiste en la disposición concéntrica de tres capas diferentes: la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia (Figura 3.1).

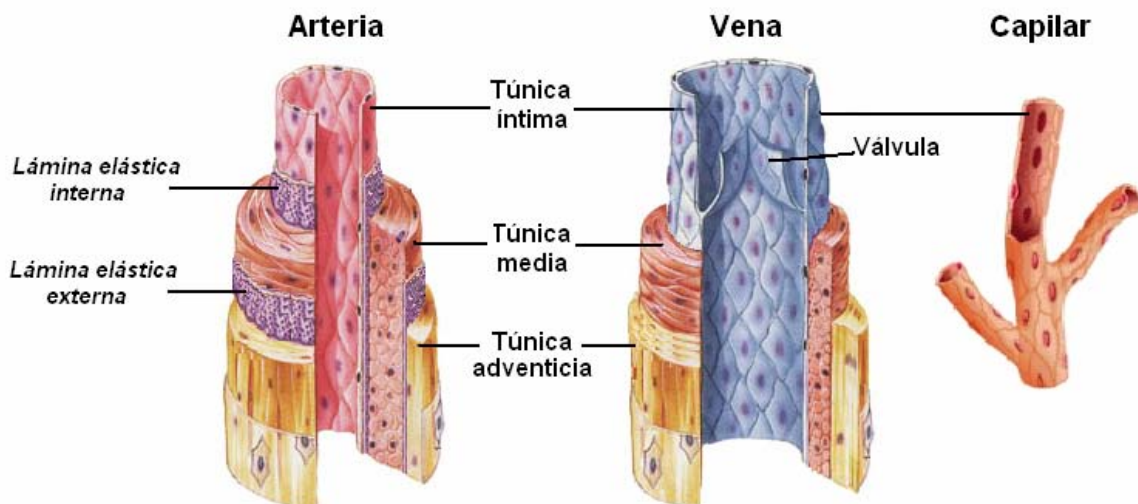


Figura 3.1. Ilustración de la estructura de los vasos sanguíneos. Las arterias presentan una túnica media bastante más desarrollada que las venas mientras que en las venas la túnica adventicia es, frecuentemente, la capa más gruesa del vaso. Los capilares sólo presentan una túnica íntima formada por células endoteliales que se apoyan en su lámina basal.

La **túnica íntima** es la capa más interna y está compuesta por una primera capa de células epiteliales planas altamente especializadas que constituye el endotelio. Éste descansa sobre una lámina basal, por debajo de la cual hay una fina capa de tejido conectivo laxo denominada capa subendotelial que puede no estar presente en los vasos de menor calibre.

En las arterias, entre la túnica íntima y la media se diferencia una capa limitante formada por fibras de elastina denominada *lámina elástica interna*. Esta capa le confiere al vaso elasticidad y capacidad para extenderse y encogerse y está bastante más desarrollada en las arterias que en las venas.

La *túnica media* es la capa intermedia y está formada por capas concéntricas de células musculares lisas entre las cuales se interponen capas organizadas de fibras elásticas, fibras colágenas y proteoglicanos. La túnica media está bastante más desarrollada en las arterias que en las venas.

En las arterias, entre la túnica media y la adventicia se diferencia una capa limitante formada por elastina denominada *lámina elástica externa*.

La *túnica adventicia* es la capa externa y está compuesta por tejido conectivo laxo constituido por fibroblastos, fibras elásticas y fibras colágenas que se disponen paralelas al eje longitudinal del vaso sanguíneo. Su espesor es variable, aunque frecuentemente es la capa más prominente de las venas. Por esta capa transcurren vasos de pequeño calibre, los *vasa vasorum*, que irrigan las células de los vasos.

2. TIPOS DE CALCIFICACIÓN

En los vasos sanguíneos, la calcificación puede presentarse en la túnica íntima y/o en la túnica media. La calcificación en la túnica íntima parece estar relacionada con la aterosclerosis [BURKE 2000; HUNT 2002] mientras que la calcificación en la túnica media parece estar más asociada con la pérdida de elasticidad y la arteriosclerosis observada con la edad, diabetes e insuficiencia renal crónica [EDMONDS 1982; GIACHELLI 2004].

La calcificación de la túnica íntima puede tener lugar independientemente de la calcificación de la túnica media y viceversa aunque también pueden observarse ambas, como sucede en la mayoría de casos de pacientes con insuficiencia renal crónica [IBELS 1979; SCHAWRZ 2000].

2.2.1. CALCIFICACIÓN EN LA TÚNICA ÍNTIMA

Este tipo de calcificación tiene lugar en placas ateroscleróticas, las cuales están constituidas principalmente por una masa central grasa (ateroma) y una capa fibrosa [LEHTO 1996; STARY 1999].

2.2.1.1. Mecanismo de formación de la placa aterosclerótica

En su formación se distinguen principalmente los siguientes procesos:

➤ **Lesión inicial o disfunción endotelial.** El endotelio vascular reviste los vasos sanguíneos, y actúa de interfase entre los componentes circulantes (células y moléculas) y los tejidos. El evento inicial en la aterogénesis es la injuria o lesión del endotelio producida por diversos factores tales como hiperlipidemia, tabaquismo, hipertensión arterial, envejecimiento. Esta lesión inicial (la cual tiene lugar con más facilidad en segmentos de la arteria más ramificados o curvados) provoca un desequilibrio entre los factores relajantes (óxido nítrico) y los factores constrictores (endotelina)

producidos por el endotelio, alterando su función vasoprotectora. La disfunción endotelial ligada a la aterosclerosis se caracteriza por una disminución en la producción del óxido nítrico y en consecuencia, un aumento del efecto de la endotelina. El óxido nítrico tiene la capacidad de inhibir la adhesión de monocitos al endotelio, la interacción de las plaquetas con la pared del vaso sanguíneo, la proliferación y migración de células musculares lisas y de disminuir la permeabilidad endotelial y el tono vascular. Así, la disfunción endotelial produce un aumento de la permeabilidad de la pared arterial favoreciendo la entrada al subendotelio de macromoléculas (como las lipoproteínas de baja densidad, LDL) y células como los monocitos [LUSIS 2000]. Cabe destacar que una concentración plasmática alta de LDL, favorece la entrada y posterior acumulación de lipoproteínas en el subendotelio donde son retenidas por la matriz de proteoglicanos [GUSTAFSSON 2004; ROSS 1999]. Las LDL retenidas, las cuales pueden sufrir una oxidación, constituyen un estímulo proinflamatorio.

➤ **Inflamación.** Las LDL estimulan la síntesis y expresión de toda una serie de moléculas que provocan la atracción, adhesión y migración de monocitos y linfocitos T a través del endotelio. En el subendotelio, los monocitos se diferencian a macrófagos y expresan receptores scavenger (cuya expresión es inducida por citoquinas, las cuales son sintetizadas por células endoteliales en respuesta a las LDL). Los receptores scavenger permiten a los macrófagos la captación de LDL en forma de LDL oxidada [LUSIS 2000].

➤ **Formación de la estría grasa.** Los macrófagos acumulan grandes cantidades de ésteres de colesterol y sufren cambios fenotípicos que les confieren un aspecto espumoso (células espumosas). Los macrófagos, células endoteliales y células espumosas producen especies reactivas de oxígeno y factores de crecimiento que provocan un aumento de la inflamación local y de la respuesta proaterogénica [LIBBY 2002]. A su vez, las citoquinas inducen la migración y proliferación de las células del músculo liso (CML) desde la media a la íntima. Las CML también pueden captar LDL oxidada y transformarse en células espumosas. Así, la formación de células espumosas y la proliferación de CML, provocan el engrosamiento de la pared arterial y la formación de la estría grasa.

➤ **Formación de la capa fibrosa.** Las CML proliferan hacia la íntima y secretan matriz extracelular (elastina, colágeno y proteoglicanos) en respuesta a diferentes factores de crecimiento [KATSUDA 2003]. La matriz extracelular sintetizada por CML se distribuye formando una capa fibrosa que cubre el núcleo de la lesión constituido por células espumosas.

La carga lipídica de las células espumosas es tóxica para las células y, en consecuencia, éstas pueden experimentar apoptosis o necrosis. La apoptosis de las células espumosas origina una masa central grasa (ateroma) compuesto por colesterol extracelular y restos celulares [STONEMAN 2004].

➤ **Progresión de la placa.** La capa fibrosa puede romperse o ulcerarse, exponiendo a la circulación los componentes de la masa central grasa y provocando la formación de un trombo que puede causar un evento coronario agudo [BADIMON 1991]. Las placas con una cubierta fibrosa delgada y un elevado número de células inflamatorias son más propensas a romperse.

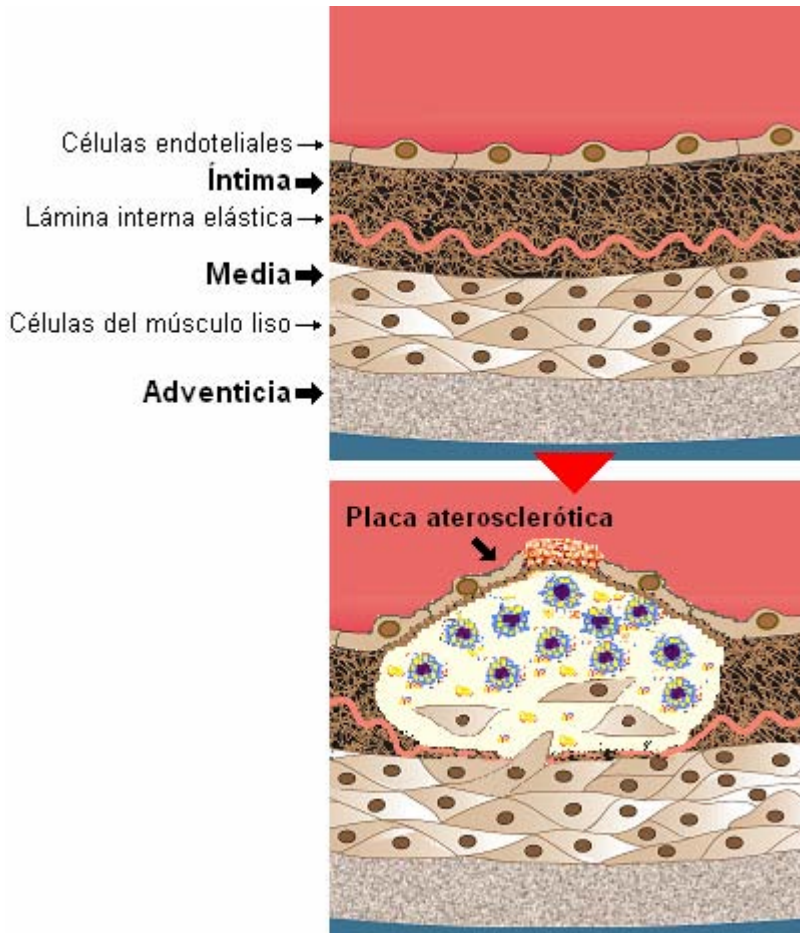


Figura 3.2. Ilustración de la formación de la placa aterosclerótica.

2.2.1.2. La calcificación en la placa aterosclerótica

En muchas ocasiones, la placa aterosclerótica presenta depósitos calcificados. La calcificación de la placa aterosclerótica puede empezar tan pronto como en la segunda década de la vida justo después de la formación de la estría grasa [STARY 1999] y seguir desarrollándose a medida que la placa aterosclerótica progresa. Inicialmente se forman pequeños agregados cristalinos de fosfato cálcico con una distribución puntual y difusa. A medida que la calcificación progresa, estos agregados se unen dando lugar a agregaciones esferulíticas mayores poco uniformes asociadas con las regiones necróticas. En algunas ocasiones, cuando la calcificación es muy extensa, se ha llegado a observar la presencia de matriz ósea en las placas ateroscleróticas [DETRANO 2000; JEZIORSKA 1998].

Estudios recientes han demostrado que la presencia de calcificación en la capa íntima indica la existencia de placa aterosclerótica [DETRANO 2000]. Así, debido a que la calcificación es una medida indirecta de la aterosclerosis, existe un gran interés clínico en el desarrollo de técnicas no invasivas para la detección y cuantificación de este tipo de calcificación.

Finalmente, destacar que la formación de la placa aterosclerótica comprende los procesos de inflamación, degeneración de tejidos y necrosis, los cuales envuelven la formación de áreas de tejidos dañados en las cuales se puede constituir un núcleo (que puede ser el propio detritus celular) que induzca la formación y crecimiento de cristales de fosfato cálcico [DOHERTY 2003].

2.2.2. CALCIFICACIÓN EN LA TÚNICA MEDIA

Tal y como se ha indicado anteriormente, este tipo de calcificación, también denominada arteriosclerosis de Mönckeberg, ocurre independientemente de la calcificación de la íntima y viceversa, por lo que parece que ambas implican diferentes aspectos etiológicos [PROUDFOOT 2001].

Este tipo de calcificación se presenta principalmente en arterias periféricas de las extremidades inferiores de pacientes varones mayores de 50 años [ELLIOT 1994]. Sin embargo, también se ha observado en pacientes más jóvenes diabéticos o urémicos [EDMONDS 1982; GIACHELLI 2004].

La calcificación en la túnica media, al contrario que en la íntima, tiene lugar en ausencia de aterosclerosis [SHANAHAN 1999]. La calcificación en la túnica media ocurre entre las células del músculo liso (CML) y las fibras elásticas. En cuanto a su mecanismo de formación, algunos autores indican que es posible que cuando las CML sufren apoptosis, liberen cuerpos apoptóticos los cuales no son eficazmente eliminados por las CML adyacentes sirviendo de nido a partir del cual se forma la calcificación a lo largo de las fibras de elastina [PROUDFOOT 2001]. Otros autores postulan que la calcificación de la túnica media está más fuertemente ligada a las fibras elásticas que a las CML y que durante el envejecimiento, la disrupción gradual de las fibras elásticas tiene un papel clave en su formación [ATKINSON 1998; DAO 2005; KEELEY 1974].

En las primeras etapas, este tipo de calcificación presenta una morfología típica de depósitos lineales de fosfato cálcico a lo largo de la lámina elástica. En lesiones avanzadas, los depósitos se disponen a lo largo de la media en forma de anillos circulares (Figura 3.3). Y además, al igual que la calcificación en la túnica íntima, se ha llegado a observar matriz ósea cuando la calcificación muy extensa [SHANAHAN 1999].

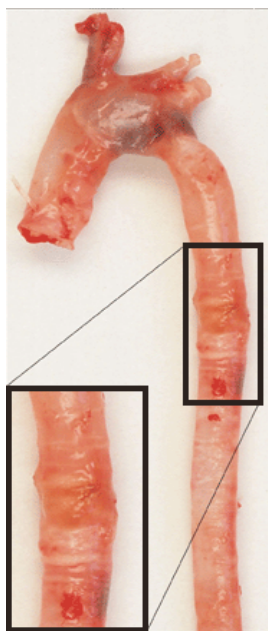


Figura 3.3. Imagen de una aorta de rata donde se aprecian los anillos circulares de fosfato cálcico típicos de la calcificación de la túnica media.

3. CALCIFICACIÓN EN LAS VÁLVULAS CARDÍACAS

En la calcificación valvular, hay que considerar dos tipos diferentes: la calcificación en las válvulas nativas y la calcificación en las válvulas bioprostéticas.

3.1. CALCIFICACIÓN EN LAS VÁLVULAS NATIVAS

Las válvulas de corazón (Figura 3.4) son tejidos circulares de aproximadamente 4 cm de diámetro formadas por unas finas membranas de tejido endotelial que es el mismo que recubre el interior de los vasos sanguíneos. Estas membranas están sujetas a unos tejidos musculares que originan el movimiento de apertura y de cierre.

En determinadas ocasiones una o varias válvulas dejan de funcionar correctamente y en estos casos se opta por el reemplazamiento de las válvulas por otras prostéticas que pueden ser mecánicas o biológicas. La lesión valvular más frecuente y que a su vez es la mayor causa de reemplazamiento es la calcificación de la válvula aórtica, aunque también se debe considerar la calcificación del anillo mitral [FARZANEH+ FAR 2001].

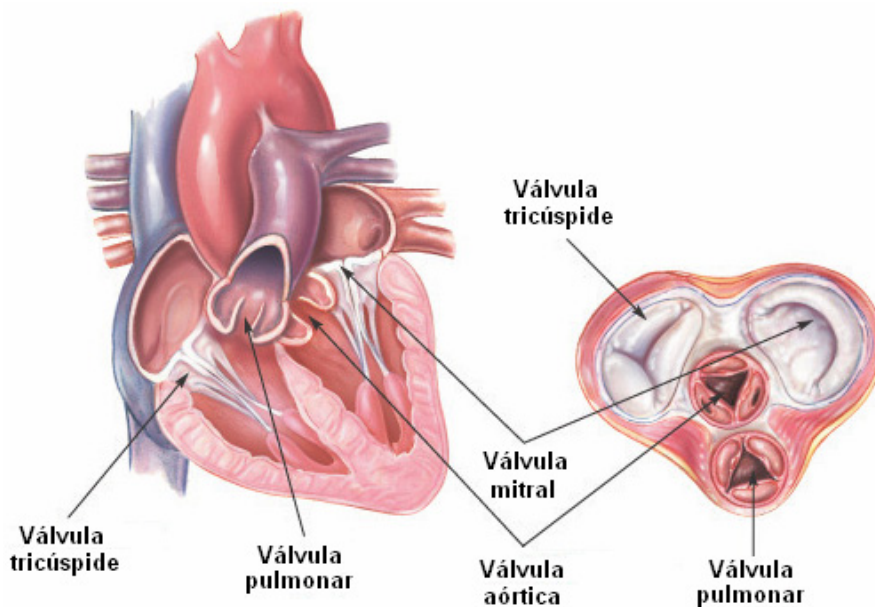


Figura 3.4. Ilustración de las válvulas cardíacas.

3.1.1. CALCIFICACIÓN EN LA VÁLVULA AÓRTICA

En la estructura de la válvula aórtica se pueden distinguir tres capas: la capa fibrosa, la capa esponjosa y la capa ventricularis (Figura 3.5).

La **capa fibrosa** está constituida principalmente por fibras de colágeno empaquetadas de manera densa que se disponen circunferencialmente otorgando a la estructura una mayor rigidez en la dirección circular que en la radial. En su parte más externa, una matriz de elastina rodea al

colágeno. Esta capa confiere a la válvula la resistencia y rigidez necesarias para mantener la estructura durante el movimiento cíclico valvular (sístole-diástole).

La **capa esponjosa** es la capa central y está compuesta por colágeno y abundantes proteoglicanos. Esta capa absorbe o amortigua los cambios mecánicos entre la capa fibrosa y la ventricularis durante el movimiento cíclico valvular.

La **capa ventricularis**, menos ordenada que la fibrosa, está constituida principalmente por colágeno con fibras elásticas alineadas radialmente. Esta capa es menos rígida que la esponjosa y se estira en la diástole y se contrae en la sístole.

La calcificación de la válvula aórtica es un proceso muy común que ocurre en el 53% de las personas entre 55 y 86 años [COLLI 2007]. Desde la década de los 90, se han establecido numerosas similitudes en el mecanismo de formación y los factores de riesgo entre la calcificación aórtica valvular y la calcificación en la placa aterosclerótica (Tabla 3.I) [O'BRIEN 1996; OTTO 1994]. Así, estudios histopatológicos indican que la calcificación se inicia con la formación de una lesión que tiene mucho en común con las etapas iniciales de la placa aterosclerótica, ya que implica una disfunción endotelial, la posterior infiltración y deposición de lipoproteínas y la participación de células inflamatorias (macrófagos, células espumosas y linfocitos T) [FREEMAN 2007; OTTO 1994].

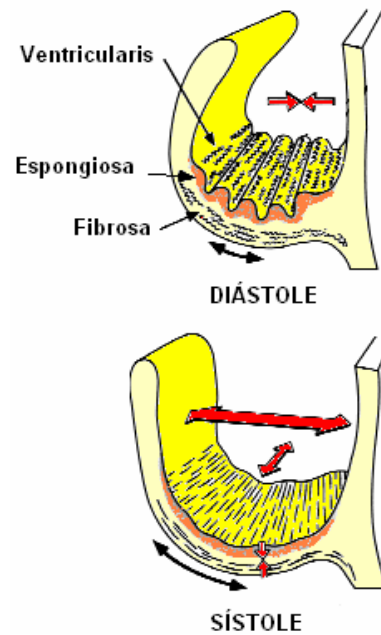


Figura 3.5. Ilustración de la estructura de la válvula aórtica.

Tabla 3.I. Comparación entre la calcificación en la válvula aórtica y en la placa aterosclerótica [FREEMAN 2005; COLLI 2005].

	Placa aterosclerótica	Válvula aórtica
Factores de riesgo		
Hipertensión	++++	+++
LDL elevado	++++	+++
Diabetes mellitus	++++	+
Tabaco	++++	+++
Disfunción renal	++++	++++
Histopatología		
Calcificación	+++	++++
Acumulación de lipoproteína	++++	++++
Oxidación lipídica	++++	++++
Inflamación	++++	++++
Marcadores inflamatorios	++	+
Tipo de célula prominente	Células del músculo liso	Fibroblastos

La calcificación de la válvula aórtica suele iniciarse en la capa fibrosa de las cúspides, en aquellas áreas de deformación tisular máxima durante sistole-diástole [SCHOEN 1999]. Inicialmente, presenta una morfología puntual y difusa en forma de pequeños agregados cristalinos de fosfato cálcico y a medida que la calcificación progresa, estos agregados se vuelven más grandes y compactos. También, cuando la calcificación es muy extensa, se ha llegado a observar matriz ósea [MOHLER 2001; O'BRIEN 1995].

3.1.2. CALCIFICACIÓN EN EL ANILLO MITRAL

La calcificación del anillo mitral es un proceso degenerativo que se da en la capa fibrosa de la base de la válvula mitral [ADLER 2001]. Al igual que la calcificación en la válvula aórtica, la incidencia de este tipo de calcificación está fuertemente ligada al envejecimiento [FULKERSON 1979; SELL 1965] y algunos estudios establecen una asociación entre el mecanismo de formación y los factores de riesgo de la calcificación del anillo mitral y la aterosclerosis (p.e., hipertensión, diabetes e hiperlipidemia) [BOON 1997; FINK 2001]. La calcificación del anillo mitral suele ir siempre acompañada de calcificación de la válvula aórtica. Sin embargo, de todos los casos de calcificación de válvula aórtica, sólo el 50% aproximadamente presentan también calcificación en el anillo mitral [SELL 1965].

3.2. CALCIFICACIÓN EN LAS VÁLVULAS BIOPROSTÉTICAS

Existen dos tipos de válvulas prostéticas: las válvulas mecánicas y las válvulas bioprostéticas (Figura 3.6) [GRUNKEMEIER 1990; JORGE-HERRERO 2005].

Las **válvulas mecánicas** están fabricadas de materiales no biológicos (p.e., polímeros, metales, compuestos cerámicos). Estas válvulas poseen una larga durabilidad y satisfactorias características hemodinámicas. Sin embargo, son trombogénicas por lo que requieren una terapia anticoagulante de por vida (Figura 3.6A).

Las **válvulas bioprostéticas** están fabricadas, al menos en parte, de tejido biológico (principalmente válvulas de cerdo o pericardio bovino fijados con glutaraldehído). Estas válvulas presentan mejores propiedades hemodinámicas y tromboresistentes que las mecánicas y por ello, al contrario que las mecánicas, no están asociada a terapias anticoagulantes de por vida [JORGE-HERRERO 2005]. Sin embargo, las válvulas bioprostéticas tienen una durabilidad limitada debido, principalmente, a la degradación y calcificación de los tejidos (Figura 3.6B) [SCHOEN 1999].

El porcentaje de uso de las válvulas mecánicas y bioprostéticas está bastante igualado. Las válvulas bioprostéticas se utilizan, como norma general, en pacientes mayores de 65 años mientras que las mecánicas se usan en los más jóvenes [COLLI 2007].

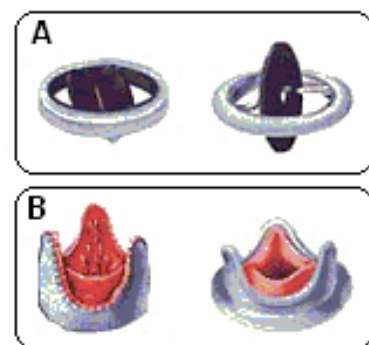


Figura 3.6. Ilustración de válvulas prostéticas: **A.** válvulas mecánicas. **B.** válvulas bioprostéticas.

Aproximadamente el 30% de los pacientes con válvulas bioprostéticas necesitan el reemplazamiento de ésta por otra en menos de 10 años [FARZANEH+ FAR, 2001], siendo la calcificación la mayor causa de fallo [SCHOEN 1992; VYVAHARE 1997].

En el mecanismo de calcificación de las válvulas bioprostéticas es importante considerar los tratamientos de fijación a los cuales son sometidos los tejidos biológicos utilizados para fabricar las válvulas bioprostéticas (válvulas de cerdo, pericardio bovino) a fin de preservarlas. El glutaraldehído (1,5-pentanodial) es el producto más usado en estos tratamientos de fijación. Los grupos aldehído del glutaraldehído reaccionan con las aminas de las proteínas (Figura 3.7) formando un complejo resistente a la degradación (Base de Schiff). Es interesante considerar que la fijación con glutaraldehído impide la vida de las células que constituyen la válvula, con lo que parece ser que la muerte celular juega un papel promotor crucial en el acelerado proceso de calcificación en este tipo de válvulas [JORGE-HERRERO 2005].

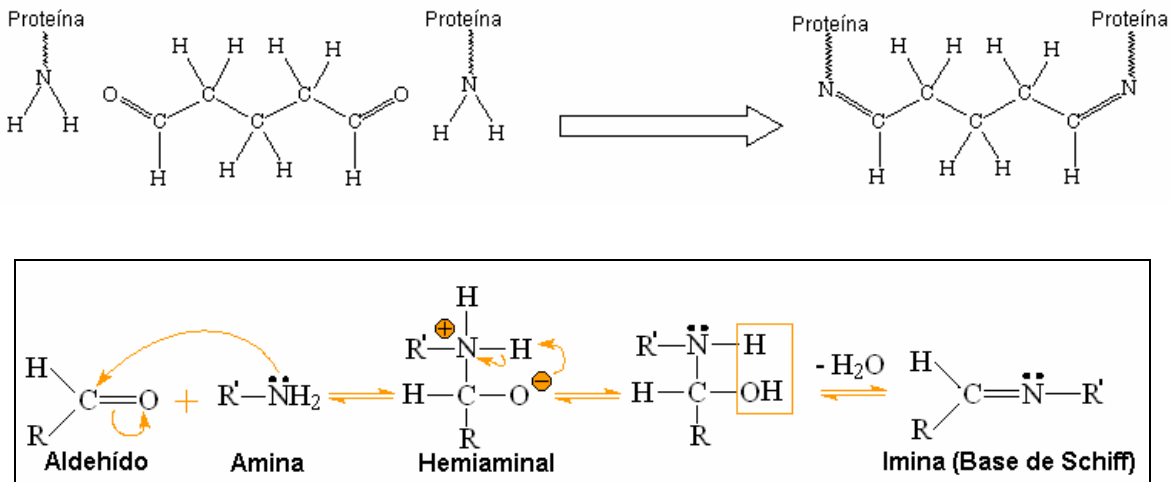


Figura 3.7. Mecanismo de reacción entre las proteínas del tejido y el glutaraldehído.

Otro factor interesante a considerar es la edad. Diversos estudios indican que las válvulas bioprostéticas calcifican más rápidamente en los pacientes más jóvenes que en los ancianos, por lo que parece ser que el sistema inmunitario también tiene un papel importante en este mecanismo de calcificación. Así, una posible razón por la cual las válvulas de los pacientes más jóvenes se degradan y calcifican más rápidamente es que poseen una respuesta inmunitaria más agresiva [HUMAN 2001; SIMIONESCU 2004].

En cuanto a la morfología y situación de la calcificación en las válvulas bioprostéticas, al igual que en las nativas, tiene lugar más fácilmente en aquellas regiones de las cúspides de máxima flexión y se presenta en forma de depósitos calcificados con menor relación Ca/P, menor cristalinidad y mayor solubilidad que en las válvulas nativas [TOMAZIC 1995].

4. FACTORES ETIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LAS CALCIFICACIONES CARDIOVASCULARES

Las calcificaciones cardiovasculares, al igual que cualquier proceso patológico de cristalización, son consecuencia del desequilibrio entre tres grandes grupos de factores: la sobresaturación, los promotores y los inhibidores [GRASES 2005]. Sin embargo, además de estos tres aspectos, debemos considerar otro grupo de factores: las proteínas implicadas en la calcificación, ya que existen una serie de proteínas presentes en los tejidos y en los fluidos de los mamíferos que han demostrado participar activamente en el proceso de calcificación y cuyo mecanismo de acción todavía presenta cierta discusión.

4.1. SOBRESATURACIÓN

Un sistema está sobresaturado respecto a un soluto cuando lo contiene en cantidades superiores a la establecida por el producto de solubilidad. Si consideramos el pH y las concentraciones plasmáticas de calcio y fosfato, observamos que el plasma sanguíneo siempre está sobresaturado con respecto al fosfato cálcico, siendo sólo una cuestión cinética (período de inducción) que acabe por formarse el correspondiente sólido [EPPLÉ 2001].

Varios estudios han demostrado la importancia de la sobresaturación en la formación de calcificaciones cardiovasculares. Estos estudios establecen una relación directa entre la hiperfosfatemia (concentraciones séricas de fosfatos mayores de 1.0 -1.5 mmol/L) y la extensión de la calcificación cardiovascular y las enfermedades vasculares [JONO 2000]. Una de las causas más comunes de hiperfosfatemia es la insuficiencia renal crónica y la posterior diálisis renal, en la que los niveles séricos de fosfato inorgánico pueden superar valores de 2 mmol/L.

4.2. PROMOTORES DE LA CALCIFICACIÓN

El principal motivo por el cual el plasma sanguíneo, a pesar de estar sobresaturado con respecto al fosfato cálcico, permanece metaestable en disolución es porque el período de inducción es muy elevado debido a que la etapa de nucleación está cinéticamente desfavorecida [KOKUBO 2000]. Sin embargo, existen determinadas sustancias sólidas, los nucleantes heterogéneos o promotores de la calcificación, que son capaces de actuar como núcleo a partir del cual se pueda constituir el futuro depósito calcificado y de esta manera, disminuyen el periodo de inducción y facilitan la formación de la calcificación. Algunos autores han indicado la capacidad para actuar como nucleantes heterogéneos de algunas sustancias presentes en los tejidos cardiovasculares (como el colágeno, la elastina, los fosfolípidos, los glicosaminoglicanos, las vesículas de matriz y las membranas mitocondriales) [TOMAZIC 2001] y que el hecho de que estas sustancias puedan actuar como promotoras de la calcificación se debe a que previamente se ha producido algún tipo de lesión celular, muerte celular y/o apoptosis [FARZANEH-FAR 2001; PROUDFOOT 2001B]. En los tejidos, la relación de calcio extracelular/intracelular es superior a 1000. Esta relación disminuye cuando la célula sufre una lesión, la bomba Ca/Na falla y, en consecuencia, se produce una acumulación incontrolada de

calcio en la célula. Así, este aumento de la concentración de calcio junto con la elevada concentración intracelular de fosfato y el gran exceso de ATP (el cual es capaz de proporcionar más fosfato) puede conducir a una nucleación rápida con la posterior formación de fosfatos cálcicos, especialmente sobre los fragmentos celulares disponibles [TOMAZIC 2001].

4.3. INHIBIDORES DE LA CALCIFICACIÓN

Los inhibidores de la calcificación son sustancias que dificultan o impiden el desarrollo de cristales cálcicos por adsorción sobre el núcleo o las caras de los cristales en formación. Pueden actuar tanto a nivel de nucleación (adsorbiéndose sobre el núcleo homogéneo o heterogéneo en formación), como de crecimiento cristalino (adsorbiéndose sobre las caras del cristal en formación) e incluso en ambos procesos a la vez [GRASES 2000]. Algunos inhibidores de la cristalización de sales cálcicas, como el pirofosfato y los bisfosfonatos, han demostrado poseer un efecto inhibitor en las calcificaciones cardiovasculares evitando o dificultando la formación de depósitos de fosfato cálcico [BEVILACQUA 2005; LOMMASHVILI 2004; PRICE 2001A; PRICE 2001B].

4.3.1. PIROFOSFATO

➤ Características generales

Tal y como se ha indicado en el capítulo anterior, el pirofosfato (Figura 3.8) es un constituyente natural de sangre [FLEISCH 1962A] y orina [FLEISCH 1962B] que a nivel celular, se genera como producto de numerosas reacciones metabólicas y se degrada a fosfato inorgánico por acción de enzimas específicas [RUSSELL 2006; TERKELTAUB 2001].

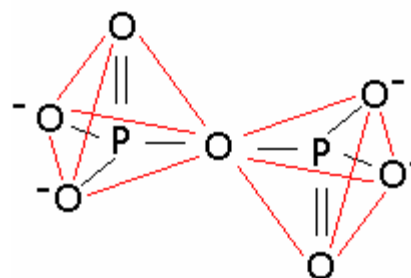


Figura 3.8. Estructura de la molécula de pirofosfato.

➤ Función en el proceso de calcificación

Desde la década de los 60, diversos estudios han demostrado que el pirofosfato inhibe la cristalización y disolución de sales cálcicas (como la hidroxiapatita) en concentraciones similares a las que se encuentran en el plasma (10^{-6} M) [FLEISCH 1961; FLEISCH 1966; MEYER 1984]. Así, algunos autores han demostrado que inhibe la formación de calcificación aórtica en ratas a las cuales se les suministró grandes dosis de vitamina D [FLEISCH 1965; SCHIBLER 1968]. Otros que la destrucción del pirofosfato por parte de la pirofosfatasa, una enzima que se encuentra en altas concentraciones en lugares calcificados [DULCE 1960; FLEISCH 1962A], facilita el proceso de calcificación [FLEISCH 1965]. Y en humanos, se ha establecido una relación directa entre niveles bajos de pirofosfato en plasma y una calcificación arterial extensa [RUTSCH 2001].

Sin embargo, a pesar de que el pirofosfato tiene un papel muy importante en la prevención de calcificaciones patológicas, estudios "in vivo" desvelaron que el aporte exógeno de pirofosfato tan sólo tiene efecto inhibitor sobre la calcificación cuando éste es inyectado ya que, por administración oral, el pirofosfato es hidrolizado en el tracto gastrointestinal y en consecuencia, no

presenta acción inhibidora. Este hecho llevó a estudiar compuestos análogos que tuvieran características fisicoquímicas similares al pirofosfato y que además fueran resistentes a la hidrólisis y no fueran degradados metabólicamente.

4.3.2. BISFOSFONATOS

➤ Características generales

Los bisfosfonatos son compuestos sintéticos con propiedades inhibidoras de la cristalización y disolución de sales cálcicas análogas a las del pirofosfato y que, a diferencia de éste, no sufren hidrólisis enzimática cuando son administrados oralmente [RUSSELL 1970]. La estructura de los bisfosfonatos (Figura 3.9) presenta dos grupos fosfonato unidos a un carbono central (geminal) y dos cadenas adicionales, R_1 y R_2 .

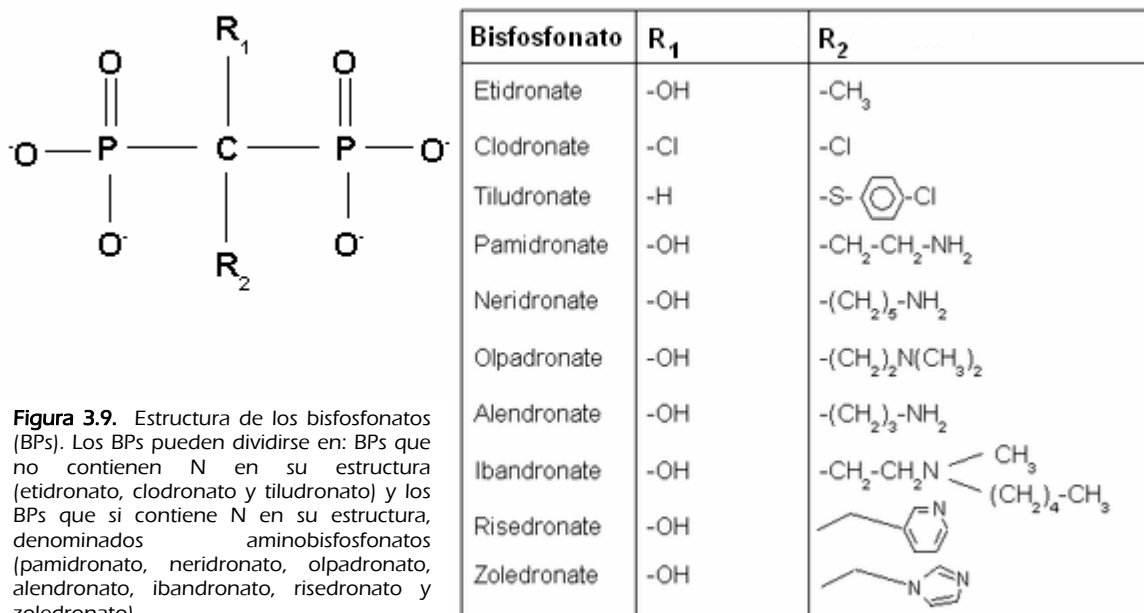


Figura 3.9. Estructura de los bisfosfonatos (BPs). Los BPs pueden dividirse en: BPs que no contienen N en su estructura (etidronato, clodronato y tiludronato) y los BPs que sí contiene N en su estructura, denominados aminobisfosfonatos (pamidronato, neridronato, olpadronato, alendronato, ibandronato, risedronato y zoledronato).

La disposición de las dos cadenas laterales permite numerosas sustituciones y posibilita el desarrollo de análogos con diferentes propiedades farmacológicas. Así, la capacidad de los bisfosfonatos para unirse a los cristales de hidroxiapatita y prevenir el crecimiento y la disolución del cristal aumenta cuando el sustituyente R_1 es un grupo hidroxilo (como en el etidronato) en lugar de un halógeno o un hidrógeno (como el clodronato y el tiludronato, respectivamente).

En cuanto al sustituyente R_2 , la introducción de compuestos nitrogenados aumenta su acción, de manera que los bisfosfonatos con una amina primaria (alendronato, pamidronato y neridronato) son más potentes que el etidronato (entre 10 y 1000 veces) pero menos que los que contienen una amina terciaria (ibandronato y olpadronato) [MUEHLBAUER 1991; PAPAPOULOS 1988]. Sin embargo, los bisfosfonatos más potentes son los que contienen un anillo heterocíclico con un N (risedronato y zoledronato),

los cuales han demostrado tener una acción de unas 10000 veces superior a la del etidronato [GOA 1998; GREEN 1994].

Los bifosfonatos fueron sintetizados por primera vez en 1800 aunque su aplicación en medicina no empezó hasta 1960 [RUSSELL 2006]. En 1971 el etidronato fue el primer bisfosfonato que demostró inhibir la resorción ósea en humanos cuando se administraba a pacientes con la enfermedad de Paget [SMITH 1971]. Actualmente en Europa, nueve bisfosfonatos se emplean clínicamente en humanos: etidronato, alendronato y risedronato son usados en tratamientos posmenopáusicos de la osteoporosis; clodronato, pamidronato, ibandronato y zoledronato para la hipercalcemia y para la metástasis osteolítica del hueso; y tiludronato, neridronato y risedronato en la enfermedad de Paget [BEVILACQUA 2006].

La farmacología clínica de los bisfosfonatos está caracterizada por una absorción intestinal baja y una localización y una retención altamente selectiva en los huesos. La absorción de los bisfosfonatos administrados por vía oral es menor al 5% y su vida media es de pocas horas. Estos compuestos deben tomarse en ayunas porque de lo contrario, su absorción disminuye. De la fracción absorbida el 60% como máximo, queda absorbida en los huesos y el resto, es excretada sin ninguna alteración por la orina. Así, para la inhibición de la resorción ósea se necesitan concentraciones más bajas que para la inhibición de la calcificación [RUSSELL 2006].

➤ Función en el proceso de calcificación

Los bisfosfonatos han demostrado inhibir la calcificación en muchos tejidos blandos como la piel, el riñón, los vasos sanguíneos y las válvulas cardíacas [FLEISCH 1970; LEVY 1987; PRICE 2001A; PRICE 2001B; ROSENBLUM 1977]. El etidronato, el clodronato y otros bisfosfonatos de primera generación han demostrado inhibir la calcificación arterial inducida con vitamina D en ratas. Sin embargo la dosis necesaria para la cual los bisfosfonatos inhiben dicha calcificación es superior a $5 \text{ mg P} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ y en estas dosis, se produce también la inhibición de la mineralización normal de tejidos como el hueso y el cartilago [FRANCIS 1969; FLEISCH 1970; KING 1971; KINGMA 1990; POTOKAR 1978; ROSENBLUM 1977]. Estudios actuales en ratas han demostrado que el alendronato y el ibandronato son capaces de inhibir la calcificación arterial en dosis comparables a las que inhiben la resorción del hueso (0.05 y $0.10 \text{ mg P} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$, respectivamente) y con las que no tiene lugar ningún efecto negativo en la mineralización normal [PRICE 2001A]. No se ha observado inhibición de la mineralización normal del hueso por parte del ibandronato y el alendronato en dosis de $1 \text{ mg P} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ [MUHLBAUER 1991; SCHENK 1986].

En humanos, el etidronato, ha sido usado por vía oral para impedir o dificultar la calcificación patológica y osificación en enfermedades como la litiasis renal, después de una lesión en la columna vertebral o de un trasplante de cadera. Sin embargo, los resultados obtenidos no han sido muy esperanzadores ya que, en las dosis para las cuales inhibe la mineralización normal del hueso, los efectos del etidronato sobre la calcificación patológica no son relevantes [FLEISCH 1998]. Mejores efectos se obtuvieron con aplicaciones tópicas para prevenir cálculos dentales [MUHLEMANN 1970; STURZENBERGER 1971] y, actualmente, en algunos países se comercializan dentífricos con bisfosfonatos.

4.4. PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL PROCESO DE LA CALCIFICACIÓN

Algunas proteínas que se encuentran presentes en tejidos y fluidos de mamíferos han demostrado estar implicadas en el proceso de calcificación. Por ello, algunos autores apuntan que la calcificación cardiovascular es, al menos en parte, un proceso activo que está asociado a la expresión de toda una serie de proteínas. Actualmente son muchas las proteínas que se han descrito e identificado con una potencial participación en el proceso de calcificación, entre ellas encontramos la proteína Gla de matriz, la osteocalcina, la fetuína-A, la osteopontina y la osteoprotegerina. Diversos estudios "in vitro" han asignado a muchas de estas proteínas un papel como inhibidores o promotores de la formación de la hidroxiapatita, aunque las concentraciones de calcio, fosfato y de la propia proteína que utilizan dichos estudios no son fisiológicas por lo que se hace muy difícil extrapolar los resultados obtenidos a la realidad a fin de encontrar conclusiones generalizables sobre su función inhibidora o promotora en el proceso de calcificación [HUNTER 1996; ROMBERG 1986; SILVERMAN 2004].

4.4.1. PROTEÍNA GLA DE MATRIZ

➤ Características generales

La proteína Gla de matriz (MGP) es una proteína con un peso molecular de 14 kDa que forma parte de la familia de proteínas N-terminal- γ -carboxiladas.

La funcionalidad de la MGP depende de la γ -carboxilación de sus residuos de ácido glutámico, proceso que tiene lugar por la acción de una carboxilasa que utiliza como cofactor la vitamina K, por lo que la MGP es una proteína K-dependiente (Figura 3.10).

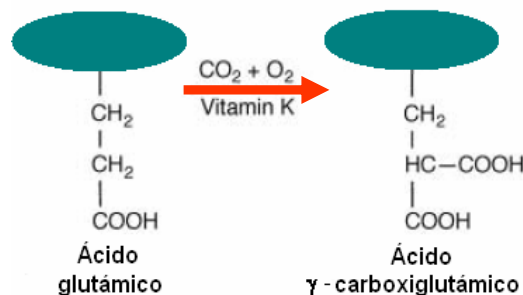


Figura 3.10. Esquema de la γ -carboxilación de los residuos de ácido glutámico. Este proceso tiene lugar por la acción de una carboxilasa que utiliza como cofactor la vitamina K.

Esta proteína está presente en el cartílago [LOESER 1992], la matriz ósea [HAUSCHKA 1989] y la pared arterial [WALLIN 1999] y su concentración plasmática es aproximadamente 20 - 100 $\mu\text{g/L}$ [COEN 2006]. En los vasos sanguíneos, parece ser que la MGP es expresada predominantemente por células del músculo liso en la túnica media y por macrófagos, células del músculo liso y células endoteliales en la túnica íntima [SHANAHAN 1994].

➤ Función en el proceso de calcificación

Se ha demostrado que los ratones deficientes en MGP (MGP $-/-$) presentan severas calcificaciones de la túnica media de la aorta y fallecen a los pocos semanas después de nacer. En estos ratones se observó que las células del músculo liso vascular perdían sus características, evolucionando a células tipo condrocito, con una posterior formación de cartilago e incluso tejido osificado [LUO 1997]. A pesar de que el mecanismo de actuación está bajo investigación, algunos autores defienden que la MGP bloquea las propiedades osteoinductivas de la BMP-2 (*Bone morphogenetic protein-2*) y en consecuencia, la MGP actúa en las calcificaciones cardiovasculares inhibiendo la funcionalidad de la BMP-2 en lugar de la cristalización de hidroxipatita [ZEBBOUDJ 2002].

4.4.2. OSTEOCALCINA

➤ Características generales

La osteocalcina (*bone-Gla-protein*) se encuentra casi exclusivamente en el hueso y es la proteína no colagenosa del hueso más abundante, representando por encima del 26% de las mismas. Posee un peso molecular de aproximadamente 5.8 kDa y está constituida por 49 aminoácidos entre los cuales se encuentran 3 residuos del ácido γ -carboxiglutámico (Gla), es también una proteína K-dependiente (Figura 3.11).

La osteocalcina es sintetizada casi exclusivamente por los osteoblastos durante la formación del hueso y, después de su producción, la mayor parte se incorpora a la matriz ósea y una pequeña fracción se libera al torrente sanguíneo [GUNDBERG 1984; HAUSCHKA 1989]. La concentración plasmática de osteopontina oscila entre 10 y 40 $\mu\text{g/L}$ [POWER 1991].

➤ Función en el proceso de calcificación

Diversos estudios han demostrado que la concentración circulante de osteocalcina es un buen marcador de la diferenciación osteoblástica y por tanto, de la formación del hueso [SUGIMORI 2003]. En humanos, se ha demostrado la presencia de osteocalcina en calcificaciones patológicas de placas ateroscleróticas y válvulas aórticas [LEVY 1983]. También se ha demostrado que ratones genéticamente modificados deficientes en osteocalcina, a pesar de que en el nacimiento presentan propiedades óseas normales, con la edad desarrollan un fenotipo caracterizado por un aumento de la masa y densidad ósea. Además, estudios histomorfométricos efectuados antes y después de realizar una ovariectomía a las ratas deficientes en osteopontina, indican que la ausencia de osteocalcina conduce a un aumento de la formación del hueso sin dañar la resorción ósea. En cuanto a sus arterias, éstas fueron aparentemente normales [DUCY 1996].

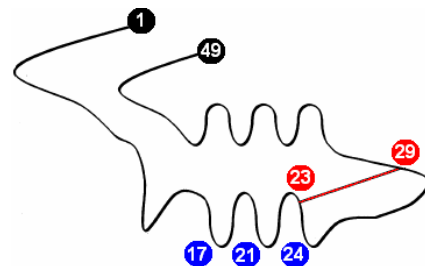


Figura 3.11. Diagrama de la estructura secundaria de la osteocalcina. Los residuos Gla se encuentran en la posición 17, 21 y 24 y el puente disulfuro está presente entre los residuos 23 y 29.

4.4.3. FETUÍNA-A

➤ Características generales

La fetuina-A (*α 2-Schmid Heremans glycoprotein*) es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 60 kDa que se produce en el hígado y cuya concentración sérica normal está comprendida entre 0.5 – 1 g/L (Figura 3.12).

➤ Función en el proceso de calcificación

Algunos autores han indicado que esta proteína limita la formación y la expansión de los cristales de hidroxiapatita y que esta acción inhibidora se debe, al menos en parte, a la formación transitoria de un complejo esférico coloidal soluble de fetuina-A, calcio y fosfato [HEISS 2003]. De esta manera, estos complejos solubles sirven para transportar y eliminar los depósitos insolubles de fosfato cálcico que se han formado en tejidos blandos (calcificación patológica). También, en ratas tratadas con etidronato, se ha observado la formación de un complejo soluble (análogo al anterior) de fosfato cálcico, fetuina-A y proteína Gla de matriz [PRICE 2002]. Estudios “in vivo” han demostrado que ratones deficientes en fetuina-A (fetuina-A -/-) desarrollan considerables calcificaciones patológicas en corazón, pulmón, piel y riñón aunque no desarrollan calcificación arterial [SCHAFFER 2003; SCHUEPPEL 2007]. Otros estudios en humanos, han establecido una relación entre las calcificaciones coronarias y aórticas con bajas concentraciones séricas de fetuina-A que se dan en pacientes dializados [KETTELER 2003; ODAMAKI 2005]. Algunos autores han observado alrededor de las calcificaciones vasculares depósitos de fetuina-A con una buena correlación con el grado de calcificación [MOE 2005].

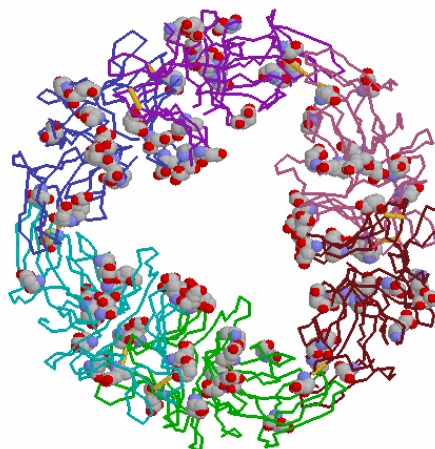


Figura 3.12. Estructura de la Fetuina-A donde se pueden apreciar en color CPK los aminoácidos con grupos carboxilo libres (ácido aspártico y ácido glutámico).

4.4.4. OSTEOPONTINA

➤ Características generales

La osteopontina (*bone sialoprotein 1*) es una glicoproteína altamente fosforilada constituida por unos 300 aminoácidos de los cuales un 30-36% aproximadamente presentan grupos carboxilo libres (ácidos aspártico o ácido glutámico) cuyo peso molecular varía entre 45 y 70 kDa como resultado de modificaciones postranscripcionales. La osteopontina es una de las proteínas óseas extracelulares no colagenosas más importantes e interviene en importantes interacciones célula-matriz y célula-célula. Esta proteína es expresada por preosteoblastos, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Considerando las calcificaciones cardiovasculares, se ha demostrado que es altamente expresada por los macrófagos en la capa íntima de las arterias, aunque también es expresada por las células del músculo liso tanto en la túnica media como en la íntima [O'BRIEN 1994; SHANAHAN 1999]. También se ha demostrado su presencia sobre válvulas bioprotéticas de cerdo con calcificación [SHEN 1997]. Su concentración plasmática normal suele estar comprendida entre 25 – 600 µg/L [BRAKORA 2004].

➤ Función en el proceso de calcificación

Esta proteína ósea extracelular no colagenosa tiene capacidad para unirse a las integrinas, incluyendo la $\alpha_v\beta_3$ -integrina, que es la más importante en la superficie celular osteoclástica [GRAVALLESE 2003]. Las integrinas son cruciales para la migración de los osteoclastos a los lugares de resorción y el posterior acoplamiento al hueso [GRAVALLESE 2003]. Así, es posible que la osteopontina interaccione fuertemente con el calcio de la hidroxiapatita, marcándola para que posteriormente los osteoclastos la reconozcan mediante la integrina específica, permitiendo de esta forma el proceso de resorción de la calcificación por parte del osteoclasto (Figura 3.13) [REINHOLT 1990].

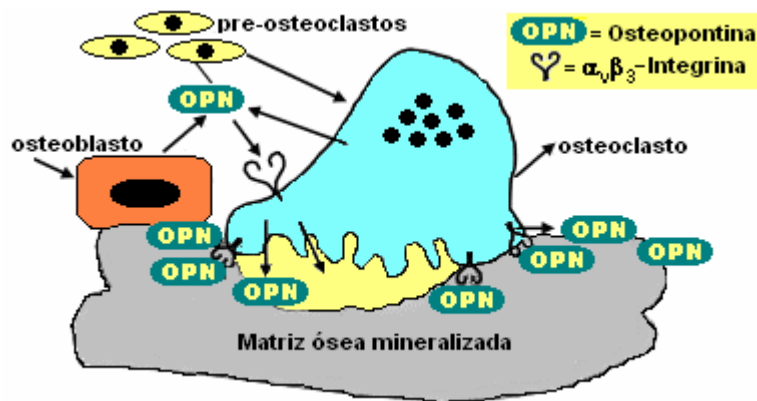


Figura 3.13. Ilustración del mecanismo de acción de la osteopontina. La osteopontina unida a la hidroxiapatita interacciona con la $\alpha_v\beta_3$ -integrina de los osteoclastos y de esta forma, permite el proceso de resorción de la calcificación por parte del osteoclasto.

Los estudios realizados en ratones hembra ovariectomizados transgénicos han demostrado que los ratones que no expresan osteopontina presentan una reducción de la masa ósea de sólo un 10%, mientras que los ratones normales sufren una reducción del 60% [YOSHITAKE 1999]. Otros estudios han indicado que ratones deficientes en osteopontina poseen de 5 a 10 veces más cantidad de pre-osteoclastos en el bazo y en la médula ósea. Por tanto, puede que la osteopontina tenga un papel clave en la función de los osteoclastos [RITTLING 1998]. En cuanto a la calcificación cardiovascular, algunos autores señalan que ratones deficientes en osteopontina y proteína Gla de matriz presentan una mayor calcificación arterial que aquellos que son deficientes sólo en proteína Gla de matriz [SPEER 2002]. Otros han demostrado que ratones deficientes en osteopontina presentan una mayor calcificación sobre fragmentos de válvula bioprostética implantados previamente subdérmicamente que los ratones normales.

Así, parece ser que la osteopontina, mediante el marcaje de la hidroxiapatita y posterior interacción con los osteoclastos, no protege contra la osteoporosis pero sí tiene un papel protector en el proceso de calcificación cardiovascular.

4.4.5. OSTEOPROTEGERINA

➤ Características generales

La osteoprotegerina (factor inhibidor de la osteoclastogénesis, OCIF) es una citoquina que forma parte de la superfamilia de receptores del TNF (*tumor necrosis factor*). Es una glicoproteína compuesta por 401 aminoácidos que posee un peso molecular de 60 kDa si se encuentra como monómero, o de 120 kDa si se encuentra como dímero unido por puentes disulfuro [SCHOPPET 2002]. Su concentración plasmática es 1-2 µg/L, aproximadamente [KNUDSEN 2007].

➤ Función en el proceso de calcificación

La osteoprotegerina (OPG) ha demostrado “in vivo” e “in vitro” inhibir la diferenciación y activación de los osteoclastos además de estimular su apoptosis, mientras que el ligando de la osteoprotegerina (OPG-L o RANKL) ha manifestado poseer funciones antagónicas. La OPG-L o RANKL es un ligando transmembrana expresado en los osteoblastos que se une a los preosteoclastos mediante el receptor específico RANK (*receptor activator of nuclear factor-κB*) activándolos y diferenciándolos a osteoclastos. A su vez, la osteoprotegerina puede unirse con el RANKL e inhibir la osteoclastogénesis. De esta manera, la OPG y RANK compiten para unirse con el RANKL creándose un sistema OPG/RANKL que es clave para la regulación de la osteoclastogénesis (Figura 3.14) [BOYLE 2003].

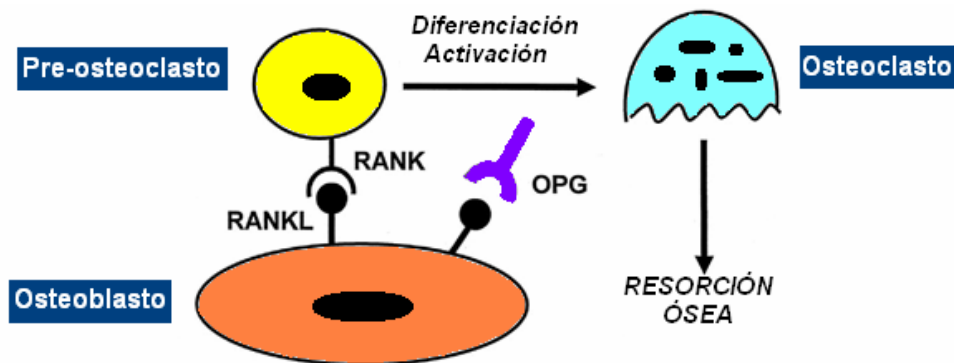


Figura 3.14. Ilustración del mecanismo de acción de la osteoprotegerina: sistema OPG/RANKL. La osteoprotegerina y el receptor RANK compiten por la unión con el ligando RANK-L y de esta manera, se regula la osteoclastogénesis.

Algunos estudios han indicado que ratones transgénicos con una sobrexpresión de osteoprotegerina en el hígado presentan altos niveles plasmáticos de esta proteína y un marcado aumento de la densidad ósea (osteopetrosis) [SIMONET 1997]. Otros, que ratones deficientes en osteoprotegerina (OPG $-/-$) presentan una importante osteoporosis (debido al aumento del número de osteoclastos) junto con calcificación en la capa media de la aorta y de las arterias renales [BUCAY 1998; ORITA 2006]. Esta situación es similar a la asociación entre la pérdida de masa ósea y la calcificación arterial en los sujetos de edad avanzada. Una posible explicación a esta paradoja sería que la disminución de osteoprotegerina provoca un aumento de la resorción ósea debido el incremento del número de osteoclastos en el tejido óseo y, en consecuencia, se produce una elevación de la sobresaturación plasmática con respecto al fosfato cálcico facilitando la formación de calcificaciones patológicas.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [ADLER 2001] Adler Y, Fink N, Spector D, Wisner I, Sagie A. Mitral annulus calcification - a window to diffuse atherosclerosis of the vascular system. *Atherosclerosis* 2001;155:1-8.
- [ATKINSON 1998] Atkinson J. Aging of arterial extracellular matrix elastin: causes and consequences. *Pathol Biol* 1998;46:555-559.
- [BADIMON 1991] Badimon L, Badimon JJ, Cohen M, Chesebro JH, Fuster V. Vessel wall - related risk factors in acute vascular events. *Drugs* 1991;42:1-9.
- [BEVILACQUA 2005] Bevilacqua M, Domínguez LJ, Rosini S, Barbagallo M. Bisphosphonates and atherosclerosis: why? *Lupus* 2005;14:773-779.
- [BOON 1997] Boon A, Cheriex E, Lodder J, Kessels F. Cardiac valve calcification: characteristics of patients with calcification of the mitral annulus or aortic valve. *Heart* 1997; 78:472-474.
- [BOYLE 2003] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-342.
- [BRAKORA 2004] Brakora KA, Lee H, Yusuf R, Sullivan L, Harris A, Colella T, Seiden MV. Utility of osteopontin as a biomarker in recurrent epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004;93:361-365.
- [BUCAY 1998] Bucay N, Saroray I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice developed early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12:1260-1268.
- [BURKE 2000] Burke AP, Taylor A, Farb A, Malcom GT, Virmani R. Coronary calcification: insights from sudden coronary death victims. *Z Kardiol* 2000;89:49-53.
- [COEN 2006] Coen G, Ballanti P, Balducci A, Grandi F, Manni M, Mantella D, Pierantozzi A, Ruggeri M, Sardella D, Sorbo G, Bonucci E. Renal osteodystrophy: α -Heremans Schmid glycoprotein/fetuin-A, matrix GLA protein serum levels, and bone histomorphometry. *Am J Kidney Dis* 2006;48:106-113.
- [COLLI 2007] Colli A, Gherli T, Mestres CA, Pomar JL. Degeneration of native and tissue prosthetic valve in aortic position: do statins play an effective role in prevention? *Int J Cardiol* 2007;116:144-52.
- [DAO 2005] Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, Moreau P. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: Impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc Res* 2005;66:307-317.
- [DETRANO 2000] Detrano RC, Doherty TM, Davies MJ, Stary HC. Predicting coronary events with coronary calcium: pathophysiologic and clinical problems. *Curr Probl Cardiol* 2000;25:374-402.
- [DOHERTY 2003] Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA., Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, Dunstan CR, Shah PK, Rajavashisth TB. Calcification in atherosclerosis: Bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:11201-11206.
- [DUCY 1996] Ducky P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996;382:448-452.
- [DULCE 1960] Dulce HJ. Biochemistry of ossification. III. Mineral content, ground substance composition, and enzymic activities in callus tissue and in rachitic bones of rats. *Z Physiol Chem* 1960;320:1-10.
- [ELLIOT 1994] Elliott RJ, McGrath LT. Calcification of the human thoracic aorta during aging. *Calcif Tissue Int* 1994;54:268-273.
- [EPPLE 2001] Epple M, Lanzer P. How much interdisciplinarity is required to understand vascular calcifications? Formulation of four basic principles of vascular calcification. *Z Kardiol* 2001;90:2-5
- [FARZANEH-FAR 2001] Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Shanahan C, Weissberg PL. Vascular and valvar calcification: recent advances. *Heart* 2001;85:13-17.
- [FINK 2001] Fink N, Adler Y, Wisner I, Sagie A. Association between mitral annulus calcification and atherosclerosis. *Harefuah* 2001;140:838-843,894.
- [FLEISCH 1961] Fleisch H, Neuman WF. Mechanisms of calcification: role of collagen, polyphosphates, and phosphatase. *Am J Physiol* 1961;200:1296-1300.
- [FLEISCH 1962A] Fleisch H, Bisaz S. Mechanism of calcification: inhibitory role of pyrophosphate. *Nature* 1962;195:911.
- [FLEISCH 1962B] Fleisch H, Bisaz S. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Amer J Physiol* 1962;203:671-675.
- [FLEISCH 1965] Fleisch H, Schibler D, Maerki J, Frossard I. Inhibition of aortic calcification by means of pyrophosphate and polyphosphates. *Nature* 1965;207:1300-1301.

- [FLEISCH 1966] Fleisch H, Russell RGG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxylapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 1966; 212:901-903.
- [FLEISCH 1970] Russell RG, Fleisch H. Pyrophosphate, phosphonates and pyrophosphatases in the regulation of calcification and calcium homeostasis. *Proc R Soc Med* 1970; 63: 876.
- [FLEISCH 1998] Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998;19:80-100.
- [FRANCIS 1969] Francis MD, Russell RG, Fleisch H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science* 1969;165:1264-1266.
- [FREEMAN 2005] Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* 2005;11:3316-3326.
- [FULKERSON 1979] Fulkerson PK, Beaver BM, Auseon JC, Graber HL. Calcification of the mitral annulus: etiology, clinical associations, complications and therapy. *Am J Med* 1979;66:967-977.
- [GIACHELLI 2004] Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2959-2964.
- [GOA 1998] Goa KL, Balfour JA. Risedronate. *Drugs Aging* 1998;13:83-91.
- [GRASES 2000] Grases F, Costa-Bauzá A, Söhnel O (2000) *Cristalización en disolución. Conceptos básicos.* Reverté, Barcelona.
- [GRASES 2005] Grases F, Prieto RM, Costa-Bauzá A. Calcificaciones cardiovasculares: factores etiológicos implicados. *Cir Cardiovasc* 2005;12:291-297.
- [GRAVALLESE 2003] Gravallesse EM. Osteopontin: a bridge between bone and the immune system. *J Clin Invest* 2003;112:147-149.
- [GREEN 1994] Green Jr, Muller K, Jaeggi KA. Preclinical pharmacology of CGP 42446, a new, potent, heterocyclic bis-phosphonate compound. *J Bone Miner Res* 1994;9:745-751.
- [GRUNKEMEIER 1990] Grunkemeier GL, Rahimtoola SH. Artificial heart valves. *Annu Rev Med* 1990;41:251-263.
- [GUNDBERG 1984] Gundberg CM, Hauschka P V, Lian JB, Gallop PM. Osteocalcin: isolation, characterization, and detection. *Methods Enzymol* 1984;107:516-544.
- [GUSTAFSSON 2004] Gustafsson M, Boren J. Mechanism of lipoprotein retention by the extracellular matrix. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:505-514.
- [HAUSCHKA 1989] Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological Rev* 1989;69:990-1047.
- [HEISS 2003] Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grotzinger J, Yamamoto K, Renne T, Jahnen-Dechent W: Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem* 2003;278:1333-1334.
- [HUMAN 2001] Human P, Zilla P. Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure. *Ann Thorac Surg* 2001;71:385-388.
- [HUNT 2002] Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T, Wolfe M, Neschis D, Milner R, Scoll B, Cusack A, Mohler ER 3rd. Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke* 2002; 33:1214-1219.
- [HUNTER 1996] Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 1996;317:59-64.
- [IBELS 1979] Ibels LS, Alfrey AC, Huffer WE, Craswell PW, Anderson JT, Weil R 3rd. Arterial calcification and pathology in uremic patients undergoing dialysis. *Am J Med* 1979;66:790-796.
- [JEZIORSKA 1998] Jeziorska M, McCollum C, Wooley DE. Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries. *Virchows Arch* 1998;433:559-565.
- [JONO 2000] Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2000;87:10-17.
- [JORGE-HERRERO 2005] Jorge-Herrero E, Garcia JM, Del Castillo-Olivares J.L. Tissue heart valve mineralization: Review of calcification mechanisms and strategies for prevention. *J Appl Biomat Biomech* 2005;3:67-82.
- [KATSUDA 2003] Katsuda S, Kaji T. Atherosclerosis and extracellular matrix. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:267-274.
- [KEELEY 1974] Keeley FW, Partridge SM. Amino acid composition and calcification of human aortic elastin. *Atherosclerosis* 1974;19:287-296.
- [KETTELER 2003] Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Böhm R, Metzger T, Wanner C, Jahnen-Dechent W, Floege J. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* 2003;361:827-833.
- [KING 1971] King WR, Francis MD, Michael WR. Effect of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate [disodium dihydrogen (1-hydroxyethylidene)diphosphonate] on bone formation. *Clin Orthop Relat Res* 1971;78: 251-270.

- [KINGMA 1990] Kingma JG Jr, Roy PE. Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate on arterial calcinosis induced by hypervitaminosis D: a morphologic investigation. *J Exp Pathol* 1990;71:145-153.
- [KNUDSEN 2007] Knudsen ST, Jeppesen P, Poulsen PL, Andersen NH, Bek T, Schmitz O, Mogensen CE, Rasmussen LM. Plasma concentrations of osteoprotegerin during normo- and hyperglycaemic clamping. *Scand J Clin Lab Invest* 2007;67:135-142.
- [KOKUBO 2001] Kokubo T, Kim HM, Kawashita M, Nakamura T. Process of calcification on artificial materials. *Z Kardiol* 2001;90:86-91.
- [LEHTO 1996] Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:978-983.
- [LEVY 1983] Levy RJ, Gundberg C, Scheinman R. The identification of the vitamin K-dependent bone protein osteocalcin as one of the gamma-carboxyglutamic acid containing proteins present in calcified atherosclerotic plaque and mineralized heart valves. *Atherosclerosis* 1983;46:49-56
- [LEVY 1987] Levy RJ, Schoen FJ, Lund SA, Smith MS. Prevention of leaflet calcification of bioprosthetic heart valves with diphosphonate injection therapy. Experimental studies of optimal dosages and therapeutic durations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;94:551-557.
- [LIBBY 2002] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874.
- [LOESER 1992] Loeser R, Carlson CS, Tulli H, Jerome WG, Miller L, Wallin R. Articular-cartilage matrix gamma-carboxyglutamic acid-containing protein. Characterization and immunolocalization. *Biochem J* 1992;282:1-6.
- [LOMASHVILI 2004] Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1392-1401.
- [LUO 1997] Luo G, Ducey P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix Gla protein. *Nature* 1997;386:78-81.
- [LUSIS 2000] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-241.
- [MAZZAFERRO 2007] Mazzaferro S, Pasquali M, Pugliese F, Barresi G, Carbone I, Francone M, Sardella D, Taggi. Serum levels of calcification inhibition proteins and coronary artery calcium score: comparison between transplantation and dialysis. *Am J Nephrol* 2007;27:75-83.
- [MEYER 1984] Meyer JL. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch Biochem Biophys* 1984;231:1-8.
- [MOE 2005] Moe SM, Reslerova M, Ketteler M, O'Neill K, Duan D, Koczman J, Westenfeld R, Jahnen-Dechent Y, Chen NX. Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int* 2005;67:2295-2304.
- [MOHLER 2001] Mohler ER 3rd, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 2001;103:1522-1528.
- [MUHLBAUER 1991] Muhlbauer RC, Bauss F, Schenk R, Janner M, Bosies E, Strein K, Fleisch H. BM 21.0955, a potent new bisphosphonate to inhibit bone resorption. *J Bone Miner Res* 1991;6:1003-1011.
- [MUHLEMANN 1970] Muhlemann HR, Bowles D, Schait A, Bernimoulin JP. Effect of diphosphonate on human supragingival calculus. *Helv Odontol Acta* 1970;14:31-33.
- [O'BRIEN 1994] O'Brien ER, Garvin MR, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM, Giachelli CM. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1648-1656.
- [O'BRIEN 1995] O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE, Otto CM. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 1995;92:2163-2168.
- [O'BRIEN 1996] O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM. Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:523-532.
- [ODAMAKI 2005] Odamaki M, Shibata T, Takita T, Kumagai H. Serum fetuin-A and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2005;68:2915-2916.
- [ORITA 2007] Orita Y, Yamamoto H, Kohno N, Sugihara M, Honda H, Kawamata S, Mito S, Soe NN, Masao Y. Role of osteoprotegerin in arterial calcification. Development of new animal model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2058-2064.
- [OTTO 1994] Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 1994;90:844-853.
- [PAPAPOULOS 1988] Papapoulos SE, Hoekman K, Löwik CW, Vermeij P, Bijvoet OL. Application of an in vitro model and a clinical protocol in the assessment of the potency of a new bisphosphonate. *J Bone Miner Res* 1988;4:775-781.

- [POTOKAR 1978] Potokar M, Schmidt-Dunker M. The inhibitory effect of new diphosphonic acids on aortic and kidney calcification in vivo. *Atherosclerosis* 1978;30:313-320.
- [POWER 1991] Power MJ, O'Dwyer B, Breen E, Fottreil PF. Osteocalcin concentrations in plasma prepared with different anticoagulants. *Clin Chem* 1991;37:281-284.
- [PRICE 2001A] Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:817-824.
- [PRICE 2001B] Price PA, Buckley JR, Williamson MK. The amino bisphosphonate ibandronate prevents vitamin D toxicity and inhibits vitamin D-induced calcification of arteries, cartilage, lungs and kidneys in rats. *J Nutr* 2001;131:2910-2915.
- [PRICE 2002] Price PA, Thomas GR, Pardini AW, Figueira WF, Caputo JM, Williamson MK: Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats. *J Biol Chem* 2002;277:3926-3934.
- [PROUDFOOT 2001A] Proudfoot D, Shanahan CM. Biology of calcification in vascular cells: intima versus media. *Herz* 2001;26:245-251.
- [PROUDFOOT 2001B] Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Farzaneh-Far A, Shanahan CM, Weissberg PL. The role of apoptosis in the initiation of vascular calcification. *Z Kardiol* 2001;90:43-46.
- [REINHOLT 1990] Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegard D. Osteopontin - a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4473-4475.
- [RITTLING 1998] Rittling SR, Matsumoto HN, McKee MD, Nanci A, An XR, Novick KE, Kowalski AJ, Noda M, Denhardt DT. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res* 1998;13:1101-1111.
- [ROMBERG 1986] Romberg RW, Werness PG, Riggs BL, Mann KG. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* 1986;25:1176-1180.
- [ROSENBLUM 1977] Rosenblum IY, Black HE, Ferrell JF. The effects of various diphosphonates on a rat model of cardiac calciphylaxis. *Calcif Tissue Res* 1977;23:151-159.
- [ROSS 1999] Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
- [RUSSELL1970] Fleisch HA, Russell RG, Bisaz S, Muhlbauer RC, Williams DA. The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur J Clin Invest* 1970;1:12-18.
- [RUSSELL 2006] Russell R, Graham G. Bisphosphonates: From Bench to Bedside. *Ann NY Acad Sci* 2006;1068:367-401.
- [RUTSCH 2001] Rutsch F, Vaingankar S, Johnson K, Goldfine I, Maddux B, Schauerte P, Kalhoff H, Sano K, Boisvert WA, Superti-Furga A, Terkeltaub R. PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification. *Am J Cardiovasc Pathol* 2001;158:543-554.
- [SCHÄFER 2003] Schäfer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, Muller-Esterl W, Schinke T, Jahn-Dechent W. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* 2003;112:357-366.
- [SCHENK 1986] Schenk R, Eggli P, Fleisch H, Rosini S. Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. *Calcif Tissue Int* 1986;38:342-349.
- [SCHIBLER 1968] Schibler D, Russell RG, Fleisch H. Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D3 in rats. *Clin Sci* 1968;35:363-372.
- [SCHLIEPER 2007] Schlieper G, Westenfeld R, Brandenburg V, Ketteler M. Inhibitors of calcification in blood and urine. *Semin Dial* 2007;20:113-121.
- [SCHOEN 1992] Schoen FJ, Levy RJ, Piehler HR. Pathological considerations in replacement cardiac valves. *Cardiovasc Pathol* 1992;1:29-52.
- [SCHOEN 1999] Schoen FJ, Levy RJ. Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res* 1999;47:439-465.
- [SCHOPPET 2002] Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:549-553.
- [SCHWARZ 2000] Schwarz U, Buzello M, Ritz E, Stein G, Raabe G, Wiest G, Mall G, Amann K. Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:218-223.
- [SELL 1965] Sell S, Scully RE. Aging changes in the aortic and mitral valves. Histologic and histochemical studies, with observations on the pathogenesis of calcific aortic stenosis and calcification of the mitral annulus. *Am J Pathol* 1965;46:345-355.

- [SHANAHAN 1994] Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. High expression of genes for calcification - regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;93:2393-2402.
- [SHANAHAN 1999] Shanahan CM, Cary NRB, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 1999;100:2168-2176.
- [SHEN 2001] Shen M, Marie P, Farge D, Carpentier S, De Pollak C, Hott M, Chen L, Martinet B, Carpentier A. Osteopontin is associated with bioprosthetic heart valve calcification in humans. *Ann Thorac Surg* 2001;71:413-416.
- [SILVERMAN 2004] Silverman L, Boskey AL. Diffusion systems for evaluation of biomineralization. *Calcif Tissue Int* 2004;75:494-501.
- [SIMIONESCU 2004] Simionescu DT. Prevention of calcification in bioprosthetic heart valves: challenges and perspectives. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:1971-1985.
- [SIMONET 1997] Simonet S, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-319.
- [SMITH 1971] Smith R, Russel RGG, Bishop M. Diphosphonates and Paget's disease of bone. *Lancet* 1971;1:945-947.
- [SPEER 2002] Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, Karsenty G, Giachelli CM. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med* 2002;196:1047-1055.
- [STONEMAN 2004] Stoneman VEA, Bennett MR. Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications. *Clin Sci* 2004;107:343-354.
- [STURZENBERGER 1971] Sturzenberger OP, Swancar JR, Reiter G. Reduction of dental calculus in humans through the use of a dentifrice containing a crystal-growth inhibitor. *J Periodontol* 1971;42:416-419.
- [SUGIMORI 2003] Sugimori K, Kawaguchi Y, Ohmori K, Kanamori M, Ishihara H, Kimura T. Significance of bone formation markers in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Spine* 2003;28:378-379.
- [TERKELTAUB 2001] Terkeltaub RA. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: 1-11.
- [TINTUT 2001] Tintut Y, Demer LL. Recent advances in multifactorial regulation of vascular calcification. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:555-560.
- [TOMAZIC 1995] Tomazic BB, Edwards WD, Schoen FJ. Physicochemical characterization of natural and bioprosthetic heart valve calcific deposits: implications for prevention. *Ann Thorac Surg* 1995;60:S322-S327.
- [TOMAZIC 2001] Tomazic BB. Physicochemical principles of cardiovascular calcification. *Z Kardiol*. 2001;90:68-80.
- [VYAVAHARE 1997] Vyavahare NR, Chen W, Joshi RR, Lee CH, Hirsch D, Levy J, Schoen FJ, Levy RJ. Current progress in anticalcification for bioprosthetic and polymeric heart valves. *Cardiovasc Pathol* 1997;6:219-229.
- [WALLIN 1999] Wallin R, Cain D, Sane DC. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells - a cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost* 1999;82:1764-1767.
- [WALLIN 2001] Wallin R, Wajih N, Greenwood GT, Sane DC. Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Med Res Rev* 2001;21:274-301.
- [WEXLER 1996] Wexler L, Brundage B, Crouse J, Detrano R, Fuster V, Maddahi J, Rumberger J, Stanford W, White R, Taubert K. Coronary artery calcification: pathophysiology, epidemiology, imaging methods, and clinical implications. A statement for health professionals from the American Heart Association. Writing Group. *Circulation* 1996;94:1175-1192.
- [YOSHITAKE 1999] Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin - deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8156-8160.
- [ZEBBOUDJ 2002] Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix Gla protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 2002;277:4388-4394.

Experimental, resultados y discusión



En este capítulo de la tesis se han estudiado los mecanismos de formación de las calcificaciones cardiovasculares así como el efecto de diferentes inhibidores de la cristalización sobre dicho proceso a través de cinco trabajos diferentes:

ARTÍCULO ORIGINAL 3.1. Un trabajo "in vitro" que permite estudiar las calcificaciones de las válvulas bioprostéticas de pericardio bovino así como el efecto de diferentes inhibidores de la cristalización sobre este tipo de calcificación. En este trabajo se desarrolló un sistema en flujo donde fragmentos de pericardio bovino fijados con glutaraldehído se encuentran ubicados en cámaras a través de las cuales circula un fluido artificial de composición iónica similar a la sangre.

ARTÍCULO ORIGINAL 3.2. Un estudio "in vivo" en animales de experimentación que permite estudiar la formación de las calcificaciones patológicas así como el papel del fitato y la osteopontina en dicho proceso. En este estudio, dos grupos de ratas (uno alimentado con una dieta con fitato y el otro alimentado con una dieta sin fitato) fueron sometidos a un tratamiento inductor de la calcinosis mediante inyecciones subcutáneas de permanganato en la región interescapular. Después de 2, 5, 8 y 10 días desde el tratamiento inductor a la calcinosis, cuatro ratas de cada grupo fueron sacrificadas para realizar las determinaciones correspondientes en los tejidos lesionados.

ARTÍCULO ORIGINAL 3.3. Un trabajo "in vivo" en animales de experimentación a fin de evaluar el efecto del fitato y el etidronato como inhibidor de las calcificaciones aórticas y cardíacas. En este estudio se establecieron tres grupos de 6 ratas: un grupo control (no sujeto a tratamiento inductor de la calcinosis), un grupo no tratado (sujeto a tratamiento inductor de la calcinosis) y un grupo tratado con fitato (sujeto a un tratamiento inductor de la calcinosis y a un tratamiento tópico diario de 4 g de crema con un 2% de fitato en forma de sal potásica). El tratamiento inductor consistía en vitamina D (1 inyección intramuscular de 300000 IU/kg) y nicotina (2 administraciones orales de 25 mg/kg). Después de 60 horas desde el tratamiento inductor, todas las ratas fueron sacrificadas para realizar las determinaciones correspondientes en orina, aorta y corazón.

ARTÍCULO ORIGINAL 3.4: Un trabajo "in vivo" en animales de experimentación a fin de evaluar y comparar la capacidad del fitato y el etidronato para actuar como inhibidores de las calcificaciones aórticas y cardíacas así como el efecto de distintos tratamientos inductores de la calcificación. Para ello, se establecieron tres grupos de ratas: un grupo placebo, un grupo tratado con fitato (administrado por vía subcutánea en dosis de 0.825 $\mu\text{mol/kg-día}$) y un grupo tratado con etidronato (administrado por vía subcutánea en dosis de 0.825 $\mu\text{mol/kg-día}$). En este estudio, todos los animales fueron sometidos a un tratamiento inductor a la calcinosis consistente en 3 inyecciones subcutáneas de 500000 IU/kg de vitamina D. Después de 96 horas desde el tratamiento inductor, todas las ratas fueron sacrificadas para realizar las determinaciones correspondientes en aorta y corazón.

ARTÍCULO ORIGINAL 3.5: Un trabajo “in vivo” en animales de experimentación a fin estudiar y evaluar el efecto del fitato sobre las calcificaciones cardiovasculares ligadas al envejecimiento. Para ello, cuatro grupos de ratas de 10 semanas fueron alimentados con cuatro dietas diferentes (dos de ellas sin fitato y dos de ellas con un 1% de fitato) y a la edad de 76 semanas todas las ratas fueron sacrificadas para realizar las determinaciones correspondientes en diferentes órganos y tejidos.

Artículo original 3.1.

***El fitato inhibe la calcificación de pericardio
bovino "in vitro"***



ELSEVIER

Cardiovascular Pathology xx (2007) xxx–xxx

**CARDIOVASCULAR
PATHOLOGY**

Original Article

Phytate inhibits bovine pericardium calcification in vitro[☆]

Félix Grases^{a,b,*}, Pilar Sanchis^{a,b}, Antonia Costa-Bauzá^{a,b}, Oriol Bonnin^c, Bernat Isern^{a,b},
Joan Perelló^{a,b}, Rafel M. Prieto^{a,b}

^aLaboratory of Renal Lithiasis Research, University Institute of Health Sciences Research (IUNICS), University of Balearic Islands, Palma of Mallorca, Spain

^bCIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CB06/03), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^cUniversity Hospital Son Dureta, Palma of Mallorca, Spain

Received 6 November 2006; received in revised form 19 June 2007; accepted 16 August 2007

Abstract

Objective: The present study examined the inhibitory effects of pyrophosphate, etidronate, and phytate on bovine pericardium calcification in vitro. **Methods:** Bovine pericardium was glutaraldehyde fixed and then placed in a flow chamber in the presence of a synthetic physiological fluid alone (control) or the fluid plus various concentrations of pyrophosphate, etidronate, or phytate. Following a 96-h incubation, fragments were removed and assayed for calcification by measuring calcium and phosphorus levels. **Results:** The data indicated that both pyrophosphate and etidronate at 1 mg/l (5.75 and 4.95 μ M, respectively) inhibited bovine pericardium calcification, whereas neither agent had an effect at 0.5 mg/l (2.87 and 2.47 μ M, respectively). Phytate was the most potent inhibitor of calcification, and the effects of this agent were apparent at levels as low as 0.25 mg/l (0.39 μ M). **Conclusions:** While pyrophosphate, etidronate, and phytate were all able to inhibit bovine pericardium calcification in vitro, phytate was found to be the most effective. © 2007 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Crystallization inhibitor; Cardiovascular calcification; Bovine pericardium; Pyrophosphate; Etidronate; Phytate

1. Introduction

Cardiovascular calcification is highly correlated with several serious diseases such as valve stenosis and myocardial infarction [1,2]. There appear to be three major factors that influence the process of arterial wall calcification [3,4]. The first of these factors is nucleation of calcium phosphate (hydroxyapatite) by dead cells and/or their membranes. In general, calcified tissue development requires a preexisting injury to act as an inducer (heterogeneous nucleant) of calcification, while disease progression depends on the presence of other promoter factors such as hypercalcemia and/or hyperphosphatemia.

The second major factor in arterial wall calcification is a deficiency in the level of calcification repressor factors (cellular defense mechanisms and/or crystallization inhibitors). In mammalian tissues, there are several cellular proteins that regulate calcification. Those proteins can stimulate or inhibit macrophage activities that destroy hydroxyapatite deposits (i.e., osteoclast-like activity). The common characteristic of these proteins is calcium ion affinity. These proteins can be classified into two groups based on chemical/structural properties: phosphoproteins and carboxyproteins. Major phosphoproteins include osteopontin [5–9] and osteoprotegerin [10–12], and a major carboxyprotein is matrix Gla protein [13–15] or bone Gla protein, also known as osteocalcin [16,17]. These cell-activity-modulating proteins have also been shown to act as crystallization inhibitors [18–20]. However, in vitro studies that afforded these results involved protein, free calcium, and phosphate concentrations that were outside the typical physiological ranges. Some of these proteins have also been reported to be calcification promoters due to heterogeneous nucleant activity [21–23]. Despite the reports that

[☆] This work was supported by the Conselleria d'Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears (grant PRDIB-2002GC1-04) and by project grant CTQ2006-05640/BQU from the Spanish Ministry of Science and Technology.

* Corresponding author. Laboratory of Renal Lithiasis Research, Faculty of Sciences, University of Balearic Islands, 07122 Palma of Mallorca, Spain. Tel.: +34 971173257; fax: +34 971173426.

E-mail address: fgrases@uib.es (F. Grases).

these proteins have crystallization-inhibiting/promoting activity, it is likely that their major role in calcification is as modulators of osteoclast/osteoblast-like cell activity and cell differentiation.

The third major factor that influences arterial wall calcification is the formation of irreversible bone-like structures in advanced atherosclerotic lesions [3].

Crystallization inhibitors are substances that obstruct or prevent crystal development. Normally, they are nonsignaling molecules that bind to the crystal nucleus or crystal faces and, as a consequence, prevent or disturb crystal development. A number of molecules have been reported to inhibit crystallization associated with cardiovascular calcifications, including pyrophosphate [24], bisphosphonates (e.g., etidronate, alendronate, and ibandronate) [25–27], and phytate (myo-inositol hexakisphosphate) [28].

The life span of bioprosthetic valve implants could be significantly increased by inhibiting valve calcification. A decrease in such calcification has been reported in valves that were pretreated during fabrication such that the surface material contained a bisphosphonate (aminobisphosphonate) [29,30], which leached from the surface at a rate of approximately 10% per 21 days [29]. Systemic administration of crystallization inhibitors would also provide bioprosthetic valve protection and would not require modification of the valve fabrication process. While bisphosphonates have been used in such a manner, concerns regarding the secondary effects of these synthetic compounds exist. In contrast, the crystallization inhibitor phytate is a natural product that is present in all mammalian cells and tissues [31]. The systemic concentration of phytate can be altered via diet [31,32], and adequate consumption levels of phytate have not been found to cause pathological side effects [33]. It is possible that increased consumption of phytate via diet may protect against bioprosthetic valve calcification.

The present study investigated the ability of the crystallization inhibitors pyrophosphate, etidronate, and phytate to inhibit bovine pericardium calcification in vitro.

2. Methods

2.1. Bovine pericardium fixation

Fresh bovine pericardium obtained from a local slaughterhouse was placed on ice, transported to the laboratory, and then washed in 0.9% cold saline (4°C) prior to fixation. The pericardium was fixed for at least 7 days at 4°C in a solution of 0.625% vol/vol glutaraldehyde (pH 7.4; Sigma-Aldrich) and 0.06 M potassium dihydrogen phosphate salt (Panreac Quimica SA) [34].

2.2. Synthetic fluid

A synthetic fluid with ionic concentrations corresponding to those of normal human plasma was prepared by mixing

Table 1
Synthetic fluid composition

Solution A (mM)		Solution B (mM)		
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2.0	NaHCO ₃	32.0	t1.4
KCl	8.0	Na ₂ CO ₃	28.0	t1.5
CaCl ₂	2.4	NaCl	91.0	t1.6
		Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.0	t1.7

equal volumes of Solutions A and B (for solution compositions, see Table 1). The pH of both solutions was adjusted to 7.4. Solutions were stored at 4°C and used within 3 days of preparation. Chemicals of reagent-grade purity were dissolved in deionized and redistilled water. All solutions were filtered through a 0.45-μm pore filter before use. The solutions were supplemented with the following antibacterial agents: 50 mg/l streptomycin (streptomycin sulfate; Sigma-Aldrich), 9.1 mg/l amoxicillin, and 0.9 mg/l clavulanic acid (from a premixed reagent comprising 2 g amoxicillin/200 mg clavulanic acid; CombinoPharm SL).

2.3. Bovine pericardium calcification flow system

Bovine pericardium was cut into 49-mm² square fragments. A fragment was placed in each of four polypropylene hermetic flasks (1.7 in diameter and 3.5 cm in length; Fig. 1) in a temperature-controlled (37°C) chamber. Synthetic fluid was introduced, using a peristaltic pump, at a constant flow rate of 50 ml/min through the bottom of each flask. Various physiologically relevant concentrations of pyrophosphate (sodium salt; Merck), etidronate (acid form; Fluka), and phytate (sodium salt; Sigma-Aldrich) were added to the synthetic fluid. Control incubations contained no such additions. The pericardium was incubated for 96 h, and the incubation fluid was replaced with fresh fluid every 48 h. Cross sections and surfaces of bovine pericardium fragments were examined for calcification using a Hitachi S-530 scanning electron microscope equipped with an energy-dispersive X-ray microanalysis unit.

Each experiment was repeated four times using pieces of bovine pericardium obtained from different animals but from the same locations (homogeneous zones devoid of additional connective tissues, such as the mediastinum).

2.4. Calcium and phosphorus determination

After 96 h in the flow system, pericardium fragments were lyophilized and weighed. Fragments were digested in a 1:1 HNO₃:HClO₄ mixture in a sand bath until the solution was clear. Digested samples were then diluted with distilled water to a final volume of 10 ml. Calcium and phosphorus concentrations were determined using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (Optima 5300DV; Perkin Elmer SL) and a corresponding calibration curve.

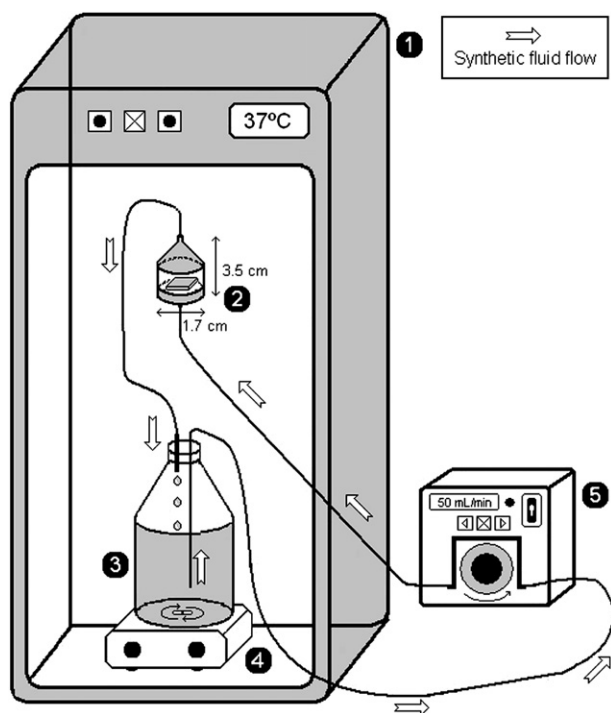


Fig. 1. Diagram of the experimental flow system device used to study bovine pericardium calcification. (1) Temperature-controlled chamber; (2) flask containing a fragment of the bovine pericardium; (3) synthetic fluid; (4) magnetic stirrer; (5) peristaltic pump.

2.5. Complexation of calcium crystallization inhibitors (pyrophosphate, etidronate, and phytate)

Crystallization inhibitors manifest their effects at significantly lower concentrations than chelating agents. Crystallization inhibitors prevent or disturb crystal formation and/or development by interacting with the crystal nucleus or crystal faces. This kinetic mechanism of crystal inhibition differs from that of chelating substances that act by decreasing target ion supersaturation. The present study examined the role of pyrophosphate, etidronate, and phytate as crystallization inhibitors. These compounds are strong crystallization inhibitors and weak chelators, while compounds such as EDTA are strong chelators and weak crystallization inhibitors [35]. The present study was performed to ensure that the observed effects of pyrophosphate, etidronate, and phytate were not due to calcium chelation that may have affected free calcium ion levels. Potentiometric analysis using a selective calcium electrode (Ingold) and a potentiometer (Crison 2002) has found that there was a negligible change in the free calcium concentration in the presence of pyrophosphate, etidronate, or phytate for the studied conditions. These findings were consistent with experimental conditions in which the concentration of inhibitors in the synthetic fluid was on the order of 10^{-6} M, while the free calcium ion concentration was 2.4×10^{-3} M, similar to those found physiologically.

2.6. Statistical analysis

Values in tables and figures are presented as mean±S.E. Student's *t* tests were used to determine the significance of differences between means. Conventional Windows software was used for statistical computations. $P < .05$ was considered to indicate a significant difference.

3. Results

The effect of pyrophosphate, etidronate, and phytate on the development of bovine pericardium calcification was determined. The levels of calcium and phosphorus in the lyophilized pericardium fragments were measured following a 96-h incubation under calcifying conditions. The pericardium incubated in the presence of 1.0 mg/l pyrophosphate showed less calcification (48.6 ± 3.4 mg calcium/g lyophilized fragment and 24.9 ± 1.8 mg phosphorus/g lyophilized fragment) than the control pericardium (61.4 ± 2.2 mg calcium/g lyophilized fragment and 31.2 ± 1.4 mg phosphorus/g lyophilized fragment) (Fig. 2). The pericardium incubated in the presence of 0.5 mg/l pyrophosphate had similar levels of calcification as the control pericardium (60.3 ± 5.9 mg calcium/g lyophilized fragment and 31.8 ± 3.4 mg phosphorus/g lyophilized fragment) (Fig. 2). The pericardium incubated in the presence of 1 mg/l etidronate had less calcification than the control pericardium (52.9 ± 2.0 mg calcium/g lyophilized fragment and 29.4 ± 1.5 mg phosphorus/g lyophilized fragment), while 0.5 mg/l etidronate had no calcification-inhibitory effect (60.2 ± 3.3 mg calcium/g lyophilized fragment and 31.2 ± 1.6 mg phosphorus/g lyophilized fragment) (Fig. 2). The most potent calcification-inhibitory effects were observed in phytate incubations. Incubations in the presence of 0.25, 0.5, and 1.0 mg/l phytate resulted in concentration-dependent decreases in calcification (36.2 ± 3.3 mg calcium/g lyophilized fragment and 21.0 ± 1.8 mg phosphorus/g lyophilized fragment; 29.6 ± 3.1 mg calcium/g lyophilized fragment and 17.7 ± 1.9 mg phosphorus/g lyophilized fragment; and 14.6 ± 1.1 mg calcium/g lyophilized fragment and 8.2 ± 0.7 mg phosphorus/g lyophilized fragment, respectively). Bovine pericardium fragments were incubated in either synthetic fluid alone or the synthetic fluid plus 1 mg/l phytate, and were then examined in both surface and cross-sectional planes using scanning electron microscopy. These images showed that calcification occurred throughout the thickness of the tissue and that phytate inhibited this calcification (Figs. 3B and 4B). Percent inhibition by the three compounds is shown in Table 2.

4. Discussion

The present in vitro study examined the effects of pyrophosphate, etidronate, and phytate on the development of calcifications in bovine pericardium. The study found that,

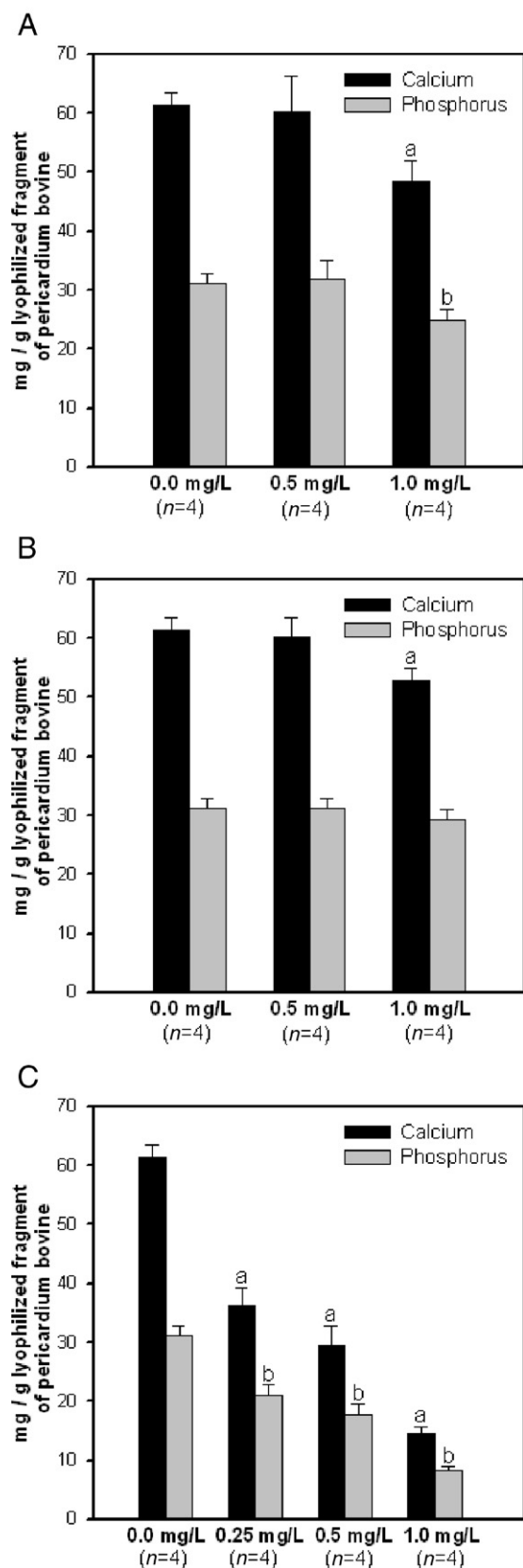


Fig. 2. Effects of different agents on the development of bovine pericardium calcification. (A) Pyrophosphate; (B) etidronate; (C) phytate. ^a $P < 0.05$ versus calcium levels of the control pericardium. ^b $P < 0.05$ versus phosphorus levels of the control pericardium.

while all three agents inhibited calcification, phytate was the most potent because it has a greater capacity to inhibit hydroxyapatite crystallization, compared to pyrophosphate and etidronate [36]. Importantly, the present experiments used the agents at physiologically relevant concentrations.

Phytate (myo-inositol hexakisphosphate) is found in abundance in plant seeds. While phytate is also found in all mammalian organs, tissues, and fluids, the levels are low [31,32] and are dependent upon exogenous supply either orally [31,32] or topically [37,38]. Phytate is less toxic than synthetic bisphosphonates and has also been shown to inhibit calcium salt crystallization in urine and soft tissues [39,40], protecting against renal calculi development [41,42] and demonstrating a higher capacity to prevent vascular calcifications than etidronate [43]. Administration of phytate as natural food salt (phytin: calcium magnesium phytate) at amounts that provide maximum absorption equivalent to doses that correspond to the consumption of the so-called “Mediterranean diet” (1–2 g phytate/diet) was not found to have any chronic effect [33]. In fact, a previous work found that phytate only manifested toxic effects at very high doses

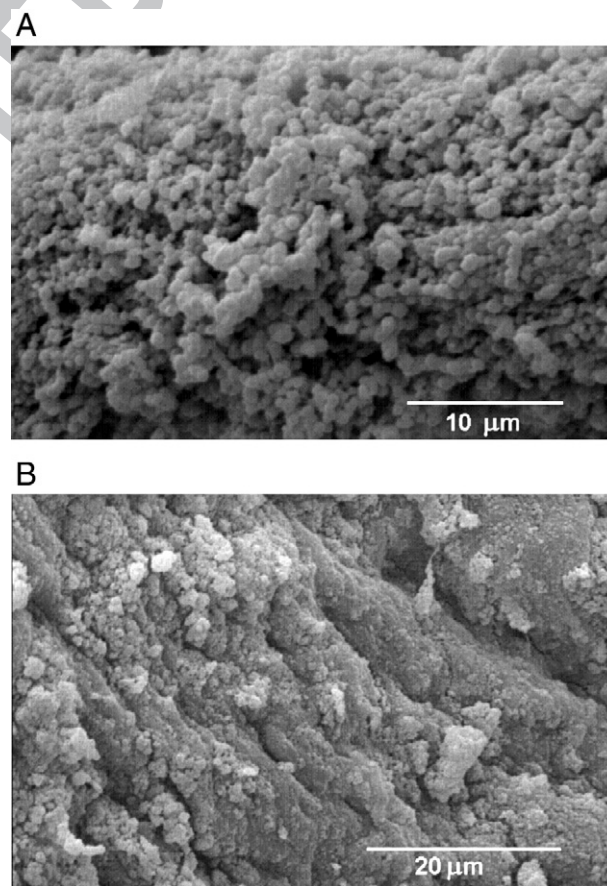


Fig. 3. Scanning electron microscopy images of surface calcification on bovine pericardium fragments. Fragments were incubated for 96 h in either (A) synthetic fluid alone (control) or (B) the synthetic fluid plus 1 mg/l phytate, after which they were examined using scanning electron microscopy. Note the typical spherulitic hydroxyapatite structure (calcification) in (A).

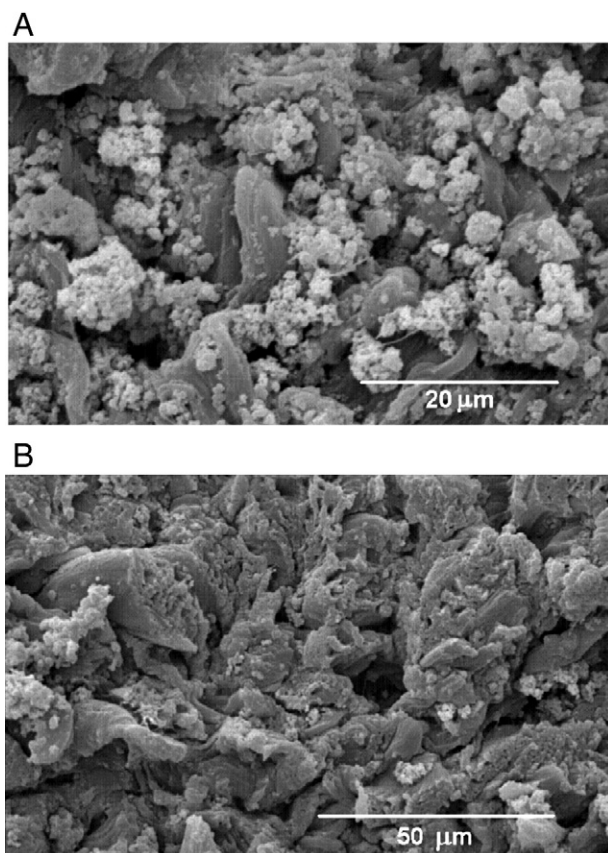


Fig. 4. Cross-sectional scanning electron microscopy images of internal calcification in bovine pericardium fragments. Fragments were incubated for 96 h in either (A) synthetic fluid alone (control) or (B) the synthetic fluid plus 1 mg/l phytate, after which they were examined using scanning electron microscopy.

(the LD₅₀ value for male rats was 1.3 mmol/kg by oral administration as sodium salt) [44]. Human studies [32] showed that a phytate intake of 2 g/day resulted in physiological phytate concentrations similar to those used in the present study (10⁻⁶ M) and did not affect mineral balance when following diets with recommended mineral intake. Thus, considering the present findings, we hypothesize that increased plasma concentration of phytate will retard the rate of bioprosthetic valve calcification. Obviously,

it is necessary to develop clinical trials to evaluate and demonstrate these aspects.

The present study showed that pyrophosphate was effective at reducing bovine pericardium calcification in vitro. It has been known since the 1930s that trace amounts of molecules such as polyphosphates can act as water softeners through their inhibition of the crystallization of calcium salts such as calcium carbonate. However, the use of such compounds as natural regulators of calcification under physiological conditions was not explored until the 1960s. During that decade, Fleisch and Bisaz [45] and Fleisch and Neuman [46] showed that pyrophosphate, a naturally occurring polyphosphate, was present in serum and urine and could prevent calcification by binding to hydroxyapatite. However, studies in animal models found that pyrophosphate could inhibit ectopic calcification in blood vessels and kidneys only when injected rather than ingested. Since oral administration was found to cause hydrolysis, hence inactivation of pyrophosphate, more stable analogues such as bisphosphonates were synthesized [47]. The present study found that the bisphosphonate etidronate had an effect similar to that of pyrophosphate in terms of inhibiting bovine pericardium calcification in vitro.

Bovine pericardium is used as a source of bioprosthetic valves [48,49], and several in vitro models have been described for studying valve calcification [50–54]. Some of those papers compared in vitro data with in vivo data [50]. It appears generally accepted that all of these in vitro models may be valuable in screening for anticalcifying agents and may hence reduce the need for animal experiments.

In the present study, while all three agents inhibited bovine pericardium calcification, none was able to totally prevent the process from occurring. Thus, it may be that the physiological role of crystallization inhibitors is to minimize the rate of valve calcification.

5. Summary

The present study examined the inhibitory effects of pyrophosphate, etidronate, and phytate on bovine pericardium calcification in vitro. The data indicated that phytate was the most potent inhibitor of calcification, and the

t2.1 Table 2

t2.2 Percent inhibition of bovine pericardium calcification by pyrophosphate, etidronate, and phytate

t2.3	Substance	Concentration [mg/l (µM)]	% Inhibition (n=4)
t2.4	Pyrophosphate	0.5 (2.87)	2±10
t2.5		1.0 (5.75)	21±7
t2.6	Etidronate	0.5 (2.47)	2±6
t2.7		1.0 (4.95)	14±5
t2.8	Phytate	0.25 (0.39)	41±6
t2.9		0.5 (0.77)	52±6
t2.10		1.0 (1.54)	76±5

$$\% \text{Inhibition} = \left(\frac{\text{mg calcium of the control experiment} - \text{mg calcium of the experiment with inhibitor}}{\text{mg calcium of the control experiment}} \right) \times 100.$$

t2.11

300 effects of this agent were apparent at levels as low as
307 0.25 mg/l (0.39 μ M).

308 Acknowledgments

309 P.S. expresses appreciation for the Spanish Ministry of
310 Education, Culture, and Sport for an FPU program
311 fellowship. B.I. expresses appreciation for the Conselleria
312 d'Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears for
313 a fellowship.

314 References

315 [1] Loecker TH, Schwartz RS, Cotta CW, Hickman JR. Fluoroscopic
316 coronary artery calcification and associated coronary disease in
317 asymptomatic young men. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:1167–72.

318 [2] Puentes G, Detrano R, Twang W, Wong N, French W, Narahara K,
319 et al. Estimation of coronary calcium mass using electron-beam
320 computed-tomography—a promising approach for predicting coronary
321 events. *Circulation* 1995;92:1487.

322 [3] Epple M, Lanzer P. How much interdisciplinarity is required to
323 understand vascular calcifications? Formulation of four basic princi-
324 ples of vascular calcification. *Z Kardiol* 2001;90(Suppl 3):2–5.

325 [4] Speer MY, Giachelli CM. Regulation of cardiovascular calcification.
326 *Cardiovasc Pathol* 2004;13:63–70.

327 [5] Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-
328 deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption.
329 *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8156–60.

330 [6] Reinholt FP, Hulthen K, Oldberg A, Heinegard D. Osteopontin—a
331 possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*
332 1990;87:4473–5.

333 [7] Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz
334 SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries
335 and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin*
336 *Invest* 1993;92:1686–96.

337 [8] O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C,
338 Alpers CE, et al. Osteopontin is expressed in human aortic valvular
339 lesions. *Circulation* 1995;92:2163–8.

340 [9] Giachelli CM, Scatena M, Wada T. Osteopontin, potential roles in
341 vascular function and dystrophic calcification. *J Bone Miner Metab*
342 1997;15:179–83.

343 [10] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki S, Yano K, Fujise N,
344 et al. Identify of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and
345 osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits
346 osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998;139:1329–37.

347 [11] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R,
348 et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the
349 regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309–19.

350 [12] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et
351 al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis
352 and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12:1260–8.

353 [13] Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al.
354 Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking
355 matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:78–81.

356 [14] Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory
357 protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 2002;277:
358 4388–94.

359 [15] Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcifica-
360 tion of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler*
361 *Thromb Vasc Biol* 1998;18:1400–7.

362 [16] Levy RJ, Schoen FJ, Levy JT, Nelson AC, Howard SL, Oshry LJ.
363 Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin
364 deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets
365 implanted subcutaneously in rats. *Am J Pathol* 1983;113:143–55.

[17] Shen M, Marie P, Farge D, Carpentier S, De Pollak C, Hott M, et al. 366
Osteopontin is associated with bioprosthetic heart valve calcification in 367
humans. *C R Acad Sci III* 1997;320:49–57. 368

[18] Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. 369
Osteopontin–hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydro- 370
xyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner* 371
1993;22:147–59. 372

[19] Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone 373
sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8562–5. 374

[20] Hunter GK, Hauschka PV, Rosenberg LC, Poole AR, Goldberg HA. 375
Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized 376
tissue proteins. *Biochem J* 1996;317:59–64. 377

[21] Govindaraj A, Selvam R. An oxalate-binding protein with crystal 378
growth promoter activity from human kidney stone matrix. *BJU Int* 379
2002;90:336–44. 380

[22] Yamate T, Kohri K, Umekawa T, Amasaki N, Amasaki N, Isikawa Y, et 381
al. The effect of osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals 382
to Madin–Darby canine kidney cells. *Eur Urol* 1996;30:388–93. 383

[23] Lieske JC, Tolback FG, Deganello S. Sialic acid-containing glycopro- 384
teins on renal cells determine nucleation of calcium oxalate dihydrate 385
crystals. *Kidney Int* 2001;60:1784–91. 386

[24] Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC. 387
Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and 388
osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1392–401. 389

[25] Price PA, Buckley JR, Williamson MK. The amino bisphosphonate 390
ibandronate prevents vitamin D toxicity and inhibits vitamin D- 391
induced calcification of arteries, cartilage, lungs and kidneys in rats. *J* 392
Nutr 2001;131:2910–5. 393

[26] Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and 394
ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those 395
that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 396
2001;21:817–24. 397

[27] Bevilacqua M, Dominguez LJ, Rosini S, Barbagallo M. Bispho- 398
sphonates and atherosclerosis: why? *Lupus* 2005;14:773–9. 399

[28] Grases F, Sanchis P, Perello J, Isern B, Prieto RM, Fernandez- 400
Palomeque C, et al. Phytate (myo-inositol hexakisphosphate) inhibits 401
cardiovascular calcifications in rats. *Front Biosci* 2006;11:136–42. 402

[29] Webb CL, Schoen FJ, Levy RJ. Covalent binding of aminopropanehy- 403
droxydiphosphonate to glutaraldehyde residues in pericardial biopros- 404
thetic tissue: stability and calcification inhibition studies. *Exp Mol* 405
Pathol 1989;50:291–302. 406

[30] Levy RJ, Hawley MA, Schoen FJ, Lund SA, Liu PY. Inhibition by 407
diphosphonate compounds of calcification of porcine bioprosthetic 408
heart valve cusps implanted subcutaneously in rats. *Circulation* 409
1985;71:349–56. 410

[31] Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG. Variation of InsP₄, 411
InsP₅, InsP₆ levels in tissues and biological fluids depending on dietary 412
phytate. *J Nutr Biochem* 2001;12:595–601. 413

[32] Grases F, Simonet BM, Vucenik I, Prieto RM, Costa-Bauzá A, 414
March JG, et al. Absorption and excretion of orally administered 415
inositol hexaphosphate (IP₆ or phytate) in humans. *Biofactors* 2001; 416
15:53–61. 417

[33] Grases F, Simonet BM, Perello J, Costa-Bauza A, Prieto RM. Effect of 418
phytate on element bioavailability in the second generation of rats. 419
J Trace Elem Med Biol 2004;17:229–34. 420

[34] Neethling WM, Hodge AJ, Glancy R. Glutaraldehyde-fixed kangaroo 421
aortic wall tissue: histology, crosslink stability and calcification 422
potential. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2003;66:356–63. 423

[35] Grases F, Costa-Bauza A, March JG. Artificial simulation of the early 424
stages of renal stone formation. *Br J Urol* 1994;74:298–301. 425

[36] Grases F, Ramis M, Costa-Bauza A. Effects of phytate and pyrophos- 426
phate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Comparison 427
with the action of other polyphosphates. *Urol Res* 2000;28:136–40. 428

[37] Grases F, Isern B, Perelló J, Sanchis P, Prieto RM. Absorption of myo- 429
inositol hexakisphosphate (InsP₆) through the skin: study of the matrix 430
effects. Mechanism of phytate topical absorption. *Front Biosci* 431
2005;10:799–802. 432

- 433 [38] Grases F, Perello J, Isern B, Prieto RM. Study of a myo-inositol
434 hexaphosphate-based cream to prevent dystrophic calcinosis cutis. *Br J*
435 *Dermatol* 2005;152:1022–5.
- 436 [39] Grases F, Prieto RM, Simonet BM, March JG. Phytate prevents tissue
437 calcifications in female rats. *Biofactors* 2000;11:171–7.
- 438 [40] Grases F, Perelló J, Prieto RM, Simonet BM, Torres JJ. Dietary myo-
439 inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft
440 tissues: a pilot study in Wistar rats. *Life Sci* 2004;75:11–9.
- 441 [41] Curhan GC, Willett WC, Knight EL, Stampfer MJ. Dietary factors and
442 the risk of incident kidney stones in younger women: Nurses' Health
443 Study II. *Arch Intern Med* 2004;164:885–91.
- 444 [42] Grases F, Isern B, Sanchis P, Perello J, Torres JJ, Costa-Bauza A.
445 Phytate acts as an inhibitor in formation of renal calculi. *Front Biosci*
446 2007;12:2580–7.
- Q3 447 [43] Grases F, Sanchis P, Perelló J, Isern B, Prieto RM, Fernández-
448 Palomeque C, Torres JJ. Effect of crystallization inhibitors on vascular
449 calcifications induced by vitamin D: a pilot study in Sprague–Dawley
450 rats. *Circ J* [in press].
- 451 [44] Ichikawa H, Ohishi S, Takahashi O, Kobayashi H, Yuzawa K,
452 Hosokawa N, Hashimoto T. Acute oral toxicities of phytic acid and
453 sodium phytate in rats. *Kenkyu Nenpo-Tokyo-toritsu Eisei Kenkyusho*
454 1987;38:371–6.
- 455 [45] Fleisch H, Bisaz S. Isolation from urine of pyrophosphate, a
456 calcification inhibitor. *Am J Physiol* 1962;203:671–5.
- 457 [46] Fleisch H, Neuman WF. Mechanism of calcification: role of
458 collagen, polyphosphates, and phosphatases. *Am J Physiol* 1961;
459 200:1296–300.
- [47] Fleisch HA, Russell RG, Bisaz S, Muhlbauer RC, Williams DA. The
460 inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium
461 phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in
462 vivo. *Eur J Clin Invest* 1970;1:12–8. 463
- [48] Middlemost SJ, Sussman M, Patel A, Manga P. The stentless
464 quadrileaflet bovine pericardial mitral valve: early clinical results.
465 *J Heart Valve Dis* 1999;8:174–9. 466
- [49] Arcidiacono G, Corvi A, Severi T. Functional analysis of bioprosthetic
467 heart valves. *J Biomech* 2005;38:1483–90. 468
- [50] Mavrilas D, Kaposos J, Koutsoukos PG, Dougenis D. Screening
469 biomaterials with a new in vitro method for potential calcification:
470 porcine aortic valves and bovine pericardium. *J Mater Sci Mater Med*
471 2004;15:699–704. 472
- [51] Dorozhkin SV, Dorozhkina EI. A first approach to in vitro simulation
473 of vascular calcification by the controlled crystallization of poorly
474 crystalline calcium phosphates onto porous cholesterol. *Proc Inst Mech*
475 *Eng [H]* 2005;219:477–82. 476
- [52] Peters F, Epple M. Simulating arterial wall calcification in vitro:
477 biomimetic crystallization of calcium phosphates under controlled
478 conditions. *Z Kardiol* 2001;90(Suppl 3):81–5. 479
- [53] Park JC, Hwang YS, Han DW, Suh H. A novel in vitro assessment of
480 tissue valve calcification by a continuous flow type method. *Artif*
481 *Organs* 2000;24:158–60. 482
- [54] Pettenazzo E, Deiwick M, Thiene G, Molin G, Glasmacher B,
483 Martignago F, et al. Dynamic in vitro calcification of bioprosthetic
484 porcine valves: evidence of apatite crystallization. *J Thorac Cardiovasc*
485 *Surg* 2001;121:500–9. 486
487

Artículo original 3.2.

***Papel del fitato y la osteopontina en el
mecanismo de calcificación de tejidos
blandos***

ROLE OF PHYTATE AND OSTEOPONTIN IN THE MECHANISM OF SOFT TISSUE CALCIFICATION

Short title: Phytate, osteopontin and calcification

* Félix Grases¹, Rafel M. Prieto¹, Pilar Sanchis¹, Carles Saus², Teresa de Francisco¹.

¹Laboratory of Renal Lithiasis Research, University Institute of Health Sciences Research (IUNICS), University of Balearic Islands; CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB06/03), Instituto de Salud Carlos III, Spain.

²University Hospital Son Dureta, Palma of Mallorca, Spain.

* Corresponding author: Prof. F. Grases - Laboratory of Renal Lithiasis Research - Faculty of Sciences - University of Balearic Islands - 07122 - Palma of Mallorca - Spain - Tel: 034971173257
Fax: 034971173426 - E-mail: fgrases@uib.es.

ABSTRACT

Background. Understanding the mechanism of calcium deposition in soft tissues is of great importance in a variety of pathological conditions, such as chronic kidney disease. The present study examined the role of phytate and osteopontin during the development of soft tissue calcification in an animal model.

Methods. Male Wistar rats (16 rats per treatment) were fed with a diet (AIN-76A) in which phytate is undetectable (non-phytate-treated group), or with a phytin-enriched AIN-76A diet (phytate-treated group). After 21 days on the respective diets, all rats were subjected to calcinosis induction by subcutaneous injection with KMnO_4 at two sites on either side of the interscapular region. At 2, 5, 8 and 10 days after the calcinosis induction, four rats of each group were sacrificed and the injured tissues were removed for histological analysis and for calcium determination.

Results. Calcification was notably and significantly reduced in phytate-treated rats compared to non-phytate-treated rats. Calcified deposits appeared as soon as 2 days after calcinosis induction, but inflammation with the presence of macrophages, lymphocytes and eosinophils were not typically observed until 5 days post-induction. Osteopontin was only detected 8 days post-induction, and was clearly associated with calcified areas.

Conclusions. The results suggest an important role for crystallization inhibitors such as phytate in reducing hydroxyapatite crystal formation in the first steps of soft tissue calcification. Histological analysis indicated that osteopontin was not involved during initiation of soft tissue calcification. Osteopontin appears to be involved in the control of calcification rather than its genesis.

Keywords: soft tissue calcification, phytate, osteopontin.

INTRODUCTION

Understanding the mechanism of calcium deposition in soft tissues is of great importance in a variety of pathological conditions, such as chronic kidney disease (1). Extraskeletal calcification is an active process that remains poorly understood. The development of soft tissue calcification implies the pre-existence of injury, tissue alteration and/or necrosis. The cellular detritus generated in such processes can induce calcium phosphate (hydroxyapatite) formation through heterogeneous nucleation. The presence of crystallization inhibitors (non-signaling molecules that bind to crystal nuclei or faces, and inhibit crystal development) can prevent or delay the formation of hydroxyapatite crystals. Molecules reported to inhibit crystallization associated with soft tissue calcification include metabolic substances such as pyrophosphate (2,3), synthetic molecules including bisphosphonates (e.g. etidronate, alendronate and ibandronate) (4-6), and natural products including phytate (myo-inositol hexakisphosphate) (7,8). Phytate occurs in abundance in plant seeds. It is also present at low levels in organs, tissues and fluids (blood, urine, interstitial and intracellular fluids) of mammals, including rats and humans, which depend on an exogenous dietary phytate supply. If phytate is eliminated from the diet, levels in blood, urine, organs and tissues decrease dramatically (9,10).

Cellular factors, including proteins that regulate bone mineralization, have also been implicated in the process of soft tissue calcification. The activity of such proteins can either enhance or inhibit the ability of macrophages to destroy hydroxyapatite deposits (i.e. osteoclastic activity) (11–13). A common characteristic of proteins involved in calcification is calcium ion affinity. Two major groups of proteins with this characteristic are phosphoproteins and carboxyproteins, the former including osteopontin (12–17) and the latter including osteoprotegerin (18–20), matrix Gla protein (21–23) and osteocalcin also known as bone-Gla-protein (13,24). While these proteins have been suggested to have some crystallization inhibitor activity, the *in vitro* experiments that demonstrated such effects involved the use of non-physiological concentrations of these proteins, calcium and phosphate (25–27). Moreover, these proteins have also been reported to have some calcification promoter activity due to their heterogeneous nucleation capacity (28–30). It appears that the major role of these proteins in soft tissue calcification is as regulators of osteoclast/osteoblast cell activity (11,12,31). Some of these proteins can also participate in cell differentiation processes (32).

Osteopontin expression is increased in response to injury and is closely associated with pathological calcified deposits in soft tissues (33). This protein has been demonstrated to play an important role as a regulator of inflammation and biomineralization (34). There is also evidence that osteopontin regulates the activity of macrophages and macrophage-derived cells (osteoclasts), facilitating phagocytosis and enhancing destruction of hydroxyapatite deposits (12,13). In a recent study osteopontin was not detected during early calcification but was present in later calcium deposits, suggesting it may be involved in the control of calcification rather than in its genesis (35).

The aim of this study was to assess the role of phytate and osteopontin in development of soft tissue calcification in an animal model, through chemically-induced formation of hydroxyapatite deposits by subcutaneous injection of permanganate.

SUBJECTS AND METHODS

Animals and diets

Thirty-two male Wistar rats of about 300 g were obtained from Harlan Iberica s.l. (Barcelona, Spain) and acclimated for 7 days in our animal house. Animals were kept in Plexiglas cages (three animals per cage) at $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, relative humidity $60\% \pm 5\%$, and a 12 h light/dark cycle. After this period, animals were randomly assigned to two groups of 16 rats. The non-phytate-treated group were fed an AIN 76-A diet (Ssniff Especialdiät GmbH, Soest, Germany). This is a purified diet in which phytate is below the level of detection. The phytate-treated group were fed a phytin-enriched AIN-76A diet (Ssniff Especialdiät GmbH, Soest, Germany). This is a purified diet with phytate. The composition of the diets used in the study is shown in Table I.

Table I. Composition of the AIN-76A and phytin-enriched AIN-76A diets. *AIN-76A + 12990 mg/kg phytin (as tetracalcium dimagnesium salt)

	AIN-76A	AIN-76A + phytin*
Phosphorus (g/kg dry weight)	6.7 ± 0.1	8.2 ± 0.1
Calcium (g/kg dry weight)	6.2 ± 0.1	8.1 ± 0.4
Magnesium (g/kg dry weight)	0.69 ± 0.01	1.62 ± 0.01
Manganese (g/kg dry weight)	0.056 ± 0.001	0.055 ± 0.001
Iron (g/kg dry weight)	0.056 ± 0.001	0.057 ± 0.003
Zinc (g/kg dry weight)	0.045 ± 0.001	0.040 ± 0.004
Phytate (g/kg dry weight)	< 0.01	10 ± 0.3

Experimental procedures were performed according to Directive 86/609/EEC regarding treatment of animals used for experimental and other scientific purposes. Permission to perform these animal experiments was obtained from the Bioethical Committee of our University.

Calcinosis induction

After 21 days on the respective diets, all rats were subjected to calcinosis induction. Calcification was induced by injury through subcutaneous injection with 200 μL of a 0.1% KMnO_4 solution at two sites, one on either side of the interscapular region.

Monitoring and sampling

Animal weights and diet intake were monitored throughout the study. At 2, 5, 8 and 10 days after calcinosis induction, four rats from each group were sacrificed and the injured tissues (calcified deposits and surrounding area) were removed.

Histological analysis

For histological analysis, blocks of excised tissue from each sacrificed animal were fixed in 4% buffered formaldehyde at pH 7 (Panreac S.A., Barcelona, Spain) for 24 hours at room temperature, embedded in paraffin, and sectioned at 4 to 6 μm . The tissue sections were stained with hematoxylin and eosin using standard techniques (36). Calcium in sections was enhanced by von Kossa stain. Macrophages were immunohistochemically detected using a cd68 monoclonal antibody (Dako Denmark A/S), lymphocytes were detected using a panel of cd3, cd20 and cd45 antibodies (Dako Denmark A/S), and osteopontin was detected using MPIIB10 antibody from the Development Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, Iowa City, USA) using the Envision(R) system (Dako Denmark A/S) in an automated stainer (Autostainer Plus, Dako Denmark A/S). Bound primary antibodies were detected using biotinylated anti-mouse secondary antibodies. The final complex was visualized by treatment with PBS containing 0.5 mg/mL diaminobenzidine and 0.03% H_2O_2 . The sections were counterstained with hematoxylin and eosin and mounted. Positive and negative controls were included to verify that antibodies did not bind non-specifically to calcium deposits. Control sections with large areas of calcification were decalcified by treatment with 3% citric acid for 1 hour before immunolabelling. All tissues were examined histologically and evaluated semi-quantitatively by an experienced pathologist.

Analysis of calcium and magnesium

Excised injured tissues were lyophilized, placed in a mixture of HNO_3 and HClO_4 (1:1) in a sand bath, and digested until the solution was clear. Digested samples were diluted with distilled water to a volume of 10 mL. The concentrations of calcium and magnesium were determined using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (Optima 5300DV spectrometer, Perkin-Elmer SL) and an appropriate calibration curve.

Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm SE. Student's *t* tests were used to assess differences between means. Windows software was used for statistical computations. A *p* value < 0.05 was considered to indicate a significant difference.

RESULTS

Figure 1 shows the development of calcification in the injured tissues for the phytate-treated and non-phytate-treated rats, evident in changes in the calcium:magnesium ratio. Rats treated with phytate had notably and significantly reduced development of calcification in comparison with non-phytate-treated rats.

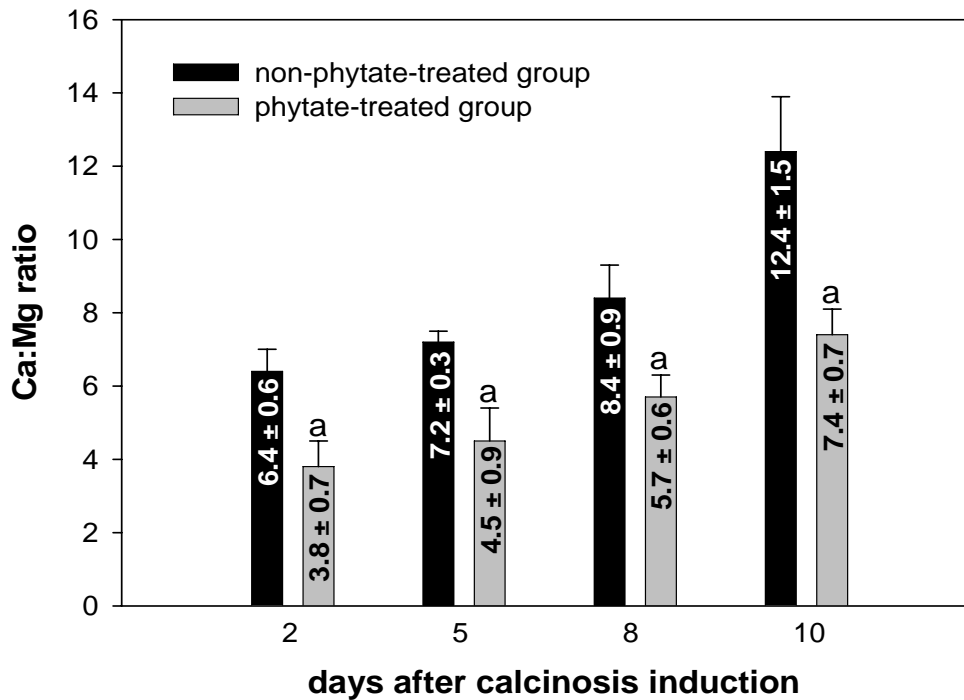


Figure 1. Calcium:magnesium ratio in the injured tissues of non-phytate-treated and phytate-treated rats at 2, 5, 8 and 10 days after calcinosis induction. Values are expressed as mean ± SE (n = 4). **a:** $p < 0.05$ vs. the corresponding non-phytate-treated value.

Histological analysis revealed that two days after calcinosis induction, calcified deposits were only present in injured tissues of non-phytate-treated group (Figure 2). These deposits were rough and not associated to dermal collagen fibers. In both groups a slight inflammatory reaction was observed but osteopontin was not immunohistochemically detected.

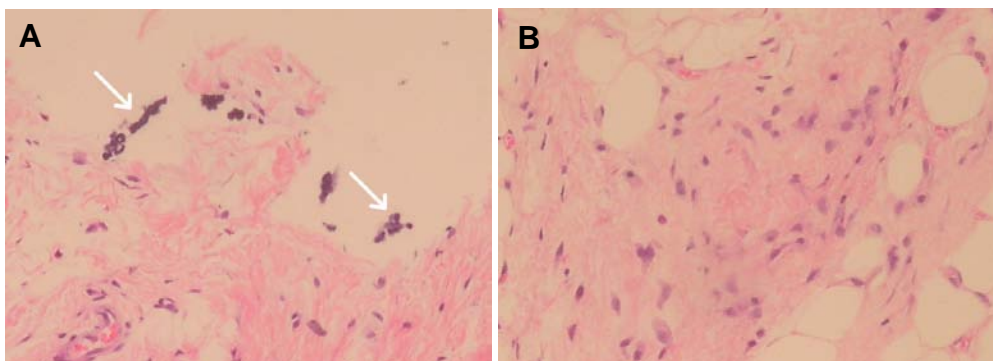


Figure 2. Injured tissue section stained with hematoxylin and eosin 2 days after calcinosis induction in non-phytate-treated (A) and phytate-treated (B) rats. Only non-phytate-treated rats had calcium deposits (white arrows), which were rough and not associated to dermal collagen fibers. The presence of calcium in the deposits was confirmed using von Kossa stain. In both groups a slight inflammatory reaction was observed but osteopontin was not detected by immunohistochemistry (original magnification x 100).

The injured tissues five days after calcinosis induction are shown in Figure 3. As can be seen, the same pattern was observed for both non-phytate-treated and phytate-treated groups. Intense mixed inflammatory reaction with the presence of macrophages, lymphocytes and eosinophils was observed. Also, new calcium deposits around dermal collagen fibers were detected by von Kossa stain and rough calcium deposits in dermic tissue were identified by hematoxylin and eosin stain. Osteopontin was not detected by immunohistochemistry (Figure 4A).

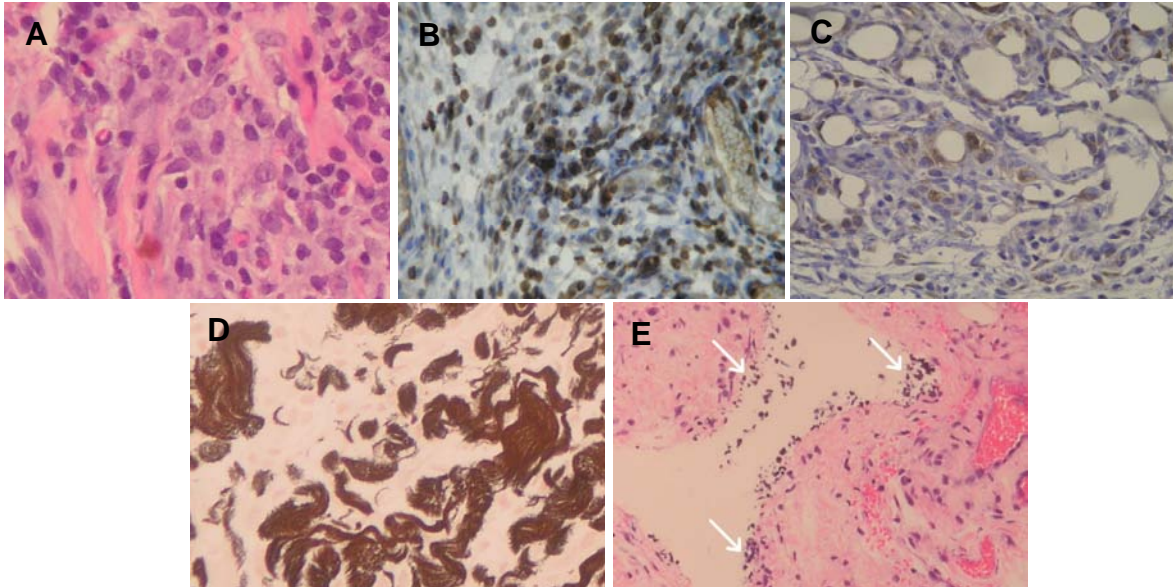


Figure 3. Images of injured tissue sections 5 days after calcinosis induction. Intense mixed inflammatory reaction stained by hematoxylin and eosin (original magnification x 200) (A); lymphocytes immunohistochemically detected using cd3 monoclonal antibody (original magnification x 200) (B); macrophages immunohistochemically detected using cd68 monoclonal antibody (original magnification x 200) (C); new calcium deposits around collagen fibers from dermic tissue detected by von Kossa stain (original magnification x 200) (D); rough calcium deposits on dermic tissue (white arrows) detected by hematoxylin and eosin stain (original magnification x 100) (E).

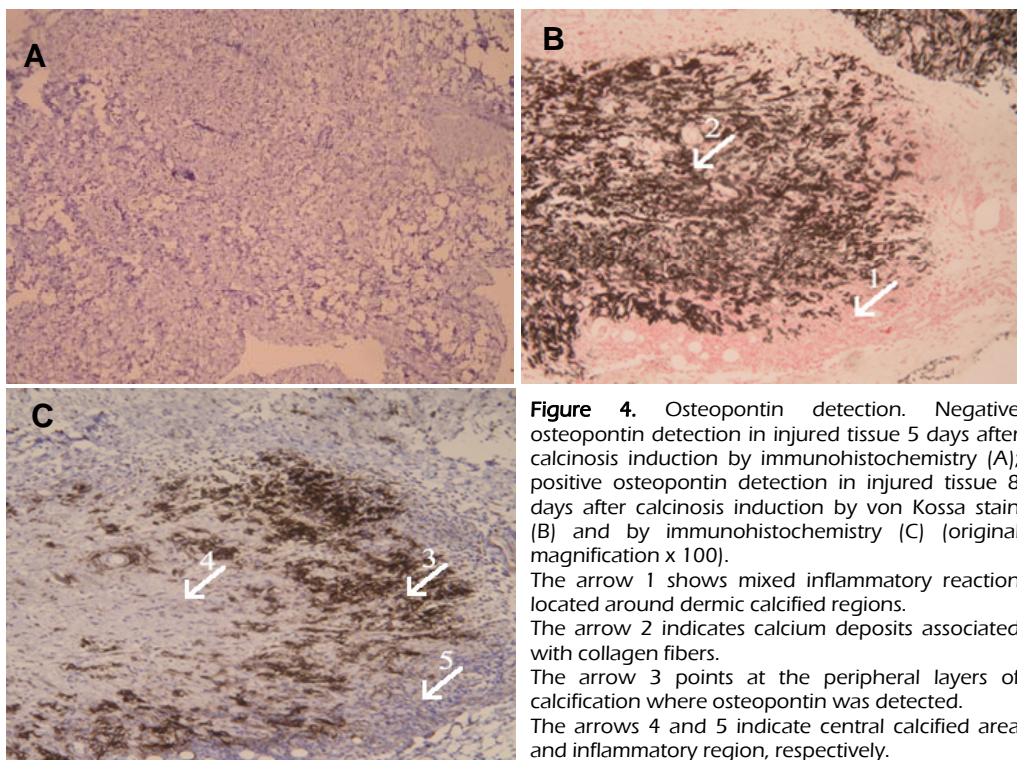


Figure 4. Osteopontin detection. Negative osteopontin detection in injured tissue 5 days after calcinosis induction by immunohistochemistry (A); positive osteopontin detection in injured tissue 8 days after calcinosis induction by von Kossa stain (B) and by immunohistochemistry (C) (original magnification x 100). The arrow 1 shows mixed inflammatory reaction located around dermic calcified regions. The arrow 2 indicates calcium deposits associated with collagen fibers. The arrow 3 points at the peripheral layers of calcification where osteopontin was detected. The arrows 4 and 5 indicate central calcified area and inflammatory region, respectively.

Finally, eight days after calcinosis induction, injured tissue for both non-phytate-treated and phytate-treated group presented the same pattern. Like the five days post-induction injured tissues, mixed inflammatory reaction was located around dermic calcified regions and calcium deposits associated with collagen fibers were detected by von Kossa stain. In this case, osteopontin was detected by immunohistochemistry for the first time and it was only observed in the peripheral layer of the calcified regions and not in central calcified layers (Figure 4B,C).

DISCUSSION

The present study examined the role of phytate and osteopontin during development of soft tissue calcification. Phytate treatment was found to significantly reduce tissue calcification, and osteopontin was not associated with the initiation steps of calcification. Osteopontin, apparently provided by macrophages, was first detected 8 days after calcinosis induction and accumulated in large calcified areas surrounding collagen fibers (Figure 3). In fact, two days after calcinosis induction, injured tissues of non-phytate-treated group presented a slight inflammatory reaction with presence of macrophages, lymphocytes and eosinophils but osteopontin was not detected (Figure 3). Nevertheless, eight days after calcinosis induction, the inflammatory reaction of injured tissues was located around dermic calcified regions and osteopontin was only observed in the peripheral layers of the calcified regions and not in central calcified layers. This fact suggests that osteopontin diffusion is from the inflammatory area to calcified region (Figure 4).

Phytate (myo-inositol hexakisphosphate) is a relatively low molecular weight compound that exerts potent action as an inhibitor of crystallization of calcium salts (oxalate and phosphate salts) *in vitro* (37,38) and *in vivo* (39,40).

Crystallization inhibiting substances are normally non-signaling molecules that bind to the crystal nucleus or faces and, as a consequence, prevent or disrupt crystal development. Crystallization inhibitors are effective at significantly lower concentrations than chelating agents, which act by decreasing target ion supersaturation.

Previous studies (41) demonstrated that phytate at normal concentrations in biological fluids decreases mineralization in a process thought to involve interstitial phytate-inhibition of the nucleation and growth of hydroxyapatite crystals.

The rats in the non-phytate-treated group had significantly reduced phytate concentrations. Thus, other previous study (40) demonstrated that rats fed a purified diet in which phytate was absent (AIN-76A) had notably reduced phytate plasma levels ($0.026 \pm 0.006 \mu\text{M}$) in comparison with rats fed a phytate-enriched diet (AIN-76A + 12 990 mg/kg phytin) ($0.393 \pm 0.013 \mu\text{M}$).

After calcinosis induction, calcification of soft tissues progressed at a high rate and significant concentrations of osteopontin formed 8 days from induction. High concentrations of osteopontin were only detected in the presence of large calcified areas of tissue in close contact with macrophages. These findings suggest an important role for crystallization inhibitors, such

as phytate, in reducing hydroxyapatite crystal formation in early stages of calcification. Reducing hydroxyapatite crystal formation may enhance the potential for tissue restoration through macrophage activity, as inhibition of crystal development appears to facilitate re-absorption of injured tissues by the immune system. With worse injury there is a greater likelihood of substantial calcification, and hence difficulty in re-absorption. Phagocytosis of hydroxyapatite has been observed in association with implants (42), and basic calcium phosphate crystals can stimulate the endocytotic activity of cells (43,44). Moreover, it has been demonstrated that osteoclast adhesion to hydroxyapatite depends on the presence of specific extracellular adhesive proteins including osteopontin (11,12,31). Some studies have indicated that matrix proteins such as osteopontin are not involved in initiation of soft tissue calcification, and this is supported by the results of the present study. Nevertheless, proteins related to the extracellular matrix play a role in the regulation of calcification (27,35), and some may function as modulators of immune responses or cell activity, signaling the presence of calcification rather than acting as crystallization inhibitors. Although some studies have suggested osteopontin inhibits crystallization of hydroxyapatite, physiological concentrations of the protein were not used (25–27). Moreover, the plasma concentrations of some crystallization inhibitors (such as pyrophosphate, phytate and bisphosphonates) are around 10^{-3} – 10^{-4} mM when they manifest important inhibitory effects on hydroxyapatite formation (10,45–47). Several studies have demonstrated reduced plasma pyrophosphate levels in hemodialysis patients (1,48,49). Although the osteopontin molecule has potential calcium binding sites (50), its normal plasma concentration (approximately 10^{-6} – 10^{-7} mM) (51) seems too low for it to be acting as a crystallization inhibitor of hydroxyapatite in the calcification process.

The present study suggests an important role for crystallization inhibitors such as phytate in reducing hydroxyapatite crystal formation in the first steps of soft tissue calcification. The inhibition of crystal development appeared to facilitate re-absorption of injured tissues by the immune system. Histological analysis indicated that osteopontin was not involved during initiation of soft tissue calcification. Osteopontin appears to be involved in the control of calcification rather than its genesis, regulating the activity of macrophage and macrophage-derived cells (i.e. osteoclasts) and facilitating phagocytosis and enhancing destruction of hydroxyapatite deposits.

ACKNOWLEDGMENTS

P.S. expresses appreciation to the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport for an FPU program fellowship. This work was supported by Fundación Barceló (Ref. 1458/2007) and by the project grant CTQ2006-05640/BQU from the Spanish Ministry of Science and Technology. Monoclonal antibodies MP111 10 (1) developed by M. Solrush/A. Franzen were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank under the auspices of NICHD and maintained by the Department of Biological Sciences of the University of Iowa (Iowa City, IA, USA).

REFERENCES

1. Brancaccio D, Cozzolino M. The mechanism of calcium deposition in soft tissues. *Contrib Nephrol* 2005; 149: 279-86.
2. Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1392-401.
3. Fleisch H, Bisaz S. Mechanism of calcification: inhibitory role of pyrophosphate. *Nature* 1962; 195: 911.
4. Bevilacqua M, Dominguez LJ, Rosini S, Barbagallo M. Bisphosphonates and atherosclerosis: why? *Lupus* 2005; 14: 773-9.
5. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 817-24.
6. Price PA, Buckley JR, Williamson MK. The amino bisphosphonate ibandronate prevents vitamin D toxicity and inhibits vitamin D-induced calcification of arteries, cartilage, lungs and kidneys in rats. *J Nutr* 2001; 131: 2910-5.
7. Grases F, Sanchis P, Perello J, Isern B, Prieto RM, Fernandez-Palomeque C, Fiol M, Bonnin O, Torres JJ. Phytate (myo-inositol hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats. *Front Biosci* 2006; 11: 136-42.
8. Grases F, Sanchis P, Perelló J, Isern B, Prieto RM, Fernández-Palomeque C, Torres JJ. Effect of crystallization inhibitors on vascular calcifications induced by vitamin D: A Pilot Study in Sprague-Dawley Rats. *Circ J* 2007; 71: 1152-6.
9. Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG. Variation of InsP4, InsP5 and InsP6 levels in tissues and biological fluids depending on dietary phytate. *J Nutr Biochem* 2001; 12: 595-601.
10. Grases F, Simonet BM, Vucenik I, Prieto RM, Costa-Bauza A, March JG, Shamsuddin AM. Absorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP6 or phytate) in humans. *Biofactors* 2001; 15: 53-61.
11. Bas A, Lopez I, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 484-90.
12. Redey SA, Razzouk S, Rey C, Bernache-Assollant D, Leroy G, Nardin M, Cournot G. Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies. *J Biomed Mater Res* 1999; 45: 140-7.
13. Shen M, Marie P, Farge D, Carpentier S, De Pollak C, Hott M, Chen L, Martinet B, Carpentier A. Osteopontin is associated with bioprosthetic heart valve calcification in humans. *C R Acad Sci III* 1997; 320: 49-57.
14. Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1993; 92: 1686-96.
15. O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE, Otto CM. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 1995; 92: 2163-8.
16. Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegard D. Osteopontin-a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 4473-5.
17. Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 8156-60.
18. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12: 1260-8.
19. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-19.
20. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998; 139: 1329-37.
21. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; 386: 78-81.
22. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1400-7.
23. Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 2002; 277: 4388-94.
24. Levy RJ, Schoen FJ, Levy JT, Nelson AC, Howard SL, Oshry LJ. Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. *Am J Pathol* 1983; 113: 143-55.
25. Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: Inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner* 1993; 22: 147-59.

26. Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 8562-5.
27. Hunter GK, Haushka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 1996; 317: 59-64.
28. Govindaraj A, Selvam R. An oxalate-binding protein with crystal growth promoter activity from human kidney stone matrix. *BJU Int* 2002; 90: 336-44.
29. Lieske JC, Toback FG, Deganello S. Sialic acid-containing glycoproteins on renal cells determine nucleation of calcium oxalate dihydrate crystals. *Kidney Int* 2001; 60: 1784-91.
30. Yamate T, Kohri K, Umekawa T, Amasaki N, Isikawa Y, Iguchi M, Kurita T. The effect of osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals to Madin-Darby canine kidney cells. *Eur Urol* 1996; 30: 388-93.
31. Ruoslahti E, Obrink B. Common principles in cell adhesion. *Exp Cell Res* 1996; 227: 1-11.
32. Vignery A. Osteoclasts and giant cells: Macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 291-304.
33. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of soft tissue calcification. *Am J Pathol* 2002; 161: 2035-46.
34. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* 2000; 19: 615-22.
35. Gadeau AP, Chaulet H, Daret D, Kockx M, Daniel-Lamaziere JM, Desgranges C. Time course of osteopontin, osteocalcin, and osteonectin accumulation and calcification after acute vessel wall injury. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 79-86.
36. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. *Laboratory methods in histotechnology*. American Registry of Pathology. Washington D.C. (USA) 1992.
37. Grases F, Ramis M, Costa-Bauza A. Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization: comparison with the action of other polyphosphates. *Urol Res* 2000; 28: 136-40.
38. Grases, Costa-Bauza A, March JG. Artificial simulation of the early stages of renal stone formation. *Br J Urol* 1994; 74:298-301.
39. Grases F, Prieto RM, Simonet BM, March JG. Phytate prevents tissue calcifications in female rats. *Biofactors* 2000; 11: 171-7.
40. Grases F, Perello J, Prieto RM, Simonet BM, Torres JJ. Dietary myo-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues: a pilot study in Wistar rats. *Life Sci* 2004; 75: 11-9.
41. Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG. Phytate levels in diverse rat tissues: influence of dietary phytate. *Br J Nutr* 2001; 86: 225-31.
42. Najman S, Dordevic Lj, Savic V, Ignjatovic N, Plavsic M, Uskokovic D. Changes of HAp/PLLA biocomposites and tissue reaction after subcutaneous implantation. *Facta Universitatis* 2003; 10: 131-4.
43. Nadra I, Mason JC, Philippidis P, Florey O, Smythe CDW, McCarthy GM, Landis RC, Haskard DO. Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ Res* 2005; 96: 1248-56.
44. Sun YB, Zeng XR, Wenger L, Cheung HS. Basic calcium phosphate crystals stimulate the endocytotic activity of cells-inhibition by anti-calcification agents. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 1053-9.
45. Lomashvili KA, Khawandi W, O'Neill WC. Reduced plasma pyrophosphate levels in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2495-2500.
46. Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 1996; 18: 75-85.
47. Yun MH, Kwon Ki. High - performance liquid chromatography method for determining alendronate sodium in human plasma by detecting fluorescence: Application to a pharmacokinetic study in humans. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 40: 168-72.
48. Ketteler M, Westenfeld R, Schlieper G, Brandenburg V. Pathogenesis of vascular calcification in dialysis patients. *Clin Exp Nephrol* 2005; 9: 265-70.
49. Lomashvili KA, Khawandi W, O'Neill WC. Reduced plasma pyrophosphate levels in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2495-500.
50. Chen Y, Bal BS, Gorski JP. Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *J Biol Chem* 1992; 267: 24871-8.
51. Zhang H, Ye QH, Ren N, Zhao L, Wang YF, Wu X, Sun HC, Wang L, Zhang BH, Liu YK, Tang ZY, Qin LX. The prognostic significance of preoperative plasma levels of osteopontin in patients with hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 709-17.

Artículo original 3.3.

***El fitato inhibe las calcificaciones
cardiovasculares en ratas***

Phytate (*Myo*-inositol hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats

Felix Grases¹, Pilar Sanchis¹, Joan Perello¹, Bernat Isern¹, Rafel Maria Prieto¹, Carlos Fernandez-Palomeque², Miguel Fiol², Oriol Bonnin² and Jose Juan Torres²

¹ University Institute of Health Sciences Research (IUNICS), University of Balearic Islands, ² University Hospital Son Dureta, Palma of Mallorca, Spain

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. Materials and methods
 - 3.1. Animals, diets and treatments
 - 3.2. InsP₆ cream pre-treatment
 - 3.3. Calcinosis induction
 - 3.4. Monitorization and sample intake
 - 3.5. Histological analysis
 - 3.6. InsP₆ determination
 - 3.7. Calcium determination
 - 3.8. Statistic
4. Results
5. Discussion
6. Acknowledgements
7. References

1. ABSTRACT

Calcification is an undesirable disorder, which frequently occurs in the heart vessels. In general, the formation of calcific vascular lesions involves complex physicochemical and molecular events. Calcification (hydroxyapatite) is initiated by injury and is progressed by promoter factors and/or the deficit of inhibitory signals. *Myo*-inositol hexakisphosphate (phytate, InsP₆) is found in organs, tissues and fluids of all mammals and exhibits an important capacity as a crystallization inhibitor of calcium salts in urine and soft tissues. The levels found clearly depend on the dietary intake but it can also be absorbed topically. In this paper, the capacity of InsP₆ as a potential inhibitor of cardiovascular calcifications was assessed in Wistar rats. Three groups were included, a control group, an InsP₆ treated group (subjected to calcinosis induction by Vitamin D and nicotine and treated with standard cream with a 2% of InsP₆ as potassium salt) and an InsP₆ non-

treated group (only subjected to calcinosis induction). All rats were fed AIN 76-A diet (a purified diet in which InsP₆ is undetectable). Animals were monitorized every 12 hours. After 60 hours of calcinosis treatment, all rats of the InsP₆ non-treated group died and the rest were sacrificed. Aortas and hearts were removed. A highly significant increase in the calcium content of aorta and heart tissue was observed in the InsP₆ non-treated rats (21 +/- 1 mg calcium / g dry aorta tissue, 10 +/- 1 mg calcium / g dry heart tissue) when compared with controls (1.3 +/- 0.1 mg calcium / g dry aorta tissue, 0.023 +/- 0.004 mg calcium / g heart dry tissue) and InsP₆ treated (0.9 +/- 0.2 mg calcium / g dry aorta tissue, 0.30 +/- 0.03 mg calcium / g dry heart tissue) animals. Only InsP₆ non-treated rats displayed important mineral deposits in aorta and heart. These findings are consistent with the action of InsP₆, as an inhibitor of calcification of cardiovascular system.

2. INTRODUCTION

Calcification is an undesirable disorder frequently observed in the cardiovascular system, where it alters blood-vessel flexibility and promotes thrombosis and arterial rupture (1-3). When it appears in cardiac valves it is associated to several disorders that, if uncorrected, can lead to heart failure and death (4).

At present many identified risk factors for coronary artery calcifications as end-stage renal disease (5), advanced age (6), elevated plasma cholesterol (7), diminished high-density lipoprotein cholesterol (7), cigarette smoking (8), elevated blood pressure (9), obesity (7), diabetes (8) and elevated triglycerides (7) are known. Nevertheless, although vascular calcification may appear to be a uniform response to different types of vascular injury, it is a complicated disorder, with overlapping yet distinct unknown mechanisms of initiation and progression. In general, the formation of calcific vascular lesions appears to involve different complex physicochemical and molecular biological principles. Thus, it seems that the preexistence of an injury acting as inductor (heterogeneous nucleant) of the calcification (hydroxyapatite) is necessary and its progression would depend on the presence of other promoter factors (as hypercalcemia, hyperphosphatemia, etc.) and/or the deficit of inhibitory factors.

Some inhibitors of vascular tissue mineralization have been described, thus a candidate molecule seems to be a matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein, a mineral binding protein (9), although the action of this protein appears to be also related to other complex cellular process linked to ossification processes (10). Phytate (*myo*-inositol hexakisphosphate, InsP_6) is a molecule found in abundance in plant seeds and also found in all mammalian organs, tissues and fluids but at significantly low concentrations (11,12). The levels found in blood and mammalian tissues clearly depend on its dietary intake (11,12), furthermore it has been demonstrated that this molecule is also topically absorbed (13) and it exhibits an important capacity as a crystallization inhibitor of calcium salts in urine and soft tissues (14,15). For this reason the aim of the present paper is to evaluate the capacity of phytate as a feasible inhibitor of cardiovascular calcifications.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Animals, diets and treatments

Eighteen male Wistar rats of approximately 250 g from Harlan Iberica s.l. (Barcelona, Spain) were acclimated in the course of 7 days to our animal house. Animals were kept in Plexiglas cages (three animals per cage) at a temperature of 21 ± 1 °C and relative humidity of 60 ± 5 % with a 12-h on-off light cycle. After this period, animals were randomly assigned into three groups of six rats respectively. Control group (it was subjected to placebo calcinosis induction), InsP_6 treated group (it was subjected to calcinosis induction and pre-treated with InsP_6 cream) and InsP_6 non-treated group (it was only subjected to calcinosis induction). All rats were fed with AIN 76-A diet (Ssniff Especialdiät GmbH, Soest, Germany), a purified diet in which InsP_6 is undetectable. The procedures used in

this experiment were carried out according to the Directive 86/609/EEC regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes and official permission to perform this animal experiment was obtained from the Bioethical Committee of our University.

3.2. InsP_6 cream pre-treatment

After a period of 16 days consuming AIN 76-A diet, the urinary InsP_6 became undetectable. Then InsP_6 treated group was topically subjected once a day until the end of the experiment (20 days) with 4 g of a standard cream with a supplement 2.0 % of InsP_6 as potassium salt used in previous work (13). The surface of treatment was about 50 cm^2 . The application area was located on the back skin of the animal which was previously shaved using an *electric shaver* (each 4 days).

3.3. Calcinosis induction

After a period of 16 days with cream pre-treatment, the InsP_6 treated group and non-treated group were subjected to calcinosis induction and control group only to placebo calcinosis induction. Calcifications were induced according to P. Kieffer et al. (16) by injecting 300.000 IU/kg i.m. of vitamin D_3 (supplied by Fort Dodge Veterinaria, S.A., Girona, Spain) and 25 mg/kg p.o. of nicotine (as a solution 5 g/L of (-)-nicotine hydrogen tartrate salt supplied by Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). The nicotine administration was repeated ten hours later. Control group received instead vitamin D_3 and nicotine, 0.15 M NaCl i.m. and distilled water respectively.

3.4. Monitorization and sample intake

The animals were monitorized every 12 hours. After 60 hours of calcinosis treatment, all rats of the InsP_6 non-treated group died and the rest of rats were sacrificed. Aortas and hearts were removed.

3.5. Histological analysis

Histological analysis of the aorta and heart calcifications was carried out on 10% buffered formalin fixed tissues. Tissues were first placed in 10% buffered formalin and fixed for 24 h at room temperature. Tissues were embedded, sectioned (sections of $4 \mu\text{m}$) and stained by hematoxiline-eosine. For histological analysis the section of all tissues was examined by an experimented pathologist. The calcium deposits presence was estimated semiquantitatively (in the transverse section) by absent, low, moderate or high notation.

3.6. InsP_6 determination

Samples of 24-h urine were collected at day 15 of cream pre-treatment to evaluate InsP_6 excretion by using a metabolic cage (Tecniplast, Gazzada, s.a.r.l., Italy).

The determination of InsP_6 levels in urine samples was performed using an analytical methodology based on column separation and following total phosphorus determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) (17). This methodology allows a measurement of total InsP_6 with a detection limit of $60 \mu\text{g/l}$.

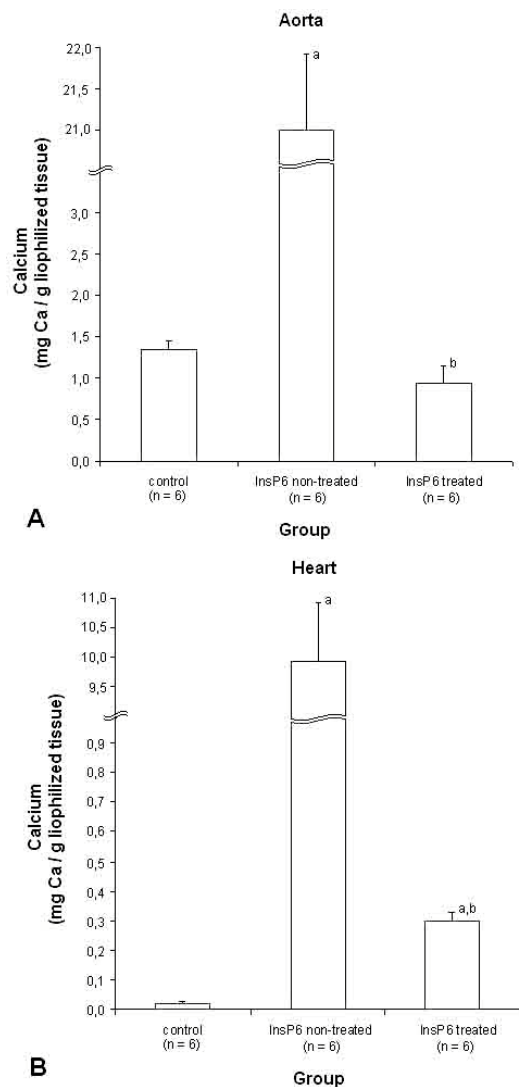


Figure 1. Calcium content in different tissues by the three studied groups (control, InsP₆ non-treated, InsP₆ treated): **a.** Aorta; **b.** Heart. a: $p < 0.001$ vs corresponding control group, b: $p < 0.001$ vs corresponding InsP₆ non-treated group

5.0 ml of urine (acidified with HCl 1:1 until pH = 3-4) was transferred to a column containing 0.2 g of anion exchange resin (the inner diameter was 4 mm). The first eluate was discarded, then the column was washed with 50 ml of HCl 50 mM. The second eluate was discarded. Then, the column was washed with 3.0 ml of HNO₃ 2 M. The determination of InsP₆ was carried out through direct phosphorus analysis of this last eluate by ICP-AES using the corresponding calibration curve.

The ICP-AES conditions used were the following: outer argon flow 15 l/min, auxiliary argon flow 1 l/min, inner argon flow 1 l/min, nebulizer uptake rate 1 ml/min and wavelength 213.618 nm.

3.7. Calcium determination

The samples of aortas and hearts were lyophilised and weighted. The residues were digested with 1:1

HNO₃:HClO₄ mixture in a sand bath until the solution was clear. For calcium determination, digested samples were diluted with distilled water until a final volume of 10 ml. The concentration of calcium was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (Perkin-Elmer S.L., Spain) using the corresponding calibration curve.

3.8. Statistics

Values in the table and figures are expressed as mean \pm (SE). One-way ANOVA was used to calculate significance of difference between groups. The Student *t*-test was used to assess differences of means. Conventional Windows software was used for statistical computations. A value of $p < 0.05$ was considered to assess statistical significance.

4. RESULTS

The calcium accumulation in aorta and heart tissues by the three studied groups (control, InsP₆ treated and InsP₆ non-treated) is shown in Figure 1 and phytate concentration in urine after 15 days of cream pre-treatment is shown in Table 1. As can be observed in Figure 1, a highly significant increase in the calcium content of the two studied tissues was observed in the InsP₆ non-treated rats (21 \pm 1 mg calcium / g dry aorta tissue, 10 \pm 1 mg calcium / g dry heart tissue) when compared with controls (1.3 \pm 0.1 mg calcium / g dry aorta tissue, 0.023 \pm 0.004 mg calcium / g dry heart tissue) and InsP₆ treated (0.9 \pm 0.2 mg calcium / g dry aorta tissue, 0.30 \pm 0.03 mg calcium / g dry heart tissue) animals. No significant differences were observed in aorta calcium content between the InsP₆ treated rats and controls. Significant differences between heart calcium content of InsP₆ treated rats and control rats were also observed. In Table 1 it can be appreciated that highly significant urinary excretion of InsP₆ was observed in the InsP₆ treated rats when compared with controls and InsP₆ non-treated rats.

As it is shown in Figures 2 and 3, only non-treated InsP₆ rats displayed important mineral deposits in aorta and heart. The histological analysis of calcium deposits of aortas and hearts were estimated as absent in control and InsP₆ treated tissues and as severe in InsP₆ non-treated tissues. The calcium deposits in aorta were observed predominantly in the intima and the intern vessel layers. The heart calcium deposits were observed in the walls of coronary vessels and in the adjacent myocardium. Also they presented myocardium necrosis and inflammation (heart attack).

5. DISCUSSION

As it is commented in the introduction section, the development of undesirable hydroxyapatite deposits (calcifications) in the cardiovascular system is a consequence of unbalance between promoter factors (injuries, hypercalcemia, hyperphosphatemia) and inhibitory factors (default of cellular defences, deficit of crystallization inhibitors).

Phytate inhibits cardiovascular calcifications

Table 1. Phytate (InsP₆) concentration in urine for the different groups after 15 days of cream pre-treatment

	Control	InsP ₆ non-treated	InsP ₆ treated
InsP ₆ concentration in urine (mg/L)	0.08 +/- 0.03 (n = 6)	0.09 +/- 0.03 (n = 6)	36.15 +/- 7.26 ^{1,2} (n = 6)

1: $p < 0.001$ vs control group, 2: $p < 0.001$ vs InsP₆ non-treated group

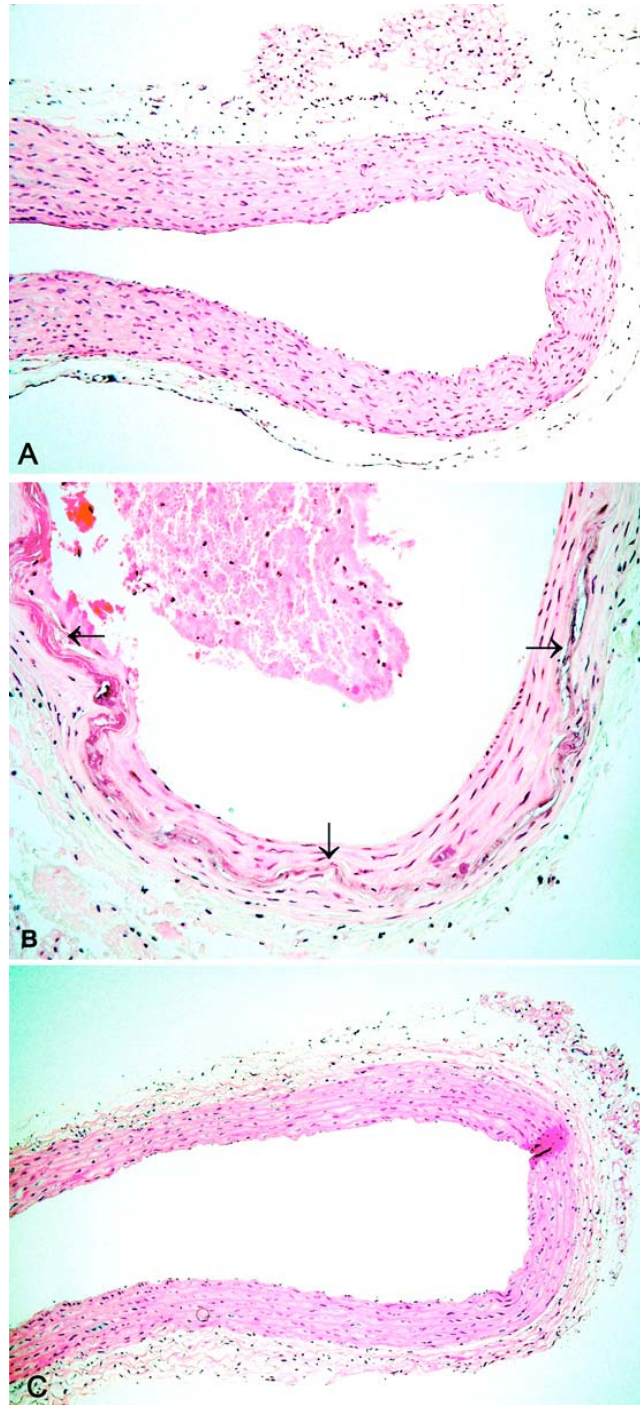


Figure 2. Images of sections of aortas by the three studied groups: **a.** control (original magnification x 10); **b.** InsP₆ non-treated (original magnification x 20); **c.** InsP₆ treated (original magnification x 10). The arrows show extensive calcifications.

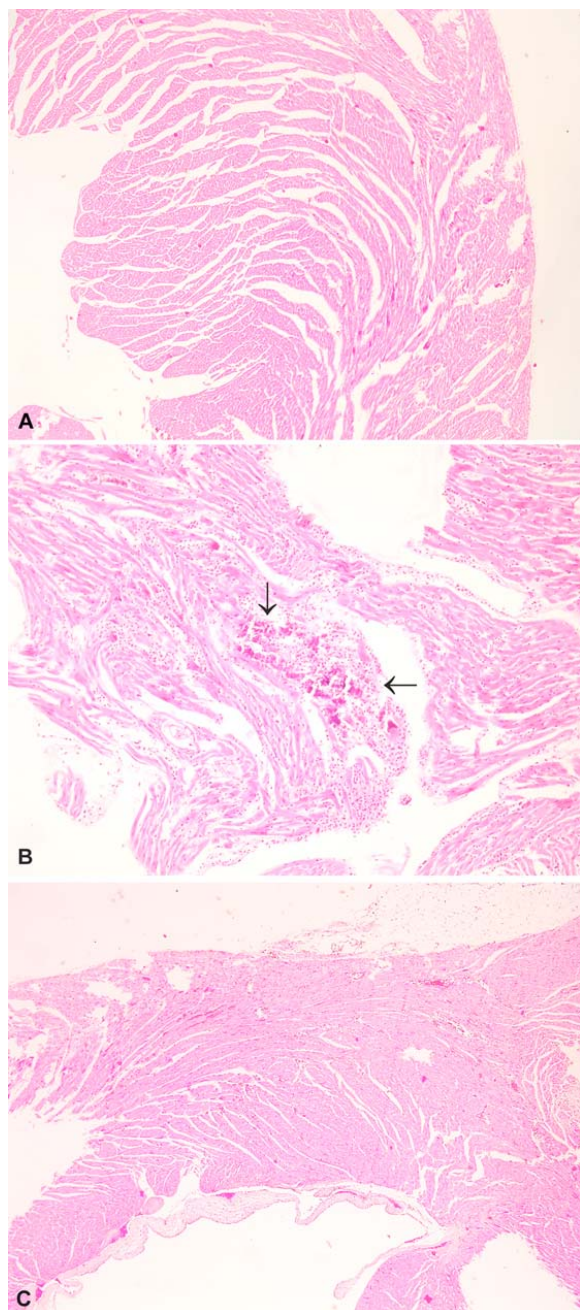


Figure 3. Images of sections of hearts by the three studied groups: **a.** control (original magnification x 4); **b.** InsP₆ non-treated (original magnification x 10); **c.** InsP₆ treated (original magnification x 4). The arrows show extensive calcifications.

A number of extracellular matrix proteins have been reported to inhibit mineralization, including osteocalcin, albumin, osteopontin and matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein (9,16,18-20). *In vitro* experiments demonstrate some activity of these proteins as crystallization inhibitors. Thus, osteopontin has been reported to inhibit *de novo* mineral formation by blocking crystal growth rather than hydroxyapatite nucleation (19,21,22) and can also promote cell adhesion and

migration (23). Otherwise, also promoter activity of hydroxyapatite development has been assigned to these proteins or their analogs due to their nucleating activity (24-26). Nevertheless, a clear action of some of these proteins regulating the cellular activity on calcification processes has been described. Hence, osteocalcin is a Gla-containing protein with a potential function as an inhibitor of osteoblast activity (27). In the rapidly calcifying bone of newborn rats matrix Gla protein levels are about 130% higher than those in adult rats (28). Hence it seems that extracellular protein matrix has an important role as signaling agents in the control of cellular processes associated to the tissue calcification, rather than a typical action as crystallization inhibitors.

InsP₆ (phytate) has demonstrated a powerful capacity as crystallization inhibitor of hydroxyapatite in *in vitro* experiments (29) and in no cases it has demonstrated a promoting capacity. The levels found in mammals clearly depend on its dietary intake (11,12) being this molecule also topically absorbed (13) as it is also demonstrated by the presented results, correlating the amounts found in blood and tissues with the urinary values (11,12). On the other hand, this is a molecule of low molecular weight to which no signaling capacity of cells implied in calcification processes has been assigned. Thus, considering the results obtained in this paper, the clear action of InsP₆ avoiding the calcification of cardiovascular system must be attributed to its capacity as crystallization inhibitor. Consequently, this could be another important factor linked to cardiovascular calcifications that need further studies to be able to evaluate its authentic dimension. In this aspect, it is interesting to comment that culture of normal aortas with alkaline phosphatase resulted in hydroxyapatite calcification of the elastic lamina. This was not due to dephosphorylation of osteopontin and calcification was not increased in aortas from osteopontin-deficient mice. The inhibitor was identified as pyrophosphate (30), which is another well known crystallization inhibitor of hydroxyapatite in *in vitro* experiments (29,31). Consequently, when hydroxyapatite inhibitory factors are considered, mechanisms of cellular defence to such processes and authentic crystallization inhibitory activity of some molecules in front of hydroxyapatite development should probably be distinguished.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

J.P. and P.S express their appreciation to the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport for a fellowship of the FPU program. Also, B.I. expresses his appreciation to the Conselleria d'Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears for a fellowship. This work was supported by the Conselleria d'Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears (Grant PROIB-2002GC1-04) and by the project BQU 2003-01659 of the Spanish Ministry of Science and Technology.

7. REFERENCES

1. J. H. Qiao, P. Z. Xie, M. C. Fishbein, J. Kreuzer, T. A. Drake, L. L. Demer & A. J. Lusis: Pathology of

Phytate inhibits cardiovascular calcifications

- atheromatous lesions in inbred and genetically engineered mice. Genetic determination of arterial calcification. *Arterioscler Thromb* 14(9), 1480-1497 (1994)
2. K. D. O'Brien, J. Kuusisto, D. D. Reichenbach, M. Ferguson, C. Giachelli, C. E. Alpers & C. M. Otto: Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 92(8), 2163-2168 (1995)
 3. J. D. Reid & M. E. Andersen: Medial calcification (whitlockite) in the aorta. *Atherosclerosis* 101(2), 213-224 (1993)
 4. E. R. Mohler III, F. Gannon, C. Reynolds, R. Zimmerman, M. G. Keane & F. S. Kaplan: Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 103(11), 1522-1528 (2001)
 5. P. Schoenhagen & E. M. Tuzcu: Coronary artery calcification and end-stage renal disease: Vascular biology and clinical implications. *Cleve Clin J Med* 69(3), 12-20 (2002)
 6. J. T. Lie & P. I. Hammond: Pathology of the senescent heart: anatomic observation on 237 autopsy studies of patients 90 to 105 years old. *Mayo Clin Proc* 63(6), 552-564 (1988)
 7. L. T. Mahoney, T. L. Burns, W. Stanford, B. H. Thompson, J. D. Witt, C. A. Rost & R. M. Lauer: Coronary risk factors measured in childhood and young adult life are associated with coronary artery calcification in young adults: the Muscatine Study. *J Am Coll Cardiol* 27(2), 277-284 (1996)
 8. R. C. Detrano, N. D. Wong, W. J. French, W. Tang, D. Georgiou, E. Young, O. S. Brezden, T. Doherty & B. H. Brundage: Prevalence of fluoroscopic coronary calcific deposits in high-risk asymptomatic persons. *Am Heart J* 127(6), 1526-1532 (1994)
 9. G. Luo, P. Ducy, M. D. McKee, G. J. Pinero, E. Loyer, R. R. Behringer & G. Karsenty: Spontaneous calcification of arteries and cartilage mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386(6620), 78-81 (1997)
 10. M. Murshed, T. Schinke, M. D. McKee & G. Karsenty: Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol* 165(5), 625-630 (2004)
 11. F. Grases, B. M. Simonet, R. M. Prieto & J. G. March: Variation of InsP₄, InsP₅, InsP₆ levels in tissues and biological fluids depending on dietary phytate. *J Nutr Biochem* 12(10), 595-601 (2001)
 12. F. Grases, B. M. Simonet, I. Vucenik, R. M. Prieto, A. Costa-Bauzá, J. G. March & A. M. Shamsuddin: Absorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP₆ or phytate) in humans. *BioFactors* 15(1), 53-61 (2001)
 13. F. Grases, B. Isern, J. Perelló, P. Sanchis & R. M. Prieto: Absorption of myo-inositol hexakisphosphate (InsP₆) through the skin: study of the matrix effects. Mechanism of phytate topical absorption. *Front Biosci* 10(1), 799-802 (2005)
 14. F. Grases, R. M. Prieto, B. M. Simonet & J. G. March: Phytate prevents tissue calcifications in female rats. *BioFactors* 11(3), 171-177 (2000)
 15. F. Grases, J. Perelló, R. M. Prieto, B. M. Simonet & J. J. Torres: Dietary myo-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues: a pilot study in Wistar rats. *Life Sci* 75(1), 11-19 (2004)
 16. P. Kieffer, A. Robert, C. Capdeville-Atkinson, J. Atkinson & I. Lartaud-Idjouadiene: Age-related arterial calcifications in rats. *Life Sci* 66(24), 2371-2381 (2000)
 17. F. Grases, J. Perelló, B. Isern & R. M. Prieto: Determination of myo-inositol hexakisphosphate (phytate) in urine by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) *Anal Chim Acta* 510, 41-43 (2004)
 18. R. W. Romberg, P. G. Werness, B. L. Riggs & K. G. Mann: Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* 25(5), 1176-1180 (1986)
 19. A. L. Boskey, M. Maresca, W. Ullrich, S. B. Doty, W. T. Butler & C. W. Prince: Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: Inhibition of hydroxyapatite formation and growth in gelatin-gel. *Bone Miner* 22(2), 147-159 (1993)
 20. D. Couchourel, C. Escoffier, R. Rohanizadeh, S. Bohic, G. Daculsi, Y. Fortun & M. Padrines: Effects of fibronectin on hydroxyapatite formation. *J Inorg Biochem* 73(3), 129-136 (1999)
 21. G. K. Hunter & H. A. Goldberg: Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18), 8562-8565 (1993)
 22. G. K. Hunter, P.V. Hauschka, A. R. Poole, L. C. Rosenberg & H. A. Goldberg: Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 317(1), 59-64 (1996)
 23. L. Liaw, M. P. Skinner, E. W. Raines, R. Ross, D. A. Cheresch, S. M. Schwartz & C. M. Giachelli: The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest* 95(2), 713-724 (1995)
 24. A. Govindaraj & R. Selvam: An oxalate-binding protein with crystal growth promoter activity from human kidney stone matrix. *BJU Int* 90(3), 336-344 (2002)
 25. T. Yamate, K. Kohri, T. Umekawa, N. Amasaki, N. Amasaki, Y. Isikawa, M. Iguchi & T. Kurita: The effect of osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals to Madin-Darby canine kidney cells. *Eur Urol* 30(3), 388-393 (1996)
 26. J. C. Lieske, F. Gary Toback & S. Deganello: Sialic acid-containing glycoproteins on renal cells determine nucleation of calcium oxalate dihydrate crystals. *Kidney Int* 60(5), 1784-1791 (2001)
 27. M. Weinreb, D. Shinar, G. A. Rodan: Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *J Bone Miner Res* 5(8), 831-842 (1990)
 28. P. A. Price, J. W. Lothringer, S. K. Nishimoto: Absence of the vitamin K-dependent bone protein in fetal rat mineral. Evidence for another gamma-carboxyglutamic acid-containing component in bone. *J Biol Chem* 255(7), 2938-2942 (1980)
 29. F. Grases, M. Ramis & A. Costa-Bauza: Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Comparison with the action of other phosphates. *Urol Res* 28(2), 136-140 (2000)
 30. K. A. Lomashvili, S. Cobbs, R. A. Hennigar, K. I. Hardcastle & W. C. O'Neill: Phosphate-induced vascular

Phytate inhibits cardiovascular calcifications

calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 15(6), 1392-1401 (2004)

31. J. W. Wilson, P. G. Werness & L. H. Smith: Inhibitors of crystal growth of hydroxyapatite: a constant composition approach. *J Urol* 134(6), 1255-1258 (1985)

Key Words: Phytate, Crystallization Inhibitor, Cardiovascular Calcifications, Heart, Vessel

Send correspondence to: Professor F. Grases, Laboratory of Renal Lithiasis Research, Faculty of Sciences, University of Balearic Islands, 07122 - Palma of Mallorca, Spain, Tel: 034971173257, Fax: 034971173426, E-mail: fgrases@uib.es

<http://www.bioscience.org/current/vol11.htm>

Artículo original 3.4.

***Efecto de los inhibidores de la cristalización
sobre las calcificaciones cardiovasculares
inducidas por vitamina D***

Effect of Crystallization Inhibitors on Vascular Calcifications Induced by Vitamin D

— A Pilot Study in Sprague-Dawley Rats —

Félix Grases, PhD; Pilar Sanchis, MSc; Joan Perelló, PhD;
Bernat Isern, MSc; Rafel M. Prieto, PhD;
Carlos Fernández-Palomeque, MD*; José J Torres, MD*

Background Pathological calcification in soft tissues (ie, ectopic calcification) can have severe consequences. Hydroxyapatite is the common mineral phase present in all tissue calcifications. In general, the development of tissue calcifications requires a pre-existing injury as an inducer (heterogeneous nucleant), whereas further progression requires the presence of other promoter factors (such as hypercalcemia and/or hyperphosphatemia) and/or a deficiency in calcification repressor factors (crystallization inhibitors and cellular defense mechanisms). The present study investigated the capacity of etidronate (a bisphosphonate used in osteoporosis treatment) and phytate (a natural product) to inhibit vascular calcification in rats.

Methods and Results Six male Sprague-Dawley rats in each of the 3 treatment groups were subcutaneously injected with either a placebo (physiological serum solution), etidronate ($0.825 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) or phytate ($0.825 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) for 8 days. Four days into this regimen, calcinosis was induced by subcutaneous injections of 500,000 IU/kg vitamin D at 0h, 24h and 48h. Ninety-six hours after the final vitamin D injection, the rats were killed and aortas and their hearts were removed for histological and calcium analyses. The data showed that phytate-treated rats had lower levels of aortic calcium than placebo-treated rats. All groups had similar heart calcium levels.

Conclusions The present study found that phytate acted as a vascular calcification inhibitor. Thus, the action of polyphosphates could be important in protecting against vascular calcification. (*Circ J* 2007; 71: 1152–1156)

Key Words: Crystallization inhibitors; Etidronate; Phytate; Vascular calcification; Vitamin D

Pathological calcification in soft tissues (ie, ectopic calcification) can have severe consequences when it occurs in vital organs such as the vascular or renal systems. Ectopic calcification in arteries can cause thrombosis, arterial rupture and myocardial infarction^{1–3} In the heart, the most common valvular lesion is aortic stenosis because of valvular calcification, and this can lead to heart failure and death⁴ In the kidneys, tissue calcification can be associated with the formation of the calcium oxalate monohydrate papillary calculi-type kidney stone⁵ and in extreme cases can cause renal failure⁶

Hydroxyapatite (basic calcium phosphate crystals) is the common mineral phase present in all tissue calcifications. In general, the development of tissue calcification requires a preexisting injury as an inducer (heterogeneous nucleant), whereas further progression requires the presence of other promoter factors (such as hypercalcemia and/or hyperphosphatemia) and/or a deficiency in calcification repressor factors (crystallization inhibitors and cellular defense mechanisms).

Several proteins modulate calcification in mammalian

tissues and their activity can either enhance or inhibit the ability of macrophages to destroy hydroxyapatite deposits (ie, osteoclastic activity)^{7–9} A common characteristic of the proteins involved in calcification is calcium ion affinity, and there are 2 major groups of such proteins: phosphoproteins and carboxyproteins. Major phosphoproteins include osteopontin^{10–13} and osteoprotegerin^{14–16} and a major carboxy-protein is matrix Gla protein^{17–19} or bone-Gla-protein, also known as osteocalcin^{9,20} Although these proteins have been suggested to have some crystallization inhibitor activity, the in vitro experiments that demonstrated such effects involved the use of nonphysiological concentrations of these proteins and of calcium and phosphate^{21–23} Moreover, these proteins have been reported to also have some calcification promoter activity because of their heterogeneous nucleant capacity^{24–26} It appears that the major calcification modulator role of these proteins is as regulators of osteoclast/osteoblast cell activity^{7,8,27}

Crystallization inhibitors obstruct or prevent crystal development. In general, crystallization inhibitors bind to the crystal nucleus or to the crystal face and hence prevent or disturb crystal development without any cellular signaling capacity. Pyrophosphate²⁸ bisphosphonates (such as etidronate, alendronate and ibandronate)^{29–31} and phytate (myo-inositol hexakisphosphate)³² have been shown to inhibit crystallization in the form of vascular calcification. Etidronate is used to treat osteoporosis³³ and phytate is a naturally occurring compound that can either be ingested^{34,35} or absorbed topically³⁶

(Received December 21, 2006; revised manuscript received March 26, 2007; accepted April 13, 2007)

Laboratory of Renal Lithiasis Research, University Institute of Health Sciences Research (IUNICS), University of Balearic Islands, *University Hospital Son Dureta, Palma of Mallorca, Spain

Mailing address: Félix Grases, PhD, Laboratory of Renal Lithiasis Research, Faculty of Sciences, University of Balearic Islands, 07122 Palma of Mallorca, Spain. E-mail: fgrases@uib.es

Table 1 Composition of the UAR-A04 Diet

Moisture (g/kg)	119
Crude protein (g/kg)	161
Crude oil (g/kg)	31
Nitrogen free extract (g/kg)	600
Crude fibre (g/kg)	3.9
Calcium (mg/kg)	8,400
Phosphorus (mg/kg)	5,700
Sodium (mg/kg)	2,500
Potassium (mg/kg)	6,400
Manganese (mg/kg)	70
Copper (mg/kg)	17
Phytate (mg/kg dry matter)	9,000

The present study investigated the ability of etidronate and phytate to act as inhibitors of vascular calcification.

Methods

Animals and Diets

Male Sprague-Dawley rats (approximately 450 g) were purchased from Harlan Iberica S.L. (Barcelona, Spain). Rats were given 7 days to acclimatize to the animal house conditions before the experimentation. Rats were fed a UAR-A04 diet (Panlab S.L., Barcelona, Spain; Table 1), and were kept in Plexiglas cages (3 per cage) at a temperature of $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and relative humidity of $60 \pm 5\%$, under a 12 h light/dark cycle.

Experimental procedures were performed according to the Directive 86/609/EEC regarding treatment of animals used for experimental and other scientific purposes. Permission to perform these animal experiments was obtained from the Bioethical Committee of the University.

Treatments

Placebo, Etidronate and Phytate Treatments Rats (6 per group) were administered a placebo, etidronate or phytate subcutaneously once daily for 8 days (ie, for the duration of the experiment). Placebo was administered at $200 \mu\text{l/day}$ as sodium chloride 0.9% solution, etidronate was administered at $0.825 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ in the acid form (Fluka, Buchs, Schweiz), and phytate at $0.825 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ as a sodium salt (Sigma, St Louis, MO, USA).

Calcinosis Induction The rats were treated for 4 days, then underwent calcinosis induction, as described previously.³¹ Briefly, the rats were given 3 subcutaneous injections of 500,000 IU/kg vitamin D (Fort Dodge Veterinaria S.A., Fort Dodge, USA) at 0, 24 and 48 h. They were monitored every 12 h and at 96 h after the 3rd injection they were killed and their aortas and hearts removed for calcium determination and histological analysis.

Histological Analysis

Aortas and hearts were placed in 4% buffered formaldehyde at pH 7 (Panreac, Barcelona, Spain) and fixed for 24 h at room temperature. Tissues were then embedded, sectioned ($4 \mu\text{m}$) and stained with hematoxylin-eosin. Tissue analysis was performed by an experienced pathologist.

Calcium Determination

Aortas and hearts were lyophilized and weighed, and then digested using a 1:1 $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ mixture in a sand bath until the solution was clear. For calcium determination, digested samples were diluted with distilled water to a

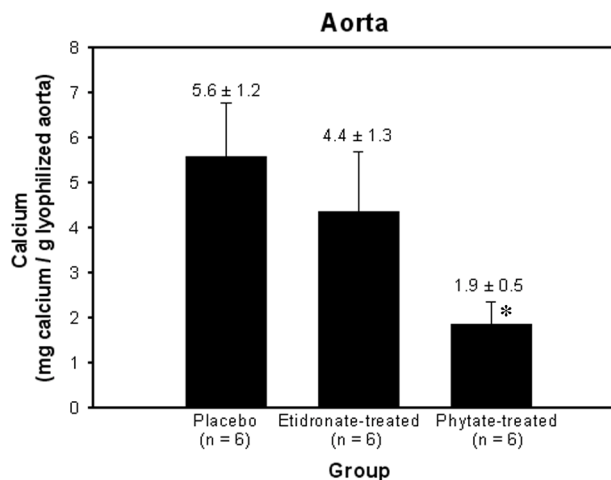


Fig 1. Calcium content of the aortas of placebo-treated, etidronate-treated and phytate-treated rats. * $p < 0.05$ vs the placebo group.

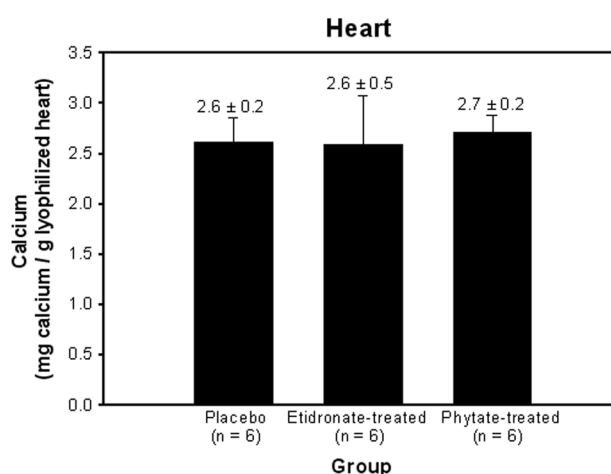


Fig 2. Calcium content of the hearts of placebo-treated, etidronate-treated and phytate-treated rats.

volume of 20 ml, and the concentration of calcium was determined using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (Perkin-Elmer SL, Optima 5300DV spectrometer) and a corresponding calibration curve.

Statistical Analysis

Values are expressed as mean \pm SE. One-way ANOVA was used to determine the significance of differences between groups. Student's *t*-tests were used to assess differences between means. Conventional Windows software was used for statistical computations. A *p*-value < 0.05 was considered to indicate a significant difference.

Results

Analysis of the aortas showed that phytate-treated rats had lower levels of calcium in the aorta (1.9 ± 0.5 mg calcium/g lyophilized aorta) than did placebo-treated rats (5.6 ± 1.2 mg calcium/g lyophilized aorta) (Fig 1). Although etidronate-treated rats (4.4 ± 1.3 mg calcium/g lyophilized aorta) also appeared to have lower aortic calcium levels than placebo-treated rats, this difference was not statisti-

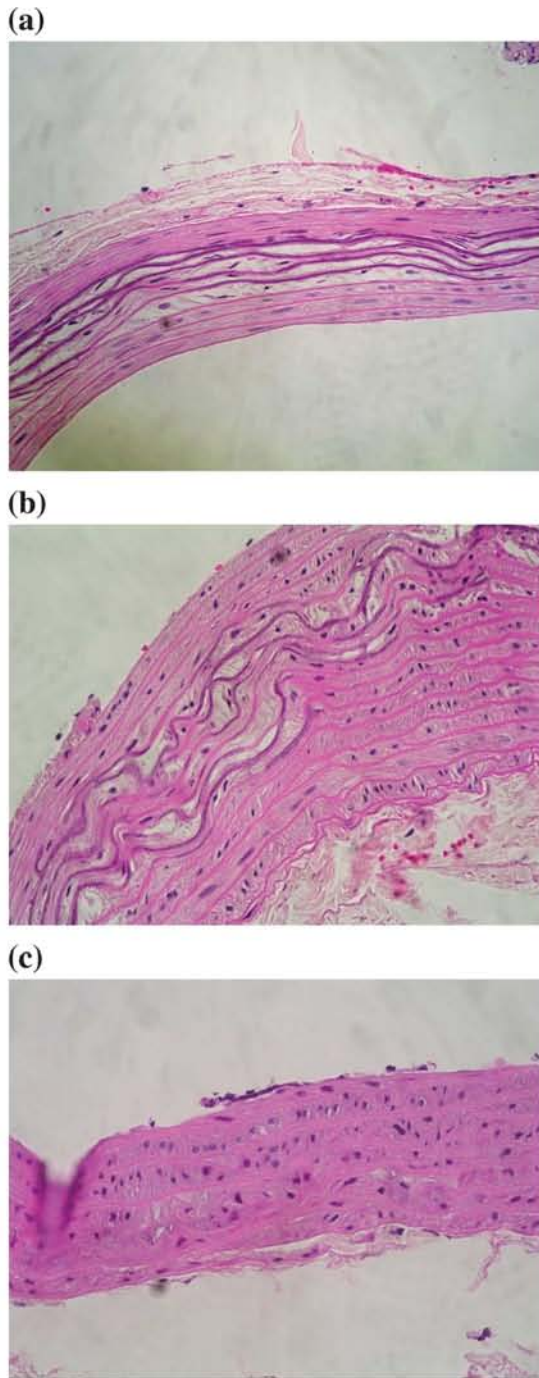


Fig 3. Sections of aortas from placebo-treated (original magnification $\times 100$) (a), etidronate-treated (original magnification $\times 200$) (b) and phytate-treated (original magnification $\times 100$) (c) rats. Each section is stained with hematoxylin-eosin solution, which stains calcification dark purple.

cally significant (Fig 1).

No significant differences were observed in the heart calcium content between the phytate-treated (2.7 ± 0.2 mg calcium/g lyophilized heart), etidronate-treated (2.6 ± 0.5 mg calcium/g lyophilized heart) and placebo-treated (2.6 ± 0.2 mg calcium/g lyophilized heart) rats (Fig 2).

The calcium deposits in the aorta were found to have developed predominantly in the internal tunica vessel layers

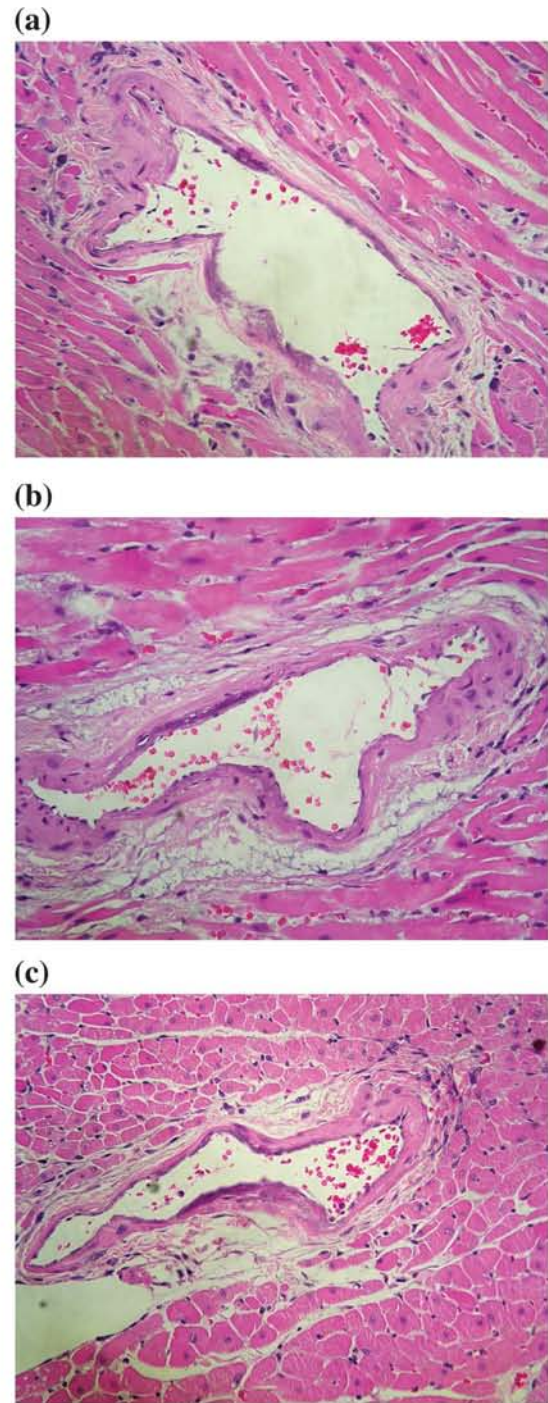


Fig 4. Sections of hearts from placebo-treated (original magnification $\times 200$) (a), etidronate-treated (original magnification $\times 200$) (b) and phytate-treated (original magnification $\times 200$) (c) rats. Each section is stained with hematoxylin-eosin solution, which stains calcification dark purple.

(Fig 3). Heart calcium deposits developed in the walls of the coronary vessels and in the adjacent myocardium (Fig 4). In addition, hearts showed evidence of multiple myocardium necrosis and inflammation (ie, heart attack).

Discussion

The present study examined the effect of etidronate and

phytate on the calcification of vascular tissue in vitamin D-treated rats. The results indicate that phytate treatment reduced aortic calcification, whereas neither etidronate nor phytate reduced calcification in the heart tissue.

The development of ectopic soft tissue calcification, such as vascular calcification and nephrocalcinosis, can be linked to high doses of vitamin D³^{1,37-39} a process that is associated with the consequent hypercalcemia that dramatically increases the supersaturation of calcium phosphate salts in the blood. A previous study using both vitamin D (300,000 IU/kg im) and nicotine (25 mg/kg po) reported higher levels of calcification in the rats' arteries and hearts compared with the current study.³² That study used lower levels of vitamin D, and thus involved lower levels of calcium phosphate supersaturation than the present study. These observations demonstrate the importance of a pre-existing lesion (caused by nicotine in the other study) in the development of tissue calcification.

The present study found that phytate decreased calcification in the aorta, but had no effect in the heart. A previous study found that phytate could inhibit vitamin D and nicotine-induced calcification in both the aorta and the heart of Wistar rats.³² The difference between the findings of the 2 studies may be related to less lesions in the absence of nicotine, and that as a consequence of the higher hydroxyapatite supersaturation (because of increased blood calcium and phosphorus levels), the calcium deposits may have developed directly through homogeneous nucleation and not as a consequence of hydroxyapatite heterogeneous nucleation induced by the injured tissue. The tissue calcium content data for the 2 studies shows that more calcium was deposited when using vitamin D and nicotine than using only high vitamin D doses, despite the former experiments being half the duration of the latter. Aortic lesions were more severe than heart lesions in the present experiments, making the activity of crystallization inhibitors more obvious.

Although etidronate appeared to reduce the aortic calcium content, this effect was not statistically significant. A previous study³¹ reported that the bisphosphonate ibandronate inhibited vitamin D-induced calcification in arteries. It is pertinent to note that other studies have reported that the activity of crystallization inhibitors decreases as supersaturation increases.⁴⁰ In the present study, the protective effect of phytate on aortic calcification was clearly superior to that of etidronate, most likely because phytate has a greater capacity to inhibit hydroxyapatite crystallization than etidronate.⁴¹ The effect of phytate depends on the level of calcium phosphate supersaturation (free calcium and phosphate plasma concentrations) and the severity of the injury. Under normal dietary circumstances the phytate plasma concentration in rats of 5×10^{-7} mol/L is enough to manifest important inhibitory capacity.⁴² However, phytate levels must be increased in order to inhibit crystallization under conditions of supersaturation and severe injury, such as in the present experiments. Administration of phytate as the natural food salt (phytin: calcium magnesium phytate) at amounts that provide maximum absorption, equivalent to doses that correspond to the consumption of the so-called "Mediterranean diet" (1–2 g phytate/day) were not found to have any chronic effect.⁴³ The chronic effects of phytate can be attributed to the decreased availability of oligo-elements such as zinc and iron. Obviously, administration via subcutaneous injection would avoid this problem. Previous work found that phytate only manifested toxic effects at very

high doses (the LD₅₀ value for male rats was 1.3 mmol/kg administered as sodium phytate).⁴⁴

The inhibiting of crystallization appears to facilitate the reabsorption of injured tissue by the immune system. The greater the injury, the more difficult is reabsorption, and the more likely is high-level calcification. Indeed, phagocytosis of hydroxyapatite has been observed in implants,⁴⁵ and basic calcium phosphate crystals can stimulate the endocytotic activity of cells.^{46,47} Hence, crystallization inhibitors can prevent excessive calcium phosphate precipitation facilitating phagocytosis and calcified injury reabsorption. It has been demonstrated that osteoclast adhesion to hydroxyapatite depends on the presence of specific extracellular adhesive proteins.^{7,8,27} Thus, the role of some proteins in the calcification processes is to signal the presence of calcification and hence modulate cell activity, rather than act as crystallization inhibitors.

Phytate has shown a powerful capacity as an inhibitor of hydroxyapatite crystal formation in both in vitro and in vivo experiments.^{48,49} Phytate levels found in tissues reflect dietary intake,^{34,35} as well as topical absorption.³⁶ Bisphosphonates are commonly used for treating osteoporosis, and have also been shown to act as crystallization inhibitors both in vitro and in vivo.²⁹⁻³¹ Pyrophosphate, another well-known inhibitor of calcium salt crystallization, is also reported to prevent vascular calcification.²⁸ Notably, these molecules have structural similarities (polyphosphates), which explains their common activity. It appears that the action of polyphosphates (of natural origin or not) could be important in protecting against vascular calcification. These compounds, plus the action of cell modulator proteins, can combine to result in both the minimization of the size of the calcified lesions and the reabsorption of such lesions.

Conclusion

The present study found that phytate acted as a vascular calcification inhibitor. Thus, the action of polyphosphates could be important in protecting against vascular calcifications.

Acknowledgments

Pilar Sanchis expresses appreciation to the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport for a FPU program fellowship, and Bernat Isern expresses appreciation to the Conselleria d'Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears for a fellowship.

This work was supported by the Conselleria d'Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears (Grant PRDIB-2002GCI-04) and by the project grant CTQ2006-05640/BQU from the Spanish Ministry of Science and Technology.

References

1. Beadenkopf WG, Daoud AS, Love BM. Calcification in the coronary arteries and its relationship to arteriosclerosis and myocardial infarction. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1964; **92**: 865–871.
2. Loecker TH, Schwartz RS, Cotta CW, Hickman JR Jr. Fluoroscopic coronary artery calcification and associated coronary disease in asymptomatic young men. *J Am Coll Cardiol* 1992; **19**: 1167–1172.
3. Wong ND, Detrano RC, Abrahamson D, Tobis JM, Gardin JM. Coronary artery screening by electron beam computed tomography: Facts, controversy, and future. *Circulation* 1995; **92**: 632–636.
4. O'Keefe JH Jr, Lavie CJ, Nishimura RA, Edwards WD. Degenerative aortic stenosis: One effect of the graying of America. *Postgrad Med* 1991; **89**: 143–146, 151–154.
5. Kim SC, Coe FL, Timmuth WW, Kuo RL, Paterson RF, Parks JH, et al. Stone formation is proportional to papillary surface coverage by Randall's plaque. *J Urol* 2005; **173**: 117–119.

6. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study. *Am J Kidney Dis* 1998; **31**: 607–617.
7. Bas A, Lopez I, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J Bone Miner Res* 2006; **21**: 484–490.
8. Redey SA, Razzouk S, Rey C, Bemache-Assollant D, Leroy G, Nardin M, et al. Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: Relationship to surface energies. *J Biomed Mater Res* 1999; **45**: 140–147.
9. Shen M, Marie P, Farge D, Carpentier S, De Pollak C, Hott M, et al. Osteopontin is associated with bioprosthetic heart valve calcification in humans. *C R Acad Sci III* 1997; **320**: 49–57.
10. Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1993; **92**: 1686–1696.
11. O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE, et al. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 1995; **92**: 2163–2168.
12. Reinholt FP, Hulthén K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontin: A possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4473–4475.
13. Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 8156–8160.
14. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; **12**: 1260–1268.
15. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; **89**: 309–319.
16. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yanai K, Fujise N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998; **139**: 1329–1337.
17. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; **386**: 78–81.
18. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; **18**: 1400–1407.
19. Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 2002; **277**: 4388–4394.
20. Levy RJ, Schoen FJ, Levy JT, Nelson AC, Howard SL, Oshry LJ. Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. *Am J Pathol* 1983; **113**: 143–155.
21. Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: Inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner* 1993; **22**: 147–159.
22. Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8562–8565.
23. Hunter GK, Haushka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 1996; **317**: 59–64.
24. Govindaraj A, Selvam R. An oxalate-binding protein with crystal growth promoter activity from human kidney stone matrix. *BJU Int* 2002; **90**: 336–344.
25. Lieske JC, Toback FG, Deganello S. Sialic acid-containing glycoproteins on renal cells determine nucleation of calcium oxalate dihydrate crystals. *Kidney Int* 2001; **60**: 1784–1791.
26. Yamate T, Kohri K, Umekawa T, Amasaki N, Amasaki N, Isikawa Y, et al. The effect of osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals to Madin-Darby canine kidney cells. *Eur Urol* 1996; **30**: 388–393.
27. Ruoslahti E, Obrink B. Common principles in cell adhesion. *Exp Cell Res* 1996; **227**: 1–11.
28. Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC. Phosphate-induced vascular calcification: Role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 1392–1401.
29. Bevilacqua M, Dominguez LJ, Rosini S, Barbagallo M. Bisphosphonates and atherosclerosis: Why? *Lupus* 2005; **14**: 773–779.
30. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**: 817–824.
31. Price PA, Buckley JR, Williamson MK. The amino bisphosphonate ibandronate prevents vitamin D toxicity and inhibits vitamin D-induced calcification of arteries, cartilage, lungs and kidneys in rats. *J Nutr* 2001; **131**: 2910–2915.
32. Grases F, Sanchis P, Perello J, Isem B, Prieto RM, Fernandez-Palomeque C, et al. Phytate (myo-inositol hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats. *Front Biosci* 2006; **11**: 136–142.
33. Francis RM. Bisphosphonates in the treatment of osteoporosis in 1997: A review. *Curr Ther Res Clin Exp* 1997; **58**: 656–678.
34. Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG. Variation of InsP₄, InsP₅ and InsP₆ levels in tissues and biological fluids depending on dietary phytate. *J Nutr Biochem* 2001; **12**: 595–601.
35. Grases F, Simonet BM, Vucenik I, Prieto RM, Costa-Bauza A, March JG, et al. Absorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP₆ or phytate) in humans. *Biofactors* 2001; **15**: 53–61.
36. Grases F, Perello J, Isem B, Prieto RM. Study of a myo-inositol hexaphosphate-based cream to prevent dystrophic calcinosis cutis. *Br J Dermatol* 2005; **152**: 1022–1025.
37. Coburn JW, Barbour GL. Vitamin D intoxication and sarcoidosis. In: Coe FL, editor. Hypercalcaemic states: Pathogenesis, consequences and treatment. Orlando, Grune and Stratton; 1984; 379–406.
38. Pettifor JM, Bikle DD, Cavaleros M, Zachen D, Kamdar MC, Ross FP. Serum levels of free 1,25-dihydroxyvitamin D in vitamin D toxicity. *Ann Intern Med* 1995; **122**: 511–513.
39. Stern PH, Bell NH. Disorders of vitamin D metabolism: Toxicity and hypersensitivity. In: Tam CS, Heersche JNM, Murrat TM, editors. Metabolic bone disease: Cellular and tissue mechanism. Boca Raton: CRC Press; 1989; 203–213.
40. Grases F, Costa-Bauza A, Konigsberger E, Konigsberger LC. Kinetic versus thermodynamic factors in calcium renal lithiasis. *Int Urol Nephrol* 2000; **32**: 19–27.
41. Grases F, Ramis M, Costa-Bauza A. Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization: Comparison with the action of other polyphosphates. *Urol Res* 2000; **28**: 136–140.
42. Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG. Phytate levels in diverse rat tissues: Influence of dietary phytate. *Br J Nutr* 2001; **86**: 225–231.
43. Grases F, Simonet BM, Perello J, Costa-Bauza A, Prieto RM. Effect of phytate on element bioavailability in the second generation of rats. *J Trace Elem Med* 2004; **17**: 229–234.
44. Ichikawa H, Ohishi S, Takahashi O, Kobayashi H, Yuzawa K, Hosokawa N, et al. Acute oral toxicities of phytic acid and sodium phytate in rats. *Kenkyu Nenpo-Tokyo-toritsu Eisei Kenkyusho* 1987; **38**: 371–376.
45. Najman S, Dordevic Lj, Savic V, Ignjatovic N, Plavsic M, Uskokovic D. Changes of HAp/PLLA biocomposites and tissue reaction after subcutaneous implantation. *Facta Universitatis* 2003; **10**: 131–134.
46. Nadra I, Mason JC, Philippidis P, Florey O, Smythe CDW, McCarthy GM, et al. Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: A vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ Res* 2005; **96**: 1248–1256.
47. Sun YB, Zeng XR, Wenger L, Cheung HS. Basic calcium phosphate crystals stimulate the endocytotic activity of cells-inhibition by anti-calcification agents. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **312**: 1053–1059.
48. Grases F, Prieto RM, Simonet BM, March JG. Phytate prevents tissue calcifications in female rats. *Biofactors* 2000; **11**: 171–177.
49. Grases F, Perello J, Prieto RM, Simonet BM, Torres JJ. Dietary myo-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues: A pilot study in Wistar rats. *Life Sci* 2004; **75**: 11–19.

Artículo original 3.5.

***El fitato y las calcificaciones
cardiovasculares relacionadas con el
envejecimiento en ratas***

PHYTATE (MYO-INOSITOL HEXAKISPHOSPHATE) AND AGE-RELATED CARDIOVASCULAR CALCIFICATION IN RATS

Short title: Cardiovascular calcification, aging and phytate.

* Félix Grases, Professor¹; Pilar Sanchis, MSc¹; Joan Perelló, PhD¹; Bernat Isern, MSc¹; Rafel M. Prieto, PhD¹; Carlos Fernández-Palomeque, MD²; Carles Saus, MD²

¹Laboratory of Renal Lithiasis Research, University Institute of Health Sciences Research (IUNICS), University of Balearic Islands; CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB06/03), Instituto de Salud Carlos III, Spain.

²University Hospital Son Dureta, Palma of Mallorca, Spain.

* Corresponding author: Prof. F. Grases - Laboratory of Renal Lithiasis Research - Faculty of Sciences - University of Balearic Islands - 07122 - Palma of Mallorca - Spain - Tel: 034971173257
Fax: 034971173426 - E-mail: fgrases@uib.es.

ABSTRACT

Background. Human arterial and valvular calcification increases progressively with aging and there are no drugs available to prevent its occurrence. Phytate is a natural polyphosphate that has been shown to inhibit calcium salt crystallization in urine and soft tissues. The aim of this research was to evaluate the effect of dietary phytate on cardiovascular calcification in rats during aging.

Methods and Results. Male Wistar rats (10 weeks old) were randomly assigned to four diet groups. The control group was fed with a balanced diet (UAR-A04) containing phytate. The AIN group was fed with a purified diet (AIN-76A) in which phytate is undetectable. The PHY group was fed with a purified diet (AIN-76A) enriched with phytate (phytin, as the calcium magnesium salt). The MOD group was fed with the AIN-76A diet (phytate undetectable) enriched with MgO, inositol and CaHPO₄. At 76 weeks of age all rats were sacrificed, and the aortas, hearts, kidneys, livers and femurs were removed for chemical analysis. The most significant differences were found in the aorta calcium content. Phytate-treated rats (the control and PHY groups) had significantly lower levels of calcium in the aorta compared to nonphytate-treated rats (AIN and MOD groups).

Conclusions. The present study demonstrated that dietary phytate treatment significantly reduced age-related aorta calcification.

Key words: cardiovascular calcification, aging, phytate, diet, prevention

INTRODUCTION

Human arterial and valvular calcification increases progressively during aging and is amplified by vascular pathologies such as hypertension or arteriosclerosis¹⁻³. Moreover, age-linked ectopic calcification has poor prognosis and there are no drugs available to prevent its occurrence.

Development of pathological tissue calcification requires a pre-existing injury to act as an inducer (heterogeneous nucleus) of calcification: dead cells and/or their membranes act as important heterogeneous nuclei for calcium phosphate (hydroxyapatite) crystallization⁴. Another major factor in arterial wall calcification is a deficiency in calcification repressor factors (cellular defense mechanisms and/or crystallization inhibitors). A number of studies have documented expression of several mineralization-regulating proteins in soft tissue calcification leading to the suggestion that these proteins play a role in vascular calcification acting as cellular or molecular regulators. The common characteristic of these proteins is calcium ion affinity. These proteins include osteopontin⁵⁻⁹, osteoprotegerin¹⁰⁻¹², matrix Gla protein¹³⁻¹⁵ and osteocalcin (also known as bone Gla protein)^{16,17}. These cell activity-modulating proteins have also been shown to act as crystallization inhibitors¹⁸⁻²⁰ *in vitro*, but these data were obtained using protein, free calcium and phosphate concentrations outside typical physiological ranges. Some of these proteins have also been reported to be calcification promoters due to heterogeneous nucleation activity²¹⁻²³. Despite the reports that these proteins have crystallization inhibitor/promoter activity, it is likely that their major role in calcification is as modulators of osteoclast/osteoblast-like cell activity and cell differentiation.

Crystallization inhibiting substances are normally non-signaling molecules that bind to the crystal nucleus or faces and, as a consequence, prevent or disrupt crystal development. Crystallization inhibitors are effective at significantly lower concentrations than chelating agents, which act by decreasing target ion supersaturation. Some molecules have been reported to inhibit crystallization associated with cardiovascular calcification, including pyrophosphate²⁴⁻²⁶, bisphosphonates (e.g. etidronate, alendronate and ibandronate)²⁷⁻³⁰ and phytate (myo-inositol hexakisphosphate)^{31,32}. We recently showed that phytate significantly inhibited calcification in the aorta and heart of male Wistar rats treated with vitamin D and nicotine³¹. Phytate has also been shown to act as a vascular calcification inhibitor in male Sprague-Dawley rats treated with high doses of vitamin D, and the effect was clearly superior to that of etidronate³².

The aim of the present study was to evaluate the role of dietary phytate in cardiovascular calcification in rats during aging.

MATERIAL AND METHODS

Animals and diets

Sixty male Wistar rats of approximately 250 g (10 weeks of age; Harlan Iberica S. L., Barcelona, Spain) were acclimated over 7 days in our animal house. Animals were kept on a 12 h light:dark cycle in Plexiglas cages (three animals per cage) at $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and relative humidity of $60 \pm 5\%$. After acclimation the animals were randomly assigned to 4 groups (control, AIN, PHY and MOD) of 15 rats each. The control group was fed a balanced diet that contains phytate (UAR-A04; Panlab S.L., Barcelona, Spain), the AIN group was fed a purified diet in which phytate is undetectable (AIN-76A; Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany), the PHY group was fed a modified AIN-76A diet enriched by the addition of phytate at a concentration equivalent to that in UAR-A04 (AIN-76A + 12990 mg/kg phytin; Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany), and the MOD group was fed with a modified AIN-76A diet in which phytate is undetectable (no added phytin) but with the same magnesium, calcium and phosphorus concentrations as the PHY diet (AIN-76A + 1220 mg/kg MgO + 1720 mg/kg inositol + 9050 mg/kg CaHPO₄; Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany). The mineral compositions of the diets are listed in Table 1.

Table 1. Mineral composition of the four diets used in the study: UAR-A04, AIN-76A, AIN-76A enriched with phytate (AIN-76A + 12990 mg/kg phytin), and AIN-76A modified diet (AIN-76A + 1220 mg/kg MgO + 1720 mg/kg inositol + 9050 mg/kg CaHPO₄). *Statistics:* **a:** $p < 0.05$ vs. the corresponding value for UAR-A04; **b:** $p < 0.05$ vs. the corresponding value for AIN-76A; **c:** $p < 0.05$ vs. the corresponding value for AIN-76A + phytin.

	UAR-A04 (n = 3)	AIN-76A (n = 3)	AIN-76A + phytin (n = 3)	AIN-76A modified (n = 3)
Calcium (mg/g dry weight)	9.3 ± 0.2	6.2 ± 0.1 ^a	8.1 ± 0.4 ^b	8.9 ± 0.1 ^b
Magnesium (mg/g dry weight)	1.75 ± 0.05	0.69 ± 0.01 ^a	1.62 ± 0.01 ^b	1.60 ± 0.01 ^b
Manganese (mg/g dry weight)	0.069 ± 0.006	0.056 ± 0.001	0.055 ± 0.001	0.057 ± 0.01
Iron (mg/g dry weight)	0.25 ± 0.03	0.056 ± 0.001 ^a	0.057 ± 0.003 ^a	0.059 ± 0.002 ^a
Zinc (mg/g dry weight)	0.051 ± 0.002	0.045 ± 0.001	0.040 ± 0.004	0.041 ± 0.003
Phytate (mg/g dry weight)	7.3 ± 0.2	< 0.01 ^a	10 ± 0.3 ^{a,b}	< 0.01 ^{a,c}

Experimental procedures were performed according to Directive 86/609/EEC concerning the treatment of animals used for experimental and other scientific purposes. Permission to perform these animal experiments was obtained from the Bioethical Committee of our University. The present study conforms with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Echocardiographic study

At 76 weeks of age, 15 rats randomly chosen from the AIN and PHY groups (termed AIN and PHY subgroups, respectively) were subjected to an echocardiographic examination by an experienced echocardiographer using a Vivid-i echo platform (General Electric and Vigmed Ultrasound Systems, Horten, Norway) with a 10 MHz sector phased array probe. The rats were sedated with 0.2 mg intraperitoneal ketamine (Merial, Lyon, France) plus 0.02 mg medetomidine (OrionPharma, Espoo, Finland). The aortic root wall, mitral annulus and aortic valve were analyzed, and digital file records of the studies were reviewed to score the degree of calcification according to previously described echocardiographic criteria³³: 1 – no calcification, 2 – mild calcification, 3 – moderate calcification, 4 – severe calcification. The frame rate used was at least 250 fps. The echocardiographer had no knowledge of which animal group was being analyzed.

Monitoring and sampling

Animal weights and diet intake were monitored throughout the study. At 76 weeks of age, all rats were sacrificed and aortas, hearts, kidneys, livers and femurs were removed.

Histological analysis

Aortas from 3 rats of each group were placed in 4% buffered (pH = 7) formaldehyde (Panreac, Barcelona, Spain) and fixed for 24 h at room temperature. After fixation, two sections of each aorta, one from aortic arch and one from abdominal aorta, were embedded in paraffin blocks. Histological 4 μ m sections were obtained and stained with Hematoxylin Eosin and Von Kossa stain. All sections were examined by an experienced pathologist.

Chemical analysis

Organs, tissues and diets were lyophilized and weighed, and then digested using a 1:1 HNO₃:HClO₄ mixture in a sand bath until the solution was clear. Digested samples were diluted with distilled water to a volume of 20 ml. The concentrations of calcium, magnesium, manganese, iron and zinc were determined using inductively-coupled plasma atomic emission spectrometry (Optima 5300DV spectrometer; Perkin-Elmer S. L.) and a corresponding calibration curve.

Statistics

Chemical analysis values are expressed as mean \pm SE. A one-way ANOVA was used to determine the significance of differences among groups. Student's *t* tests were used to assess differences between means. In the echocardiographic study, Fisher's Exact test was used to determine significant differences among groups. Conventional Windows software was used for statistical computations. A *p* value < 0.05 was considered to indicate a significant difference.

RESULTS

No significant differences in body weight were found among the groups throughout the study. Figure 1 shows the body weight trajectory for each group.

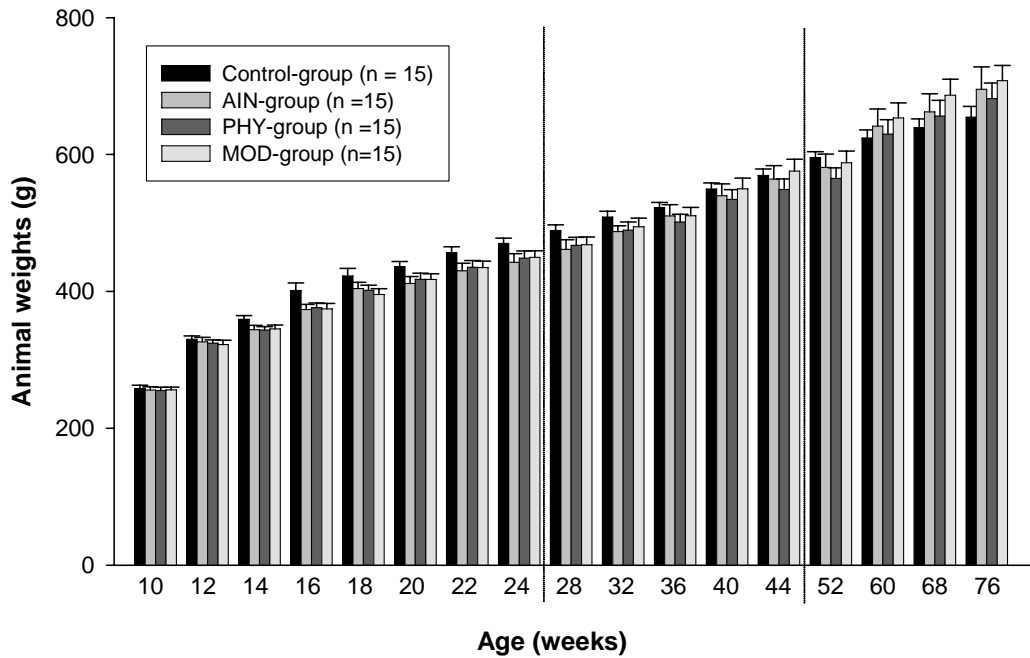


Figure 1. Animal weight trajectories for rats in the control, AIN, PHY and MOD groups.

Figure 2 and Table 2 show the results of chemical analyses (Ca, Mg, Mn, Fe, Zn) of the aorta, heart, kidney, liver and femur for the four groups.

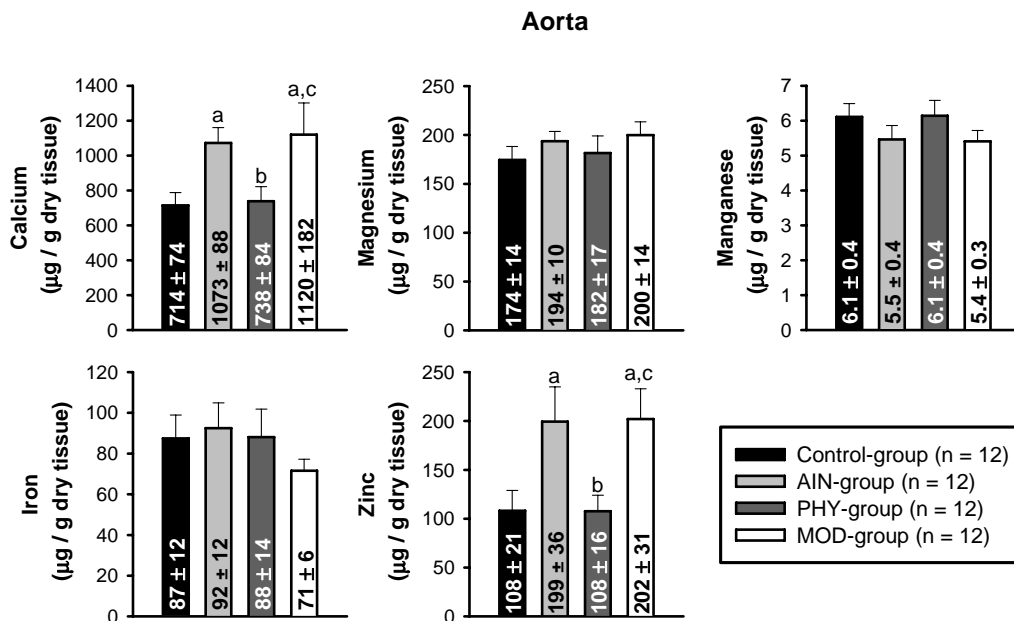


Figure 2. Chemical analysis (Ca, Mg, Mn, Fe, Zn) of the aorta for rats in the control, AIN, PHY and MOD groups. *Statistics*. **a**: $p < 0.05$ vs. the corresponding value for the control group; **b**: $p < 0.05$ vs. the corresponding value for the AIN group; **c**: $p < 0.05$ vs. the corresponding value for the PHY-group.

Table 2. Chemical analysis (Ca, Mg, Mn, Fe, Zn) of the heart, kidney, liver and femur for rats in the control, AIN, PHY and MOD groups. *Statistics:* a: $p < 0.05$ vs. the corresponding value for the control group.

	Control group (n = 15)	AIN group (n = 15)	PHY group (n = 15)	MOD group (n = 15)
Heart				
Calcium ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	196 \pm 10	196 \pm 8	204 \pm 16	186 \pm 9
Magnesium ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	514 \pm 76	495 \pm 68	440 \pm 65	498 \pm 66
Manganese ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	1.2 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
Iron ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	301 \pm 11	266 \pm 13 ^a	242 \pm 11 ^a	263 \pm 7 ^a
Zinc ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	64 \pm 7	60 \pm 7	62 \pm 7	58 \pm 6
Kidney				
Calcium ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	372 \pm 11	351 \pm 16	360 \pm 14	344 \pm 21
Magnesium ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	706 \pm 22	677 \pm 25	660 \pm 19	649 \pm 23
Manganese ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	3.0 \pm 0.2	3.0 \pm 0.1	2.9 \pm 0.1	2.6 \pm 0.1
Iron ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	673 \pm 32	587 \pm 22 ^a	564 \pm 22 ^a	542 \pm 19 ^a
Zinc ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	78 \pm 6	81 \pm 9	74 \pm 5	67 \pm 3
Liver				
Calcium ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	158 \pm 7	173 \pm 26	168 \pm 12	189 \pm 10
Magnesium ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	454 \pm 20	462 \pm 38	451 \pm 20	499 \pm 18
Manganese ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	4.8 \pm 0.2	4.4 \pm 0.3	4.7 \pm 0.2	4.7 \pm 0.3
Iron ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	835 \pm 75	641 \pm 50 ^a	650 \pm 43 ^a	647 \pm 27 ^a
Zinc ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	65 \pm 2	63 \pm 3	67 \pm 5	68 \pm 2
Femur				
Calcium (mg/g dry weight)	263 \pm 3	248 \pm 6 ^a	246 \pm 5 ^a	247 \pm 3 ^a
Magnesium (mg/g dry weight)	4.4 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1 ^a	3.9 \pm 0.2 ^a	4.1 \pm 0.1 ^a
Manganese ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	0.61 \pm 0.03	0.77 \pm 0.03 ^a	0.73 \pm 0.03 ^a	0.75 \pm 0.02 ^a
Iron ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	41 \pm 3	44 \pm 4	37 \pm 3	36 \pm 3
Zinc ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	214 \pm 4	210 \pm 3	207 \pm 3	216 \pm 8

The most significant differences were found in the aorta chemical content (see Figure 2). Phytate-treated rats (the control and PHY groups) had significantly lower levels of calcium and zinc in the aorta compared to nonphytate-treated rats (AIN and MOD groups). These results clearly suggest that dietary phytate treatment results in a significant reduction of zinc accumulation and aortic calcification due to aging. Histological analysis revealed that aortic calcified deposits were mainly associated with the medial elastic lamellae (Figure 3).

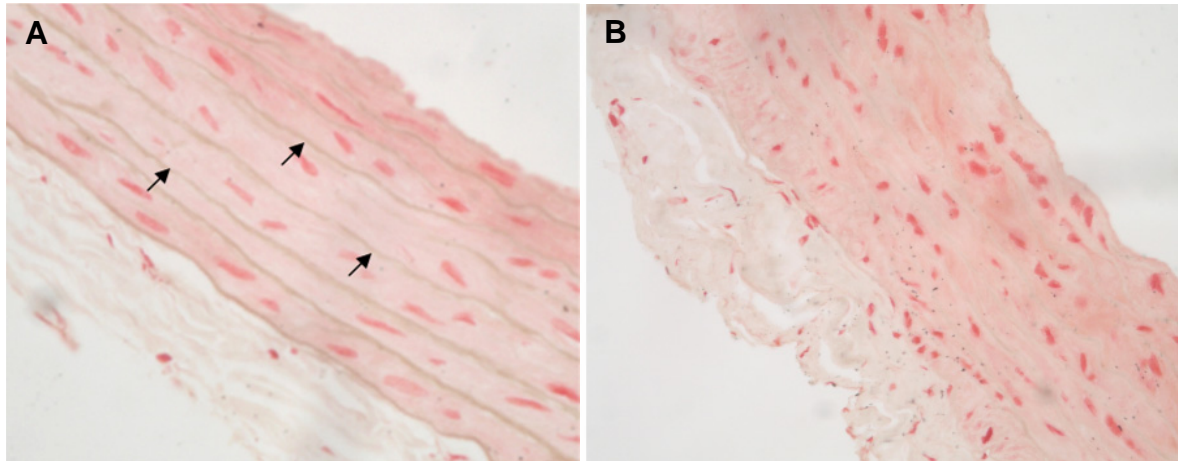


Figure 3. Aorta sections (original magnification $\times 100$) after Von Kossa stain: (A) AIN group (B) PHY group. Aortic calcification (dark purple areas, arrows) was greater for the AIN and MOD groups than for the control and PHY groups. Calcium deposits were associated with medial elastic fibers.

No significant differences were found in the calcium, magnesium, manganese or zinc content among groups with respect to the mineral content of the heart, kidney and liver. However, significant differences in iron content were found between the control group and the other three groups, which may be a consequence of the higher iron content of the UAR diet relative to the other diets (see Table 1). Significant differences were also found in the femur chemical analysis between the control group and other three groups, with respect to calcium, magnesium and manganese levels. These results indicate that phytate (as calcium magnesium salt) did not affect element bioavailability (see Table 2).

Table 3 and Figure 4 show the results of the echocardiographic study. Most rats in the PHY subgroup had significantly less calcification in the aortic root wall and mitral annulus compared to rats in the AIN subgroup. No differences in aortic valve calcification were detected between these subgroups.

Table 3. Echocardiographic results (expressed as number of rats) for the AIN ($n = 7$) and PHY ($n = 8$) subgroups according to the following criteria: 1 – no calcification, 2 – mild calcification, 3 – moderate calcification, 4 – severe calcification. *Statistics. a:* $p < 0.05$ vs. the corresponding value for the AIN subgroup.

	Aortic root wall		Aortic valve		Mitral annulus	
	AIN subgroup	PHY subgroup ^a	AIN subgroup	PHY subgroup	AIN subgroup	PHY subgroup ^a
No or mild calcification (scores 1 and 2)	0	5	5	6	2	7
Moderate or severe calcification (scores 3 and 4)	7	3	2	2	5	1

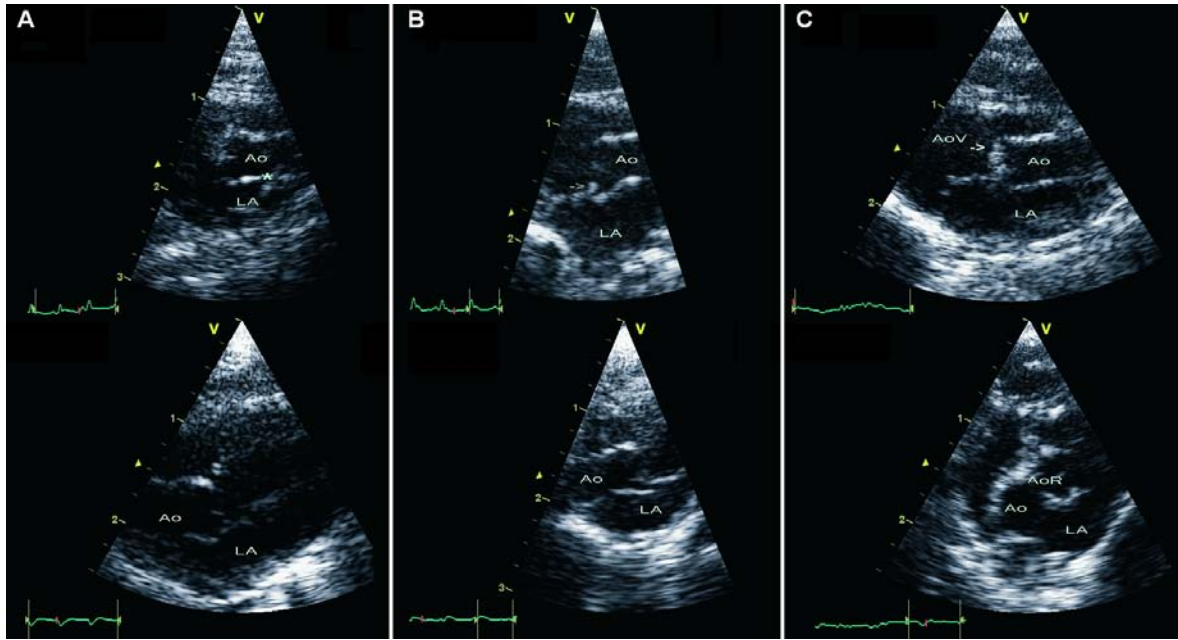


Figure 4. Images of the echocardiographic study (upper: long axis view, bottom: subcostal view). The degree of calcification was scored according to previously described echocardiographic criteria (Rosenhek et al., 2004); (A) example of score 2 – mild calcification. Echo intensity increased in small isolated spots (star) in aortic wall; (B) example of score 3 – moderate calcification. More uniform thickening of the aortic wall extended to the posterior cusp of the aortic valve; (C) Example of score 4 – severe calcification. Severe thickening affecting the aortic root and the aortic valve. *Abbreviations.* Ao.- Aorta. AoV.- Aortic valve. AoR.- Aortic root. LA.- Left atrium.

DISCUSSION

As has previously been described, the calcium content in arteries of rats increases with age². The present study found that dietary phytate treatment significantly reduced aortic calcification during aging.

It has been known since the 1930s that the presence of trace amounts of molecules including polyphosphates can act as water softeners by inhibiting crystallization of calcium salts such as calcium carbonate. However, the use of such compounds as regulators of calcification under physiological conditions was not explored until the 1960s. During that decade, Fleisch *et al.* showed that pyrophosphate, a naturally occurring polyphosphate, was present in serum and urine, and could prevent calcification by binding to hydroxyapatite^{34,35}. However, studies using animal models found that pyrophosphate could inhibit ectopic calcification in blood vessels and kidneys only when injected rather than ingested. Oral administration was found to cause hydrolysis and hence inactivation of pyrophosphate, and this led to a search for more stable analogues. Bisphosphonates, a group of synthetic polyphosphates, were found to have a high affinity for hydroxyapatite and to prevent calcification both *in vitro* and *in vivo*, even when administered orally³⁶.

Phytate is abundant in plant seeds, and has been shown to inhibit vascular calcification and calcium salt crystallization in urine and soft tissues^{31,32,37,38}, as do other polyphosphates such as pyrophosphate and bisphosphonates³⁹. Phytate is found in all mammalian organs, tissues and fluids^{40,41} which are dependent upon an exogenous supply, either oral^{40,41} or topical^{42,43}.

Administration of phytate as a food salt (phytin, as calcium magnesium phytate) in amounts corresponding to the so-called 'Mediterranean diet' (1–2 g phytate/day) has not been found to have any negative effect ⁴⁴, and phytate is only toxic at very high doses ⁴⁵, with an oral LD50 (as the sodium salt) of 1.3 mmol·kg⁻¹ for male rats.

The present study demonstrated that phytate decreased calcification in the aorta during aging. Histological analysis showed that calcified deposits were mainly associated with the medial elastic lamellae (Figure 3). A striking feature of arterial aging is the progressive thinning, splitting, fraying and fragmentation of elastic lamellae ^{46,47}, and the intensity of calcification during aging follows the elastin gradient, with larger arteries having proportionately higher levels of elastin and calcification ⁴⁷. Accordingly, gradual disruption of elastic fibers could act as an inducer of calcification through heterogeneous nucleation of calcium phosphate crystals on such fibers, and so facilitate the age-linked calcification process. The action of crystallization inhibitors which avoid hydroxyapatite development appears to involve re-absorption of injured tissue by the immune system. With worse injuries, re-absorption is more problematic and there is greater likelihood of high-level calcification. Indeed, phagocytosis of hydroxyapatite has been observed in implants ⁴⁸, and basic calcium phosphate crystals can stimulate the endocytotic activity of cells ^{49,50}. Hence, crystallization inhibitors such as phytate can prevent excessive calcium phosphate precipitation, facilitating phagocytosis and post-injury re-absorption. Phytate has also been demonstrated to have antioxidant properties as a consequence of its capacity to avoid free radical formation ⁵¹. The results obtained support the current view that whole-grain is an important dietary component associated with reduced risk of cardiovascular events ⁵²⁻⁵⁴, with phytate probably being beneficially involved due to its activity as a crystallization inhibitor and also as an antioxidant.

ACKNOWLEDGMENTS

P.S. expresses appreciation to the *Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España* for an FPU program fellowship. B.I. expresses appreciation to *the Conselleria d'Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears* for a fellowship. This work was supported by the *Conselleria d'Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears* (Grant PRDIB-2002GC1-04) and by the project grant CTO2006-05640/BQU from the *Ministerio de Ciencia y Tecnología de España*. We also express our gratitude to Mar Felix Fando, veterinarian, for her help in the echocardiographic study.

REFERENCES

1. R. J. Elliott and L. T. McGrath: Calcification of the human thoracic aorta during aging. *Calcif Tissue Int* 54, 268-273 (1994).
2. P. Kieffer, A. Robert, C. Capdeville-Atkinson, J. Atkinson and I. Lartaud-Ijdouadiene: Age-related arterial calcification in rats. *Life Sci* 66, 2371-2381 (2000).
3. A. Boon, E. Cheriex, J. Lodder and F. Kessels: Cardiac valve calcification: characteristics of patients with calcification of the mitral annulus or aortic valve. *Heart* 78, 472-474 (1997).
4. B. B. Tomazic: Physiochemical principles of cardiovascular calcification. *Z Kardiol* 90, 68-80 (2001).
5. H. Yoshitake, S. R. Rittling, D. T. Denhardt and M. Noda: Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Natl Acad Sci U S A* 96, 8156-8160 (1999).
6. F. P. Reinholt, K. Hulthenby, A. Oldberg and D. Heinegard: Osteopontin - a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4473-4475 (1990).
7. C. M. Giachelli, N. Bae, M. Almeida, D. T. Denhardt, C. E. Alpers and S. M. Schwartz: Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 92, 1686-1696 (1993).
8. K. D. O'Brien, J. Kuusisto, D. D. Reichenbach, M. Ferguson, C. Giachelli, C. E. Alpers and C. M. Otto: Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 92, 2163-2168 (1995).
9. C. M. Giachelli, M. Scatena and T. Wada: Osteopontin, potential roles in vascular function and dystrophic calcification. *J Bone Miner Metab* 15, 179-183 (1997).
10. H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, S. Mochizuki, K. Yano, N. Fujise, Y. Sato, M. Goto, K. Yamaguchi, M. Kuriyama, T. Kanno, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga and K. Higashio: Identify of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 139, 1329-1337 (1998).
11. W. S. Simonet, D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M. S. Chang, R. Luthy, H. Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H. L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T. M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee and W. J. Boyle: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309-319 (1997).
12. N. Bucay, I. Sarosi, C. R. Dunstan, S. Morony, J. Tarpley, C. Capparelli, S. Scully, H. L. Tan, W. Xu, D. L. Lacey, W. J. Boyle and W. S. Simonet: Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12, 1260-1268 (1998).
13. G. Luo, P. Ducy, M. D. McKee, G. J. Pinero, E. Loyer, R. R. Behringer and G. Karsenty: Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386, 78-81 (1997).
14. A. F. Zebboudj, M. Imura and K. Bostrom: Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 277, 4388-4394 (2002).
15. P. A. Price, S. A. Faus and M. K. Williamson: Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1400-1407 (1998).
16. R. J. Levy, F. J. Schoen, J. T. Levy, A. C. Nelson, S. L. Howard and L. J. Oshry: Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. *Am J Pathol* 113, 143-155 (1983).
17. A. P. Gadeau, H. Chaullet, D. Daret, M. Kockx, J. M. Daniel-Lamaziere and C. Desgranges: Time course of osteopontin, osteocalcin, and osteonectin accumulation and calcification after acute vessel wall injury. *J Histochem Cytochem* 49, 79-86 (2001).
18. A. L. Boskey, M. Maresca, W. Ullrich, S. B. Doty, W. T. Butler and C. W. Prince: Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner* 22, 147-159 (1993).
19. G. K. Hunter and H. A. Goldberg: Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8562-8565 (1993).
20. G. K. Hunter, P. V. Hauschka, L. C. Rosenberg, A. R. Poole and H. A. Goldberg: Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 317, 59-64 (1996).
21. A. Govindaraj and R. Selvam: An oxalate-binding protein with crystal growth promoter activity from human kidney stone matrix. *BJU Int* 90, 336-344 (2002).
22. T. Yamate, K. Kohri, T. Umekawa, N. Amasaki, N. Amasaki, Y. Isikawa, M. Iguchi and T. Kurita: The effect of osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals to Madin-Darby canine kidney cells. *Eur Urol* 30, 388-393 (1996).
23. J. C. Lieske, F. G. Toback and S. Deganello: Sialic acid-containing glycoproteins on renal cells determine nucleation of calcium oxalate dihydrate crystals. *Kidney Int* 60, 1784-1791 (2001).
24. K. A. Lomashvili, S. Cobbs, R.A. Hennigar, K.I. Hardcastle and W. C. O'Neill: Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 15, 1392-1401 (2004).
25. D. Schibler, R. G. G. Russell and H. Fleisch: Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D3 in rats. *Clin Sci* 35, 363-372 (1968).
26. H. Fleisch, D. Schibler, J. Maerki and I. Frossard: Inhibition of aortic calcification by means of pyrophosphate and polyphosphates. *Nature* 207, 1300-1301 (1965).

27. P. A. Price, J. R. Buckley and M. K. Williamson: The amino bisphosphonate ibandronate prevents vitamin D toxicity and inhibits vitamin D-induced calcification of arteries, cartilage, lungs and kidneys in rats. *J Nutr* 131, 2910-2915 (2001).
28. P. A. Price, S. A. Faus and M. K. Williamson: Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 817-824 (2001).
29. M. Bevilacqua, L. J. Dominguez, S. Rosini and M. Barbagallo: Bisphosphonates and atherosclerosis: why? *Lupus* 14: 773-779 (2005).
30. P. A. Price, A. M. Roublick and M. K. Williamson: Artery calcification in uremic rats is increased by a low protein diet and prevented by treatment with ibandronate. *Kidney Int* 70, 1577-1583 (2006).
31. F. Grases, P. Sanchis, J. Perello, B. Isern, R. M. Prieto, C. Fernandez-Palomeque, M. Fiol, O. Bonnin and J. J. Torres: Phytate (myo-inositol hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats. *Front Biosci* 11, 136-142 (2006).
32. F. Grases, P. Sanchis, J. Perello, B. Isern, R. M. Prieto, C. Fernandez-Palomeque and J. J. Torres: Effect of crystallization inhibitors on vascular calcifications induced by vitamin D: A Pilot Study in Sprague-Dawley Rats. *Circ J* 71, 1152-1156 (2007).
33. R. Rosenhek, U. Klaar, M. Schemper, C. Scholten, M. Heger, H. Gabriel, T. Binder, G. Maurer and H. Baumgartner: Mild and moderate aortic stenosis. Natural history and risk stratification by echocardiography. *Eur Heart J* 25, 185-187 (2004).
34. H. Fleisch and S. Bisaz: Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am J Physiol* 203, 671-675 (1962).
35. H. Fleisch and W. F. Neuman: Mechanism of calcification: role of collagen, polyphosphates, and phosphatases. *Am J Physiol* 200, 1296-1300 (1961).
36. H. A. Fleisch, R. G. Russell, S. Bisaz, R. C. Muhlbauer and D. A. Williams: The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur J Clin Invest* 1, 12-18 (1970).
37. F. Grases, R. M. Prieto, B. M. Simonet and J. G. March: Phytate prevents tissue calcifications in female rats. *Biofactors* 11, 171-177 (2000).
38. F. Grases, J. Perello, R. M. Prieto, B. M. Simonet and J. J. Torres: Dietary myo-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues: a pilot study in Wistar rats. *Life Sci* 75, 11-19 (2004).
39. J. M. Van Gelder, E. Breuer, A. Ornoy, A. Schlossman, N. Patlas and G. Golomb: Anticalcification and antiresorption effects of bisacylphosphonates. *Bone* 16, 511-520 (1995).
40. F. Grases, B. M. Simonet, R. M. Prieto and J. G. March: Variation of InsP4, InsP5 and InsP6 levels in tissues and biological fluids depending on dietary phytate. *J Nutr Biochem* 12, 595-601 (2001).
41. F. Grases, B. M. Simonet, I. Vucenik, R. M. Prieto, A. Costa-Bauza, J. G. March and A. M. Shamsuddin: Absorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP6 or phytate) in humans. *Biofactors* 15, 53-61 (2001).
42. F. Grases, B. Isern, J. Perello, P. Sanchis and R. M. Prieto: Absorption of myo-inositol hexakisphosphate (InsP6) through the skin: Study of the matrix effects. Mechanism of phytate topical absorption. *Front Biosci* 10, 799-802 (2005).
43. F. Grases, B. Isern, J. Perello, P. Sanchis and A. Costa-Bauza: Absorption of myo-inositol hexakisphosphate (InsP6) through the skin in humans. *Pharmazie* 61, 652-652 (2006).
44. F. Grases, B. M. Simonet, J. Perello, A. Costa-Bauza and R. M. Prieto: Effect of phytate on element bioavailability in the second generation of rats. *J Trace Elem Med Biol* 17, 229-234 (2004).
45. H. Ichikawa, S. Ohishi, O. Takahashi, H. Kobayashi, K. Yuzawa, N. Hosokawa and T Hashimoto: Acute oral toxicities of phytic acid and sodium phytate in rats. *Kenkyu Nenpo-Tokyo-toristu Eisei Kenkyusho* 38, 371-376 (1987).
46. C. Fornieri, D. Jr. Quagliano and G. Mori: Role of extracellular matrix in age-related modifications of the rat aorta. Ultrastructural, morphometric, and enzymatic evaluations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 12, 1008-1016 (1992).
47. J. Atkinson: Aging of arterial extracellular matrix elastin: causes and consequences. *Pathol Biol* 46, 555-559 (1998).
48. S. Najman, Lj. Dordevic, V. Savic, N. Ignjatovic, M. Plavsic and D. Uskokovic: Changes of HAp/PLLA biocomposites and tissue reaction after subcutaneous implantation. *Facta Universitatis* 10, 131-134 (2003).
49. I. Nadra, J. C. Mason, P. Philippidis, O. Florey, C. D. W. Smythe, G. M. McCarthy, R. C. Landis and D. O. Haskard: Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ Res* 96, 1248-1256 (2005).
50. Y. B. Sun, X. R. Zeng, L. Wenger and H. S. Cheung: Basic calcium phosphate crystals stimulate the endocytotic activity of cells-inhibition by anti-calcification agents. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 1053-1059 (2003).
51. E. Graf E and J. W. Eaton: Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radic Biol Med* 8, 61-69 (1990).
52. L. M. Steffen, D. R. Jr. Jacobs, J. Stevens, E. Shahar, T. Carithers and A. R. Folsom: Associations of whole-grain, refined-grain, and fruit and vegetable consumption with risks of all-cause mortality and incident coronary artery disease and ischemic stroke: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Am J Clin Nutr* 78, 383-390 (2003).
53. E. B. Rimm, A. Ascherio, E. Giovannucci, D. Spiegelman, M. J. Stampfer and W. C. Willett: Vegetable, fruit, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *JAMA* 275, 447-451 (1996).
54. D. R. Jacobs, M. A. Pereira, K. A. Meyer and L. H. Kushi: Fiber from whole grains, but not refined grains, is inversely associated with all-cause mortality in older women: the Iowa women's health study. *J Am Coll Nutr* 19, 326S-330S (2000).

Conclusiones



ARTÍCULO ORIGINAL 3.1. El fitato inhibe la calcificación de pericardio bovino "in vitro"

- El pirofosfato y el etidronato a concentraciones de 1 mg/L (5.75 y 4.95 μM , respectivamente) inhiben el desarrollo de calcificaciones de pericardio bovino fijado con gluteraldehído, mientras que en concentraciones de 0.5 mg/L (2.87 y 2.47 μM , respectivamente) ninguna de las dos sustancias presenta efecto inhibidor.
- El fitato presenta un efecto inhibidor en las calcificaciones de pericardio bovino notablemente superior al que presentan el pirofosfato y el etidronato. El efecto inhibidor del fitato se aprecia a concentraciones de tan sólo 0.25 mg/L (0.39 μM) y aumenta a medida que aumenta su concentración de 0.25 a 1 mg/L (0.39 a 1.54 μM).
- Considerando que la administración de fitato en humanos en concentraciones que se corresponden a la cantidad ingerida en la llamada "dieta mediterránea" (1-2 g/día) proporciona unos niveles plasmáticos de fitato 10^{-6} M, se concluye que una ingesta adecuada de fitato en humanos podría disminuir la calcificación de las válvulas bioprostéticas fabricadas con pericardio bovino fijado con gluteraldehído.

ARTÍCULO ORIGINAL 3.2. Papel del fitato y la osteopontina en el mecanismo de calcificación de tejidos blandos

- La notable y significativa disminución de la calcificación en los tejidos lesionados para el grupo tratado con la dieta con fitato (AIN-76A + 1% de fitato en forma de sal cálcico-magnésica) con respecto al grupo tratado sin fitato (AIN-76A) indican que el fitato (administrado a través de la dieta) disminuye la formación de depósitos calcificados en tejidos blandos lesionados en ratas.
- Si se considera el punto anterior y que el grupo tratado con fitato se alimentó con una dieta que proporciona unos niveles plasmáticos y urinarios de fitato similares a los que se obtienen en humanos con la ingesta diaria de 1-2 g de fitato (cantidad que se corresponde a la ingerida en la denominada "dieta mediterránea"), se concluye que una ingesta adecuada de fitato podría evitar o disminuir la formación de depósitos calcificados en tejidos blandos lesionados en humanos.
- La detección de la osteopontina por primera vez a los 8 días después de la inducción a la calcificación en las áreas calcificadas próximas a las zonas con inflamación en las que se identifican macrófagos, linfocitos e eosinófilos, indica que esta proteína no está involucrada en el inicio de la calcificación y que su función en el proceso de calcificación podría estar relacionada con la regulación celular de la calcificación. Parece ser que la osteopontina es segregada por los macrófagos a fin de señalar la hidroxapatita y posibilitar su identificación y posterior destrucción por parte del sistema inmunitario.

- El fitato, al retardar y disminuir el desarrollo de depósitos calcificados en tejidos blandos, puede facilitar la reabsorción de los tejidos dañados por parte del sistema inmunitario.

ARTÍCULO ORIGINAL 3.3. El fitato inhibe las calcificaciones cardiovasculares en ratas

- La notable y significativa disminución del contenido de calcio en aorta y corazón del grupo tratado diariamente por vía tópica con fitato (4 g/día de una crema con un 2% de fitato en forma de sal potásica) en comparación con el grupo no tratado con fitato, pone de manifiesto que el fitato (administrado por vía tópica) es capaz de inhibir las calcificaciones aórticas y cardíacas inducidas con vitamina D y nicotina en ratas.
- Utilizando nicotina (2 administraciones orales de 25 mg/kg) y vitamina D (1 inyección intramuscular de 300000 IU/kg) como tratamiento inductor a la calcificación en ratas, los depósitos calcificados en la aorta ocurren predominantemente en las capas más internas de la túnica íntima mientras que en el corazón se presentan en las paredes de los vasos coronarios y en el miocardio adyacente.

ARTÍCULO ORIGINAL 3.4. Efecto de los inhibidores de la cristalización sobre las calcificaciones cardiovasculares inducidas por vitamina D

- La ligera disminución no estadísticamente significativa en el contenido en calcio de la aorta del grupo tratado con etidronato con respecto al grupo placebo, indica que el etidronato (administrado por vía subcutánea en dosis de 0.825 μ mol/kg-día en forma de sal sódica) no es capaz de provocar una clara inhibición de las calcificaciones aórticas inducidas con dosis elevadas de vitamina D en ratas.
- La notable y significativa disminución del contenido en calcio del grupo tratado con fitato en comparación con el grupo placebo y el grupo etidronato, indica que el fitato (administrado por vía subcutánea en dosis de 0.825 μ mol/kg-día en forma de sal sódica) es capaz de inhibir las calcificaciones aórticas inducidas con dosis elevadas de vitamina D en ratas.
- Utilizando vitamina D (3 inyecciones subcutáneas de 500000 IU/kg) como tratamiento inductor a la calcificación en ratas, los depósitos calcificados en la aorta ocurren predominantemente en las capas más internas de la túnica íntima mientras que en el corazón se presentan en las paredes de los vasos coronarios y en el miocardio adyacente.
- El hecho de que los valores de calcio aórtico de este estudio (tratamiento inductor con altas dosis vitamina D: 3 inyecciones subcutáneas de 500000 IU/kg) sean menores en comparación con los obtenidos en el estudio anterior (tratamiento inductor con nicotina: 2 administraciones orales de 25

mg/kg y dosis menores de vitamina D: 1 inyección intramuscular de 300000 IU/kg), revela que la existencia de una lesión sobre la cual pueda desarrollarse los cristales de fosfato cálcico es un factor promotor más importante en el desarrollo de calcificaciones cardiovasculares que un aumento en la sobresaturación plasmática con respecto al fosfato cálcico.

ARTÍCULO ORIGINAL 3.5. El fitato y las calcificaciones cardiovasculares relacionadas con el envejecimiento en ratas

- La notable y significativa disminución del contenido en calcio de la aorta para los grupos tratados con dietas que contenían un 1% de fitato (en forma de sal cálcico-magnésica; grupo control y grupo PHY) en comparación con los grupos alimentados con dietas sin fitato (grupo AIN y grupo MOD), indica que el fitato (administrado a través de la dieta) previene las calcificaciones aórticas ligadas al envejecimiento en ratas.
- Si se considera el punto anterior y que los grupos tratados con fitato se alimentaron con una dieta que proporciona unos niveles plasmáticos de fitato similares a los que se obtienen en humanos con la ingesta diaria de 1-2 g de fitato (cantidad que se corresponde a la ingerida en la denominada "dieta mediterránea"), se concluye que una ingesta adecuada de fitato podría evitar o disminuir las calcificaciones aórticas ligadas al envejecimiento en humanos.
- La calcificación aórtica ligada al envejecimiento en ratas ocurre principalmente en las fibras elásticas de la túnica media, con lo que la disrupción gradual de éstas fibras con la edad puede tener un papel clave en la calcificación ligada al envejecimiento al proporcionar núcleos heterogéneos sobre los cuales, en ausencia o déficit de inhibidores de la cristalización, puedan formarse y desarrollarse cristales de fosfato cálcico.
- La inexistencia de diferencias estadísticamente significativas en el contenido de calcio, magnesio, manganeso y zinc en corazón, riñón e hígado entre los diferentes grupos, indica que el fitato (como fitina, sal cálcico-magnésica) no afecta a la biodisponibilidad mineral.
- Las diferencias estadísticamente significativas encontradas en el contenido de hierro en corazón riñón e hígado entre el grupo control y los otros tres grupos pueden ser consecuencia del alto contenido en hierro de la dieta UAR en comparación con las otras tres.

CAPÍTULO 4.
INHIBIDORES DE LA CRISTALIZACIÓN
Y OSTEOPOROSIS

Introducción



1. EL HUESO. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN

El tejido óseo es un tejido conectivo altamente especializado que, junto al cartílago, compone el sistema esquelético. Dicho sistema tiene tres funciones:

- **Mecánica**, soporte muscular para la locomoción.
- **Protectora**, de órganos vitales y médula ósea.
- **Metabólica**, reserva de iones para todo el organismo, especialmente de calcio y fósforo.

1.1. COMPOSICIÓN DEL HUESO

En la composición del hueso, podemos distinguir entre matriz ósea y células óseas.

1.1.1. MATRIZ ÓSEA

La matriz ósea está compuesta por el conjunto de las sustancias intercelulares que componen el tejido óseo. Para su estudio, esta matriz se puede dividir en: matriz orgánica y matriz inorgánica.

La **matriz orgánica**, también llamada osteoide, representa entre el 30-40% del peso seco. El principal componente orgánico del hueso es el colágeno (predomina el tipo I) el cual constituye aproximadamente el 90-95% de la matriz orgánica. También se encuentran glicosaminoglicanos (condroitín-sulfato, queratán-sulfato, ácido hialurónico) y algunas proteínas no colagenosas dependientes de vitamina D y prácticamente exclusivas del hueso (como son la osteocalcina (2% de la matriz orgánica), la osteopontina y la osteonectina).

La **matriz inorgánica** representa aproximadamente el 60-70% del peso seco de la matriz ósea. Los iones más abundantes son el fosfato y el calcio aunque también contiene agua (representa aproximadamente el 20% del hueso) y pequeñas cantidades de otros iones como el bicarbonato, el magnesio, el potasio, el sodio y el citrato. El calcio y el fosfato forman cristales de fosfato cálcico (hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) de unos 3 nm de espesor y hasta 60 nm de largo. Los cristales se sitúan paralelamente de manera regular y periódica a lo largo de las fibras de colágeno. Los iones de la superficie de los cristales de hidroxiapatita están hidratados de manera que esta capa de hidratación facilita el intercambio de iones entre el cristal y el líquido intersticial.

1.1.2. CÉLULAS ÓSEAS

Se consideran células óseas las células osteoprogenitoras o preosteoblastos, los osteoblastos, los osteocitos, las células de revestimiento o tapizantes del hueso y los osteoclastos [GENESER 2000; JUNQUEIRA 2005;

STEVENS 1996].

1.1.2.1. Células osteoprogenitoras o preosteoblastos

➤ **Características generales.** Son unas células no especializadas, derivadas del mesénquima que pueden experimentar mitosis y transformarse en osteoblastos.

➤ **Génesis.** Ocasionalmente y bajo la influencia de factores de crecimiento, algunas células hematopoyéticas de la médula ósea pueden diferenciarse a células osteoprogenitoras.

➤ **Función.** Estas células cuentan con potencial para diferenciarse a osteoblastos. Los osteoblastos y los osteocitos carecen de capacidad mitótica, por lo que a medida que disminuye la población de osteoblastos durante los procesos de remodelación continua del hueso, las células osteoprogenitoras que proliferan y se diferencian proveen nuevos osteoblastos para el tejido. Por este motivo, las células osteoprogenitoras son más activas durante el crecimiento de los huesos y la reparación de lesiones óseas.

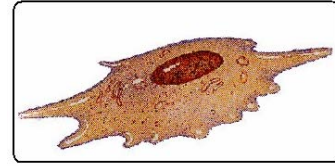


Figura 4.1. Ilustración de una célula osteoprogenitora o preosteoblasto.

1.1.2.2. Osteoblastos

➤ **Características generales.** Son las células responsables de la formación y la organización de la matriz extracelular del hueso y de su posterior mineralización. Contienen abundante retículo endoplasmático rugoso, un aparato de Golgi muy desarrollado, numerosas vesículas y un núcleo, con nucléolo único, situado con frecuencia en el extremo de la célula más distante de la superficie ósea. Parte de su membrana se encuentra en contacto con el borde osteoide, llamándose así el área donde está teniendo lugar la calcificación.

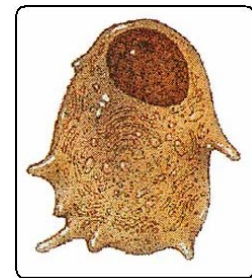


Figura 4.2. Ilustración de un osteoblasto.

➤ **Génesis.** Proceden de células osteoprogenitoras que son inducidas a la diferenciación osteoblástica a través distintos factores de crecimiento.

➤ **Función.** Su función es la formación de la matriz ósea. El principal producto de los osteoblastos maduros es el colágeno de tipo I, aunque también producen otras proteínas como la osteocalcina, la proteína Gla de matriz, la osteopontina y la osteonectina. La mayoría de osteoblastos, una vez han ejercido su función, desaparecen a través de un proceso de apoptosis o muerte celular programada. Sin embargo, algunos quedan rodeados y enclaustrados por la matriz que han sintetizado y de esta manera, cesan su actividad anabólica y se convierten en osteocitos. Otros quedan retenidos en la superficie ósea y se convierten en células de revestimiento o tapizantes.

1.1.2.3. Osteocitos

➤ **Características generales.** Estas células se encuentran en cavidades de la matriz ósea, denominadas lagunas osteocitarias u osteoplastos. A diferencia de los osteoblastos, los osteocitos quedan conectados entre sí y con el resto de células óseas, mediante prolongaciones citoplasmáticas y uniones comunicantes. El sistema de conexión que poseen es el adecuado para poder llevar a cabo un intercambio entre ellas, ya que son incapaces de moverse en la matriz mineralizada que las rodea. En el citoplasma, tienen poco desarrollados el retículo endoplasmático rugoso y el aparato de Golgi.

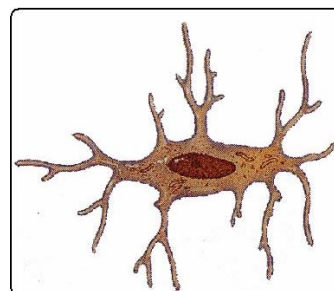


Figura 4.3. Ilustración de un osteocito.

➤ **Génesis.** Son células que se forman a partir de la diferenciación de los osteoblastos, que a su vez derivan de las células osteoprogenitoras.

➤ **Función.** Parece ser que modulan las señales procedentes de los estímulos mecánicos y regulan la apoptosis de las células óseas.

1.1.2.4. Células de revestimiento o tapizantes

➤ **Características generales.** Son unas células planas muy delgadas, similares a las células endoteliales, que recubren la superficie inactiva del hueso.

➤ **Génesis.** Derivan de los osteoblastos.

➤ **Función.** Desempeñan un papel clave en el inicio de la remodelación ósea.

1.1.2.5. Osteoclastos

➤ **Características generales.** Son células polinucleadas de gran tamaño que se localizan en las superficies óseas firmemente asociadas a la matriz ósea. Los osteoclastos se caracterizan por disponer de una porción arrugada de su membrana, en forma de cepillo, rodeada de un citoplasma libre de orgánulos, llamada zona clara con la que se adhiere a la superficie del hueso.

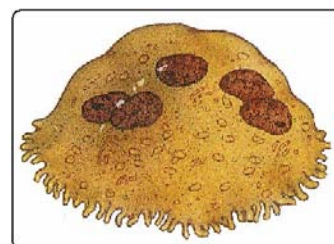


Figura 4.4. Ilustración de un osteoclasto.

➤ **Génesis.** Se forman por la fusión de varias células mononucleares derivadas de una célula madre sanguínea de la médula ósea, las cuales son precursoras hematopoyéticas que también dan origen a los monocitos y macrófagos. Es por ello que los osteoclastos presentan características similares a los macrófagos.

➤ **Función.** Son las células responsables de resorción de la matriz ósea.

1.2. TIPOS DE TEJIDO ÓSEO

De acuerdo a su función y localización dentro del esqueleto, el hueso varía en tamaño, forma y consistencia. Si consideramos su morfología ósea podemos distinguir entre: huesos largos, huesos cortos y huesos planos. A su vez, los huesos largos se dividen en tres partes: epífisis (los extremos), diáfisis (la parte cilíndrica alargada) y metáfisis (la zona de unión de la epífisis y diáfisis).

A parte de esta clasificación morfológica, el tejido óseo puede clasificarse en varios tipos en función de la disposición de las fibras de colágeno (clasificación histológica) o en función de su estructura macroscópica (clasificación macroscópica) [JUNQUEIRA 2005].

1.2.1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA

Histológicamente, atendiendo a la disposición de las fibras de colágeno, el hueso puede clasificarse en dos tipos: hueso reticular y hueso laminar. Los dos tipos poseen las mismas células y los mismos constituyentes de la matriz ósea.

El **hueso reticular** se caracteriza por estar constituido por fibras de colágeno dispuestas al azar sin un orden específico. Es mecánicamente débil y se considera tejido inmaduro.

El **hueso laminar** se caracteriza por una alineación ordenada de láminas de colágeno. Es mecánicamente fuerte y es el que, en condiciones normales, reemplaza al reticular de manera que prácticamente todo el hueso adulto sano es laminar.

El hueso reticular se forma cuando los osteoblastos producen matriz ósea rápidamente. En estas condiciones, las fibras de colágeno se depositan de forma irregular entrelazadas con laxitud. Esto ocurre inicialmente en todos los huesos fetales, aunque con el tiempo el hueso reticular es sustituido gradualmente por remodelación y depósito de hueso laminar más resistente. En el adulto se forma hueso reticular cuando la formación de nuevo hueso es muy rápida, como en la reparación de una fractura o en la enfermedad de Paget. Tras una fractura el hueso reticular es remodelado y se deposita hueso laminar, pero en la enfermedad de Paget el hueso reticular persiste provocando debilidad mecánica y deformidades óseas.

1.2.2. CLASIFICACIÓN MACROSCÓPICA

En el hueso adulto, si se realiza un corte transversal, se reconocen a simple vista dos disposiciones estructurales diferenciadas del tejido óseo. Así, se puede observar que está constituido por zonas que no presentan cavidades visibles (hueso cortical o compacto) y por zonas que muestran numerosas cavidades intercomunicadas (hueso esponjoso o trabecular). Esta clasificación es macroscópica y no histológica, dado que el tejido compacto y los tabiques que separan las cavidades del hueso esponjoso presentan la misma estructura histológica básica.

El **hueso cortical o compacto** representa el 80% del volumen total de hueso y el 30% de la superficie disponible para la remodelación. Este tipo de hueso aparece en la superficie externa como una masa sólida y continua. Presenta láminas dispuestas en paquetes cilíndricos concéntricos, adosados

unos a otros entre las cuales se ubican las lagunas osteocitarias. También, presenta una red de finos canales longitudinales (canales de Havers) y transversales (canales de Volkmann) que transportan los nervios y los vasos que posibilitan su nutrición. Está cubierto por el periostio, una membrana de tejido conectivo denso que contiene células osteoprogenitoras. El hueso cortical o compacto forma un escudo rígido externo resistente a la deformación y tiene fundamentalmente funciones de sostén y protección (Figura 4.5A).

El **hueso esponjoso o trabecular** representa el 20% del volumen total de hueso y el 70% de la superficie disponible para la remodelación. Este tipo de hueso aparece en la superficie interna y posee una red de láminas con configuración aplanada y forman trabéculas que se entrecruzan y que limitan los espacios ocupados por la médula ósea y los vasos sanguíneos. El hueso esponjoso o trabecular es más flexible y resistente que el compacto.

En los huesos largos, las extremidades o epífisis están formadas por hueso esponjoso con una fina capa superficial de hueso compacto. La diáfisis está constituida casi totalmente por hueso compacto con una pequeña cantidad de hueso esponjoso en su zona más profunda, que delimita el canal medular (Figura 4.5B).

Los huesos cortos muestran una parte central esponjosa y están recubiertos en toda su periferia por una capa compacta.

Los huesos planos, como los que forman la bóveda craneal muestran dos capas de hueso compacto (tablas interna y externa) separadas por hueso esponjoso.

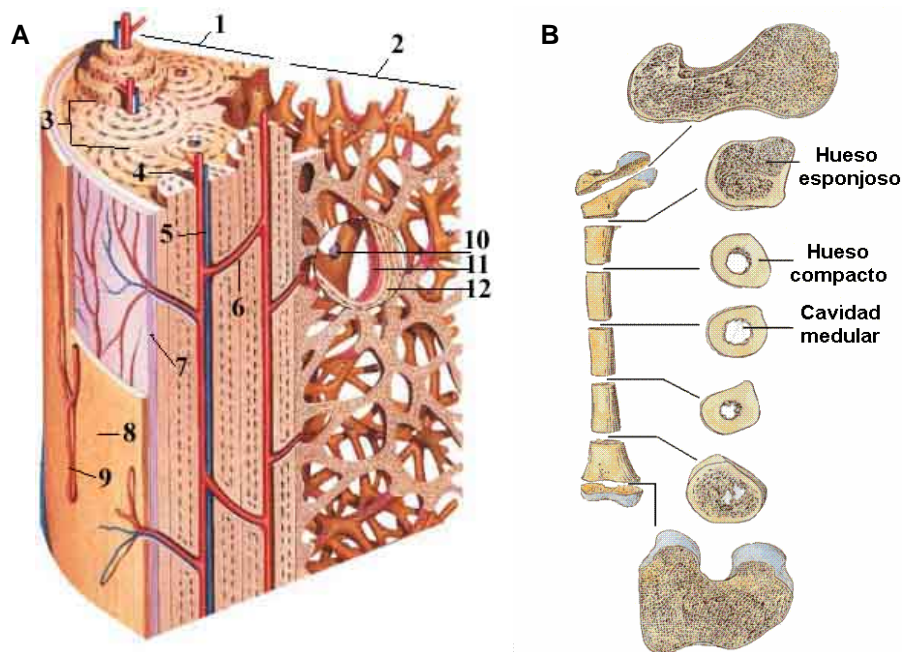


Figura 4.5. Ilustración de la estructura ósea: **A.** Ilustración de los componentes del hueso: 1. Hueso compacto o cortical. 2. Hueso esponjoso o trabecular. 3. Sistema haversiano (tiene un canal central que contiene un paquete neurovascular). 4. Colágeno. 5. Canal de Havers. 6. Canal de Volkmann 7. Periostio. 8. Revestimiento óseo. 9. Vasos del periostio. 10. Osteoclastos. 11. Osteoblastos. 12. Osteocitos. **B.** Ilustración de la disposición del hueso cortical o compacto y trabecular o esponjoso en el fémur.

2. REMODELACIÓN ÓSEA

El hueso es un tejido dinámico que sufre procesos de crecimiento, reparación, modelado y remodelado, siendo éste último de gran relevancia ya que la mayoría de patologías óseas son consecuencia de alguna alteración en este proceso. La remodelación del hueso es un proceso muy activo que consiste en la renovación ósea mediante la acción sucesiva de osteoclastos (resorción ósea) y osteoblastos (formación ósea) en diminutos focos por todo el esqueleto, denominados unidades de remodelación ósea. Anualmente se renueva el 25% del hueso trabecular y el 3% del cortical y en un período de 10 años, se ha renovado la totalidad de los huesos por lo menos una vez.

2.1. ETAPAS DE LA REMODELACIÓN ÓSEA

En cada ciclo de remodelación se pueden distinguir las etapas de activación, resorción, acoplamiento, formación, mineralización y reposo (Figura 4.6) [MANOLAGAS 2000; PARFITT 1984].

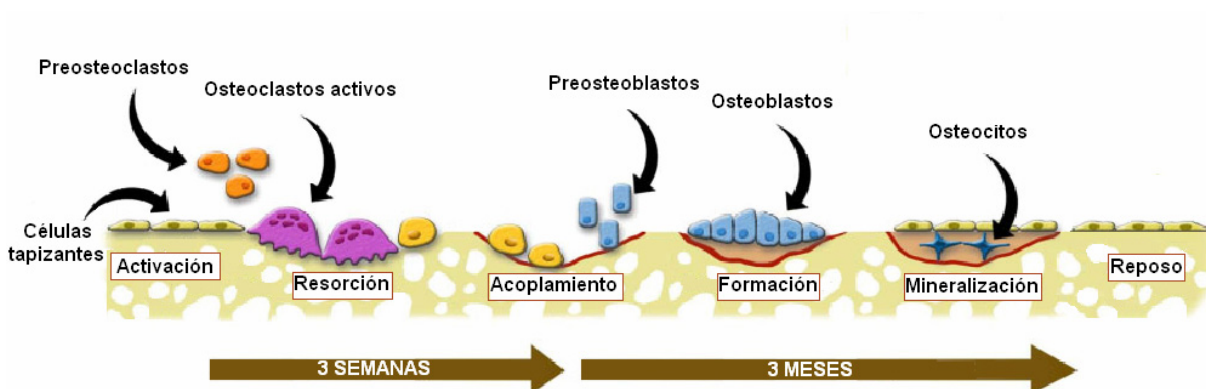


Figura 4.6. Ilustración del ciclo de remodelado óseo, en el cual se pueden distinguir las etapas de activación, resorción, acoplamiento, formación, mineralización y reposo.

2.1.1. ETAPA DE ACTIVACIÓN

En esta etapa, parece ser que las células tapizantes se retraen y mediante señales quimiotácticas atraen a los preosteoclastos, los cuales se fijan en la superficie ósea y desplazan a las células tapizantes del hueso. Posteriormente, estas células son activadas dando lugar a los osteoclastos.

2.1.2. ETAPA DE RESORCIÓN

Los osteoclastos, una vez en contacto con el hueso, lo resorben dando lugar a una cavidad de forma y dimensiones características. En el hueso trabecular forman una cavidad en forma de laguna (laguna de Howship) mientras que en el hueso cortical la cavidad tiene forma de túnel (cono penetrante). Este período dura entre 1 y 3 semanas. Se cree que la resorción ósea tiene lugar a partir de los siguientes procesos (Figura 4.7):

- Los osteoclastos aíslan la zona del hueso a la cual se han unido y liberan enzimas lisosómicas que hidrolizan la matriz orgánica.
- La acidez local provocada fundamentalmente por el transporte de protones mediante la bomba de protones ATP-dependiente, el intercambio Na^+/H^+ y la anhidrasa carbónica, aumenta la solubilidad de los cristales de hidroxiapatita, liberándose los iones calcio y fosfato.
- Los osteoclastos resorben por endocitosis algunos de los productos de degradación solubles de la desmineralización y de la hidrólisis proteica.

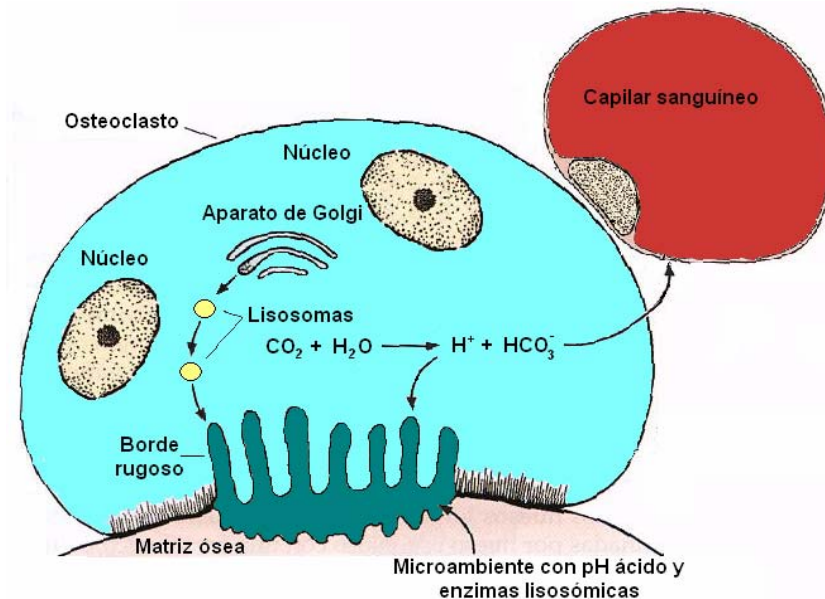


Figura 4.7. Ilustración de la resorción ósea. Las enzimas contenidas en los lisosomas originados en el complejo de Golgi, junto con los iones hidrógeno también producidos por el osteoclasto, se transfieren hacia el microambiente cerrado correspondiente a la zona clara, en donde actúan separados del resto de tejidos. La acidificación facilita la disolución de la matriz inorgánica y mantiene un pH ideal para la acción de las enzimas hidrolíticas de los lisosomas. Así se elimina la matriz, que es atrapada por el citoplasma de los osteoclastos donde posiblemente continúa la digestión y cuyos productos son transferidos hacia los capilares sanguíneos.

2.1.3. ETAPA DE ACOPLAMIENTO

En el período de tiempo entre el cese de la etapa de resorción e inicio de la etapa de formación se deposita en la superficie ósea excavada una capa con escaso contenido de colágeno, que atrae a los osteoblastos mediante factores locales liberados por los osteoclastos. Este período de inactivación dura aproximadamente dos semanas.

2.1.4. ETAPA DE FORMACIÓN

En esta etapa, los osteoblastos atraídos a la superficie de excavación inicial cubren el hueso socavado con componentes orgánicos de la matriz ósea (osteoides) que se depositan como laminillas o bien cilíndricas concéntricas (hueso cortical) o bien paralelas y aplanadas (hueso

trabecular). Una vez finalizada esta etapa, aproximadamente el 65% de los osteoblastos sufren apoptosis [JILKA 1998A] mientras que el otro 35% se transforma en osteocitos o en células tapizantes.

2.1.5. ETAPA DE MINERALIZACIÓN

Entre el inicio del depósito de osteoide y el inicio de su mineralización, existe un tiempo de demora de unos diez días. Para que tenga lugar la mineralización del osteoide, los osteoblastos deben producir previamente vesículas de matriz (las cuales son redondeadas y están limitadas por una membrana). Durante la formación del osteoide, estas vesículas se separan del osteoblasto por gemación (derivan muy probablemente de la membrana celular) y pasan a la matriz, donde constituyen el nido para la formación inicial de cristales de fosfato cálcico. Actualmente se cree que las vesículas de matriz derivadas del osteoblasto son el factor más importante en el inicio de esta etapa, ya que una vez formados los primeros cristales de hidroxapatita, éstos crecen y se producen más rápidamente [ANDERSON 2005]. La mineralización se inicia en la interfase entre el osteoide y el hueso mineralizado preexistente y avanza hacia la superficie a lo largo de un plano de barrido (Figura 4.8).

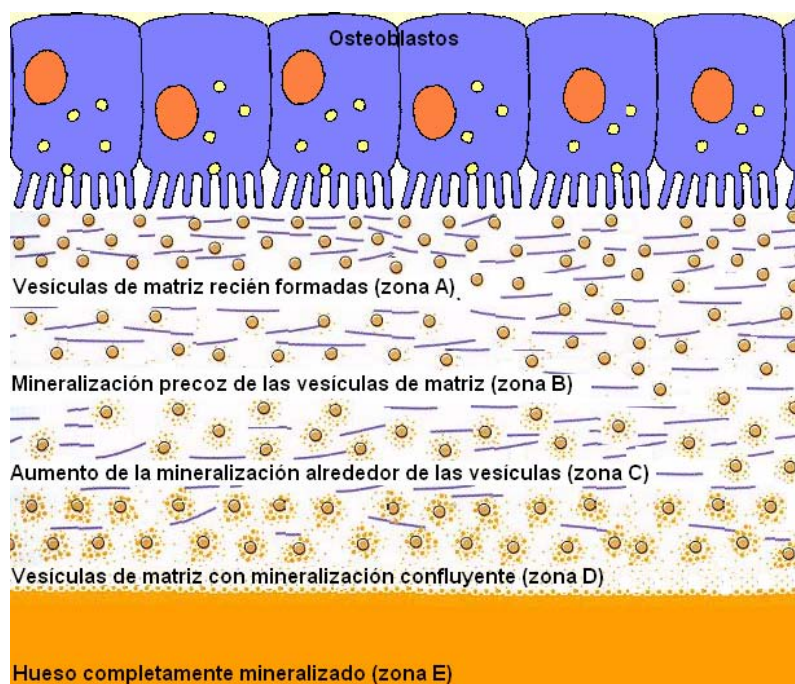


Figura 4.8. Ilustración de la mineralización ósea. En las inmediaciones de la superficie irregular de los osteoblastos existe una **zona A** de colágeno y glicosaminoglicanos recién depositados (osteoide) con vesículas de matriz recién formadas. A continuación, hay una **zona B** en las que se están formando cristales de hidroxapatita sobre las vesículas ligeramente más "viejas", y después existe otra **zona C** en la cual los focos de mineralización crecen con rapidez. En la **zona D** los focos separados de mineralización han confluido casi por completo y en la **zona E** la mineralización es completa.

Si las concentraciones locales de iones calcio y fosfato son normales, esta etapa tiene lugar poco después de la formación del nuevo osteoide. Sin embargo, en situaciones de recambio elevado, los osteoblastos producen una gran cantidad de matriz orgánica en poco tiempo y la mineralización se retrasa, completándose sólo si disminuye la velocidad de producción del osteoide nuevo. Durante una fase de retraso pueden observarse claramente capas de osteoide no mineralizado entre la capa

de osteoblastos activos y el hueso previamente mineralizado. Esto se pone de manifiesto en las fases de rápido crecimiento óseo de la vida fetal y también en la vida adulta durante periodos de remodelación activa del hueso, como por ejemplo, después de una fractura o formando parte de algunos procesos patológicos (osteomalacia).

2.1.6. ETAPA DE REPOSO

Finalizada la formación ósea, existe una etapa de reposo que se mantendrá hasta el inicio de un nuevo ciclo de remodelado.

2.2. REGULACIÓN DEL REMODELADO ÓSEO

El proceso de remodelado óseo es un proceso complejo controlado por toda una serie de factores que actúan conjuntamente a fin de preservar la masa ósea [CANALIS 1983; RAISZ 1983]. En líneas generales, se halla sometido a dos tipos de controles: local y sistémico.

2.2.1. CONTROL LOCAL

El control local está constituido por factores de naturaleza física y, fundamentalmente, de naturaleza humoral.

Los **factores de naturaleza física** se basan en la existencia de un mecanismo que regula la cantidad de masa ósea en función de la sobrecarga que el hueso tuviera que soportar.

Los **factores de naturaleza humoral** son los más importantes y tienen una acción directa sobre el metabolismo celular y modifican la replicación, la diferenciación y/o la actividad de células de estirpe osteoblástica u osteoclástica. Estos factores son generalmente sintetizados por células óseas [MANOLAGAS 2000; MUNDY 1994]. Entre ellos encontramos:

- **Factores de crecimiento.** Destacan los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF I y IGF II) y el factor de crecimiento transformativo beta (TGF-β), los cuales inducen la formación de hueso estimulando la proliferación de los preosteoblastos, así como la actividad de los osteoblastos [DELANEY 1994; HOCK 1988]. También cabe considerar las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), las cuales estimulan la diferenciación de los osteoblastos y podrían desempeñar un papel importante en el acoplamiento entre osteoclastos y osteoblastos.
- **Las citoquinas.** En particular, las interleuquinas IL-1, IL-6, e IL-11 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) son potentes agentes promotores de la resorción ósea. Estas citoquinas estimulan la maduración de los osteoclastos [SUDA 1997].
- **Prostaglandinas.** La mayoría de los autores defienden que las prostaglandinas juegan un papel importante en la resorción ósea. Entre ellas destacamos la prostaciclina y las prostaglandinas E1 y E2, las cuales han demostrado ser potentes estimuladores de la resorción ósea ya que pueden activar la proliferación de los osteoclastos [AKATSU 1989; STEIN 1986; YAMASAKI 1980].

2.2.2. CONTROL SISTÉMICO

El control sistémico está constituido por diversas hormonas que actúan sobre los osteoclastos y los osteoblastos de forma directa o indirecta. Estas hormonas regulan la síntesis, activación, efecto y unión a proteínas de los factores locales [RIZZOLI 1997]. Entre ellas destacan:

- **Parathormona.** Su secreción depende inversamente de los niveles de calcio iónico plasmático que existan. Aumenta la absorción intestinal y la reabsorción renal de calcio. Y en el hueso, estimula la función osteoclástica aumentando la resorción. Sin embargo, si la acción es intermitente y a dosis bajas tiene una acción anabólica al aumentar la síntesis de ciertos factores de crecimiento (IGF-I y TGF- β) que estimulan la proliferación y actividad de los osteoblastos [LOTINUN 2002; PARTRIDGE 2006].
- **Calcitonina.** Inhibe la resorción mediada por los osteoclastos.
- **Vitamina D.** La forma activa de la vitamina D (calcitriol) aumenta la absorción intestinal y la reabsorción renal de calcio. En el hueso, la acción del calcitriol es menos conocida. Algunos autores han demostrado la presencia de receptores de vitamina D en los osteoblastos, donde promueve su diferenciación y regula la producción de sustancias tales como el colágeno, la fosfatasa alcalina y la osteocalcina. A la vez, induce en las membranas celulares el RANKL. De esa manera, el calcitriol regula tanto la formación como la resorción óseas [VAN LEEUWEN 2001].
- **Insulina.** Estimula la síntesis de matriz ósea y es necesaria para que la mineralización sea correcta.
- **Hormona del crecimiento.** Favorece la formación ósea a través de la estimulación de IGF-I.
- **Glucocorticoides.** A dosis fisiológicas modulan la remodelación ósea, y a suprafisiológicas inducen la pérdida ósea. Inhiben directamente la actividad de los osteoclastos y parte de su efecto está mediado por la parathormona y la vitamina D.
- **Hormonas tiroideas.** Estimulan la actividad osteoclástica y aceleran el recambio óseo.
- **Hormonas sexuales.** Tienen un papel fundamental en la prevención de la pérdida ósea. En cuanto a los estrógenos, se sabe que su déficit implica un predominio de la resorción sobre la formación [MUÑOZ-TORRES 1999]. Algunos autores indican que existen receptores para los estrógenos tanto en los osteoclastos [OURSLE 1991A] como para los osteoblastos [ERIKSEN 1988]. Así, parece ser que promueven la apoptosis de los osteoclastos [KAMEDA 1997], disminuyen la síntesis de citoquinas y prostaglandinas que promueven la resorción ósea [AMMAN 1997; JILKA 1998B] y aumentan la producción de factores de crecimiento que incrementan la formación ósea [OURSLE 1991B]. Hay estudios que evalúan su efecto en el metabolismo del calcio e indican que aumentan la absorción intestinal y disminuyen su eliminación renal [MCKANE 1995; RIGGS 1998]. En cuanto a los andrógenos, existen receptores para ellos en los osteoblastos [COLVARD 1989] y provocan una proliferación de los osteoblastos y un aumento de la síntesis de proteínas de matriz [VANDERSCHUEREN 1995].

2.3. MARCADORES DEL REMODELADO ÓSEO

Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo son sustancias liberadas a la circulación durante el proceso de formación y/o resorción que reflejan la actividad metabólica del tejido óseo en un momento puntual. Diversos autores han demostrado que los valores medios de los marcadores del remodelado óseo varían significativamente en pacientes con osteoporosis con respecto a individuos sanos [BETTICA 1996; EBELING 1992; MCLAREN 1992; SCHNEIDER 1997; SEIBEL 1993; SEIBEL 1994].

Los marcadores de remodelado óseo se clasifican en dos grupos: los que reflejan la tasa de formación y los que reflejan la tasa de resorción. Cuando ambos eventos están acoplados, cualquier marcador puede reflejar la tasa global de remodelado óseo. Los marcadores bioquímicos de formación ósea suelen determinarse en sangre mientras que la mayoría de los de resorción ósea se analizan en orina (Tabla 4.1) [MOLINA 2003].

Tabla 4.1. Principales marcadores del remodelado óseo.

Marcadores de resorción	Marcadores de formación
<i>Orina</i>	<i>Suero</i>
Hidroxiprolina	Fosfatasa alcalina total (ALP)
Piridinolina (Pyd) y deoxipiridinolina (Dpd)	Fosfatasa alcalina específica del hueso (BSAP)
<i>Suero</i>	Osteocalcina (OC)
Fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP)	Péptido C-terminal del procolágeno tipo I (PICP)
Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (ICTP)	Péptido N-terminal del procolágeno tipo I (PINP)
<i>Suero y orina</i>	
Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (CTX)	
Telopéptido N-terminal del colágeno I (NTx)	

2.3.1. MARCADORES DE RESORCIÓN ÓSEA

La mayoría de estos marcadores son resultado de la destrucción del colágeno tipo I. Entre ellos encontramos:

- **Hidroxiprolina.** Es un aminoácido no esencial derivado de la prolina. Se encuentra fundamentalmente en el tejido conectivo y óseo constituyendo el 13% del contenido de aminoácidos de la molécula del colágeno. Con las limitaciones pertinentes, se considera que la excreción de hidroxiprolina es un marcador de resorción ósea debido a que la mitad del colágeno corporal es óseo y a que no se reutiliza para la síntesis de nuevas cadenas de colágeno. Su excreción urinaria está fuertemente influenciada por el aporte dietético de hidroxiprolina exógena, por lo que la recolecta de orina para la determinación de hidroxiprolina como marcador de la resorción ósea requiere un régimen previo con ausencia del aminoácido (el día previo al examen no consumir carne roja o de ave, ni gelatina).
- **Piridinolina y deoxipiridinolina.** Estas moléculas forman los enlaces estabilizadores del colágeno maduro (*cross-link*). La piridinolina se encuentra principalmente en bajas concentraciones en el colágeno tipo II del cartilago y en el colágeno tipo I del hueso. En contraste, la deoxipiridinolina se encuentra casi exclusivamente en el colágeno tipo I del hueso (también se encuentra en la dentina), siendo de esta manera un buen marcador de pérdida ósea [ROSEN 1994]. La piridinolina y la deoxipiridinolina son liberadas cuando la matriz ósea se degrada por acción de los osteoclastos, no son reutilizadas para la síntesis de nuevas cadenas de colágeno y se excretan por la orina en forma

libre (40%) o ligada a péptidos (60%). Diversos estudios han demostrado que los niveles urinarios de piridinolina y deoxipiridinolina se correlacionan bien con otros marcadores de resorción ósea, confirmando su utilidad como marcador [EYRE 1992].

➤ **Telopéptidos de colágeno.** Los telopéptidos con carbono terminal (CTx) y nitrógeno terminal (NTx) son también fragmentos liberados durante la actividad de los osteoclastos y sus niveles en orina y sangre aumentan en la resorción. Estos telopéptidos son marcadores más específicos que la piridinolina y la deoxipiridinolina debido a que estas últimas también se pueden encontrar estabilizando enlaces en otras proteínas distintas al colágeno, como la elastina.

➤ **Fosfatasa ácida resistente al tartrato.** Los osteoclastos segregan una fosfatasa ácida que es resistente a la inhibición por ácido tártrico. Los niveles plasmáticos de esta fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) aumentan durante la resorción. La TRAP es el único marcador de remodelado que evalúa la actividad directa del osteoclasto ya que el resto de marcadores de resorción son indicadores del grado de destrucción de la matriz ósea.

2.3.2. MARCADORES DE FORMACIÓN ÓSEA

➤ **Fosfatasa alcalina en suero.** Las fosfatasas alcalinas son enzimas liberadas por los osteoblastos y también por células de otros órganos como hígado, placenta y riñón. Así, existen diversas patologías no esqueléticas que pueden producir niveles muy elevados de la fosfatasa alcalina, como es el caso de enfermedades hepáticas. Es por ello que la determinación de la fosfatasa alcalina total en el suero es un pobre indicador de la formación ósea. Sin embargo, en ausencia de enfermedades hepáticas, existe una buena correlación entre los niveles séricos de fosfatasa alcalina y la actividad osteoblástica [DELMAS 1990].

➤ **Osteocalcina.** Es la proteína no colagenosa más abundante en el hueso y es sintetizada por los osteoblastos. La mayor parte de la osteocalcina se incorpora a la matriz extracelular del hueso, aunque una pequeña parte es liberada al torrente sanguíneo. Los niveles séricos de osteocalcina son un buen indicador de la formación ósea [DELMAS 1993].

➤ **Péptidos de procolágeno.** Durante la síntesis de colágeno, fragmentos de péptidos amino (PINP) y carboxiterminales (PICP) de una molécula precursora (pro-colágeno) son liberados a la circulación. Sin embargo, no se han establecido correlaciones definitivas entre estos fragmentos y la formación ósea [EBELING 1992].

➤ **Otras proteínas no colágenas de la matriz ósea.** Además de la osteocalcina, se han identificado otras proteínas no-colágenas en la matriz ósea. Algunas de ellas son glicoproteínas fosforiladas que participan en la regulación y en el mantenimiento del proceso de mineralización. Entre estas proteínas no-colágenas encontramos la sialoproteína (BSP), la osteonectina y la osteopontina, las cuales son sintetizadas por los osteoblastos y depositadas en el nuevo tejido osteoide. Los primeros ensayos clínicos con BSP sugieren que puede ser empleada como marcador de resorción ósea [REINHOLT 1990].

3. OSTEOPOROSIS

La osteoporosis es una enfermedad multifactorial que actualmente, según el *National Institute of Health*, se define como “un trastorno esquelético que se caracteriza por una disminución de la resistencia ósea y una mayor predisposición a las fracturas” [NHI 2001]. En esta definición la resistencia ósea integra dos aspectos: la densidad mineral ósea (componente cuantitativo) y la calidad ósea (componente cualitativo). La densidad mineral ósea (DMO) se expresa en gramos de mineral por área de volumen (cm^2) y puede determinarse por una amplia variedad de técnicas siendo la DEXA (*dual-energy x-ray absorptiometry*) la más relevante [IBÁÑEZ 2003]. La calidad ósea se refiere a la microarquitectura del tejido óseo la cual sólo es posible objetivar mediante técnicas como la biopsia ósea que no son aplicables en el diagnóstico clínico. Es por ello que el diagnóstico de la osteoporosis se basa en la determinación de la DMO según unos criterios densitométricos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS).



Figura 4.9. Ilustración de las fracturas más frecuentes debidas a la osteoporosis.

3.1. CRITERIO DIAGNÓSTICO DE LA OSTEOPOROSIS

En 1994, la OMS estableció las categorías o criterios diagnósticos de la osteoporosis basándose en criterios epidemiológicos que tienen en cuenta la evolución de los valores de la masa ósea con la edad (evaluados con densitometría ósea como DMO) y la prevalencia e incidencia de las fracturas osteoporóticas en mujeres posmenopáusicas de raza blanca [WHO 1994]. Así, definió la escala T que toma como referencia la DMO de la población adulta sana del mismo sexo y raza cuando se alcanza el pico de masa ósea. El pico de masa ósea es el valor máximo de masa ósea que presenta una persona a lo largo de su vida y se suele alcanzar entre los 20 y 30 años. En la escala T el criterio diagnóstico se establece a partir del número de desviaciones estándar (DE) en que el valor de DMO medido está por debajo o por encima del valor de referencia (pico de masa ósea). En esta escala se consideran cuatro categorías:

- **Normal**, cuando la DMO es superior a -1 DE en la escala T.
- **Osteopenia**, cuando la DMO se sitúa entre -1 y -2.5 DE en la escala T.
- **Osteoporosis**, cuando la DMO es inferior -2.5 DE en la escala T.

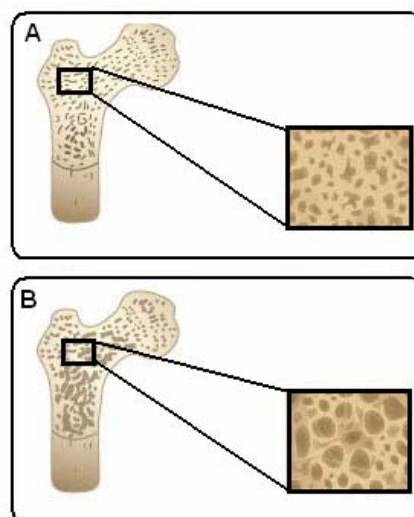


Figura 4.10. Ilustración de la osteoporosis en cabeza de fémur: **A.** Cabeza de fémur con diagnóstico normal. **B.** Cabeza de fémur con diagnóstico de osteoporosis.

➤ **Osteoporosis grave o establecida**, cuando al criterio de osteoporosis se le añade la presencia de fracturas.

Hasta la fecha, esta clasificación densitométrica se considera universalmente aceptada como criterio diagnóstico, a pesar de que es una clasificación que plantea varias limitaciones. De manera estricta, sólo es adecuada para mujeres posmenopáusicas de raza blanca y no tiene en cuenta el componente cualitativo del hueso.

3.2. EPIDEMIOLOGÍA

La osteoporosis es la enfermedad ósea más frecuente. A partir de los 50 años afecta a una de cada cuatro mujeres y a uno de cada ocho varones y su incidencia aumenta de forma significativa en mujeres después de la menopausia, hasta el punto de que al día de hoy se estima que es la enfermedad crónica más prevalente en todo el mundo en mujeres de raza blanca mayores de 65 años.

En España, según criterios de la OMS, la prevalencia de osteoporosis lumbar en mujeres aumenta progresivamente con la edad desde un 4.3% para el grupo de edad 45-50 años hasta un 40% para las mayores de 70 años [DÍAZ-LÓPEZ 2000]. Para los varones la prevalencia de osteoporosis es del 8.1% en mayores de 50 años [NAVES 2005].

De esta manera, la osteoporosis afecta principalmente (no exclusivamente) a personas (fundamentalmente mujeres) mayores de 50 años y por tanto, el progresivo envejecimiento de la población es un indicador de que muy probablemente en la próximas décadas se producirá un aumento sustancial en la incidencia de esta enfermedad, convirtiendo a la osteoporosis en un problema sanitario de primer orden.

3.3. CLASIFICACIÓN DE LA OSTEOPOROSIS

La osteoporosis, atendiendo a las causas que la provocan, se clasifica en osteoporosis primaria y osteoporosis secundaria.

3.3.1. OSTEOPOROSIS PRIMARIA

Constituye el grupo más amplio e incluye los casos de osteoporosis en los que no se identifica ninguna enfermedad que la justifique directamente. Se distinguen:

➤ **Osteoporosis idiopática juvenil y osteoporosis del adulto joven**. Afecta a niños o adultos jóvenes de ambos sexos con función gonadal normal. La osteoporosis idiopática juvenil es un trastorno raro, que se inicia generalmente entre los 8 y los 14 años. Se manifiesta por la aparición brusca de dolor óseo y de fracturas con traumatismos mínimos. En muchos casos, el trastorno remite por sí solo y la recuperación tiene lugar de forma espontánea en un plazo de 4 ó 5 años. La osteoporosis idiopática del adulto joven se observa en varones jóvenes y mujeres premenopáusicas en las que no

se objetiva ningún factor etiológico. En algunas mujeres, esta patología aparece con el embarazo o poco después.

➤ **Osteoporosis posmenopáusica. Tipo I.** Ocurre en un subgrupo de mujeres posmenopáusicas de 51 a 75 años y se caracteriza por un predominio de la resorción ósea sobre la formación con una pérdida acelerada y desproporcionada de hueso trabecular debido al déficit de estrógenos. Esta pérdida de masa ósea decrece exponencialmente con el tiempo, produciéndose la mayor parte de la pérdida entre los 4 y 8 años primeros tras la menopausia. Tiende a asociarse con fracturas vertebrales y del antebrazo [RIGGS 1990].

➤ **Osteoporosis senil. Tipo II.** Se detecta en algunas mujeres y varones de más de 70 años como consecuencia de un déficit de la función de los osteoblastos (bajo remodelado óseo). Otros factores patogénicos son: sedentarismo-inmovilización, menor absorción intestinal de calcio, menor insolación y trastornos nutricionales que ocasionan déficit de vitamina D e hiperparatiroidismo secundario. Tiende a asociarse con fracturas de cadera y vertebrales [RIGGS 1990].

3.3.2. OSTEOPOROSIS SECUNDARIA

Se clasifican en este grupo todos aquellos casos de osteoporosis que son una consecuencia o bien una manifestación acompañante de algunos trastornos, enfermedades o de su tratamiento. Entre ellas se encuentran enfermedades endocrinológicas (p.e., hipogonadismo, hipertiroidismo, diabetes mellitus), enfermedades gastrointestinales (p.e., cirrosis), trastornos genéticos, trastornos hematológicos (p.e., leucemia), trasplantes de órganos (p.e., médula) y determinadas drogas (p.e., corticoides).

3.4. FACTORES DE RIESGO DE LA OSTEOPOROSIS

Un factor de riesgo de la osteoporosis se puede definir como aquella variable, estado o condición asociado con un mayor riesgo de padecer la enfermedad y, sobretodo, una de sus consecuencias determinantes: la fractura. Los valores de densidad mineral ósea que presenta una persona en un momento determinado dependen de:

- El valor de **pico de masa ósea** que se alcanza.
- Y las **pérdidas de masa ósea** que se puedan producir con posterioridad al alcance del pico de masa ósea.

Ambas situaciones están influidas por diversos factores de manera que el pico de masa ósea parece estar más influenciado por factores genéticos, mientras que las pérdidas que se producen tras la consecución del pico de masa ósea parecen estar más relacionadas con los llamados factores adquiridos.

La lista de factores que se han identificado como factores de riesgo es larga y variable. En la Tabla 4.II se muestran los factores de riesgo más sólidamente relacionados con la osteoporosis según diversos estudios epidemiológicos [HERMOSO DE MENDOZA 2003; KANIS 1997; NOF 1998].

Tabla 4.II. Factores de riesgo para la osteoporosis [HERMOSO DE MENDOZA 2003; KANIS 1997; NOF 1998]-

Clasificación de los factores	Ejemplos
Factores genéticos o constitucionales	Edad - Sexo femenino - Fracturas previas por fragilidad - Raza caucásica o asiática - Antecedentes familiares de osteoporosis
Estilos de vida y nutrición	Baja ingesta de calcio en la dieta - Déficit de vitamina D - Índice de masa corporal bajo (IMC < 19) - Tóxicos (tabaco y alcohol) - Sedentarismo o inmovilización prolongada
Déficit de hormonas sexuales	Menarquia tardía (>15 años) - Amenorrea prolongada (> 1 año) - Nuliparidad de causa hormonal - No lactar o lactar más de 6 meses - Menopausia precoz - Hipogonadismo en el varón
Tratamiento farmacológico crónico	Glucocorticoides y ACTH - Anticonvulsivos - Tiroxina sobredosificada - Litio - Heparina - Antiandrógenos - Quimioterápicos - Antiácidos con fosfato y aluminio - Tamoxifeno
Patologías que afectan al metabolismo óseo	Enfermedades endocrinas (p.e., diabetes mellitus tipo I, hipertiroidismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo) - Alteraciones de la absorción intestinal y hepatopatías crónicas (p.e., gastrectomía, síndromes de mala absorción, cirrosis biliar primaria) - Enfermedades renales (p.e., insuficiencia renal crónica) - Enfermedades hematológicas (p.e., leucemia)

Debido a la gran cantidad de factores de riesgo que se han descrito, algunos autores proponen clasificarlos en dos grandes grupos para poder sistematizarlos y al mismo tiempo poder estudiar su trascendencia [RIGGS 1998]. Estos grupos son:

- Factores obligados: menopausia y envejecimiento.
- Factores esporádicos: el resto, que en principio podrían darse o no.

De manera que, la intervención de los distintos factores se puede resumir en la siguiente expresión:

$$Q = I - (\text{envejecimiento} + \text{menopausia} + \text{factores esporádicos})$$

donde <<Q>> es la masa ósea actual e <<I>> es el pico de masa ósea.

Con esta fórmula se pretende subrayar la importancia de los factores obligados frente a los esporádicos, además de proporcionar una idea clara de que el déficit de masa ósea es el resultado de la actuación conjunta de diversos y numerosos factores.

En esta misma línea están los trabajos de otros autores que han intentado desarrollar métodos para identificar los factores de riesgo de baja masa ósea y medir el carácter predictivo de osteoporosis de cada factor para facilitar el diagnóstico de esta enfermedad [SOSA 2001]. Según estos autores, los factores con mayor peso son diez años de menopausia, antecedentes de fractura previa, historia familiar de osteoporosis y la edad.

Se debe considerar que los factores esporádicos, si bien tienen menor peso en la mayoría de ocasiones, tienen una gran trascendencia práctica puesto que son los únicos sobre los cuales se puede actuar más enérgicamente a fin de corregirlos o modificarlos.

4. TRATAMIENTOS DE LA OSTEOPOROSIS

En la actualidad existen distintos tratamientos para la osteoporosis que se pueden clasificar en tratamientos antirresortivos y tratamientos estimuladores de la formación ósea. Entre los fármacos antirresortivos cabe destacar los suplementos de calcio (asociados o no a la vitamina D), el tratamiento hormonal sustitutivo, la calcitonina y los bisfosfonatos. Entre los fármacos que estimulan la formación ósea, hay que considerar el flúor y la teriparatida. También cabe destacar el ranelato de estroncio, que es un nuevo agente para el tratamiento de la osteoporosis que estimula la formación de nuevo hueso y además disminuye la resorción.

4.1. TRATAMIENTOS ANTIRRESORTIVOS

4.1.1. CALCIO Y VITAMINA D

La adecuada ingesta de calcio es de extraordinaria importancia en la prevención y tratamiento de la osteoporosis [CDC 1993; LAW 1991]. Parece ser que el pico de masa ósea desarrollado por un sujeto viene condicionado, en gran medida, por la ingesta de calcio desde el período del crecimiento hasta la tercera década de la vida y que ya en la edad adulta, una ingesta insuficiente de calcio incrementa la pérdida de masa ósea [LAW 1991; RIGGS 1992].

La ingesta recomendada de calcio depende de la edad y de las circunstancias individuales (embarazo, lactancia, crecimiento, menopausia, etc.) aunque oscila alrededor de 800-1200 mg/día. Se suele recomendar una ingesta diaria de 800 mg de calcio durante la edad de 1 a 10 años, 1.200 mg desde los 11 a los 18 años, y de 800 a 1000 mg en la edad adulta. Durante el embarazo y la lactancia debe incrementarse a 1200-1500 mg/día [MSC 1992] y de forma especial, tras la menopausia, debe garantizarse un aporte dietético de 1200 mg/día [CDC 1993; MSC 1992; RIGGS 1992].

El calcio se puede suministrar en forma de suplementos cuando su aporte alimentario es insuficiente. Los suplementos de calcio son frecuentemente administrados junto con otros agentes antirresortivos (vitamina D, bisfosfonatos) para el tratamiento y prevención de la osteoporosis [LAW 1991; LINDSAY 1993; WISNESKI 1992].

La vitamina D (calcitriol) actúa aumentando la absorción intestinal de calcio y su reabsorción en los riñones. Durante el envejecimiento los niveles de vitamina D tienden a disminuir y por este motivo, los suplementos de calcio y vitamina D son tratamientos frecuentes para la osteoporosis en ancianos.

Los estudios epidemiológicos han demostrado que el tratamiento con suplementos de calcio parece tener un ligero efecto positivo si es administrado los cinco primeros años de menopausia [DAWSON-HUGHES 1990]. En ancianos con osteoporosis, suplementos de calcio (1.2 g/día) y de vitamina D (800 IU/día) han demostrado reducir el riesgo de fracturas de cadera y no-vertebrales tras 18 meses de tratamiento [CHAPUY 1994].

4.1.2. CALCITONINA

La calcitonina es una hormona polipeptídica que tiene capacidad para disminuir la resorción ósea mediada por los osteoclastos, los cuales poseen receptores específicos para esta hormona [NICHOLSON 1986]. La calcitonina actúa tanto sobre el osteoclasto activo como sobre la proliferación y diferenciación de sus precursores [CHAMBERS 1982; HEDLUNG 1983].

Sin embargo, la utilización de calcitonina en el tratamiento de la osteoporosis se ve limitada por el hecho de que las dosis y la duración de este tratamiento no han sido claramente establecidas debido a que existen pocos datos sobre el mismo [WALLACH 1993].

4.1.3. BISFOSFONATOS

Los bisfosfonatos son sintéticos análogos del pirofosfato con capacidad para adsorberse sobre los cristales de hidroxiapatita del hueso e inhibir su resorción. Así, son potentes agentes antirresortivos que se adhieren a la superficie ósea inhibiendo la acción de los osteoclastos y promoviendo su apoptosis. Muchos estudios realizados en animales de experimentación han demostrado que los bisfosfonatos previenen la pérdida de hueso, aumentan la masa ósea y mejoran las condiciones biomecánicas [BALENA 1993; FERRETI 1990; SEEDOR 1991; THOMPSON 1990; THOMPSON 1992; TOOLAN 1992]. Los bisfosfonatos, y concretamente el etidronato, el alendronato y el risedronato administrados por vía oral, se consideran efectivos tanto en la prevención como en el tratamiento de la osteoporosis y su uso se asocia con un aumento de la masa ósea junto a una disminución del riesgo de padecer fracturas [LINDSAY 1993; MSC 1992; RIGGS 1992].

Tabla 4.III. Potencia Relativa de los Bisfosfonatos (P.R.B.) para inhibir la resorción ósea en ratas [FLEISCH 1998].

Nombre	P.R.B.
Etidronato	1
Clodronato	10
Tiludronato	10
Pamidronato	100
Neridronato	100
Alendronato	100 - 1000
Olpadronato	100 - 1000
Risedronato	1000 - 10000
Ibandronato	1000 - 10000
Zoledronato	>10000
YH 529	>10000

Tal y como se ha indicado en el capítulo anterior, a pesar de que los bisfosfonatos tienen una estructura similar y un mecanismo de acción común, entre ellos existen importantes diferencias en su potencia (Tabla 4.III).

Los bisfosfonatos se administran casi siempre junto a suplementos de calcio y vitamina D, pues muchos pacientes osteoporóticos presentan deficiencias de estas especies. Actualmente, el alendronato y el risedronato por vía oral son los bisfosfonatos de primera elección en el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusicas [RIZZOLI 2002]. El ibandronato [LAMY 2003] y el pamidronato [THIEBAUD 1997], de administración endovenosa, también han demostrado aumentar la densidad mineral ósea y pueden ser una alternativa en pacientes con intolerancia o imposibilidad para la administración oral.

Los bisfosfonatos son fármacos en general bien tolerados cuando se administran correctamente. Los efectos secundarios más frecuentes son los relacionados con el aparato digestivo. La administración continuada de etidronato puede inhibir la mineralización y causar osteomalacia de ahí que se administre intermitentemente [MILLER 1997]. Además, algunos estudios sugieren que los bisfosfonatos inhiben el remodelado óseo y que su uso prolongado puede alterar ciertas propiedades

biomecánicas del hueso aumentando su fragilidad [MASHIBA 2000]. Sin embargo, no hay evidencia clínica de que ello ocurra con la administración de bisfosfonatos a las dosis habituales por vía oral. De hecho, diversos estudios en animales de experimentación indican, que si no son administrados en exceso, los bisfosfonatos mejoran las propiedades biomecánicas del hueso [BALENA 1993; FERRETTI 1993; TOOLAN 1992] y que incluso con los bisfosfonatos más potentes no se anula por completo el proceso de remodelado, sino que persiste con una menor frecuencia de activación de las unidades de remodelado y una menor velocidad de recambio.

4.1.4. TERAPIA HORMONAL SUSTITUTIVA

La terapia sustitutiva con estrógenos y progestágenos en mujeres posmenopáusicas ha demostrado aumentar la DMO y disminuir el riesgo de fractura [CAULEY 2003], pero la asociación de su empleo con aumento de incidencia de cáncer de mama, eventos cardiovasculares y enfermedades tromboembólicas venosas [ALONSO 2004; CUSHMAN 2004] hacen que en la actualidad su empleo sea muy reducido con este fin.

4.2. TRATAMIENTOS ESTIMULADORES DE LA FORMACIÓN ÓSEA

4.2.1. FLÚOR

Se conoce que el flúor tiene efecto osteoformador y que es capaz de endurecer los huesos. Sin embargo, desde que comenzase a utilizarse en el tratamiento de la osteoporosis sus resultados han sido muy contradictorios. Algunos autores han señalado los beneficios de su empleo [MAMELLE 1988; PAK 1995; RUBIN 2001] con mínimos efectos secundarios, fundamentalmente de tipo digestivo. Mientras que otros autores han comunicado la ausencia de beneficio significativo o la presencia de importantes efectos adversos asociados al tratamiento [GUTTERIDGE 2002; MEUNIER 1998].

4.2.2. PARATHORMONA

Los efectos de la parathormona (PTH) como estimulador de la formación ósea son conocidos desde los años 70, aunque no fue hasta 1990 cuando se iniciaron los ensayos con este fármaco. La PTH, cuando actúa de forma continuada sobre el hueso, induce efectos catabólicos (resorción ósea) estimulando a los osteoclastos. Y por el contrario, es anabólica (formación ósea) cuando se administra intermitentemente, en concreto una dosis al día. Numerosos estudios han demostrado que la PTH intermitente estimula la diferenciación y la actividad de los osteoblastos. Tras estos hallazgos, los efectos de esta hormona intacta y de sus fragmentos se han estudiado a fin de encontrar la secuencia o cadena con mayor efecto estimulador sobre los osteoblastos.

Actualmente, la cadena 1-34 de la secuencia de la PTH humana es la que ofrece un mejor perfil de afinidad con el receptor, mayor potencia anabólica y limitada o inapreciable inducción de hipercalcemia tras la administración intermitente diaria. Así, actualmente el empleo de fragmentos

de PTH humana recombinante (1-34 o 1-84) está autorizado o se encuentra en fases finales de experimentación [LANE 2004]. La teriparatida (1-34 rh-PTH) estimula la formación de nuevo hueso durante los primeros meses de tratamiento, resultando en un aumento de la fortaleza del hueso y disminuyendo el riesgo de fracturas [LINDSAY 1997; NEER 2001]. Se han llevado a cabo diversos estudios de combinación con teriparatida y bisfosfonatos intentando conseguir un efecto sinérgico aunque no se ha observado ningún aumento significativo de la DMO comparado con el que se obtiene con el tratamiento de teriparatida aislada [BLACK 2003; FINKELSTEIN 2003]. Es por ello, que algunos autores propugnan el empleo de la teriparatida antes del tratamiento con bisfosfonatos [CUMMINGS 2003]. No obstante, la necesidad de empleo por vía subcutánea de forma diaria y el hallazgo de un incremento en la incidencia de osteosarcoma en algunos animales de experimentación hacen que su empleo sólo se recomiende en pacientes con alto riesgo de fractura [QUATTROCHI 2004].

4.3. OTROS

4.3.1. RANELATO DE ESTRONCIO

Se trata de un nuevo agente para el tratamiento de la osteoporosis que posee un doble mecanismo de acción: por un lado estimula la formación de nuevo hueso y además disminuye la resorción. Estudios "in vivo" e "in vitro" han indicado que el ranelato de estroncio inhibe la actividad de los osteoclastos y favorece su apoptosis y que al mismo tiempo es capaz de favorecer la formación de hueso aumentando la replicación de los osteoblastos y la síntesis de colágeno [MARIE 2006]. Hasta la fecha, diversos estudios han demostrado que aumenta la DMO y disminuye el riesgo a sufrir fracturas en mujeres con osteoporosis posmenopáusica [MEUNIER 2002; MEUNIER 2004]. De esta manera, el ranelato de estroncio parece ser un agente terapéutico prometedor aunque es preciso profundizar en el mecanismo dual de acción de este fármaco [FERNÁNDEZ-GARCÍA 2005].

5. BIBLIOGRAFÍA

- [AKATSU 1989] Akatsu T, Takahashi N, Debari K, Morita L, Murota S, Nagata N, Takatani O, Suda T. Prostaglandins promote osteoclast like cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3',5' monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. *J Bone Miner Res* 1989;4:29-35.
- [ALONSO 2004] Alonso G, Fernández-García D, de la Higuera-López, Frías M, Muñoz-Torres M. Terapia hormonal sustitutiva: hacia una redefinición de sus indicaciones. *REEMO* 2004;13:72-76.
- [AMMANN 1997] Ammann P, Rizzoli R, Bonjour JP, Bourrin S, Meyer JM, Vassalli P, Garcia I. Transgenic mice expressing soluble tumor necrosis factor-receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. *J Clin Invest* 1997;99:1699-1703.
- [ANDERSON 2005] Anderson HC, Garimella R, Tague SE. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci* 2005;10:822-837.
- [BALENA 1993] Balena R, Toolan BC, Shea M, Markatos A, Myers ER, Lee SC, Opas EE, Seedor JG, Klein H, Frankenfield D, et al. The effects of 2-year treatment with the aminobisphosphonate alendronate on bone metabolism, bone histomorphometry, and bone strength in ovariectomized nonhuman primates. *J Clin Invest* 1993;92:2577-2586.
- [BETTICA 1996] Bettica P, Taylor AK, Talbot J, Moro L, Talamini R, Baylink DJ. Clinical performances of galactosyl hydroxylysine, pyridinoline, and deoxypyridinoline in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;8:542-546.
- [BLACK 2003] Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, Palermo L, McGowan JA, Lang TF, Garnero P, Bouxsein AL, Bilezikian JP, Rosen CJ, Bilezikian JP, Lee K, Stiney J, Ensrud KE, Wyu V, Michaels N, Greenspan SL, Ryan JL, Wagner JM, Rosen CJ, Fowler L, Strom D, Black DM, Hue T, Palermo L, Sellmeyer D, Bauer DC, Raisz L, Hui S, Recker R, Kiel D, Hanley D. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2003;349:1207-1215.
- [CANALIS 1983] Canalis E. The hormonal and local regulation of bone formation. *Endocr Rev* 1983;4:62-77.
- [CANALIS 1993] Canalis E (1993) Regulation of bone remodelling. En: *Primer of the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, pp 33-37. Raven Press, New York.
- [CAULEY 2003] Cauley JA, Robbins J, Chen Z, Cummings SR, Jackson RD, LaCroix AZ, LeBoff M, Lewis CE, McGowan J, Neuner J, Pettinger M, Stefanick ML, Wactawski-Wende J, Watts NB. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women's Health Initiative randomized trial. *JAMA* 2003;290:1729-1738.
- [CDC 1993] Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993;94:646-650.
- [CHAMBERS 1982] Chambers TJ, Magnus CJ. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J Pathol* 1982;82:27-39.
- [CHAPUY 1994] Chapuy MC, Arlot ME, Delmas PD, Meunier PJ. Effect of calcium and cholecalciferol treatment for three years on hip fractures in elderly women. *BMJ* 1994;308:1081-1082.
- [COLVARD 1989] Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, Riggs BL, Spelsberg TC. Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:854-857.
- [CUMMINGS 2003] Cummings SR. Parathyroid hormone increases lumbar spine bone mineral density and decreases vertebral fractures in osteoporosis. *ACP J Club* 2003;139:11.
- [CUSHMAN 2004] Cushman M, Kuller LH, Prentice R, Rodabough RJ, Psaty BM, Stafford RS, Sidney S, Rosendaal FR. Estrogen plus progestin and risk of venous thrombosis. *JAMA* 2004;292:1573-1580.
- [DAWSON-HUGHES 1990] Dawson-Hughes B, Dallal GE, Drall EA, Sadowski L, Sahyoun N, Tannenbaum S. A controlled trial of the effects of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women. *New Engl J Med* 1990;323:878-883.
- [DELANY 1994] Delany AM, Dong Y, Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone cells. *J Cell Biochem* 1994;56:295-302.
- [DELMAS 1990] Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1990;19:1-18.
- [DELMAS 1993] Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover. Theoretical considerations and clinical use in osteoporosis. *Am J Med* 1993;95:115-165.
- [DÍAZ-LÓPEZ 2000] Díaz-López JB, Naves-Díaz M, Gómez-Alonso C, Fernández-Martín JL, Rodríguez-Rebollar A, Cannata-Andía JB. Prevalence of vertebral fracture in population older than 50 years in Asturias (Spain) defined following different radiological criteria. *Med Clin* 2000;115:326-331.
- [EBELING 1992] Ebeling PR, Peterson JM, Riggs BL. Utility of type I procollagen propeptide assays for assessing abnormalities in metabolic bone diseases. *J Bone Miner Res* 1992;7:1243-1250.

- [ERIKSEN 1988] Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988;241:84-86.
- [EYRE 1992] Eyre D. New biomarkers of bone resorption. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:470A-470C.
- [FERNÁNDEZ-GARCÍA 2005] Fernández-García D, Alonso G, Muñoz-Torres M. Anabolic therapy of osteoporosis. *Med Clin* 2005;125:341-345.
- [FERRETTI 1990] Ferretti JL, Cointry G, Capozza R, Montuori E, Roldan E, Perez Lloret A. Biomechanical effects of the full range of useful doses of (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1,1-bisphosphonate (APD) on femur diaphyses and cortical bone tissue in rats. *Bone Miner* 1990;11:111-122.
- [FINKELSTEIN 2003] Finkelstein JS, Hayes A, Hunzelman JL, Wyland JJ, Lee H, Neer RM. The effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis. *N Engl J Med* 2003;349:1216-1226.
- [FLEISCH 1998] Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998;19:80-100.
- [GENESER 2000] Geneser F (2000) *Histología*, pp 268-291. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- [HERMOSO DE MENDOZA 2003] Hermoso de Mendoza MT. Classification of osteoporosis. Risk factors. Clinical manifestations and differential diagnosis. *An Sist Sanit Navar* 2003; 26:29-52.
- [HOCK 1988] Hock JM, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 1988;122:254-260.
- [IBÁÑEZ 2003] Ibáñez R. Bone mineral density measurement techniques. *An Sist Sanit Navar* 2003;26:19-27.
- [JILKA 1998A] Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 1998;13:793-802.
- [JILKA 1998B] Jilka RL. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone* 1998;23:75-81.
- [KAMEDA 1997] Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, Nakamaru Y, Hiroi E, Hiura K, Kameda A, Yang NN, Hakeda Y, Kumegawa M. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med* 1997;186:489-495.
- [KANIS 1997] Kanis JA, Delmas P, Burckhardt P, Cooper C, Torgerson D. Guidelines for diagnosis and management of osteoporosis. The European Foundation for Osteoporosis and Bone Disease. *Osteoporosis Int* 1997;7:390-406.
- [JUNQUEIRA 2005] Junqueira LC, Carneiro J (2005) *Histología Básica. Texto y atlas*, pp 136-154. Masson, Barcelona.
- [LAMY 2003] Lamy O, Sandini L, Pache I, Fatio S, Burnand J, Burckhardt P. Intravenous ibandronate in men with osteoporosis: an open pilot study over 2 years. *J Endocrinol Invest* 2003;26:728-732.
- [LANE 2004] Lane NE. Parathyroid hormone: evolving therapeutic concepts. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16:457-463.
- [LAW 1991] Law MR, Wald NJ, Meade TW. Strategies for prevention of osteoporosis and hip fracture. *Br Med J* 1991;303:453-459.
- [LINDSAY 1993] Lindsay R. Prevention and treatment of osteoporosis. *Lancet* 1993;341:801-805.
- [LINDSAY 1997] Lindsay R, Nieves J, Formica C, Henneman E, Woelfert L, Shen V, Dempster D, Cosman F. Randomised controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis. *Lancet* 1997;350:550-555.
- [LOTINUN 2002] Lotinun S, Sibonga JD, Turner RT. Differential effects of intermittent and continuous administration of parathyroid hormone on bone histomorphometry and gene expression. *Endocrine* 2002;17:29-36.
- [MAMELLE 1988] Mamelle N, Meunier PJ, Dusan R, Guillaume M, Martin JL, Gaucher A, Prost A, Zeigler G, Netter P. Risk-benefit ratio of sodium fluoride treatment in primary vertebral osteoporosis. *Lancet* 1988;2:361-365.
- [MANOLAGAS 2000] Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000;21:115-137.
- [MARIE 2006] Marie PJ. Strontium ranelate: a physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone* 2006;38:10-14.
- [MASHIBA 2000] Mashiba T, Hirano T, Turner CH, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB. Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage accumulation and reduces some biomechanical properties in dog rib. *J Bone Miner Res* 2000;15:613-620.
- [MCKANE 1995] McKane WR, Khosla S, Burritt MF, Kao PC, Wilson DM, Ory SJ, Riggs BL. Mechanism of renal calcium conservation with estrogen replacement therapy in women in early postmenopause—a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3458-3464.
- [MCLAREN 1992] McLaren AM, Hordon LD, Bird HA, Robins SP. Urinary excretion of pyridinium crosslinks of collagen in patients with osteoporosis and the effects of bone fracture. *Ann Rheum Dis* 1992;51:648-651.

- [MEUNIER 2002] Meunier PJ, Slosman DO, Delmas PD, Sebert JL, Brandi ML, Albanese C, Lorenc R, Pors-Nielsen S, De Vernejoul MC, Roces A, Reginster JY. Strontium ranelate: dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis: a 2-year randomized placebo controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2060-2066.
- [MEUNIER 2004] Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, Cannata J, Balogh A, Lemmel EM, Pors-Nielsen S, Rizzoli R, Genant HK, Reginster JY. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2004;350:459-468.
- [MILLER 1997] Miller PD, Watts NB, Licata AA, Harris ST, Genant HK, Wasnich RD, Ross PD, Jackson RD, Hoseyni MS, Schoenfeld SL, Valent DJ, Chesnut CH 3rd. Cyclical etidronate in the treatment of postmenopausal osteoporosis: efficacy and safety after seven years of treatment. *Am J Med* 1997;103:468-476.
- [MOLINA 2003] Molina FC. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo. *Rev Metab Oseo Min* 2003;1:91-98.
- [MSC 1992] Ministerio de Sanidad y Consumo (1992) Guía práctica de manejo de la Osteoporosis. Instituto Nacional de la Salud, Madrid.
- [MUNDY 1994] Mundy GR. Peptides and growth regulatory factors in bone. *Rheum Dis Clin North Am* 1994;20:577-588.
- [MUÑOZ-TORRES 1999] Muñoz-Torres M, Mezquita-Raya P. Nuevos planteamientos acerca del papel de los estrógenos sobre el metabolismo óseo. *Med Clin* 1999;113:292-293.
- [NAVES 2005] Naves M, Díaz-López JB, Gómez C, Rodríguez-Rebollar A, Serrano-Arias M, Cannata-Andia JB. Prevalence of osteoporosis in men and determinants of changes in bone mass in a non-selected Spanish population. *Osteoporosis Int* 2005;16:603-609.
- [NEER 2001] Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001;344:1434-1441.
- [NICHOLSON 1986] Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest* 1986;78:355-360.
- [NIH 2001] National Institute of Health. Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference. *South MJ* 2001;94:569-573.
- [NOF 1998] National Osteoporosis Foundation. Osteoporosis: Review of the evidence for prevention, diagnosis and treatment and cost-effectiveness analysis. *Osteoporosis Int* 1998;8:1-88.
- [OURSLEER 1991A] Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC. Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6613-6617.
- [OURSLEER 1991B] Oursler MJ, Cortese C, Keeting P, Anderson MA, Bonde SK, Riggs BL, Spelsberg TC. Modulation of transforming growth factor- β production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone. *Endocrinology* 1991;129:3313-3320.
- [PAK 1995] Pak CY, Sakhaee K, Adams-Huet B, Piziak V, Peterson RD, Poindexter JR. Treatment of postmenopausal osteoporosis with slow-release sodium fluoride. Final report of a randomized controlled trial. *Ann Intern Med* 1995;123:401-408.
- [PARFITT 1984] Parfitt AM. The cellular basis of bone remodeling: The quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone. *Calcif Tissue Int* 1984; 36:37-45.
- [PARTRIDGE 2006] Partridge NC, Li X, Qin L. Understanding Parathyroid Hormone Action. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:187-193.
- [QUATTROCCHI 2004] Quattrocchi E, Kourlas H. Teriparatide: a review. *Clin Ther* 2004;26:841-854.
- [RAISZ 1983] Raisz LG, Kream BE. Regulation of bone formation. *N Engl J Med* 1983;309:29-35.
- [REINHOLT 1990] Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegard D. Osteopontin - a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4473-4475.
- [RIGGS 1990] Riggs BL, Melton LJ 3rd. Clinical review 8: Clinical heterogeneity of involutional osteoporosis: implications for preventive therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1229-1232.
- [RIGGS 1992] Riggs BL, Melton L.J. The prevention and treatment of osteoporosis. *N Engl J Med* 1992;327:620-627.
- [RIGGS 1998] Riggs BL, Melton L.J (1998) Osteoporosis: etiología, diagnóstico y tratamiento, pp 171-271. Raven Press, New York.
- [RIZZOLI 1997] Rizzoli R, Bonjour JP. Hormones and bones. *Lancet* 1997;349:120-123.
- [RIZZOLI 2002] Rizzoli R, Greenspan SL, Bone G 3rd, Schnitzer TJ, Watts NB, Adami S, Foldes AJ, Roux C, Levine MA, Uebelhart B, Santora AC 2nd, Kaur A, Pevery CA, Orloff JJ. Two-year results of once-weekly

- administration of alendronate 70 mg for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2002;17:1988-1996.
- [ROSEN 1994] Rosen HN, Dresner-Pollak R, Moses AC, Rosenblatt M, Zeind AJ, Clemens JD, Greenspan SL. Specificity of urinary excretion of cross-linked N-telopeptides of type I collagen as a marker of bone turnover. *Calcif Tissue Int* 1994;54:26-29.
- [RUBIN 2001] Rubin CD, Pak CY, Adams-Huet B, Genant HK, Li J, Rao DS. Sustained-release sodium fluoride in the treatment of the elderly with established osteoporosis. *Arch Intern Med* 2001;161:2325-2333.
- [SCHNEIDER 1997] Schneider DL, Barrett-Connor EL. Urinary N-telopeptide levels discriminate normal, osteopenic, and osteoporotic bone mineral density. *Arch Intern Med* 1997;157:1241-1245.
- [SEEDOR 1991] Seedor JG, Quartuccio HA, Thompson DD. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J Bone Miner Res* 1991;6:339-346.
- [SEIBEL 1993] Seibel MJ, Cosman F, Shen V, Gordon S, Dempster DW, Ratcliffe A, Lindsay R. Urinary hydroxypyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption and estrogen efficacy in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1993;8:881-889.
- [SEIBEL 1994] Seibel MJ, Woitge H, Scheidt-Nave C, Leidig-Bruckner G, Duncan A, Nicol P, Ziegler R, Robins SP. Urinary hydroxypyridinium crosslinks of collagen in population-based screening for overt vertebral osteoporosis: results of a pilot study. *J Bone Miner Res* 1994;9:1433-1440.
- [SOSA 2001] Sosa Henríquez M, Gómez de Tejada MJ, Hernández D. Prevención de la osteoporosis. Concepto, clasificación, factores de riesgo y clínica de la osteoporosis. *Rev Esp Enferm Metabol Óseas* 2001;10:7-11.
- [STEIN 1986] Stein GE, Guarneros SL, Hernández ME. Mecanismos celulares de la prostaglandina E1 en relación con la inducción de la destrucción ósea en ratas. *ADM* 1986;2:2-8.
- [STEVENS 1996] Stevens A, Lowe J (1996) *Human Histology*, pp 234-247. Mosby, New York.
- [SUDA 1997] Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* 1997;12:869-879.
- [THIEBAUD 1997] Thiebaud D, Burckhardt P, Kriegbaum H, Huss H, Mulder H, Juttman JR, Schoter KH. Three monthly intravenous injections of ibandronate in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Am J Med* 1997;103:298-307.
- [THOMPSON 1990] Thompson DD, Seedor JG, Weinreb M, Rosini S, Rodan GA. Aminohydroxybutane bisphosphonate inhibits bone loss due to immobilization in rats. *J Bone Miner Res* 1990;5:279-286.
- [THOMPSON 1992] Thompson DD, Seedor JG, Quartuccio H, Solomon H, Fioravanti C, Davidson J, Klein H, Jackson R, Clair J, Frankenfield D, et al. The bisphosphonate, alendronate, prevents bone loss in ovariectomized baboons. *J Bone Miner Res* 1992;7:951-960.
- [TOOLAN 1992] Toolan BC, Shea M, Myers ER, Borchers RE, Seedor JG, Quartuccio H, Rodan G, Hayes WC. Effects of 4-amino-1-hydroxybutylidene bisphosphonate on bone biomechanics in rats. *J Bone Miner Res* 1992;7:1399-1406.
- [VANDERSCHUEREN 1995] Vanderschueren D, Bouillon R. Androgens and bone. *Calcif Tissue Int* 1995;56:341-346.
- [VAN LEEUWEN 2001] Van Leeuwen JP, van Driel M, van den Bemd GJ, Pols HA. Vitamin D control of osteoblast function and bone extracellular matrix mineralization. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp* 2001;11:199-226.
- [WALLACH 1993] Wallach S. Calcitonin treatment in osteoporosis. *Drug Ther* 1993;23:61-74.
- [WHO 1994] Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organization technical report series 1994;843:1-129.
- [WISNESKI 1992] Wisneski LA. Clinical management of postmenopausal osteoporosis. *South Med J* 1992;85:832-839.
- [YAMASAKI 1980] Yamasaki K, Miura F, Suda T. Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movements in rats. *J Dent Res* 1980;59:1635-1642.

Experimental, resultados y discusión



En este capítulo de la tesis se ha estudiado algunos de los factores implicados en la osteoporosis así como el efecto de diferentes inhibidores de la cristalización sobre dicho proceso a través de dos trabajos diferentes:

ARTÍCULO ORIGINAL 4.1. Un trabajo “in vitro” a fin de estudiar y evaluar el efecto de diferentes inhibidores de la cristalización (fitato, alendronato y etidronato) sobre la disolución de hidroxiapatita.

ARTÍCULO ORIGINAL 4.2. Un trabajo “in vivo” en animales de experimentación que permite estudiar el efecto del fitato sobre la osteoporosis. En este estudio, dos grupos de ratas ovariectomizadas (uno alimentado con una dieta sin fitato y el otro alimentado con una dieta con un 1% de fitato) fueron sacrificadas a las 14 semanas de la ovariectomía para realizar las correspondientes determinaciones en orina, suero, huesos femorales y vértebra L4.

Artículo original 4.1.

***El fitato inhibe la disolución de
hidroxiapatita***

PHYTATE (MYO-INOSITOL HEXAKISPHOSPHATE) INHIBITS HYDROXYAPATITE DISSOLUTION

Short title: phytate inhibits hydroxyapatite dissolution

*Félix Grases, Pilar Sanchis, Antonia Costa-Bauzá, Joan Perelló

Laboratory of Renal Lithiasis Research, University Institute of Health Sciences Research (IUNICS),
University of Balearic Islands; CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB06/03),
Instituto de Salud Carlos III, Spain.

* Corresponding author: Prof. F. Grases - Laboratory of Renal Lithiasis Research - Faculty of
Sciences - University of Balearic Islands - 07122 - Palma of Mallorca - Spain - Tel: 034971173257
Fax: 034971173426 - E-mail: fgrases@uib.es.

ABSTRACT

Crystallization inhibitors bind to crystal nuclei or crystal faces and disturb crystal development. The adsorption of such inhibitors to crystal faces can also inhibit crystal dissolution. The current study compared the effects of phytate and two bisphosphonates (etidronate and alendronate) on *in vitro* dissolution of hydroxyapatite (HAP) in order to evaluate the possible use of phytate to inhibit bone resorption.

Incubation of HAP with phytate reduced subsequent acid-driven HAP dissolution. The effect of phytate was similar to that of alendronate and greater than that of etidronate. These data suggest phytate may have a role in osteoporosis prevention, and that *in vivo* studies may be warranted to further elucidate such a potential role.

Key words: crystallization inhibitors, hydroxyapatite dissolution, bone resorption, phytate, bisphosphonates.

INTRODUCTION

It has been known since the 1930s that the presence of trace amounts of molecules such as polyphosphates can act as water softeners through their inhibition of the crystallization of calcium salts such as calcium carbonate. However, the use of such compounds as natural regulators of calcification under physiological conditions was not explored until the 1960s. During that decade, Fleisch *et al.* showed that pyrophosphate, a naturally occurring polyphosphate, was present in serum and urine and could prevent calcification by binding to hydroxyapatite (Fleisch and Bisaz [1], Fleisch and Neuman [2]). However, studies in animal models found that pyrophosphate could inhibit ectopic calcification in blood vessels and kidneys only when injected rather than ingested. Oral administration was found to cause hydrolysis and hence inactivation of pyrophosphate, resulting in a search for more stable analogues. Bisphosphonates, a group of polyphosphates, were found to have a high affinity for hydroxyapatite and to prevent calcification both *in vitro* and *in vivo*, even when administered orally to animals (Fleisch *et al.* [3]).

Crystallization inhibitors bind to crystal nuclei or crystal faces and disturb crystal development. The adsorption of such compounds to crystal faces can also inhibit crystal dissolution. The observations that bisphosphonates could inhibit hydroxyapatite crystal dissolution (Fleisch *et al.* [4], Russell *et al.* [5]) and could be administered orally resulted in studies examining their potential use as inhibitors of bone resorption (Fleisch *et al.* [4], Russell *et al.* [5], Fleisch [6]). To date, many studies with a variety of bisphosphonates, experimental systems and clinical assays have shown that this class of compounds can inhibit osteoclast-mediated bone resorption (Fleisch [6], Fleisch [7], Fleisch [8]).

Phytate (myo-inositol hexakisphosphate) is found in abundance in plant seeds. While phytate is also found in all mammalian organs, tissues and fluids, the levels are low (Grases *et al.* [9], Grases *et al.* [10]) and are dependent upon exogenous supply either orally (Grases *et al.* [9], Grases *et al.* [10]) or topically (Grases *et al.* [11], Grases *et al.* [12]). Phytate has been shown to inhibit calcium salt crystallization in urine and soft tissues (Grases *et al.* [13], Grases *et al.* [14]), similar to other polyphosphates such as pyrophosphate and bisphosphonates (Grases *et al.* [15]).

The current study examined the effects of phytate and two bisphosphonates (etidronate and alendronate) on *in vitro* dissolution of hydroxyapatite. Inhibition of hydroxyapatite dissolution by phytate would suggest it may be useful clinically as an inhibitor of bone resorption.

MATERIALS AND METHODS

Adsorption of phytate, alendronate and etidronate to hydroxyapatite

A suspension was prepared consisting of 130 mg hydroxyapatite (HAP; Fluka) in 400 mL Trizma buffer (Sigma) at pH 7.4. The HAP suspension was then incubated with either nothing (control), 1 or 3 μM phytate (as sodium salt; Sigma), 1 or 3 μM alendronate (as sodium salt; Sigma) or 1 or 3 μM etidronate (in acid form; Fluka) under stirred conditions for 8 h at 37°C in a thermostatic bath. The incubation suspensions were then filtered through a 0.45 μm pore filter and the incubated HAP dried at room temperature in a desiccator.

Inhibition of hydroxyapatite dissolution

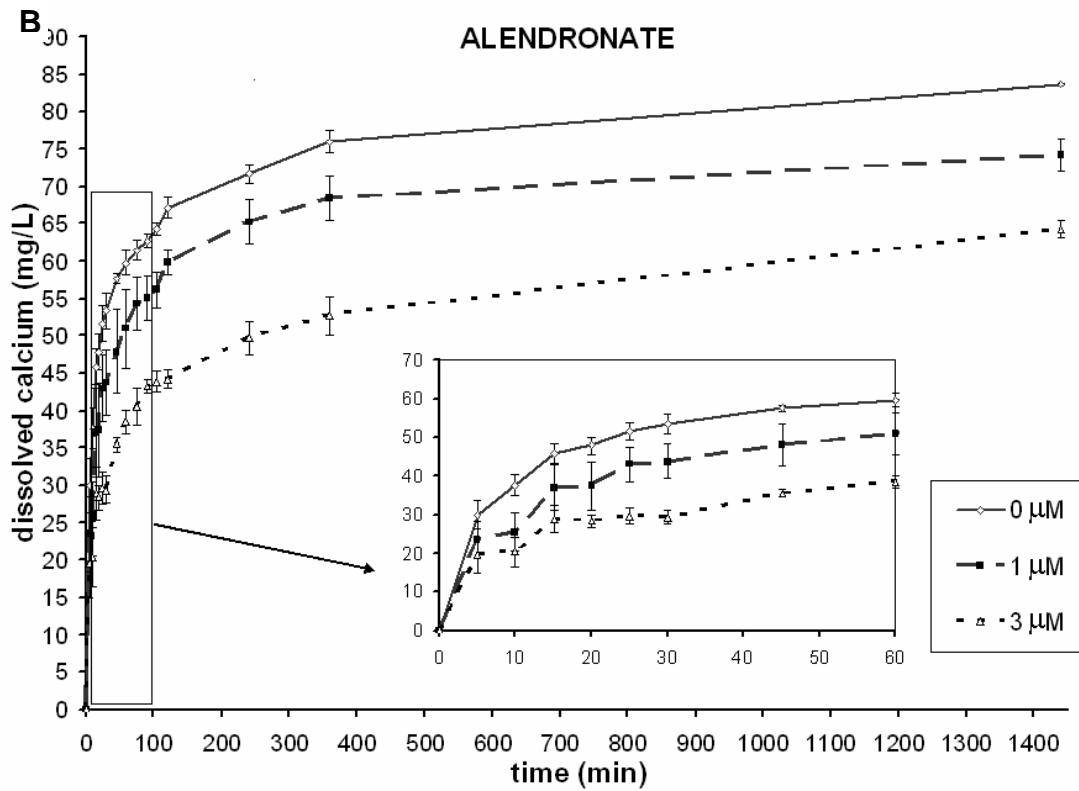
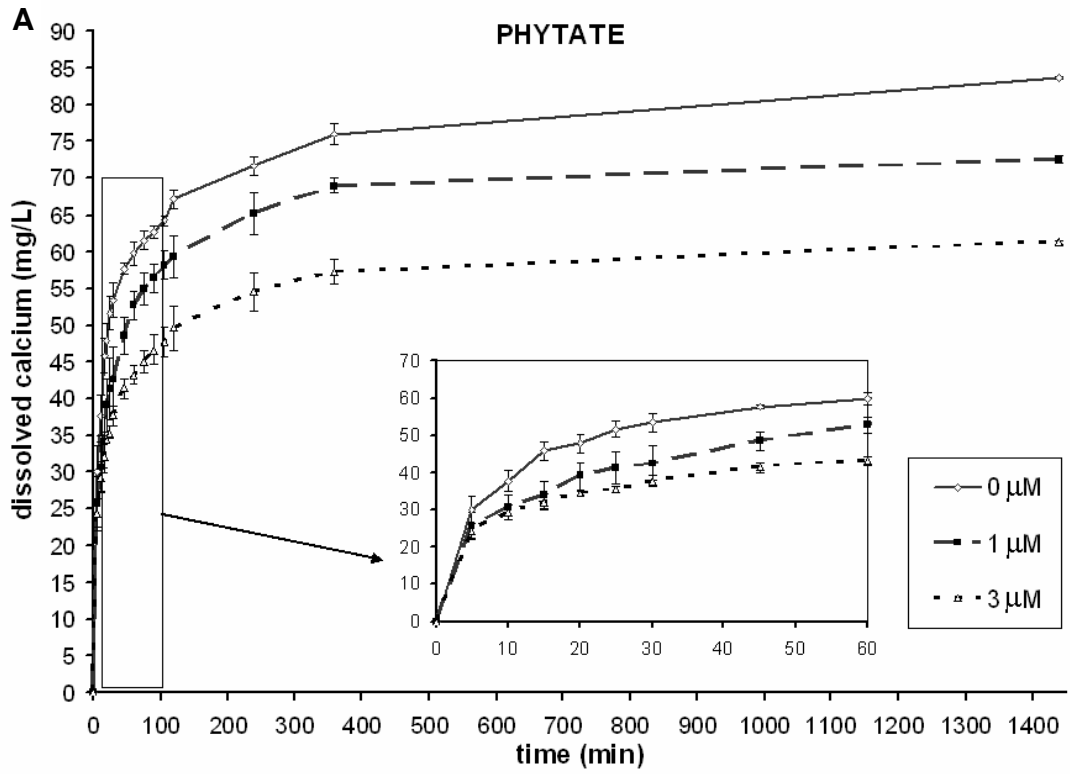
Hydroxyapatite dissolution was determined as previously described (Van Gelder et al. [16]). Briefly, the dry incubated HAP was resuspended in 200 mL 0.15 M acetate buffer (pH 5.0) to initiate dissolution. Aliquots were withdrawn at various times over a 24 h period and immediately filtered through a 0.45 μm pore filter. Dissolved calcium was determined using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (Perkin-Elmer Optima 5300DV spectrometer). Experiments were performed three times.

Statistics

Values in the table and figures represent mean \pm SE. One-way ANOVA was used to determine any significant differences between groups. Student's *t*-test was used to determine significant differences between means. Conventional Windows software was used for statistical computations. A *p* value < 0.05 was considered to indicate a significant difference.

RESULTS

HAP was incubated with either nothing (control), phytate, alendronate or etidronate. This incubated HAP was then subjected to acid-driven dissolution, and calcium levels were measured. Kinetic analysis over the 24 h dissolution period showed that HAP incubated with phytate, alendronate or etidronate showed less dissolution than control HAP (Figure 1).



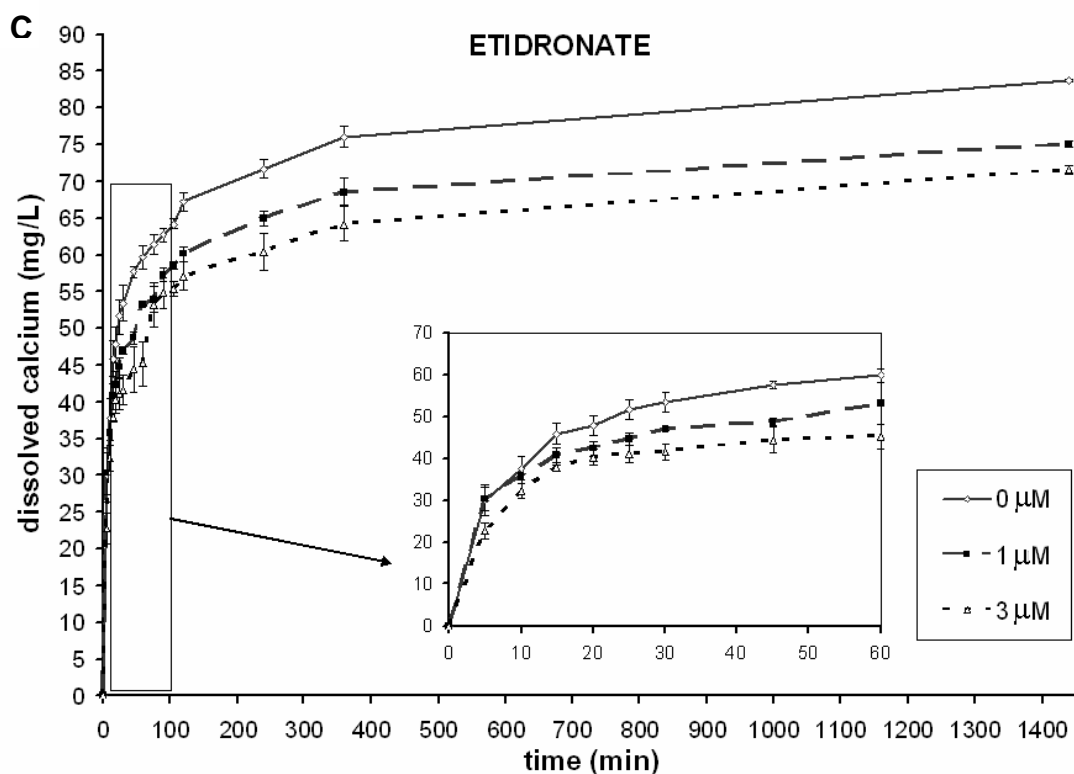


Figure 1. The effect of phytate, alendronate and etidronate on hydroxyapatite (HAP) dissolution. HAP was incubated with either nothing (control), phytate, alendronate or etidronate (1 or 3 μM), and then subjected to dissolution under acidic conditions. Aliquots were withdrawn over the 24 h dissolution period and the levels of dissolved calcium were determined: (A) phytate; (B) alendronate; (C) etidronate

Analysis of the calcium content in filtered aliquots at 24 h showed that for each compound, greater protection against dissolution was achieved at 3 μM compared to 1 μM (Table 1).

Table 1. The effect of 0, 1 or 3 μM phytate, alendronate or etidronate on calcium content (mg/L) in filtered aliquots after 24 h hydroxyapatite dissolution. Data are expressed as mean \pm SE. *Statistics:* a: $p < 0.05$ vs. the value for the corresponding 0 μM incubation; b: $p < 0.05$ vs. the value for the corresponding 1 μM incubation.

CONCENTRATION	INHIBITORY SUBSTANCE		
	Phytate	Alendronate	Etidronate
0 μM	83.7 \pm 0.1 (n = 3)	83.7 \pm 0.1 (n = 3)	83.7 \pm 0.1 (n = 3)
1 μM	72.6 \pm 0.5 ^a (n = 3)	74.2 \pm 2.2 ^a (n = 3)	75.1 \pm 0.5 ^a (n = 3)
3 μM	61.3 \pm 0.3 ^{a,b} (n = 3)	64.3 \pm 1.2 ^{a,b} (n = 3)	71.5 \pm 0.6 ^{a,b} (n = 3)

The dissolution inhibitory effects of phytate, etidronate and alendronate are represented graphically in Figure 2.

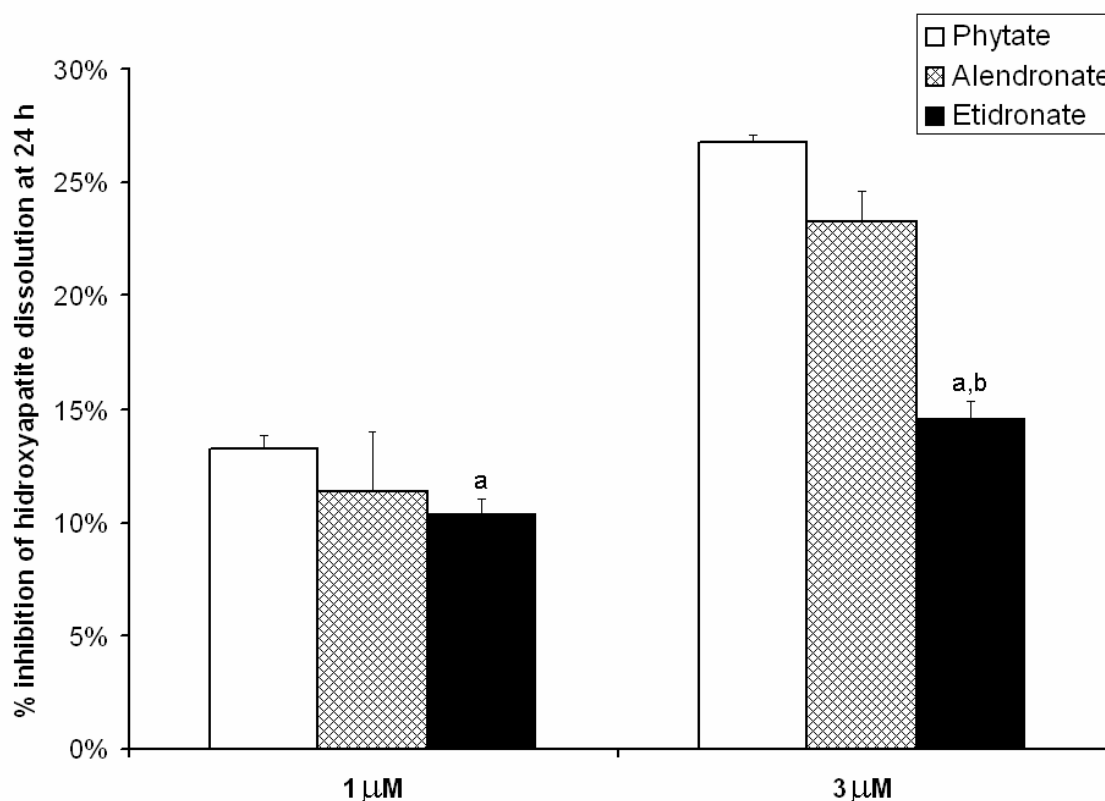


Figure 2. Percent inhibition of hydroxyapatite dissolution by phytate, alendronate and etidronate. Inhibition was calculated for both 1 and 3 μM compound concentrations. Percent inhibition = [mg calcium in filtered aliquot at 24 h for 0 μM – mg calcium in filtered aliquot at 24 h for 1 or 3 μM]/[mg calcium in filtered aliquot at 24 h for 0 μM] *100. Statistics: a = $p < 0.05$ vs. the value for the corresponding phytate concentration; b = $p < 0.05$ vs. the value for the corresponding alendronate concentration.

At 1 μM , phytate inhibited hydroxyapatite dissolution by 13.2 \pm 0.6 % compared to control HAP dissolution. This level of inhibition was greater than that by 1 μM etidronate (10.3 \pm 0.7 %), and similar to that by 1 μM alendronate (11.4 \pm 2.6 %). At 3 μM , phytate inhibited hydroxyapatite dissolution by 26.7 \pm 0.4 % compared to control HAP dissolution. This effect of phytate was greater than that of 3 μM etidronate (14.6 \pm 0.7 %) and similar to that of 3 μM alendronate (23.2 \pm 1.4 %).

DISCUSSION

The present study found that pre-incubation of HAP with phytate was able to inhibit acid-driven HAP dissolution in a concentration-dependent manner. The effect of phytate on inhibiting HAP dissolution was similar to that of alendronate, and greater than that of etidronate.

The present data suggest that phytate may play a role in osteoporosis prevention. The data are consistent with the recent finding that osteoporotic patients consumed lower amounts of phytate-rich products compared to a control population (Lopez et al. [17]). Animal studies have

found that when phytate was supplied via the diet the levels in bone reached consistent levels, but that once phytate was removed from the diet the bone concentration decreased dramatically to undetectable levels (Grases et al. [9], Grases et al. [10]).

In 1949, Mellanby demonstrated in dogs that the addition of high levels of phytate (as sodium salt) to diets resulted in reduced calcium absorption and induced rickets (Mellanby [18]). Since that time, a number of studies have attributed 'anti-nutrient' properties to phytate (Reddy et al. [19], Davies et al. [20], Forbes et al. [21], Forbes et al. [22], Lonnerdal et al. [23], Khokhar et al. [24], Zhou et al. [25]). However, recent studies indicate that phytate (mainly found as the calcium-magnesium salt phytin) amounts to approximately 0.1% of a balanced diet, has no adverse effect on mineral bioavailability (Grases et al. [26], Grases et al. [27]). Studies using humans reported that a phytate intake of 2 g per day did not affect mineral balance when mineral intake levels were sufficient (Walker et al. [28], Cullumbine et al. [29]). Interestingly, the so-called Mediterranean diet, known for its healthy properties, results in an intake of approximately 1 g of phytate per day.

CONCLUSIONS

From the presented study it can be concluded that phytate inhibits HAP dissolution in a concentration-dependent manner. The effect of phytate on inhibiting HAP dissolution was similar to that of alendronate and greater than that of etidronate. These data suggest that phytate may have a role in osteoporosis prevention although *in vivo* studies may be warranted to further investigate this potential role for phytate.

ACKNOWLEDGMENTS

P.S. expresses her appreciation to the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport for an FPU program fellowship. This work was supported by the Conselleria d'Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears (Grant PRDIB-2002GC1-04) and by the project grant CTO2006-05640/BOU from the Spanish Ministry of Science and Technology.

REFERENCES

1. Fleisch H, Bisaz S (1962) Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am J Physiol* 203:671-675.
2. Fleisch H, Neuman WF (1961) Mechanism of calcification: role of collagen, polyphosphates, and phosphatases. *Am J Physiol* 200:1296-1300.
3. Fleisch HA, Russell RG, Bisaz S, Muhlbauer RC, Williams DA (1970) The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur J Clin Invest* 1:12-18.
4. Fleisch H, Russell RG, Francis MD (1969) Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science* 165:1262-1264.
5. Russell RG, Muhlbauer RC, Bisaz S, Williams DA, Fleisch H (1970) The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calcif Tissue Res* 6:183-196.
6. Fleisch H (1997) Bisphosphonates in bone disease. From the laboratory to the patient, third edition. The Parthenon Publishing Group, New York.
7. Fleisch H (1998) Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 19:80-100.
8. Fleisch HA (1997) Bisphosphonates: preclinical aspects and use in osteoporosis. *Ann Med* 29:55-62.
9. Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001) Variation of InsP_4 , InsP_5 , InsP_6 levels in tissues and biological fluids depending on dietary phytate. *J Nutr Biochem* 12:595-601.
10. Grases F, Simonet BM, Vucenik I, Prieto RM, Costa-Bauzá A, March JG, Shamsuddin AM (2001) Absorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP_6 or phytate) in humans. *BioFactors* 15:53-61.
11. Grases F, Isern B, Perelló J, Sanchis P, Prieto RM (2005) Absorption of myo-inositol hexakisphosphate (InsP_6) through the skin: study of the matrix effects. Mechanism of phytate topical absorption. *Front Biosci* 10:799-802.
12. Grases F, Isern B, Perelló J, Sanchis P, Prieto RM, Costa-Bauzá A (2006) Absorption of myo-inositol hexakisphosphate (InsP_6) through the skin in humans. *Pharmazie* 61:652.
13. Grases F, Prieto RM, Simonet BM, March JG (2000) Phytate prevents tissue calcifications in female rats. *BioFactors* 11:171-177.
14. Grases F, Perelló J, Prieto RM, Simonet BM, Torres JJ (2004) Dietary myo-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues: a pilot study in Wistar rats. *Life Sci* 75:11-19.
15. Grases F, Ramis M, Costa-Bauzá A (2000) Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Comparison with the action of other polyphosphates. *Urol Res* 28:136-140.
16. Van Gelder JM, Breuer E, Ornoy A, Schlossman A, Patlas N, Golomb G (1995) Anticalcification and antiresorption effects of bisacylphosphonates. *Bone* 16:511-520.
17. López AA, Mari B, Grases F, Vicente MT, Cabanes T (2006) The influence of consumption of phytates (phytic acid) in the bone mass levels of the working class in the Balearic Islands. *IOF World Congress on Osteoporosis*, Toronto, Canada.
18. Mellanby E (1949) Rickets-producing and anticalcifying action of phytate. *J Physiol* 109:488-533.
19. Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK (1982) Phytates in legumes and cereals. *Adv Food Res* 28:1-92.
20. Davies NT, Olpin SE (1979) Studies on the phytate: zinc molar contents in diets as a determinant of zinc availability to young rats. *Br J Nutr* 41:591-560.
21. Forbes RM, Weingartner KE, Parker HM, Bell RR, Erdman JW Jr (1979) Bioavailability to rats of zinc, magnesium and calcium in casein-, egg- and soy protein-containing diets. *J Nutr* 109:1652-1660.
22. Forbes RM, Parker HM, Erdman JW Jr (1984) Effects of dietary phytate, calcium and magnesium levels on zinc bioavailability to rats. *J Nutr* 114:1421-1425.
23. Lonnerdal B, Cederblad A, Davidsson L, Sandstrom B (1984) The effect of individual components of soy formula and cows' milk formula on zinc bioavailability. *Am J Clin Nutr* 40:1064-1070.
24. Khokhar S, Pushpanjali F, Roger G (1994) Phytate content of Indian foods and intakes by vegetarian Indians of Hisar Region, Haryana State. *J Agric Food Chem* 42:2440-2444.
25. Zhou JR, Wong MS, Burns RA, Erdman JW (1992) Reduction of phytic acid in soy protein improves zinc bioavailability. *J Nutr* 122:2466-2473.
26. Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001) Dietary phytate and mineral bioavailability. *J Trace Elem Med* 15:221-228.
27. Grases F, Simonet BM, Perello J, Costa-Bauzá A, Prieto RM (2004) Effect of phytate on element bioavailability in the second generation of rats. *J Trace Elem Med* 17:229-234.
28. Walker AR, Fox FW, Irving JT (1948) Studies in human mineral metabolism: 1. The effect of bread rich in phytate phosphorus on the metabolism of certain mineral salts with special reference to calcium. *Biochem J* 42:452-462.
29. Cullumbine H, Basnayake V, Lemottee J, Wickramanayake TW (1950) Mineral metabolism on rice diets. *Br J Nutr* 4:101-111.

Artículo original 4.2.

***Efecto del fitato sobre el hueso en ratas
ovariectomizadas***

EFFECT OF PHYTATE (MYO-INOSITOL HEXAPHOSPHATE) ON BONE CHARACTERISTICS IN OVARECTOMIZED RATS

Short title: Phytate and bone in ovariectomized rats

* Félix Grases¹, Pilar Sanchis¹, Joan Perelló¹, Rafael M. Prieto¹, Arturo A. López-González²

¹Laboratory of Renal Lithiasis Research, University Institute of Health Sciences Research (IUNICS), University of Balearic Islands; CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB06/03), Instituto de Salud Carlos III, Spain.

²Gestión Sanitaria de Mallorca (GESMA). Servicio de Prevención de Riesgos Laborales, Spain.

* Corresponding author: Prof. F. Grases - Laboratory of Renal Lithiasis Research - Faculty of Sciences - University of Balearic Islands - 07122 - Palma de Mallorca - Spain - Tel: 034971173257
Fax: 034971173426 - E-mail: fgrases@uib.es.

ABSTRACT

Objective. The aim of this study was to evaluate the influence of dietary phytate consumption on the bone characteristics of ovariectomized rats, an animal model for postmenopausal osteoporosis.

Material and methods. Twenty ovariectomized female Wistar rats with weights of approximately 240 g were randomly assigned to two groups. The non-phytate group was fed a purified diet (AIN-76A) in which phytate is undetectable, and the phytate group was fed the same diet enriched with 1% phytate (as the calcium magnesium salt, phytin). After 12 weeks of feeding the rats were sacrificed, and both femoral bones and the L4 vertebra were removed from each rat. Bone mass, length, width, volume and mineral density were measured, and the phosphorus, calcium, magnesium and zinc contents of bones were determined. Deoxypyridinoline (a bone resorption marker) was measured in urine and osteocalcin (a bone formation marker) was measured in serum.

Results. The calcium and phosphorus content, and bone mineral density, were significantly higher in both femoral bones and the L4 vertebra for phytate-treated rats in comparison to rats in the non-phytate treatment group. Deoxypyridinoline was significantly increased in rats in the non-phytate treatment group.

Conclusions. The results indicated that phytate consumption reduces bone mineral density loss due to estrogen deficiency. Phytate is a natural polyphosphate that occurs in significant amounts as a calcium magnesium salt in common foods including legumes, whole cereals and nuts, and exhibits effects similar to bisphosphonates on bone resorption. Thus, phytate may be of use in the primary prevention of osteoporosis if larger studies in humans confirm these findings.

Key words: phytate, bone resorption, ovariectomized rats, osteoporosis.

INTRODUCTION

Osteoporosis is the most prevalent bone metabolic disease of humans. It is characterized by loss of bone mass and deterioration of the architecture of bone tissue, which results in increased bone fragility and susceptibility to fractures, especially of the hip, spine and wrist^(1,2). The etiology of osteoporosis is multifactorial, and among the most important risk factors are old age⁽³⁾ and estrogen deficiency⁽⁴⁾, although a range of other factors including genetic disposition⁽⁵⁾ and those related to lifestyle⁽⁶⁾ (such as nutritional imbalance, inadequate exercise and smoking) appear to be important risk factors^(7,8).

Of the therapeutics agents developed for osteoporosis treatment, the bisphosphonates are a group of synthetic polyphosphates that are among the most important anti-resorptive agents for the prevention and treatment of osteoporosis. Bisphosphonates have been demonstrated to prevent or disrupt calcium salt crystallization and dissolution⁽⁹⁻¹¹⁾, and many studies involving experimental systems and clinical trials have shown that a variety of bisphosphonates can also inhibit osteoclast-mediated bone resorption⁽¹²⁻¹⁴⁾.

In contrast to bisphosphonates, phytate (myo-inositol hexaphosphate) is a naturally occurring polyphosphate which has also been shown to inhibit calcium salt crystallization⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ and hydroxyapatite dissolution in a concentration-dependent manner^(18,19). Phytate occurs in significant quantities in diets rich in whole grains, legumes and nuts. In plant seeds phytate is associated with divalent ions including calcium and magnesium (the so-called phytin salt), where it acts as a phosphate and ion store. Phytate is concentrated in the germ of aleuronic layers of the kernel and in the bran or hull^(20,21). For this reason large amounts of phytate are found in whole cereals and in other edible vegetable seeds such as legumes and nuts. However, due to cereal refinement processes, the removal of seed bran and hulls, and consumption of low fiber foods, human diets in developed countries are gradually becoming poorer in phytate. In 1949 Mellanby⁽²²⁾ demonstrated that dogs fed diets high in phytate (as the sodium salt) had reduced calcium absorption and increased incidence of rickets. Since that time a number of papers have attributed "anti-nutrient" properties to phytate^(23,24), and its capacity to induce osteoporosis has even been postulated^(25,26). However, recent studies indicate that approximately 0.1% phytate (mainly as phytin) in a balanced diet has no adverse effects on mineral bioavailability⁽²⁷⁻²⁹⁾. Studies in humans have indicated that a phytate intake of 2 g per day does not affect mineral balance when mineral intake levels are adequate^(30,31). Interestingly the so-called Mediterranean diet, known for its healthy properties, results in an intake of approximately 1 g of phytate per day.

The aim of this study was to evaluate the influence of dietary phytate consumption (as the calcium magnesium salt) on bone properties in an animal model of postmenopausal osteoporosis (ovariectomized rats).

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

Female Wistar rats (20) with weights of approximately 240 g (Harlan Iberica S. L., Barcelona, Spain) were subjected to bilateral ovariectomy at the International Microsurgical Training Center, Lelystad, Holland. The animals were transported to our animal 7 days after surgery, and acclimated for 7 days in Plexiglas cages (three animals per cage) on a 12 h light:dark cycle at $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and relative humidity of $60 \pm 5\%$. Two weeks after ovariectomy the rats were randomly assigned to either a non-phytate group or a phytate group (10 ovariectomized rats per treatment). The non-phytate group was fed a purified diet in which phytate is undetectable (AIN-76A; Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany), and the phytate group were fed the same diet enriched by the addition of phytate at a concentration equivalent to a standard rat diet (AIN-76A + 12.99 g/kg phytin, as the tetracalcium dimagnesium phytate salt). The mineral composition of the diets is listed in Table 1.

Table 1. Composition of the AIN-76A and phytin-enriched AIN-76A diets.

	AIN-76A	AIN-76A + phytin*
Phosphorus (g/kg dry weight)	6.7 ± 0.1	8.2 ± 0.1
Calcium (g/kg dry weight)	6.2 ± 0.1	8.1 ± 0.4
Magnesium (g/kg dry weight)	0.69 ± 0.01	1.62 ± 0.01
Manganese (g/kg dry weight)	0.056 ± 0.001	0.055 ± 0.001
Iron (g/kg dry weight)	0.056 ± 0.001	0.057 ± 0.003
Zinc (g/kg dry weight)	0.045 ± 0.001	0.040 ± 0.004
Phytate (g/kg dry weight)	< 0.01	10.0 ± 0.3

* tetracalcium dimagnesium phytate salt.

Experimental procedures were performed according to Directive 86/609/EEC with respect to treatment of animals used for experimental and other scientific purposes. Permission to perform these animal experiments was obtained from the Bioethical Committee of our University.

Monitoring and sampling

Animal weights and dietary intake were monitored throughout the study. After 4, 8 and 12 weeks on the allocated diet, samples of urine collected from each rat over a 24 h period were analyzed. Urines samples were collected using metabolic cages (Tecniplast, Gazzada, s.a.r.l., Italy). After 12 weeks on the allocated diet, all rats were anesthetized by intraperitoneal injection with 0.2 mg ketamine (Merial, Lyon, France) plus 0.02 mg medetomidine (OrionPharma, Espoo, Finland) and sacrificed by exsanguination. The total rat blood was collected by heart puncture and centrifuged to separate the serum. The right and left femoral bones and the L4 vertebra of each rat were

excised, cleaned to remove soft tissues, and weighed. All samples were frozen at -20°C until analyzed.

Measurement of bone size, mass and mineral density parameters

Femur length and width were measured using vernier calipers. The bone mineral density (BMD) of the femoral bones was determined by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA Pixi Lunar, USA). To obtain reference values of bone mineral density for healthy individuals the femoral bones of 6 non-ovariectomized female Wistar rats of 250 g were analyzed. This reference group of animals was fed with a standard rat diet (UAR-A04, Panlab S.L., Barcelona, Spain) and subjected to the same sampling and measurement procedures as the other two groups.

Bone volumes were calculated with a pycnometer using Archimedes' principle⁽³²⁾. To ensure that air trapped in the bones was removed, the femoral bones and the L4 vertebra were placed in unstoppered glass vials filled with deionized water, and the vials were held under vacuum in a dessicator for 15 min. All bones were subsequently lyophilized and weighed.

Determination of urinary and serum bone markers

The levels of urinary deoxypyridoniline (DPD) were measured as a bone resorption marker by enzyme-immunoassay using the Pylinks-D kit and a creatinine assay using the Metra Creatinine kit (Metra Biosystems Inc., San Diego, CA, USA).

The levels of serum osteocalcin (OC) were measured as a bone formation marker by enzyme-immunoassay using the Rat Osteocalcin EIA kit (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA, USA).

Determination calcium, phosphorus, magnesium and zinc levels in bones

The femoral bones and the L4 vertebra were mineralized at 620°C for 48 h, dissolved in 12 M HCl, and diluted with distilled water to a volume of 20 mL. The concentrations of calcium, phosphorus, magnesium and zinc were determined using inductively-coupled plasma atomic emission spectrometry (Optima 5300DV spectrometer; Perkin-Elmer S. L.) and a corresponding calibration curve.

Statistics

Values are expressed as mean \pm SE. A one-way ANOVA was used to determine the significance of differences among groups when three groups were compared. Student's *t*-tests were used to assess differences between means. Conventional Windows software was used for statistical computations. A *p* value < 0.05 was considered to indicate a significant difference.

RESULTS

No significant differences in body weight and diet intake were found among the groups throughout the study. Table 2 shows the body weight trajectory for each group.

Table 2. Animal weight trajectories for rats in the non-phytate-treated and phytate-treated groups.

Week	Non-phytate group (n = 10)	Phytate group (n = 10)
0 (Ovariectomy)	242 ± 3	245 ± 3
1	254 ± 4	254 ± 4
2 (Start corresponding diet treatment)	270 ± 7	268 ± 5
6	306 ± 11	305 ± 10
10	345 ± 11	342 ± 11
14	388 ± 10	382 ± 15

Effects of phytate on bone characteristics

The concentrations of calcium, phosphorus, magnesium and zinc in femoral bones and the L4 vertebra are shown in Figure 1.

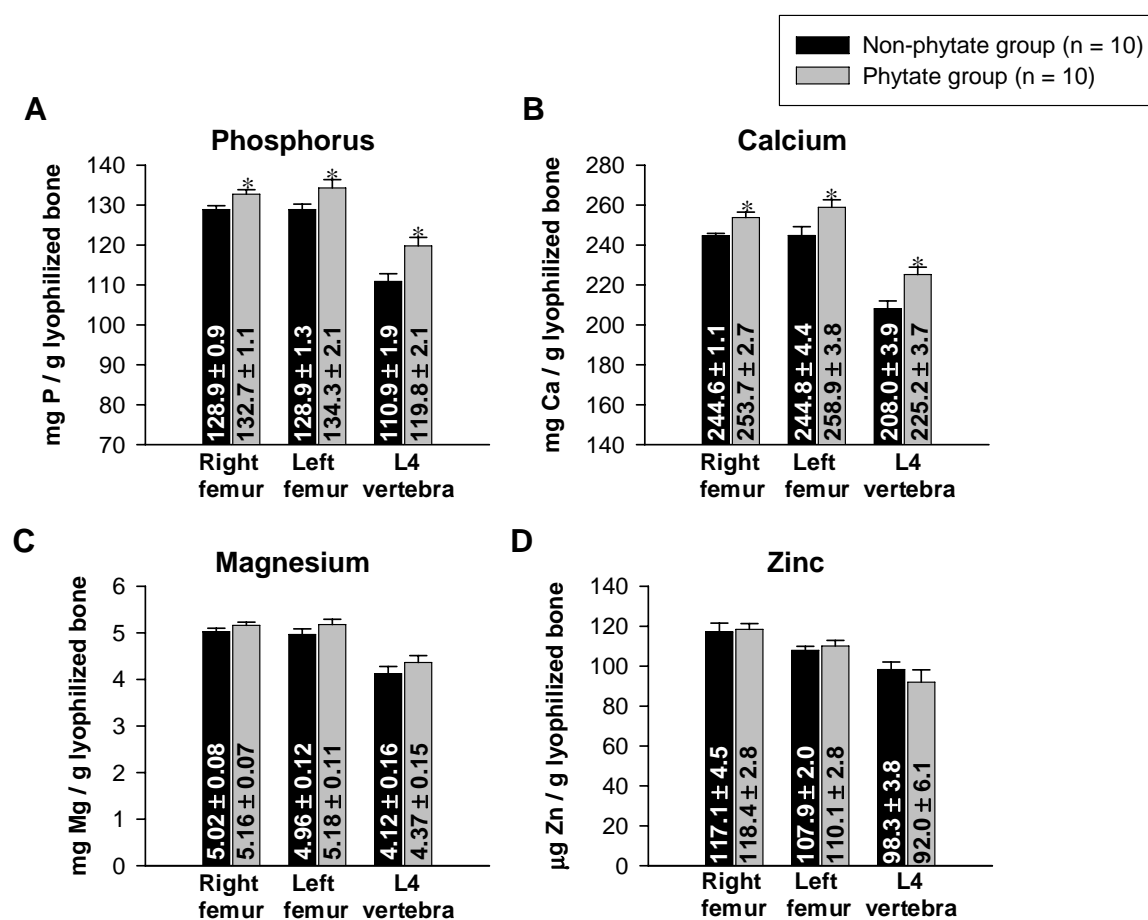


Figure 1. Phosphorus (A), calcium (B), magnesium (C) and zinc (D) concentrations in the right and left femur and the L4 vertebra for the non-phytate and phytate groups. Statistics: * : $p < 0.05$ vs. the corresponding value for the non-phytate group.

Relative to the rats in the non-phytate group the calcium and phosphorus content was significantly higher in both femoral bones and the L4 vertebra of rats in the phytate group. No significant differences were observed in the magnesium and zinc concentrations between the groups.

The effects of phytate on bone size, weight and BMD of femoral bones and the L4 vertebra are summarized in Table 3.

Table 3. Bone size, mass and mineral density for the non-phytate, phytate and reference groups. *Statistics:* a: $p < 0.05$ vs. the corresponding value for the non-phytate group. b: $p < 0.05$ vs. the corresponding value for the phytate group.

		Non-phytate group (n = 10)	Phytate group (n = 10)	Reference group* (n = 6)
Bone mass (mg)	Right femur	684 ± 17	679 ± 18	740 ± 13 ^{a,b}
	Left femur	694 ± 18	680 ± 18	750 ± 22 ^b
	L4 vertebra	174 ± 16	181 ± 18	
Length (mm)	Right femur	34.7 ± 0.2	34.4 ± 0.3	34.7 ± 0.2
	Left femur	34.6 ± 0.3	34.5 ± 0.3	34.7 ± 0.4
Width (mm)	Right femur	4.14 ± 0.05	4.07 ± 0.03	4.16 ± 0.02
	Left femur	4.06 ± 0.03	3.98 ± 0.05	4.10 ± 0.03
Volume (µl)	Right femur	439 ± 16	433 ± 12	500 ± 14 ^{a,b}
	Left femur	456 ± 14	439 ± 13	502 ± 14 ^{a,b}
	L4 vertebra	106 ± 9	115 ± 15	
Bone mineral density (mg/cm²)	Right femur	117.9 ± 0.5	119.6 ± 0.5 ^a	121.8 ± 2.1 ^a
	Left femur	116.0 ± 0.8	120.7 ± 0.6 ^a	121.2 ± 2.7 ^a

* Reference group rats were not ovariectomized, were fed a standard diet (UAR-A04), and were subjected to the same sampling and measurement procedures as the other two groups.

A significant decrease in BMD in the non-phytate group relative to the phytate and reference groups was observed after 12 weeks of treatment, while no statistically significant difference was found between the phytate and reference groups. No differences were found between the phytate and non-phytate groups for bone mass, length, width or volume.

Effects of phytate on bone biomarkers

In the process of bone degradation, DPD is released into the blood and cleared by the kidneys. Hence, urinary DPD has been shown to be a biochemical indicator of bone resorption. Osteocalcin is manufactured by osteoblasts during bone formation, and increased levels of this protein are associated with bone diseases characterized by increased bone turnover.

The levels of urinary DPD at 4, 8 and 12 weeks, and the serum osteocalcin at 12 weeks are shown in Figure 2 for the phytate and non-phytate groups. At 12 weeks, the urinary DPD was significantly increased in the non-phytate group relative to the phytate group, but no significant differences were observed in serum osteocalcin levels between the two groups.

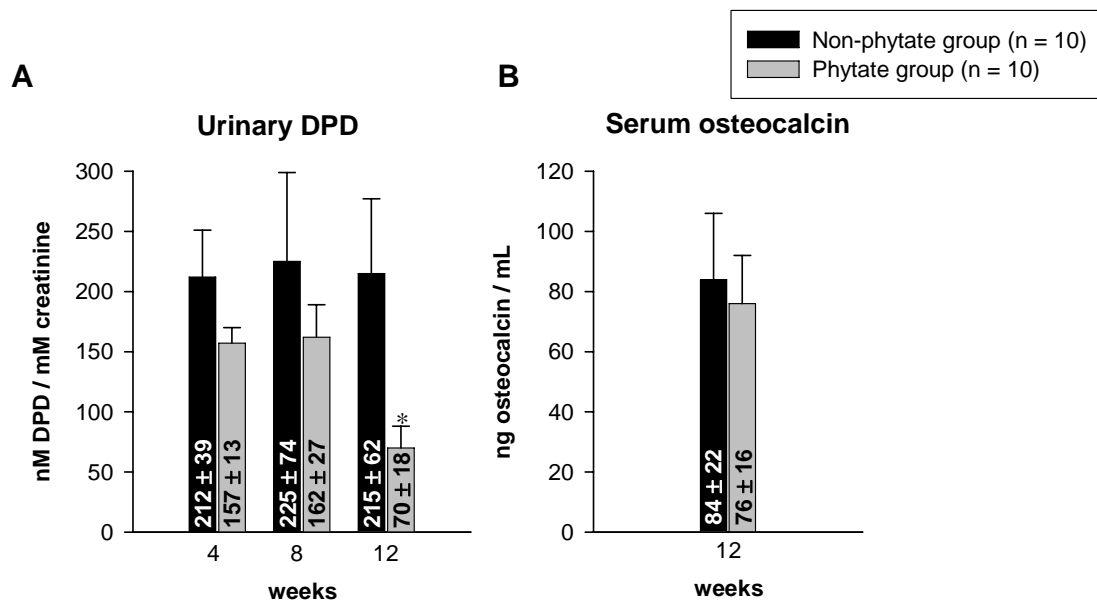


Figure 2. Urinary DPD (A) and serum osteocalcin (B) levels in the non-phytate and phytate groups. *Statistics.* *: $p < 0.05$ vs. the corresponding value for the non-phytate group.

DISCUSSION

Recently, phytate has demonstrated to have an important capacity to inhibit hydroxyapatite dissolution in *in vitro* studies and these results suggest that phytate may have a role in osteoporosis prevention although *in vivo* studies are necessary to further investigate this potential role for phytate. In this study, such effect is evaluated *in vivo*, using an animal model of postmenopausal osteoporosis. The standard rat diet is rich in maize and whole grains and contains large quantities of phytate (around 1% w/w). For this reason the phytate treatment group was fed a modified AIN-76A diet enriched by the addition of phytate (as calcium magnesium salt) to a concentration equivalent to the standard diet, giving maximum blood phytate levels (0.19 mg/L)⁽³³⁾. It has been found that phytate is present in the blood, urine, and interstitial and intracellular fluids of mammals, and the levels in urine, blood and rat tissues clearly depend on the dietary intake⁽³³⁻³⁵⁾.

This study clearly demonstrated that dietary phytate consumption had protective effects against bone loss due to estrogen deficiency. The results showed that the calcium and phosphorus content and the BMD of bones were significantly higher (between 3% and 9%) for the phytate-fed rats than for non-phytate fed rats, and urinary DPD (a biochemical marker of bone resorption) was also significantly increased in the non-phytate fed rats. These data are consistent with reports that phytate can inhibit hydroxyapatite dissolution in a concentration-dependent manner, similar to that seen for alendronate and to a greater extent than etidronate^(18,19). An important effect of phytate is as a crystallization inhibitor of calcium salts in urine^(15,16) and soft tissues⁽¹⁷⁾. Crystallization inhibitors bind to crystal nuclei or faces and disturb crystal development. The adsorption of such compounds on crystal faces can also hinder crystal dissolution. Bisphosphonates, a group of polyphosphates that may include phytate, have been

found to have a high affinity for hydroxyapatite, to prevent calcification *in vitro* and *in vivo*⁽⁹⁾, to prevent or disrupt hydroxyapatite crystal dissolution^(10,11), and to inhibit osteoclast-mediated bone resorption⁽¹²⁻¹⁴⁾.

In contrast to synthetic bisphosphonates, phytate is a natural product found in mammalian tissues and organs at levels dependent on dietary intake, but above a maximum intake level (20.9 mg/kg/day for Wistar rats)⁽³⁴⁾ no further increase in absorption occurs. When extrapolated to humans of 70 kg weight, the minimum phytate intake necessary to obtain maximum absorption is 1.463 g phytate/day, which corresponds to the phytate consumption typical in the so-called "Mediterranean diet" (1-2 g phytate/day). When phytate is eliminated from the diet, its levels in fluids and organs decrease notably^(33,35), and consequently regular consumption of phytate-rich foods is necessary to maintain elevated tissue values.

In conclusion, phytate is a natural product that occurs in significant quantities as a calcium magnesium salt in common foods including legumes, whole cereals and nuts, and has similar properties to bisphosphonates. In fact, phytate can be considered a natural bisphosphonate-like compound with analogous bone resorption properties. The possibility that phytate consumption may reduce bone mineral density loss suggests that this compound may be useful in the primary prevention of osteoporosis. Larger studies in humans will be necessary to assess this possibility.

ACKNOWLEDGMENTS

P.S. expresses her appreciation to the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport for an FPU program fellowship. This work was supported by the *Conselleria d'Innovació i Energia del Govern de les Illes Balears* (Grant PRDIB-2002GC1-04) and by the project grant CTO2006-05640/BOU from the Spanish Ministry of Science and Technology. We also express our gratitude to Bartolomé Mari Solivellas, Ester Collado and Margarita Franch (*Servicio de Medicina y Deporte, Consell Insular de Mallorca*) for their help in the bone mineral density measurements.

REFERENCES

1. National Institute of Health (2001) Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference. *South MJ* **94**, 569-573.
2. Dennison E, Cooper C (2000) Epidemiology of osteoporotic fractures. *Horm Res* **54**, 58-63.
3. Maggi S, Kelsey JL, Litvak J, Heyse SP (1991) Incidence of hip fractures in the elderly: a cross-national analysis. *Osteoporosis Int* **1**, 232-241.
4. Marcus R (1996) Clinical review 76. The nature of osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 1-5.
5. Eisman JA (1999) Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* **20**, 788-804.
6. Rizzoli R (2006) Osteoporosis: influence of life-style. In *Postmenopausal Osteoporosis: Hormones and Other Therapies*, pp. 71-76 [AR Genazzani, ed]. New York: Taylor and Francis Group.
7. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Dawson A, De Laet C, Jonsson B (2001) Ten year probabilities of osteoporotic fractures according to BMD and diagnostic thresholds. *Osteoporosis Int* **12**, 989-995.
8. Froes NDTC, Pereira ES, Negrelli WF (2002) Osteoporosis risk factors: prevention and detection through clinical and genetic monitoring. *Acta Ortop Bras* **10**, 52-56.
9. Fleisch HA, Russell RG, Bisaz S, Muhlbauer RC, Williams DA (1970) The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur J Clin Invest* **1**, 12-18.
10. Fleisch H, Russell RG, Francis MD (1969) Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science* **165**, 1262-1264.
11. Russell RG, Muhlbauer RC, Bisaz S, Williams DA, Fleisch H (1970) The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calcif Tissue Res* **6**, 183-196.
12. Fleisch H (1997) Bisphosphonates in Bone Disease: from the Laboratory to the Patient, 3rd Edition. New York: Parthenon Group.
13. Fleisch H (1998) Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* **19**, 80-100.
14. Fleisch HA (1997) Bisphosphonates: preclinical aspects and use in osteoporosis. *Ann Med* **29**, 55-62.
15. Grases F, Prieto RM, Simonet BM, March JG (2000) Phytate prevents tissue calcifications in female rats. *Biofactors* **11**, 171-177.
16. Grases F, Ramis M, Costa-Bauza A (2000) Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization: comparison with the action of other polyphosphates. *Urol Res* **28**, 136-140.
17. Grases F, Perello J, Prieto RM, Simonet BM, Torres JJ (2004) Dietary myo-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues: a pilot study in Wistar rats. *Life Sci* **75**, 11-19.
18. Gomes BC, Kaufman HW, Bloom JR, Navon J, Wilkens TJ, Rifkin RA (1984) Inhibitory effect of inositol phosphates on parathyroid hormone-induced bone resorption in organ cultures. *J Dent Res* **63**, 890-893.
19. Grases F, Sanchis P, Costa-Bauza A, Perello J. Phytate (myo-inositol hexakisphosphate) inhibits hydroxyapatite dissolution. Unpublished data.
20. Reddy NR (2002) Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. In *Food Phytates*, pp. 25-51 [NR Reddy, SK Sathe, editors]. Boca Raton: CRC Press.
21. Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK (1981) Phytates in legumes and cereals. *Adv Food Res* **28**, 1-92.
22. Mellanby E (1949) Rickets - producing and anticalcifying action of phytate. *J Physiol* **109**, 488-533.
23. Forbes RM, Weingartner KE, Parker HM, Bell RR, Erdman JW Jr (1979) Bioavailability to rats of zinc, magnesium and calcium in casein-, egg- and soy protein-containing diets. *J Nutr* **109**, 1652-1660.
24. Forbes RM, Parker HM, Erdman JW Jr (1984) Effects of dietary phytate, calcium and magnesium levels on zinc bioavailability to rats. *J Nutr* **114**, 1421-1425.
25. Allolio B (1996) Osteoporosis and nutrition. *Z Arztl Fortbild* **90**, 19-24.
26. Miller DD (1989) Calcium in the diet: food sources, recommended intakes, and nutritional bioavailability. *Adv Food Nutr Res* **33**, 103-156.
27. Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001) Dietary phytate and mineral bioavailability. *J Trace Elem Med* **15**, 221-228.
28. Grases F, Simonet BM, Perello J, Costa-Bauza A, Prieto RM (2004) Effect of phytate on element bioavailability in the second generation of rats. *J Trace Elem Med* **17**, 229-234.
29. Lau EM, Woo J (1998) Nutrition and osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* **10**, 368-372.
30. Walker AR, Fox FW, Irving JT (1948) Studies in human mineral metabolism: 1. The effect of bread rich in phytate phosphorus on the metabolism of certain mineral salts with special reference to calcium. *Biochem J* **42**, 452-462.
31. Cullumbine H, Basnayake V, Lemottee J, Wickramanayake TW (1950) Mineral metabolism on rice diets. *Br J Nutr* **4**, 101-111.

32. Deyhim F, Garica Kr, Lopez E, Gonzalez J, Ino S, Garcia M, Patil BS (2006) Citrus juice modulates bone strength in male senescent rat model of osteoporosis. *Nutrition* **22**, 559-563.
33. Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001) Phytate levels in diverse rat tissues: influence of dietary phytate. *Brit J Nutr* **86**, 225-231.
34. Grases F, Simonet BM, March JG, Prieto RM (2000) Inositol hexakisphosphate in urine: the relationship between oral intake and urinary excretion. *BJU Int* **85**, 138-142.
35. Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001) Variation of InsP4, InsP5 and InsP6 levels in tissues and biological fluids depending on dietary phytate. *J Nutr Biochem* **12**, 595-601.

Conclusiones



ARTÍCULO ORIGINAL 4.1. El fitato inhibe la disolución de hidroxiapatita

- La preincubación de cristales de hidroxiapatita con fitato, alendronato y etidronato a concentraciones de 1 y 3 μM provoca la adsorción de estas especies sobre la superficie de dichos cristales y ésta adsorción inhibe la disolución de hidroxiapatita.
- El efecto del fitato como inhibidor de la disolución de hidroxiapatita es similar a la que muestra el alendronato y mayor a la que exhibe el etidronato a las concentraciones estudiadas.
- Considerando los puntos anteriores, se concluye que el fitato, al igual que el alendronato y el etidronato, podría tener una aplicación en el tratamiento y prevención de las enfermedades óseas debidas a una excesiva resorción ósea (p.e., osteoporosis). No obstante, son necesarios estudios "in vivo" a fin de establecer y profundizar en este posible efecto del fitato.

ARTÍCULO ORIGINAL 4.2. Efecto del fitato sobre el hueso en ratas ovariectomizadas

- El mayor contenido en calcio y fósforo y la mayor densidad mineral ósea de los huesos estudiados para las ratas ovariectomizadas alimentadas con una dieta con fitato (AIN-76A + 1% de fitato en forma de sal cálcico-magnésica) con respecto a las ratas ovariectomizadas alimentadas con una dieta sin fitato (AIN-76A), indican que el fitato (administrado a través de la dieta) es capaz de disminuir la pérdida de masa ósea debida a una deficiencia en estrógenos en ratas.
- El menor contenido urinario de deoxipiridolina para las ratas ovariectomizadas alimentadas con una dieta con fitato en comparación con las ratas ovariectomizadas alimentadas con una dieta sin fitato, también indica que una ingesta adecuada de fitato es capaz de disminuir la pérdida de masa ósea debida a una deficiencia en estrógenos en ratas.
- Si se consideran los dos puntos anteriores y que el grupo tratado con fitato se alimentó con una dieta que proporciona unos niveles plasmáticos de fitato similares a los que se obtienen en humanos con la ingesta diaria de 1-2 g de fitato (cantidad que se corresponde a la ingerida en la denominada "dieta mediterránea"), se concluye que una ingesta adecuada de fitato podría tener una aplicación en la prevención y el tratamiento de la osteoporosis en humanos.

CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO 2. El ácido úrico como inductor de la litiasis oxalocálcica

1. Se ha desarrollado un método rápido, sencillo, sensible y selectivo por cromatografía líquida de alta resolución con detección por espectrometría de masas para la determinación de ácido úrico en orina, saliva y corazón de cálculos de oxalato cálcico.
2. La capacidad del ácido úrico para actuar como nucleante heterogéneo en los cálculos de oxalato cálcico monohidrato es muy notable y puede ser atribuida a que sus cristales presentan una estructura similar a los cristales de oxalato cálcico monohidrato. En las mismas condiciones, esta capacidad es superior a la que presentan la mucina (glicoproteína) o el detritus celular pero inferior a la que presenta el fluoruro cálcico.
3. La capacidad de los fragmentos de cálculos de ácido úrico para actuar como nucleantes heterogéneos en la litiasis renal oxalocálcica aumenta con la porosidad de los mismos. Los fragmentos de cálculos de ácido úrico dihidrato poroso son los que provocan un mayor crecimiento de cristales de oxalato cálcico monohidrato sobre su superficie, seguidos por los de ácido úrico dihidrato compacto, los de ácido úrico anhidro poroso y los de ácido úrico anhidro compacto, por este orden.
4. El fitato, el pirofosfato y el condroitín sulfato a concentraciones urinarias fisiológicas presentan un efecto inhibitor de alrededor del 50% en la formación y el crecimiento de cristales de oxalato cálcico monohidrato sobre cristales de ácido úrico, mientras que la mucina sólo presenta un ligero efecto inhibitor.
5. El ácido úrico puede estar implicado en el mecanismo de formación de los cálculos de oxalato cálcico monohidrato de cavidad cuyo corazón está constituido por oxalato cálcico monohidrato y materia orgánica (en los que el ácido úrico es indetectable por microscopía electrónica de barrido acoplada a microanálisis de energía dispersiva de rayos X), actuando como nucleante heterogéneo sobre el cual los cristales de oxalato cálcico monohidrato puedan formarse y desarrollarse. No obstante, el ácido úrico no participa en el mecanismo de formación de los cálculos de oxalato cálcico monohidrato papilares con el corazón constituido por oxalato cálcico monohidrato y materia orgánica, los cálculos de oxalato cálcico monohidrato papilares con el corazón constituido por hidroxiapatita, los cálculos de oxalato cálcico dihidrato con pequeñas cantidades de materia orgánica y los cálculos de oxalato cálcico dihidrato con pequeñas cantidades de materia orgánica e hidroxiapatita.

CAPÍTULO 3. Factores implicados en los mecanismos de formación de las calcificaciones cardiovasculares

6. El fitato presenta un efecto inhibitor en las calcificaciones de pericardio bovino fijado con glutaraldehído notablemente superior al que presentan el pirofosfato y el etidronato. El efecto inhibitor del fitato se aprecia a concentraciones de tan sólo 0.25 mg/L (0.39 μ M) y aumenta a medida que aumenta su concentración de 0.25 a 1 mg/L (0.39 a 1.54 μ M).
7. El fitato (por vía oral; dieta con un 1% de fitato en forma de sal cálcico-magnésica) disminuye y retarda la formación de depósitos calcificados en tejidos blandos lesionados en ratas.
8. La osteopontina no está involucrada en el inicio de la calcificación y su función en el proceso de calcificación podría estar relacionada con la regulación celular de la calcificación. Parece ser que la osteopontina es segregada por los macrófagos a fin de señalar la hidroxiapatita y posibilitar su identificación y posterior destrucción por parte del sistema inmunitario.
9. El fitato, al retardar y disminuir el desarrollo de depósitos calcificados en tejidos blandos, puede facilitar la reabsorción de los tejidos dañados por parte del sistema inmunitario.
10. El fitato (por vía tópica; 4 g/día de una crema con un 2% de fitato en forma de sal potásica) es capaz de inhibir las calcificaciones aórticas y cardíacas inducidas con vitamina D y nicotina en ratas.
11. El fitato (por vía subcutánea; 0.825 μ mol/kg-día en forma de sal sódica), es capaz de inhibir las calcificaciones aórticas inducidas con dosis elevadas de vitamina D en ratas. Sin embargo, el etidronato (por vía subcutánea; 0.825 μ mol/kg-día en forma de sal sódica) no es capaz de inhibir las calcificaciones aórticas inducidas con dosis elevadas de vitamina D en ratas.
12. El fitato (por vía oral; dieta con un 1% de fitato en forma de sal cálcico-magnésica) previene las calcificaciones aórticas ligadas al envejecimiento en ratas.
13. La disrupción gradual de las fibras elásticas de la túnica media con la edad puede tener un papel clave en la calcificación ligada al envejecimiento al proporcionar núcleos heterogéneos sobre los cuales, en ausencia o déficit de inhibidores de la cristalización, puedan formarse y desarrollarse cristales de fosfato cálcico.

CAPÍTULO 4. Inhibidores de la cristalización y osteoporosis

14. El fitato, alendronato y etidronato a concentraciones 1 y 3 μM son capaces de adsorberse sobre la superficie de los cristales de hidroxiapatita y provocar la inhibición de la disolución de la misma. El efecto del fitato como inhibidor de la disolución de hidroxiapatita es similar a la que muestra el alendronato y mayor a la que exhibe el etidronato.

15. El fitato (por vía oral; dieta con un 1% de fitato en forma de sal cálcico-magnésica) es capaz de prevenir la pérdida de masa ósea debida a una deficiencia en estrógenos en ratas ovariectomizadas, por lo que el fitato puede tener una aplicación en la prevención y el tratamiento de la osteoporosis.

