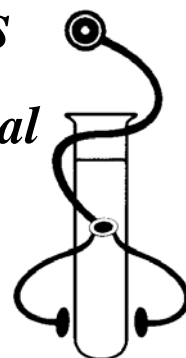




Universitat de les Illes Balears
Laboratori d'Investigació en Litiasi Renal

*Institut Universitari d'Investigació
en Ciències de la Salut*

Departament de Química



Fitato:

**estudios sobre su actividad biológica y
los efectos sobre la prevención de las
calcificaciones patológicas**

Tesis Doctoral

Joan Perelló Bestard
Diciembre, 2004

Director de la Tesis Doctoral,

Dr. Fèlix Grases Freixedas
Catedrático de Química Analítica
Universitat de les Illes Balears

Memoria presentada por
Joan Perelló Bestard,
Licenciado en Química,
Para aspirar al grado de Doctor

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

Certifica:

Que el presente trabajo de investigación, titulado **Fitato: estudios sobre su actividad biológica y los efectos sobre la prevención de las calcificaciones patológicas**, ha sido realizado bajo su dirección y constituye la Tesis Doctoral presentada por Joan Perelló Bestard.

Palma de Mallorca, diciembre de 2004

Dr. D. Fèlix Grases Freixedas

Als meus pares

Índice

Índice

Objetivos	1
Capítulo 1. Introducción general	5
Las cristalizaciones patológicas	7
Breve descripción histórica de los inhibidores. Capacidad inhibidora del fitato	9
Estudios <i>in vitro</i>	10
Estudios <i>in vivo</i>	10
Efecto hipocalciúrico del fitato	11
Absorción, distribución, excreción del fitato	11
Estudios con animales de experimentación	11
Estudios con humanos	11
Toxicidad del fitato	12
Fitato y biodisponibilidad mineral	12
Bibliografía	14
Capítulo 2. Nuevas metodologías analíticas desarrolladas	19
<i>Introducción</i>	21
Clasificación de las principales metodologías analíticas para la determinación de fitato	24
Métodos analíticos desarrollados	31
Bibliografía	32
<i>Resultados y discusión: artículo original I</i>	37
<i>Resultados y discusión: artículo original II</i>	43
<i>Resultados y discusión: artículo original III</i>	49
<i>Revisión crítica</i>	55
<i>Conclusiones</i>	65
Capítulo 3. Efectos del inositol hexakisfosfato (InsP_6) exógeno sobre los niveles de InsP_6 y de inositol trisfosfato (InsP_3) en células malignas, tejidos y fluidos biológicos	69
<i>Introducción</i>	71
Efecto antineoplásico del fitato	73
Efecto inhibidor de la cristalización del fitato	74
Efecto sobre la agregación de las plaquetas del fitato	76
Bibliografía	78
<i>Resultados y discusión: artículo original</i>	81
<i>Conclusiones</i>	95

Capítulo 4.	Absorción de fitato	99
	<i>Introducción</i>	101
	Absorción de sustancias administradas oralmente	103
	Absorción de sustancias administradas tópicamente	107
	Bibliografía	109
	<i>Resultados y discusión: artículo original I</i>	111
	<i>Resultados y discusión: artículo original II</i>	125
	<i>Conclusiones</i>	139
Capítulo 5.	Estudio a largo plazo de una dosis elevada de fitato y biodisponibilidad de elementos minerales	143
	<i>Introducción</i>	145
	Aspectos básicos de la fisiología del aparato digestivo	147
	Absorción	148
	Bibliografía	155
	<i>Resultados y discusión: artículo original</i>	157
	<i>Conclusiones</i>	165
Capítulo 6.	El myo-inositol hexafosfato dietético previene calcificaciones distróficas en tejidos blandos	169
	<i>Introducción</i>	171
	Estructura general de la piel	173
	El proceso de calcificación subcutánea	175
	Bibliografía	178
	<i>Resultados y discusión: artículo original I</i>	179
	<i>Resultados y discusión: artículo original II</i>	191
	<i>Conclusiones</i>	207
Capítol 7.	Estudio de los efectos del fitato potásico sobre la disminución del calcio urinario en ratas	211
	<i>Introducción</i>	213
	Homeostasis del calcio	215
	Hipercalciuria	219
	Bibliografía	224
	<i>Resultados y discusión: artículo original</i>	227
	<i>Conclusiones</i>	237

Objetivos

Objetivos

Los objetivos particulares de esta Tesis Doctoral se enmarcan dentro de los objetivos generales del Laboratorio de Investigación en Litiasis Renal de la UIB, en el sentido de considerar de forma integrada, aspectos de cristalización en disolución juntamente con aspectos bioquímicos, analíticos y relativos a la fisiología renal, con la finalidad de poder establecer, en definitiva, las bases moleculares de esta patología renal.

En particular, en esta Tesis Doctoral se pretende seguir profundizando en el estudio de la actividad biológica de una molécula que está demostrando unas inusitadas, y hasta hace poco desconocidas, propiedades como inhibidor del desarrollo de calcificaciones patológicas. Además, se pretenden desarrollar metodologías analíticas sensibles y sencillas para su determinación a niveles fisiológicos.

Capítulo 1

Introducción general

Introducción

El fitato es myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis(dihidrogenofosfato) y fue descubierto en el año 1872 por Pfeffer en semillas de vegetales. No obstante, no fue hasta 1914 cuando Anderson estableció la estructura correcta del fitato (*Erdman, 1979*) (Figura 1.1.).

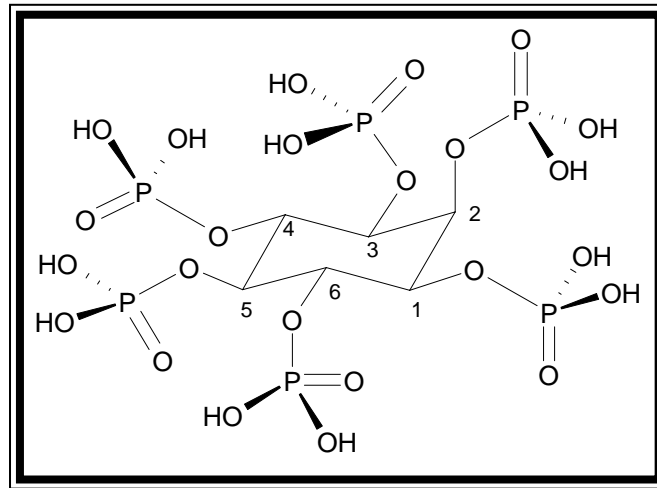


Figura 1.1.- Estructura del myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis(dihidrogenofosfato)

Las cristalizaciones patológicas

Cuando un sistema contiene un soluto en cantidad superior a la establecida por su valor de solubilidad, entonces decimos que el sistema está sobresaturado, situación que es inestable desde el punto de vista termodinámico. Entonces, es solamente una cuestión cinética que acabe formando un precipitado, aunque el tiempo que un sistema sobresaturado necesita para precipitar puede ir desde unos pocos segundos hasta años. Es precisamente este factor cinético el que hace que, en condiciones normales, no se produzcan cristalizaciones indiscriminadas dentro del organismo, a pesar de que todos los fluidos biológicos se hallan sobresaturados respecto a ciertas sustancias. En el caso de la orina, ésta siempre está sobresaturada respecto al oxalato cálcico, y según el pH, puede encontrarse sobresaturada respecto al ácido úrico ($\text{pH} < 5.5$) o con respecto a los fosfatos cálcicos ($\text{pH} > 6.0$). En lo referente al plasma sanguíneo, debido a su pH ($\text{pH} > 7$), concentración de calcio y concentración de fosfato, siempre está sobresaturado respecto al fosfato cálcico (hidroxiapatita).

A pesar de ello, los procesos normales de cristalización sólo tienen lugar en situaciones biológicamente controladas, tales como la formación del hueso y de los dientes. Sin embargo, las cristalizaciones patológicas descontroladas son frecuentes (calcificaciones de tejidos asociadas al cáncer, calcificaciones de ateromas, calcificaciones cardiovasculares difusas, formación de cálculos, ya sean renales, biliares o sublinguales, cristalización de sales de ácido úrico en enfermos de gota, podagra cálcica...). Entonces, con el fin de estructurar y explicar estos hechos, debemos considerar tres aspectos como responsables de las cristalizaciones patológicas:

- La sobresaturación: se trata de un factor termodinámico y cuanto mayor sea su valor más riesgo hay de que la sustancia en cuestión precipite.

- La presencia de nucleantes heterogéneos: se trata de un factor cinético. Son promotores de la cristalización y entre ellos hallamos sustancias como macromoléculas, restos celulares o lesiones epiteliales.

- Déficit de inhibidores: evidentemente se trata también de un factor cinético y son sustancias que dificultan el desarrollo de cristales. Pueden actuar tanto a nivel de nucleación como de crecimiento cristalino y actúan retardando la cristalización de la sustancia sobresaturada, evitando que la cristalización tenga lugar antes de la renovación del fluido correspondiente, ya que se ha de tener en cuenta que la vida implica un cambio y una renovación continuos.

Queda claro que cualquier cristalización patológica (ya sea una litiasis renal, sialolitiasis, calcificación subcutánea, gota, podagra cálcica...) es un proceso multifactorial y se han de considerar varios factores de riesgo. En el caso de la litiasis renal debemos considerar también la propia morfología del riñón:

- La existencia de cavidades de baja eficacia urodinámica puede provocar la retención de orina con materia orgánica o cristales que, en principio, se eliminarían como cristaluria asintomática y que por el hecho de quedar retenida en una cavidad donde el flujo está muy reducido puede acabar formando un cálculo.

- Alteraciones en el epitelio que recubre la papila renal, como la reducción de la capa antiadherente de glicosaminoglicanos, pueden favorecer el desarrollo de un cálculo unido a la papila (cálculo papilar).

Breve descripción histórica de los inhibidores. Capacidad inhibidora del fitato

Como ya se ha comentado, uno de los factores más importantes en el desarrollo de una cristalización patológica es la ausencia de inhibidores. Los primeros indicios de la existencia de este tipo de sustancias 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 & Bisaz, 1962; Fleisch & Bisaz, 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 (*Li et al., 1985; Ryall et al., 1981; Pak, 1987*) y otras de elevado peso molecular, como los glicosaminoglicanos, la glicoproteína de Tamm-Horsfall (*Crawford et al., 1968; Shum & Gohel, 1993; Hess, 1991; Hess, 1992*), la nefrocalcina (*Nakagawa et al., 1981; Nakagawa et al., 1984*) o la osteopontina (*Hoyer, 1995*). 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 et al., 1970*) o que se podía tratar de fosfocitrato (*Sallis et al., 1995*), pero no se encontraron evidencias definitivas. En la última década 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 & Williams, 1992; Grases et al., 1996*). En cualquier caso, no se debe confundir el efecto lubricante con la capacidad inhibidora que pueda tener una sustancia.

Recientemente, se ha demostrado que el fitato, una sustancia de peso molecular relativamente bajo, presente en la sangre, orina y fluidos intersticiales e intracelulares (*French et al., 1991; Bunce et al., 1993; Grases & Llobera, 1996; March et al., 1998*), presenta una capacidad inhibidora extraordinaria, siendo su efecto mil veces más importante que el del citrato (*Grases & March, 1989; Grases & Costa-Bauzá, 1991; Grases et al., 1994; Grases et al., 2000a*). Se ha demostrado que una ingesta reducida conduce a un mayor riesgo de litiasis.

Además, se han descrito otros efectos beneficiosos para esta molécula, siendo su potente capacidad inhibidora uno de los más importantes.

Con la finalidad de estudiar su acción se han llevado a cabo diversos trabajos *in vitro* e *in vivo*.

Estudios *in vitro*

La relevancia de los estudios *in vitro* está en relación con el grado de correspondencia entre las condiciones experimentales y las condiciones en un riñón en el proceso de desarrollo de un cálculo. Con el objetivo de obtener datos útiles, el modelo experimental utilizado debe reproducir alguna de las etapas del proceso biológico real.

Así, destaca un estudio en el cual se hace circular orina artificial sobre el urotelio de una vejiga urinaria de cerdo (*Grases et al., 1996*). Este estudio demuestra que sustancias que se hallan de forma natural en la orina pueden actuar como inhibidores de la cristalización, previniendo la formación de cristales de oxalato cálcico monohidrato. Después de eliminar la capa antiadherente de glicosaminoglicanos se observó como la presencia de fitato en la orina artificial, en una concentración de 1 mg/l prevenía totalmente la formación de depósitos de oxalato y/o fosfato cálcico.

Estudios *in vivo*

El simple hecho de que el fitato esté presente de forma natural en la orina a concentraciones similares a las usadas en los trabajos *in vitro* (*Grases & Llobera, 1996*) y que su concentración dependa de la ingesta a través de la dieta, ya permite intuir los posibles efectos terapéuticos que puede tener en el tratamiento de la litiasis cálcica.

Los efectos del fitato se estudiaron con ratas a las que se suministró etilenglicol como agente litiásico (*Grases et al., 1998*) y se vio como el fitato dietético disminuía las calcificaciones de la papila renal, así como la cantidad de calcio total del tejido de la papila renal.

También se ha demostrado que la ingesta de fitato incrementa notablemente la capacidad de la orina de los enfermos litiásicos para inhibir la cristalización de las sales cálcicas (oxalato y fosfato) (*Conte et al., 1999*).

Efecto hipocalciúrico del fitato

Además del efecto inhibitor se han descrito otros efectos beneficiosos del fitato, tales como el tratamiento de la hipercalciuria. Así, en 1958 Henneman trató enfermos litiásicos con dosis elevadas de fitato sódico (8.8 g/día) (*Henneman et al., 1958*). El principio hipocalciúrico del fitato se basa en la formación de complejos insolubles de calcio-fitato en el tracto digestivo, disminuyendo la absorción intestinal de calcio.

Absorción, distribución, excreción del fitato

Estudios con animales de experimentación

Estudios con ratas han demostrado que la presencia de fitato en tejidos y fluidos biológicos es función de la ingesta a través de la dieta. Se ha observado que existen unos niveles plasmáticos máximos y que se alcanzan tanto suministrando un 1 % de fitato en forma de sal sódica o un 0.12 % de fitato en forma de sal cálcico-magnésica (fitina) procedente del germen de garrofín (*Grases et al., 2001a*).

La eliminación del fitato de la dieta reduce los valores urinarios a niveles indetectables después de 22 días, mientras que el consumo de 20.9 mg de fitato por kg de peso corporal conducía a la eliminación a través de la orina de un 2 % de la cantidad ingerida. Aumentos de esta dosis no originan aumentos de la excreción urinaria (*Grases et al., 2000b*).

La distribución del fitato en tejidos y fluidos biológicos indica que la concentración urinaria es unas diez veces mayor a la concentración plasmática de fitato, mientras que en tejidos destaca la gran cantidad de fitato hallada en el cerebro. La eliminación del fitato de la dieta, conduce a una disminución drástica de todos sus niveles biológicos (*Grases et al., 2001b*).

Estudios con humanos

Se ha demostrado recientemente la presencia de manera natural del fitato en la orina humana, en concentraciones que oscilan entre los 0.5 y 6 mg/l, siendo las concentraciones encontradas en litiásicos de oxalato cálcico significativamente menores a las encontradas en el grupo de individuos sanos (*Grases & Llobera, 1996; Grases et al., 1998*).

En humanos, la eliminación total del fitato de la dieta produce una reducción de los niveles urinarios del 50 % después de 36 horas (*Grases et al., 2000c*), mientras que una dieta pobre en fitato mantenida durante dos semanas conduce a una disminución del fitato urinario del 90 % y una disminución del fitato plasmático del 74 % (*Grases et al., 2001c*).

Estos hechos revelan que los niveles biológicos de fitato dependen de la dieta y que el organismo no puede sintetizar de manera endógena el fitato a partir de inositol para mantener unos niveles normales.

El suministro de 1.4 g de fitato a individuos que habían seguido durante dos semanas una dieta pobre en fitato conduce a una rápida absorción, encontrándose el máximo de absorción a las cuatro horas de su ingesta (*Grases et al., 2001c*). Además, el hecho de suministrar diferentes dosis o sales no afecta a su excreción urinaria, confirmando los estudios con animales de experimentación donde se encontró que existe una cantidad ingerida óptima por encima de la cual no se absorbe más fitato.

También se encontró que existe una buena correlación entre los niveles plasmáticos de fitato y su excreción urinaria diez horas antes de la recogida de la muestra sanguínea, demostrando que la concentración de fitato en orina es un buen marcador del estatus de fitato del organismo (*Grases et al., 2001c*).

Toxicidad del fitato

Estudios de toxicidad aguda del 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 et al., 1987; Ichikawa et al., 1987*).

Fitato y biodisponibilidad mineral

Son muchos los estudios que han aparecido atribuyendo propiedades de antinutriente al fitato (*Davies, 1979; Forbes, 1979; Forbes, 1984; Hurrell, 1992; Manary, 2000; Pallauf, 1999*), basándose en que se trata de una molécula con seis grupos fosfato y, por lo tanto, se halla altamente cargada y presenta gran afinidad por cationes divalentes y trivalentes, con los cuales

puede formar especies no solubles dentro del tracto gastrointestinal, evitando así su absorción y reduciendo por lo tanto la biodisponibilidad de estos elementos.

Por otra parte y en contraposición con estos trabajos han aparecido otros estudios donde se pone en duda esta acción antinutriente del fitato (*Davidsson, 1997; Graf, 1984; Grases, 2001a; Sandstrom, 2000; Siqueira, 2001*). Además, como ya se ha descrito en esta introducción, son muchos los efectos beneficiosos que aportan cantidades adecuadas de fitato en tejidos y fluidos biológicos.

Una primera explicación a esta aparente discrepancia entre propiedades saludables y antinutrientes es la dificultad analítica derivada de una molécula como el fitato, para la que hasta hace poco no han sido descritos métodos analíticos de determinación a bajas concentraciones, como las que se encuentran en tejidos y fluidos biológicos; este aspecto es muy remarcable si consideramos que el conocimiento de todas las propiedades beneficiosas del fitato es paralelo a la aparición de metodologías analíticas adecuadas para su determinación en estos medios.

Un estudio llevado a cabo con ratas sometidas a diferentes dietas (en presencia y ausencia de fitato) demuestra que las concentraciones de minerales en tejidos y fluidos biológicos no difieren estadísticamente en el grupo tratado con un 1 % de fitato y en el grupo control (*Grases et al., 2001a*). El hecho de encontrar trabajos que afirman lo contrario puede ser atribuido a la dosis de sal utilizada y a la naturaleza y cantidad de otros componentes de la dieta. Así, los estudios realizados con dietas equilibradas y cantidades moderadas de fitato no han encontrado ningún efecto negativo para esta sustancia, mientras que los estudios que usan dosis elevadas de fitato, combinadas con dietas desequilibradas, tales como dietas a base de soja, detectan un déficit en la absorción mineral.

Como conclusión final a esta recopilación de datos que recogen aspectos beneficiosos del fitato y supuestos efectos perjudiciales (a dosis elevadas combinadas con dietas desequilibradas) podemos definir el fitato como la vitamina anticálculo, ya que es una sustancia que el organismo no es capaz de sintetizar en cantidades suficientes y que en dosis adecuadas actúa como potente inhibidor de la cristalización, además de ser un regulador de la calciuria, mientras que en dosis desproporcionadas tomadas juntamente con dietas desequilibradas, puede conducir a un déficit de la absorción mineral y por tanto a desequilibrar la biodisponibilidad de los oligoelementos.

Bibliografía

Barker LM, McPhillips JJ, Lawrence GD, Doty SB, Pallante SL, Bills CE, Scott WW, Howard JE (1970) Studies on mechanisms of calcification. I. Properties of urinary derivatives which inhibits cartilage calcification. II. Electron microscopic observations of the effect of inhibitors in crystal formation. *Johns Hopkins Med* **127**, 2-22.

Bliznakov G (1965) Sur le mecanisme de l'action des additifs adsorbants dans la croissance cristalline. *En: Adsorption et Croissance Cristalline* (Centre National de la Recherche Scientifique Ed.), Paris, 291-301

Bunce CM, French PJ, Allen P, Mountford JC, Moor B, Greaves MF, Michel RH, Brown G (1993) Comparison of the levels of inositol metabolites in transformed haemopoietic cells and their normal counterparts. *Biochem J* **289**, 667-673.

Conte A, Pizá P, Garcia-Raja A, Grases F, Costa-Bauzá A, Prieto RM (1999) Test of urinary lithogen risk: usefulness in the evaluation of renal lithiasis treatment using crystallization inhibitors (citrate and phytate). *Arch Esp Urol* **52**, 305-310.

Crawford JE, Crematy EP, Alexander AE (1968) The effect of natural and synthetic polyelectrolytes on the crystallization of urinary calcium oxalate. *Aust J Chem* **21**, 1067-1072.

Davidsson L, Galan P, Cherouvrier F, Kastenmayer P, Juillerat MA, Hercberg S, Hurrell RF (1997). Bioavailability in infants of iron from infant cereals: effect of dephytinization. *Am J Clin Nutr* **65**, 916-920.

Erdman LW (1979) Oilseed phytate: nutritional implications. *J Am Oil Chem Soc* **56**, 736-741.

Fleisch H, Bisaz S (1962) Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am J Physiol* **203**, 671-675.

Fleisch H, Bisaz S (1964) The inhibitory effect of pyrophosphate on calcium oxalate precipitation and its relation to urolithiasis. *Experiencia* **20**, 276-280.

French PJ, Bunce CM, Stephens LR, Lord JM, McConnell FM, Brown G, Creba JA, Michell RH (1991) 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* **245**, 193-201.

Fujitani T, Yoneyama M, Kabashima J, Hosokawa N, Ichikawa H (1987) Acute toxicity of phytic acid and sodium phytate in mice. *Kenkyu Nenpo-Tokio-toristu Eisei Kenkyusho* **38**, 368-370.

Graf E, Eaton JW (1984). Effects of phytate on mineral bioavailability in mice. *J Nutr* **114**, 1192-1198.

Grases F, March P (1989) A study about some phosphate derivatives as inhibitors of calcium oxalate crystal growth. *J Crystal Growth* **96**, 993-995.

Grases F, Costa-Bauzá A (1991) Potentiometric study of the nucleation of calcium oxalate in presence of several additives. *Clin Chem Enzym Comms* **3**, 319-328.

Grases F, Krooupa M, Costa-Bauzá A (1994) Studies on calcium oxalate monohydrate crystallization. Influence of inhibitors. *Urol Res* **22**, 39-43.

Grases F, Garcia-Ferragut L, Costa-Bauzá A (1996) Study of the early stages of renal stone formation: experimental model using urothelium of pig urinary bladder. *Urol Res* **24**, 305-311.

Grases F, Llobera A (1996) Determination of phytic acid in urine by ICP Atomic Emission Spectrometry. *Anal Letts* **29**, 1193-1199.

Grases F, Garcia-Gonzalez R, Torres JJ, Llobera A (1998) The effects of phytic acid-Zn(II) mixtures on renal stone formation in rats. *Scand J Urol Nephrol* **31**, 261-265.

Grases F, Ramis M, Costa-Bauzá A (2000a) Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Comparison with the action of other polyphosphates. *Urol Res* **28**, 136-140.

Grases F, Simonet BM, March JG, Prieto RM (2000b). Inositol hexakisphosphate in urine: the relationship between oral intake and urinary excretion. *BJU Int* **85**, 138-142.

Grases F, March JG, Prieto RM, Simonet BM, Costa-Bauzá A, García-Raja A, Conte A (2000c) Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people. Dietary effects on phytate excretion. *Scand J Urol Nephrol* **34**, 162-164.

Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001a) Dietary phytate and mineral bioavailability. *J Trace Elem Med Biol* **15**, 221-228.

Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001b) Phytate levels in diverse rat tissues: influence of dietary phytate. *Brit J Nutr* **86**, 1-8.

Grases F, Simonet BM, Vucenik I, Prieto RM, Costa-Bauzá A, March JG, Shamsuddin AM (2001c) Absorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP6 or phytate) in humans. *BioFactors* **15**, 53-61.

Henneman PH, Benedict PH, Forbes AP, Dudley HR (1958) Idiopathic hypercalciuria. *N Eng J Med* **17**, 802-807.

Hess B (1991) The role of Tamm-Horsfall glycoprotein and nephrocalcin in calcium oxalate monohydrate crystallization processes. *Scanning Microsc* **5**, 689-696.

Hess B (1992) Tamm-Horsfall glycoprotein-inhibitor or promoter of calcium oxalate monohydrate crystallization processes? *Urol Res* **20**, 83-86.

Hoyer JR (1995) Uropontin in urinary calcium stone formation. *Miner Electrolyte Metab* **20**, 385-392.

Ichikawa H, Ohishi S, Takahashi H, Yuzawa K, Hosokawa N, Hashimoto T (1987) Acute oral toxicities of phytic acid and sodium phytate in rats. *Kenkyu Nenpo-Tokio-toristu Eisei Kenkyusho* **38**, 371-376.

Li MK, Blacklock NJ, Garside J (1985) Effects of magnesium on calcium oxalate crystallization. *J Urol* **133**, 123-125.

March JG, Simonet BM, Grases F, Salvador A (1998) Indirect determination of phytic acid in urine. *Anal Chim Acta* **367**, 36-38.

Nagakawa Y, Margolis HC, Yokoyama S, Kezdy FJ, Kaiser ET, Coe FL (1981) Purification and characterization of a calcium oxalate crystal growth inhibitor from rat kidney tissue culture medium. *J Biol Chem* **256**, 3936-3944.

Nagakawa Y, Abram V, Coe FL (1984) Isolation of calcium oxalate crystal growth inhibitor from rat kidney and urine. *Am J Physiol* **247**, F765-F772.

Pak CYC (1987) Citrate and renal calculi. *Miner Electrolyte Metal* **13**, 257-266.

Ryall RL, Harnett RM, Marshal VR (1981) The effect of urine, pyrophosphate, citrate, magnesium and glycosaminoglycans on the growth and aggregation of calcium oxalate crystals *in vitro*. *Clin Chim Acta* **112**, 349-356.

Ryall RL (1997) Urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and their potencial role in stone formation. *World J Urol* **15**, 155-164.

Sallis JD, Parry NFG, Meehan JD, Kamperman H, Anderson ME (1995) Controlling influence of phosphocitrate *in vitro* and *in vivo* on calcium oxalate crystal formation and growth. *Scanning Microsc* **9**, 127-136.

Sandstrom B, Bugel S, McGaw BA, Price J, Reid MD (2000). A high oat-bran intake does not impair zinc absorption in humans when added to a low-fiber animal protein-based diet. *J Nutr* **130**, 594-599.

See WA, Williams RD (1992) Urothelial injury and clotting cascade activation: common denominators in particulate adherence to urothelial surfaces. *J Urol* **147**, 541-548.

Shum DK, Dohel MD (1993) Separate effects of urinary chondroitin sulphate and heparan sulphate upon the crystallization of urinary calcium oxalate: differences between stone formers and normal controls. *Clin Sci* **85**, 33-39.

Siqueira EM, Arruda SF, de Sousa LM, de Souza EM (2001). Phytate from an alternative dietary supplement has no effect on the calcium, iron and zinc status in undernourished rats. *Arch Latinoam Nutr* **51**, 250-257.

Capítulo 2

Nuevas metodologías analíticas desarrolladas

Introducción

Introducción

El conocimiento de la actividad biológica del fitato aparece de forma paralela al desarrollo de metodologías analíticas de suficiente sensibilidad para su determinación cuantitativa en fluidos y tejidos.

Hasta hace poco, se pensaba que se trataba de un compuesto con propiedades antinutrientes debido a su capacidad para formar complejos insolubles con cationes divalentes y trivalentes a nivel intestinal, evitando así la absorción de oligoelementos (*Davies & Olpin, 1979; Forbes et al., 1979; Forbes et al., 1984; Hurrell et al., 1992; Manary et al., 2000; Pallauf et al., 1999*). Sin embargo, la capacidad para determinar el fitato a niveles fisiológicos (*Grases & Llobera, 1996; March et al., 1998a; March et al., 2001*) ha permitido profundizar en el estudio de la verdadera actividad biológica de dicha sustancia, de tal manera que ha pasado de ser considerada una sustancia no deseada a un producto con importantes beneficios para la salud, cuando se consume en cantidades adecuadas (*Hawkins et al., 1993; Shamsuddin et al., 1997; Reddy, 1999; Grases & March, 1989a; Grases & Costa-Bauzá, 1991; Grases et al., 1994*).

Son muchos los métodos que se encuentran en la bibliografía para la determinación de fitato, pero la inmensa mayoría de ellos carecen de la sensibilidad suficiente para permitir el desarrollo de estudios sobre su actividad biológica y sus implicaciones en el campo de la salud. Se trata, generalmente, de metodologías que centran su aplicación en el terreno de muestras alimentarias y preparados farmacéuticos, donde el fitato se halla en porcentajes muy elevados si los comparamos con los que se encuentran en muestras biológicas (fluidos y tejidos).

El mayor inconveniente encontrado al intentar proponer nuevas metodologías de determinación del fitato es la imposibilidad de determinarlo con técnicas espectrofotométricas, debido a la ausencia de importantes bandas de absorción. No hay ninguna duda, además, de que esta dificultad analítica es el motivo principal por el que poco o nada se sabía de la importante actividad biológica de esta molécula hasta hace relativamente pocos años. Debido a este motivo, se han desarrollado diversas metodologías basadas en determinaciones indirectas de productos derivados del fitato o bien en el uso de reacciones paralelas.

Clasificación de las principales metodologías analíticas para la determinación de fitato

A continuación se clasifican y comentan los métodos de mayor relevancia que aparecen en la bibliografía para la determinación del fitato. Se realiza una clasificación en cinco grupos:

- ❑ Métodos basados en el uso de la cromatografía líquida de alta resolución
- ❑ Métodos basados en la hidrólisis del fitato
- ❑ Métodos basados en la determinación de fósforo total
- ❑ Métodos basados en el uso de reacciones paralelas
- ❑ Otras metodologías

Métodos basados en el uso de la cromatografía líquida de alta resolución

Todos ellos utilizan una columna de fase reversa o bien de intercambio aniónico; se diferencian en el tipo de detección utilizada.

1) Detector de índice de refracción.

Son múltiples los métodos descritos aunque el denominador común es el uso de una columna de fase reversa y un detector de índice de refracción, diferenciándose solamente en la composición de las fases móvil y estacionaria, y en las condiciones instrumentales de operación.

El primer trabajo lo encontramos en 1980 (*Tangendjaja et al., 1980*). En él se describe una metodología sencilla donde se usa una columna C₁₈ de fase reversa como fase estacionaria y acetato sódico 5 mM como fase móvil. El límite de detección de este método es del orden de 1 g/l.

En 1986 se describe otro método (*Sandberg & Adherinne, 1986*), mejorado nueve años después (*Matthaeus et al., 1995*), en el cual la fase estacionaria es una columna de fase reversa C₈ y la fase móvil metanol-agua (1:1). El límite de detección se sitúa sobre los 0.3 mg/g.

Se han descrito otros métodos similares (*Segueilha et al., 1993; Lerfeld, 1994; Graf & Dintzis, 1982; Knuckles, 1982*) pero todos ellos presentan límites de detección muy elevados.

II) Detector fotométrico

Como ya se ha comentado anteriormente, las pobres características espectrales del fitato obligan a llevar a cabo una reacción post-columna para su determinación espectrofotométrica, pues la determinación directa resulta totalmente inespecífica y carente de sensibilidad. Una reacción usada se basa en la destrucción de un complejo Fe³⁺- ácido sulfanílico y como señal analítica se utiliza la disminución de la absorción de dicho complejo coloreado (*Cilliers & Niekessk, 1986; Rounds & Nielsen, 1993; Thies, 1991*). Otros autores (*Phillippy & Johnston, 1985*) han determinado el fitato midiendo su efecto en el ultravioleta sobre una disolución de nitrato férrico en medio perclórico.

III) Detector conductimétrico

Destacan los trabajos llevados a cabo recientemente por Talamond, quien describe metodologías sencillas y muy sensibles para la determinación de fitato en alimentos (*Talamond et al., 1998; Talamond et al., 2000*). El fitato se extrae de los alimentos en medio clorhídrico concentrado y se inyecta a un cromatógrafo de líquidos. La fase estacionaria es una columna de intercambio aniónico, mientras que para la separación se lleva a cabo una elución en gradiente usando proporciones variables de NaOH 200 mM / H₂O / isopropanol. Antes de la detección conductimétrica el eluyente se hace circular a través de un supresor iónico que se regenera continuamente con ácido sulfúrico 50 mM. El límite de detección es inferior a 0.1 µg/l, mientras que el límite de cuantificación se sitúa sobre los 0.1 mg/l.

Métodos basados en la hidrólisis del fitato

La hidrólisis del fitato permite dos posibilidades para su determinación analítica, ya que es posible determinar cualquiera de sus productos de hidrólisis (el fosfato y el myo-inositol).

La hidrólisis presenta además una cierta versatilidad ya que puede efectuarse de varias maneras alternativas. Puede llevarse a cabo térmicamente (usando una resistencia eléctrica o radiación microondas como fuentes de calor) y enzimáticamente.

1) Hidrólisis térmica

La hidrólisis térmica puede llevarse a cabo tanto en medio ácido como en medio básico. No obstante, los rendimientos de la reacción son mayores en medio ácido, motivo por el cual esta hidrólisis es la única que se utiliza en el desarrollo de métodos analíticos.

Pueden usarse dos fuentes de calor para llevar a cabo la hidrólisis:

- ❑ Calor disipado por una resistencia eléctrica: el calor se transmite a la muestra por conducción y/o convección. Las condiciones experimentales para este tipo de hidrólisis requieren el tratamiento de la muestra durante 24 horas a 120 °C y en medio ácido fuerte 2 M (*De Koning, 1994*).
- ❑ Calor creado por irradiación con microondas: la energía es absorbida por la muestra y posteriormente disipada provocando el calentamiento de la muestra. Este proceso es mucho más eficaz que el uso de resistencias eléctricas por lo que el tiempo requerido para llevar a cabo la hidrólisis es menor y las condiciones menos drásticas. Se requieren 6 tratamientos de 2 minutos en medio HCl 0.45 M a una potencia de 650 W (*March et al., 1998b*). Estas hidrólisis se realizan en el interior de reactores de teflon (PTFE, politetrafluoretileno) ya que se trata de un plástico resistente (tanto a las condiciones ácidas como de presión y temperatura) y permeable a la radiación de microondas.

II) Hidrólisis enzimática

Recientemente (*March et al., 1995*) se ha descrito un método enzimático-espectrofotométrico para la determinación de fitato a través del fosfato donde, después de una purificación, se hidroliza el fitato usando una *fitasa*, aislada de *Aspergillus ficuum*. Las fitasas son unos enzimas (fosfatasas) capaces de hidrolizar los ésteres de fosfato de los inositoles fosfato. Las condiciones en las que se lleva a cabo esta reacción son 37 °C y pH = 2.5. De este modo, 1 hora es suficiente para un rendimiento del orden del 100 % de la reacción de hidrólisis.

Parece claro que se trata de una buena alternativa a la hidrólisis térmica, pues los tiempos de reacción son mucho menores. Sin embargo, debemos tener en cuenta que un enzima no es más que una proteína con actividad catalítica. Se requiere que las condiciones de trabajo estén perfectamente controladas para asegurar la actividad máxima del enzima. Además, los enzimas disminuyen (incluso pierden) su actividad catalítica en presencia de ciertos metales y debido a ciertas interacciones que todavía no están bien caracterizadas.

Una vez realizada la hidrólisis del fitato se puede determinar tanto el fosfato como el myo-inositol.

A) Determinación del fosfato

El primer método que se encuentra descrito fue propuesto por Harland y Oberleas (*Harland & Oberleas, 1977*). El fitato se concentra en una resina de intercambio aniónico y después de hidrolizarlo (térmicamente) se determinan los fosfatos mediante una reacción colorimétrica.

Posteriormente, aparece el primer método enzimático (*March et al., 1995*) en el cual se hidroliza el fitato mediante la fitasa de *Aspergillus ficuum* y se determinan fotométricamente los fosfatos mediante la reacción del azul de heteropoliácido. Un método similar usando la hidrólisis térmica por microondas (*March et al., 1998b*) se describe unos años más tarde. Ambos métodos se han aplicado para la determinación de fitato en preparados farmacéuticos. Ese mismo año, aparece una mejora de este método (*March et al., 1998a*) para la determinación de fitato en orina. Se incluye una extracción líquido-líquido (por formación de un par iónico) para mejorar la sensibilidad de la determinación.

B) Determinación del myo-inositol

Los métodos que hay actualmente en la bibliografía determinan el inositol, procedente de la hidrólisis del fitato, por cromatografía de gases con detección de masas, obteniéndose así una detección sensible y selectiva. En cualquier caso, el myo-inositol debe derivatizarse para poder separarlo por cromatografía de gases, con la finalidad de disminuir su polaridad y convertirlo en un compuesto más volátil. Se han propuesto varios reactivos de derivatización, como el clorotrimetilsilano (*De Koning, 1994; Jansen et al., 1986*), heptafluorobutirilimidazol (*Kennington et al., 1990*) y anhídrido trifluoracético (*Haga & Nakajima, 1989*).

Recientemente, como combinación de todos estos trabajos ha surgido un método para la determinación de fitato en muestras biológicas (*March et al., 2001*) mediante cromatografía de gases y detección de masas. El fitato se separa en una columna de intercambio aniónico y posteriormente se hidroliza enzimáticamente. A continuación se liofiliza la muestra (pues el disolvente para la reacción de derivatización es piridina y no debe contener agua) y se inyecta al cromatógrafo de gases. Se trata de una de las metodologías más sensibles que se han descrito para la cuantificación de fitato en muestras biológicas pero, evidentemente, el gran número de pasos implicados en la determinación lo convierten en un método complejo e inaplicable en el análisis rutinario de un laboratorio clínico.

Métodos basados en la determinación de fósforo total

En 1991 se describe una metodología (*Plaami & Kumpulainen, 1991*) para la determinación de fitato en cereales. En primer lugar, el fitato se separa y concentra en una resina de intercambio aniónico, mejorándose de esta forma la selectividad y la sensibilidad. Después de eluirlo, se determina el fósforo total por espectrofotometría de emisión atómica en plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) y se refiere el resultado a fitato. Con este método, las dificultades que se encontraban con las metodologías tradicionales al realizar la digestión ácida y la determinación espectrofotométrica de fósforo se eliminan al usar el ICP-AES.

Usando un proceso similar, se puede llevar a cabo la determinación de fitato en orina, aislandolo y concentrándolo en una resina de intercambio aniónico (*Grases & Llobera, 1996*). El fitato se eluye con ácido concentrado y este eluato se concentra en un evaporador rotatorio. Una posterior determinación del fósforo total permite cuantificar el fitato. Se trata de un progreso importante en la determinación de fitato en muestras biológicas, pues es un método relativamente simple y rápido que no requiere grandes tratamientos de la muestra. Se evita tener

que realizar procesos de hidrólisis aunque la falta de sensibilidad obliga a llevar a cabo una etapa de concentración por evaporación. Sin embargo, esta metodología presenta el inconveniente de que se requieren 500 ml de muestra de orina para llevar a cabo la determinación, cantidad que resulta ser algo excesiva.

Métodos basados en el uso de reacciones paralelas

Se trata de métodos muy útiles para la determinación de fitato en muestras donde éste está muy concentrado, pues su sensibilidad es limitada; sin embargo, el hecho de ser métodos simples y rápidos los hace apropiados para la determinación de fitato en alimentos.

El primer método que encontramos se remonta a 1980 y es el precursor de los posteriores métodos de HPLC con detección fotométrica utilizando una reacción post-columna. La determinación de fitato (*Latta & Eskin, 1980*) se lleva a cabo por medida de la disminución de la absorbancia a 500 nm del complejo Fe^{3+} -ácido sulfanílico (reactivo de Wade: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 0.03 % y ácido sulfanílico al 0.3 %) al añadirse el fitato previamente purificado en una resina de intercambio aniónico.

Años después, otros autores utilizaron la misma reacción para la determinación de fitato usando determinaciones volumétricas (con el ácido sulfanílico como indicador) y otras complexometrías similares (*García-Villanova et al., 1982; Ruiz de Lope et al., 1982a; Ruiz de Lope et al., 1982b; Ruiz de Lope et al., 1983*).

Existen otros métodos casi siempre basados en la destrucción de algún complejo de Fe^{3+} (*Haug & Lantzsch, 1983; Fujita et al., 1986*) aunque recientemente se ha descrito un nuevo procedimiento (*Kamaya et al., 1995*) donde el fitato se determina por destrucción de un complejo de zinc con cloranilato.

Otras metodologías

Además de todas las técnicas descritas hasta el momento, que son sin duda más comunes, se han descrito otras alternativas para la determinación de fitato.

El fitato es un potente inhibidor del crecimiento cristalino del oxalato cálcico. Esta propiedad se ha utilizado para su determinación (*Grases & March, 1989b*). Se siguieron cinéticas de crecimiento cristalino de oxalato cálcico monohidrato mediante potenciometría, utilizando un electrodo selectivo de calcio. El efecto inhibidor causado por el fitato permite su cuantificación en el intervalo 30-600 µg/l. Este procedimiento se ha aplicado a la determinación directa de fitato en orina y en un producto farmacéutico.

También se han empleado las técnicas de análisis en flujo para la determinación de fitato (*Kamaya et al., 1998*). Concretamente, se trata de un método FIA (análisis por inyección en flujo) que se basa en una modificación del método del azul de heteropoliácido. La interferencia del fosfato se elimina mediante resinas de intercambio aniónico. A pesar de ser un método sencillo y que permite un muestreo elevado (60 muestras por hora) presenta la misma desventaja que la mayoría de métodos: su elevado límite de detección no permite la cuantificación de fitato en muestras biológicas.

También se ha intentado determinar el fitato por resonancia magnética nuclear (*O'Neill et al., 1980*) a través del ^{31}P , pero el método resulta ser nuevamente poco sensible.

Finalmente, otra técnica usada para la determinación de fitato es la electroforesis capilar (*Nardi et al., 1992; Blatny et al., 1995*). Existe una metodología reciente (*Simonet et al., 2003*) con detección fotométrica indirecta. Se utiliza un sistema por inyección en flujo, el cual incluye una microcolumna con resina de intercambio aniónico, usado para la extracción del fitato. El sistema por inyección en flujo está acoplado automáticamente al equipo de electroforesis capilar a través de una interfase mecánica. No obstante, su sensibilidad solamente le permite la cuantificación del fitato presente en muestras de alimentos.

Métodos analíticos desarrollados

En este capítulo se describe una metodología para la determinación de myo-inositol en orina y saliva y dos nuevas metodologías para la determinación de fitato en orina.

- Determinación de myo-inositol por HPLC-MS (cromatografía líquida de alta resolución y detección de masas): el myo-inositol es una molécula importante pues se trata de un intermedio clave en el ciclo del fosfatidilinositol. Además, su forma totalmente fosforilada (el fitato) presenta numerosos efectos beneficiosos ya descritos en esta tesis. Los métodos de determinación actuales se basan en el uso de enzimas o bien en el uso de cromatografía de gases, por lo que se requiere una derivatización previa con el objetivo de aumentar su volatilidad. El procedimiento que se propone utiliza HPLC-MS como técnica, por lo que no requiere derivatización y simplifica notablemente su determinación analítica.

- Determinación de fitato por HPLC-MS (cromatografía líquida de alta resolución y detección de masas): se trata de un método basado en el anterior, donde el fitato se purifica empleando una resina de intercambio aniónico y después se hidroliza térmicamente. El myo-inositol resultante se determina usando el procedimiento que se describe en el trabajo anterior.

- Determinación de fitato por ICP-AES (espectrometría de emisión atómica usando un plasma acoplado inductivamente): se trata de una mejora de un método similar (*Grases & Llobera, 1996*). Se consigue una metodología simple y sensible, donde la cuantificación del fitato en orina es posible usando un volumen de muestra muy reducido (5 ml) frente a los 500 ml que requería el método anterior.

Bibliografía

Blatny P, Kvasnicka F, Kenndler E (1995) Determination of phytic acid in cereal grains, legumes and feeds by capillary isotachopheresis. *J Agric Food Chem* **43**, 129-133.

Cilliers JLL, Nieskesk PJ (1986) HPLC determination of phytic acid in food by postcolumn colorimetric detection. *J Agric Food Chem* **34**, 680-683.

Davies NT, Olpin, SE (1979) Studies on the phytate: zinc molar contents in diet as a determinant of Zn availability to young rats. *Br J Nutr* **41**, 590-603.

De Koning AJ (1994) Determination of myo-inositol and phytic acid by gas chromatography using scyllitol as internal standard. *Analyst* **119**, 1319-1323.

Forbes RM, Weingartner KE, Parker HM, Bell RR, Erdman JW (1979) Bioavailability to rats of zinc, magnesium and calcium in casein-, egg-, and soy protein-containing diets. *J Nutr* **109**, 1652-1660.

Forbes RM, Parker HM, Erdman JW (1984). Effects of dietary phytate, calcium and magnesium levels on zinc bioavailability to rats. *J Nutr* **114**, 4121-1425.

Fujita Y, Mori I, Fujita K, Tanaka T, Koshigama Y, Kawabe H (1986). Application of xanthene derivatives for analytical chemistry. Part L V. Application of o-hydroxyhydroquinonephthalin-iron(III) complex to determination of organic compounds containing phosphorus. *Chem Pharm Bull* **34**, 2236-2238.

García-Villanova R, García-Villanova RJ, Ruiz de Lope, C (1982) Determination of phytic acid by complexometric titration of excess of iron (III). *Analyst* **107**, 1503-1506.

Graf E, Dintzis FR (1982) High-performance liquid chromatographic method for the determination of phytate. *Anal Biochem* **119**, 413-417.

Grases F, March P (1989a) A study about some phosphate derivatives as inhibitors of calcium oxalate crystal growth. *J Crystal Growth* **96**, 993-995.

Grases F, March JG (1989b) Determination of phytic acid based on inhibition of crystalline growth of calcium oxalate monohydrate. *Anal Chim Acta* **219**, 89-95.

Grases F, Costa-Bauzá A (1991). Potentiometric study of the nucleation of calcium oxalate in presence of several additives. *Clin Chem Enzym Comms* **3**, 319-328.

Grases F, Kroupa M, Costa-Bauzá A (1994) Studies on calcium oxalate monohydrate crystallization: influence of inhibitors. *Urol Res* **22**, 39-43.

Grases F, Llobera A (1996) Determination of phytic acid in urine by ICP atomic emission spectrometry. *Anal Lett* **29**, 1193-1199.

Haga H, Nakajima T (1989) Determination of polyol profiles in human urine by capillary gas chromatography. *Biomed Chromatogr* **3**, 68-71.

Harland BF, Oberleas D (1977) A modified method for phytate analysis using an ion-exchange procedure: application to textured vegetable proteins. *Cereal Chem* **54**, 827-832.

Haug W, Lantzsch HJ (1983) Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J Sci of Food Agric* **34**, 1423-1426.

Hawkins PT, Poyner DR, Jackson TR, Letcher AJ, Lander DA, Irvine RF (1993) Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for myo-inositol hexakisphosphate. *Biochem J* **294**, 929-934.

Hurrell RF, Juillerat MA, Reddy MB, Lynch SR, Dassenko SA, Cook JD (1992) Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr* **56**, 573-578.

Jansen G, Muskiet FA, Schierbeek H, Berger R, Van der Slik W (1986) Capillary gas chromatographic profiling of urinary, plasma and erythrocyte sugars and polyols as their trimethylsilyl derivatives, preceded by a simple and rapid prepurification method. *Clin Chim Acta* **157**, 277-293.

Kamaya M, Furuki T, Nagagshima K, Ishii E, Saito H (1995) Indirect spectrophotometric determination of phytic acid with zinc chloranilate. *Phytochem Anal* **6**, 251-254.

Kamaya M, Furuki T, Nagashima K (1998) Flow injection analysis of phytic acid by a modified molybdenum blue method. *Phytochem Anal* **9**, 119-123.

Kennington AS, Hill CR, Craig J, Bogardus C, Raz I, Ortmeier HK, Hansen BC, Romero G, Lerner J (1990) Low urinary chiro-inositol excretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New Engl J Med* **323**, 373-378.

Knuckles BE, Kuzmicky DD, Betschart AA (1982) HPLC analysis of phytic acid in selected foods and biological samples. *J Food Sci* **47**, 1257-1258.

Latta M, Eskin M (1980) A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J Agric Food Chem* **28**, 1313-1315.

Lehrfeld L (1994) HPLC separation and quantitation of phytic acid and some inositol phosphates in foods: problems and solutions. *J Agric Chem* **42**, 2726-2731.

Manary MJ, Hotz C, Krebs NF, Gibson RS, Westcott JW, Arnold T, Broadhead RL, Hambidge KM (2000) Dietary phytate reduction improves zinc absorption in Malawian children recovering from tuberculosis but not in well children. *J Nutr* **130**, 2959-2964.

March JG, Villacampa AI, Grases F (1995) Enzymatic-spectrophotometric determination of phytic acid with phytase from *Aspergillus ficuum*. *Anal Chim Acta* **300**, 269-272.

March JG, Simonet BM, Grases F, Salvador A (1998a) Indirect determination of phytic acid in urine. *Anal Chim Acta* **367**, 63-68.

March JG, Grases F, Salvador A (1998b) Hydrolysis of Phytic Acid by Microwave Treatment: Application to Phytic Acid Analysis in Pharmaceutical Preparations. *Microchem J* **59**, 413-416.

March JG, Simonet BM, Grases F (2001) Determination of phytic acid by gas chromatography-mass spectroscopy: application to biological samples. *J Chromatogr B* **757**, 247-255.

Matthaeus B, Laesing R, Fiebig HJ (1995) Determination of phytic acid and its degradation products in extracts of rape seeds and rapeseed meal. *J High Resol Chromatogr* **18**, 267-2688.

Nardi A, Cristalli M, Desiderio C, Ossicini L, Shukla SS, Fanali S (1992) Indirect UV photometric detection in capillary zone electrophoresis for the determination of phytate in soybeans. *J Microcol* **4**, 9-11.

O'Neill IK, Sargent M, Trimble ML (1980) Determination of phytate in foods by phosphorus-31 Fourier transform nuclear magnetic resonance spectrometry. *Anal Chem* **52**, 1288-1291.

Pallauf J, Pippig S, Most E, Rimbach G (1999) Supplemental sodium phytate and microbial phytase influence iron availability in growing rats. *J Trace Elem Med Biol* **13**, 134-140.

Phillippy BQ, Johnston MR (1985) Determination of phytic acid in foods by ion chromatography with post-column derivatization. *J Food Sci* **50**, 301-319.

Plaami S, Kumpulainen J (1991) Determination of phytic acid in cereals using ICP-AES to determine phosphorus. *J Assoc Off Anal Chem* **74**, 32-36.

Reddy BS (1999) Prevention of colon carcinogenesis by components of dietary fiber. *Anticancer Res* **19**, 3681-3683.

Rounds MA, Nielsen SS (1993) Anion-exchange high-performance liquid chromatography with post-column detection for the analysis of phytic acid and other inositol phosphates. *J Chromatogr A* **653**, 148-152.

Ruiz de Lope C, García-Villanova RJ, García-Villanova R (1982a) Determination of phytic acid in cereal flours by complexometric back-titration with iron (III). *An Bromatol* **34**, 9-12.

Ruiz de Lope C, García-Villanova RJ, García-Villanova R (1982b) Determination of phytic acid in pasta by indirect complexometry with iron (III). *Acta Quím Compostel* **6**, 19-26.

Ruiz de Lope C, García-Villanova RJ, García-Villanova R (1983) Phytic acid determination in infant dietetic flours by indirect iron (III) complexometry. *Ciencia & Industria Farmacéutica* **2**, 130-132.

Sandberg A, Ahderinne R (1986) HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates in foods and intestinal contents. *J Food Sci* **51**, 547-550.

Segueilha L, Moulin G, Galzy P (1993) Reduction of phytate content in wheat bran and glandless cotton flour by *Schwanniomyces castellii*. *J Agric Food Chem* **41**, 2451-2454.

Shamsuddin AM, Vucenik I, Cole KE (1997) IP₆: a novel anticancer agent. *Life Sci* **61**, 343-354.

Simonet BM, Ríos A, Grases F, Valcarcel M (2003) Determination of myo-inositol phosphates in food samples by flow injection-capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **24**, 2092-2098.

Talamond P, Gallon G, Treche S (1998) Rapid and sensitive liquid chromatographic method using a conductivity detector for the determination of phytic acid in food. *J Chromatogr A* **805**, 143-147.

Talamond P, Doubeau S, Rochette I, Guyot JP (2000) Anion-exchange high-performance liquid chromatography with conductivity detection for the analysis of phytic acid in food. *J Chromatogr A* **871**, 7-12.

Tangendjaja B, Buckle KA, Wooton M (1980) Analysis of phytic acid by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **197**, 274-277.

Thies W (1991) Determination of phytic acid and sinapic acid esters in rapeseed and selection of genotypes with reduced concentrations of these compounds. *Fett Wiss Technol* 93, 49-52.

Resultados y discusión: Artículo original I

Perelló J., Isern B., Costa-Bauzá A., Grases F. Determination of myo-inositol in biological samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 802, 367-370 (2004).

Resultados y discusión: Artículo original II

Perelló J., Isern B., Muñoz J. A., Valiente M., Grases F. Determination of phytate in urine by high-performance liquid chromatography - mass spectrometry. *Chromatographia* 60, 265-268 (2004).

Resultados y discusión: Artículo original III

Grases F., Perelló J., Isern B., Prieto R. M. Determination of myo-inositol hexakisphosphate (phytate) in urine by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). *Analytica Chimica Acta* 510, 41-43 (2004).

Revisión crítica

Revisión crítica de los métodos analíticos propuestos

En este apartado se comentarán ciertos aspectos relevantes que no aparecen en el apartado de resultados y discusión, pero que son de importancia para comprender la razón por la que se han desarrollado estos métodos; además, en este capítulo se explican las dificultades encontradas en su desarrollo y las vías alternativas que se han elegido. Finalmente, se comparan los métodos propuestos para la determinación de fitato entre ellos y con otro método alternativo, con la finalidad de probar su validez y campo de aplicación más idóneo.

El objetivo que se perseguía al iniciar el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para la determinación de fitato era encontrar un método suficientemente sencillo, rápido y sensible para poder cuantificar el fitato presente en la orina, sabiendo que para poder ser aplicado en la práctica clínica ordinaria el intervalo de concentraciones para esta molécula oscila entre 0.5-6 mg/l.

En primer lugar se pensó en la técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC-MS). Con una purificación previa de la muestra y una inyección directa de la muestra purificada podría obtenerse una metodología suficientemente sencilla. Sin embargo, trabajando con patrones ya se intuyó que tal idea resultaría inviable. La detección del fitato usando un sistema de ionización por electrospray a presión atmosférica y un cuadrupolo como analizador de masas resultó imposible. El hecho de que el fitato sea una molécula multicargada hace que no sea posible estabilizar el aducto formado (fitato-Na, fitato-H, fitato-K...), incluso añadiendo varios modificadores típicos de la fase móvil, debido a la dificultad que existe para controlar la variedad de posibles aductos. Evidentemente, se han descrito metodologías analíticas para la determinación de moléculas con elevada carga (por ejemplo, proteínas), pero al tratarse de moléculas con un elevado peso molecular la relación m/z es suficientemente alta para determinarlas sin interferencias. Por este motivo, se decidió elaborar un método sencillo para la determinación de myo-inositol usando la misma técnica, y si ello se conseguía con éxito, se desarrollaría otro método para la determinación de fitato, después de un proceso de hidrólisis. El resultado fue satisfactorio pero la hidrólisis complicaba y alargaba notablemente la determinación del fitato, con lo que se pensó en una metodología mucho más sencilla, que no requería procesos de hidrólisis y/o derivatización. Así, se llegó a un método basado en la determinación de fósforo total, después de la eliminación de la interferencia del fosfato, mediante espectrometría de emisión atómica usando un plasma acoplado inductivamente y, aunque no es el más sensible de todos los descritos en la bibliografía, sí es el más sencillo y lo suficientemente sensible para el análisis rutinario de muestras de orina.

A continuación se comentan los aspectos más relevantes de cada uno de los métodos desarrollados, con la finalidad de aportar información que no aparece en los artículos originales, pero que es necesaria para justificar y entender la razón y el porqué del desarrollo analítico planteado.

Determinación de myo-inositol por HPLC-MS (cromatografía líquida de alta resolución y detección de masas)

Se consiguió el propósito que se buscaba, pues se trata de un método muy sencillo y sensible a la vez. Los métodos descritos hasta entonces eran enzimáticos o bien basados en el uso de cromatografía de gases, por lo que se requiere una derivatización previa. El procedimiento que se propone utiliza HPLC-MS como técnica, por lo que no requiere derivatización. Destaca el hecho de que la separación se lleva a cabo con una columna Aminex HPX-87C y se usa solamente agua como fase móvil. Se consigue así una buena resolución para el myo-inositol. Posiblemente, podría pensarse en la introducción de un pequeño porcentaje de algún modificador orgánico de la fase móvil (acetonitrilo, metanol...), no con el fin de mejorar la separación sino para ayudar al proceso de ionización, pues la presencia de un disolvente orgánico incrementa la volatilidad del sistema en la cámara de ionización del detector. Sin embargo, el flujo de trabajo (0.6 ml/min) es lo suficientemente moderado como para no tener problemas usando solamente agua.

Determinación de fitato por HPLC-MS (cromatografía líquida de alta resolución y detección de masas)

Como ya se ha comentado con anterioridad, se trata de un método basado en el anterior, donde el fitato se purifica empleando una resina de intercambio aniónico (separándolo así de su matriz original) y después se hidroliza térmicamente. El myo-inositol resultante se determina usando el procedimiento que se describe en el trabajo anterior.

La separación y recuperación del fitato usando una columna de intercambio aniónico es un proceso que no presenta grandes dificultades analíticas mientras no se obture o sature la columna. El proceso que realmente supuso un problema fue la hidrólisis del fitato, pues se intentó llevar a cabo, en un principio, una hidrólisis enzimática, ya que de acuerdo con la

experiencia del grupo (*March et al., 1995; March et al., 2001*), este proceso era más sencillo y eficaz que la hidrólisis térmica.

Cronológicamente, las dificultades encontradas durante el desarrollo del presente método y las soluciones planteadas son las que se explican a continuación de forma breve:

□ Pretratamiento con carbón activo: el hecho de llevar a cabo una etapa previa de tratamiento de la orina con carbón activo tiene por objetivo mejorar las características mecánicas del proceso de separación de intercambio aniónico (*March et al., 1998*). Estudios de recuperación de fitato, llevados a cabo utilizando patrones, condujeron a valores de fitato recuperado que en ocasiones eran totalmente insatisfactorios (del orden del 40 %); sin embargo, se observó que este hecho no se producía siempre. Se trabajó con carbón activo de diferentes lotes y se concluyó que el fitato podía ser adsorbido por ciertas partidas de carbón activo, quizás debido a la presencia de calcio residual procedente del proceso de obtención del carbón activo. Como alternativa se propuso el filtrado de las muestras mediante filtros de 0.45 μm de tamaño de poro. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios.

□ Hidrólisis enzimática: la hidrólisis del fitato (para su posterior determinación en forma de myo-inositol) trató de realizarse con una fitasa extraída de *Aspergillus Ficum*, suministrada por Sigma. Sin embargo, a pesar de que se trata de una hidrólisis ya descrita en la bibliografía (*March et al., 2001*) no fue posible utilizarla para el desarrollo del presente método.

- I. En primer lugar, se encontró un lote que contenía myo-inositol, lo cual supondría cometer un error por exceso en la determinación de fitato. Evidentemente, se hubiera podido realizar un blanco sin muestra y restar la cantidad de inositol procedente de la fitasa, pero ello implicaría suponer que la suspensión de enzima es totalmente homogénea y tener que trabajar con una muestra más en cada serie de determinaciones.
- II. En un lote diferente, se observó que la “nueva” enzima no era capaz de desarrollar su actividad catalítica en presencia de resina. Este hecho se explica considerando que las fitasas comerciales no son productos puros, sino que son mezclas de fosfatasas que en función de su composición pueden cambiar de comportamiento y actividad.
- III. La imposibilidad de hidrolizar el fitato en presencia de resina, condujo a la opción de eluir el fitato con ácido concentrado, liofilizar el eluido y reconstituir a $\text{pH} = 2.5$ (pH de mayor actividad enzimática). Pruebas

preliminares con HCl 2 M demostraron que en las condiciones de liofilización el HCl no se congelaba y, por lo tanto, no se podía liofilizar. Entonces, la elución se llevó a cabo en medio HNO₃ 2 M, pero en este medio el fitato se pierde durante la liofilización, posiblemente porque se halla totalmente protonado y es capaz de sublimar.

- IV. Como recurso final, se intentó ajustar el pH del eluido a 2.5 por adición de hidróxido sódico, pero la elevada fuerza iónica generada impide a la enzima desarrollar su actividad enzimática.

Todos estos motivos nos condujeron a estudiar la hidrólisis térmica, que fue la que finalmente nos permitió completar el desarrollo del método.

Determinación de fitato por ICP-AES (espectrometría de emisión atómica usando un plasma acoplado inductivamente)

Como ya se ha explicado en el método anterior, se tuvieron muchos problemas en el proceso de optimización de la hidrólisis y el resultado, a pesar de que supone una importante simplificación del método de GC /MS, es un método todavía muy laborioso, pues implica una separación previa y una hidrólisis térmica cuya duración es de 11 horas.

Entonces, simultáneamente al desarrollo del método anterior se pensó en cual sería la forma más sencilla posible para la determinación del fitato, pero que no implicara técnicas a las que no tuvieran acceso laboratorios clínicos. La respuesta correcta, como siempre, es la más simple. Al replantear el problema de desarrollar un método simple que pudiera ser aplicado en la práctica clínica ordinaria, considerando los diferentes aspectos comentados y la experiencia adquirida, se llegó a la conclusión de que la mejor opción correspondería a la determinación de fitato a través del fósforo mediante espectrometría de emisión atómica ICP, después de la eliminación de otros compuestos como el ortofosfato. Este método se podría obtener mejorando uno previamente desarrollado (*Grases & Llobera, 1996*), cuando todavía se disponía de escasos conocimientos sobre la presencia de fitato en muestras biológicas. Se consiguió así una metodología simple y sensible, donde la cuantificación del fitato en orina es posible usando un volumen de muestra muy reducido (5 ml) frente a los 500 ml que requería el método anterior. No existe hasta el momento otra metodología tan simple (solamente requiere una etapa de separación) para la determinación de fitato en orina usando una técnica ordinaria de la que pueda disponer cualquier clínica.

Validación de los métodos analíticos propuestos para la determinación de fitato

Como ya se ha explicado, se han desarrollado dos métodos diferentes para la determinación de fitato en orina, uno de ellos basado en la determinación del myo-inositol (por HPLC-MS) después de un proceso de hidrólisis y el otro basado en la determinación de fósforo total después de un proceso de purificación y preconcentración.

Con el objetivo de validar ambos métodos, a continuación se compara cada uno de ellos con otro método que determina el myo-inositol (producto de hidrólisis del fitato) por GC/MS. Además, se comparan los métodos propuestos entre ellos. En la tabla 2.1. se muestran los resultados de todas las determinaciones llevadas a cabo por cada uno de los tres métodos.

Tabla 2.1.- Contenido en fitato, en mg/l, encontrado en diferentes muestras de orina utilizando tres metodologías analíticas diferentes

Muestra	Método GC/MS	Método ICP-AES	Método LC/MS
Orina 1	0.87	0.87	0.90
Orina 2	0.73	0.86	0.77
Orina 3	0.72	0.97	0.88
Orina 4	0.86	1.16	
Orina 5	0.77	0.78	0.81
Orina 6	0.49	0.25	
Orina 7	0.45	0.34	0.37
Orina 8	0.44	0.54	0.44
Orina 9	0.80	0.88	0.84
Orina 10	1.99	1.84	1.88
Orina 11	1.50	1.61	1.58
Orina 12	1.20	1.31	1.27
Orina 13	0.91	0.85	
Orina 14	0.85	0.87	
Orina 15	0.64	0.76	
Orina 16	0.77	0.75	
Orina 17	0.84	1.15	

En la figura 2.1. se representan los valores urinarios de fitato obtenidos, comparando los métodos dos a dos. Se muestra además la recta ideal $y = x$ a la que deberían aproximarse los puntos experimentales. Las rectas de regresión obtenidas para cada par de métodos son las siguientes:

- Método ICP-AES vs método GC/MS: $y = 0.9693x + 0.0832$, $s_{y/x} = 0.1551$

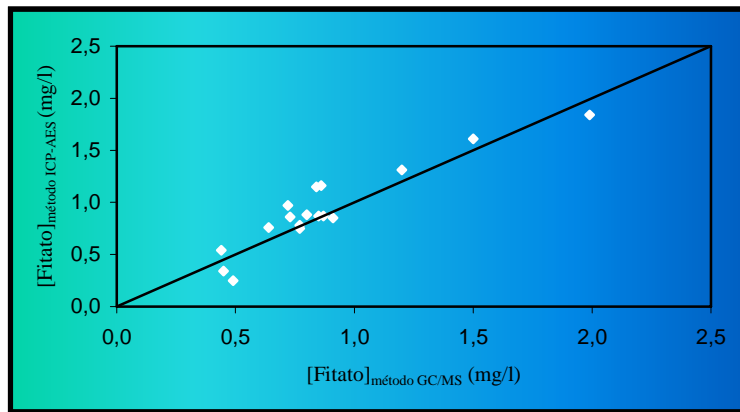
- Método LC/MS vs método GC/MS: $y = 0.9654x + 0.0598$, $s_{y/x} = 0.0801$

- Método LC/MS vs método ICP-AES: $y = 1.0201x + 0.0461$, $s_{y/x} = 0.0582$

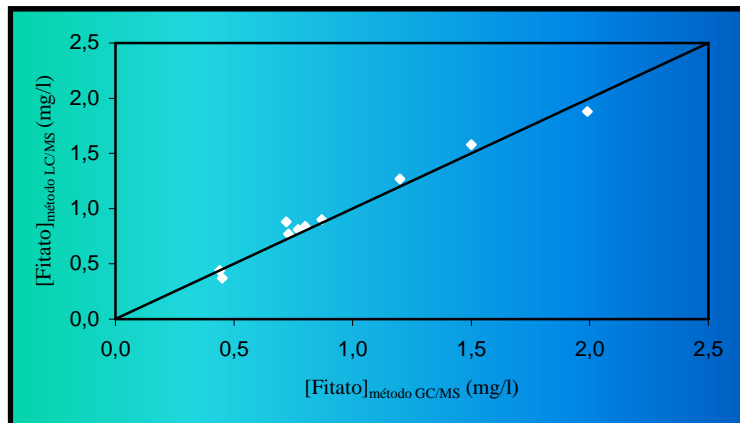
Las tres rectas de regresión resultaron ser estadísticamente comparables con la recta teórica $y = x$ para un nivel de probabilidad del 95 %.

El hecho de que los dos métodos sean estadísticamente comparables indica que las metodologías propuestas determinan, como componente mayoritario, fitato y no otros inosítoles polifosfato (inositol pentafosfato, inositol tetrafosfato, etc...), puesto que una está basada en la determinación de inositol y el otro en la determinación de fosfato (pues se determina fósforo total después de una separación con el fosfato), y la presencia de otros inosítoles fosfato inferiores alteraría la relación molar fosfato/inositol.

A.



B.



C.

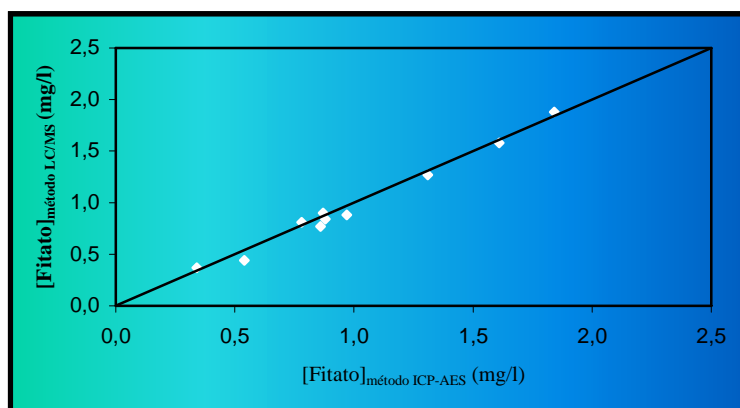


Figura 2.1.- Representación de los valores urinarios de fitato obtenidos por los diferentes métodos.

A. Resultados obtenidos por el método ICP-AES frente a los obtenidos por el método GC/MS.

B. Resultados obtenidos por el método LC/MS frente a los obtenidos por el método GC/MS.

C. Resultados obtenidos por el método LC/MS frente a los obtenidos por el método ICP-AES.

Bibliografía

Grases F, Llobera A (1996) Determination of phytic acid in urine by ICP Atomic Emission Spectrometry. *Anal Letts* **29**, 1193-1199.

March JG, Villacampa AI, Grases F (1995) Enzymatic-spectrophotometric determination of phytic acid with phytase from *Aspergillus ficuum*. *Anal Chim Acta* **300**, 269-272.

March JG, Simonet BM, Grases F, Salvador A (1998) Indirect determination of phytic acid in urine. *Anal Chim Acta* **367**, 63-68.

March JG, Simonet BM, Grases F (2001) Determination of phytic acid by gas chromatography-mass spectroscopy: application to biological samples. *J Chromatogr B* **757**, 247-255.

Conclusiones

Conclusiones

1. Se ha desarrollado un método por cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas para la determinación de myo-inositol en muestras de saliva y orina utilizando solamente 1 ml de muestra en cada caso. La exactitud del método se ha estudiado utilizando el método de la adición de patrón. Se han obtenido porcentajes de recuperación satisfactorios en las muestras de saliva. La mayor complejidad de las muestras de orina conduce a recuperaciones insuficientes en algunas de ellas por lo que se recomienda llevar a cabo adición de patrón siempre que se trabaje con este tipo de muestras.
2. Se ha desarrollado un método por cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas para la determinación de fitato en muestras de orina. Se ha comparado el método con otros métodos, uno de ellos basado en la determinación de myo-inositol por GC/MS y el otro basado en la determinación de fósforo total por ICP-AES.
3. Se ha desarrollado un método para la determinación de fitato basado en la separación y concentración del analito en una resina de intercambio aniónico, y posterior determinación de fósforo total del eluato por espectrometría de emisión atómica ICP. En este método se fusionan unas buenas características analíticas y una simplicidad suficiente para poder ser usado en laboratorios clínicos. El método se ha comparado con el método GC/MS y el método LC/MS.
4. El hecho de que los resultados obtenidos por métodos basados en fundamentos químicos diferentes sean coincidentes no deja lugar a dudas sobre la validez de los métodos desarrollados.

Capítulo 3

*Efectos del inositol hexakisfosfato (InsP₆)
exógeno sobre los niveles de InsP₆ y de
inositol trisfosfato (InsP₃) en células*

Introducción

Introducción

El *myo*-inositol hexafosfato (InsP_6 , IP_6 o fitato) es el inositol totalmente fosforilado. Se ha demostrado recientemente su presencia natural en orina y plasma de ratas y humanos (*Grases et al., 2001a; Grases et al., 2001b; Grases et al., 2001c*), y que sus niveles disminuyen drásticamente después de la ingesta de una dieta pobre en InsP_6 , mientras que vuelven al nivel basal al restablecerse la dieta normal o bien al tomar algún suplemento dietético (*Grases et al., 2001a*). También se ha demostrado que el InsP_6 soluble administrado a través del agua de bebida se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal, es rápidamente defosforilado y distribuido a varios órganos (*Sakamoto et al., 1993*).

Se trata de una molécula que en principio fue catalogada como antinutriente. A pesar de ello, en las últimas décadas se han demostrado numerosos efectos beneficiosos de esta molécula, destacando el efecto antineoplásico (*Shamsuddin et al., 1997; Shamsuddin, 1999*), la actividad anti-agregación de las plaquetas (*Vucenik et al., 1999*) y la capacidad para inhibir la formación de piedras en el riñón (*Grases & Costa-Bauzá, 1999*) y biocalcificaciones patológicas en general (*Grases et al., 2004*).

Efecto antineoplásico

Son varios los mecanismos de acción que se han propuesto para la acción anticáncer del fitato; los podríamos clasificar en tres aspectos claramente diferenciados:

✓ *Alteración genética*: ya que el InsP_6 interfiere en procesos de transducción (*Huang et al., 1997*) y ejerce una influencia en genes reguladores del ciclo celular y en genes supresores de tumores (*Shamsuddin et al., 1997*).

✓ *Exaltación inmunitaria* (*Urbano et al., 2000; Reddy, 1999; Baten et al., 1989; Morrison et al., 1994*).

✓ *Propiedades antioxidantes*: parece ser que de los tres aspectos éste es el efecto biológico más importante. El fitato, gracias a su elevada carga (debida a los seis grupos fosfato que presenta) puede formar quelatos con iones divalentes, especialmente el hierro, inhibiendo así reacciones oxidativas donde éste interviene, y evitando que se formen radicales hidróxido libres y otras especies reactivas de oxígeno; así se limita el crecimiento del tumor (*Graf & Eaton, 1990; Midorikawa et al., 2001*). La progresión tumoral podría limitarse también por

quelación de otros iones tales como el magnesio y el zinc, ya que ambos son críticos para la proliferación de células tumorales (Urbano *et al.*, 2000).

Efecto inhibitor de la cristalización

En general, los inhibidores de la cristalización pueden actuar inhibiendo la nucleación (ya sea homogénea o bien heterogénea) de los cristales, el crecimiento cristalino o bien la agregación de cristales ya formados (este último punto no se tratará).

En la figura 3.1 se presenta un esquema sobre el mecanismo de inhibición de la nucleación homogénea; primeramente se muestra la formación normal de un núcleo de tamaño crítico que después continua creciendo. A continuación, se muestra la acción de un inhibidor en la nucleación homogénea: la unión del inhibidor con las micropartículas de tamaño inferior crítico impide que se alcance dicho tamaño.

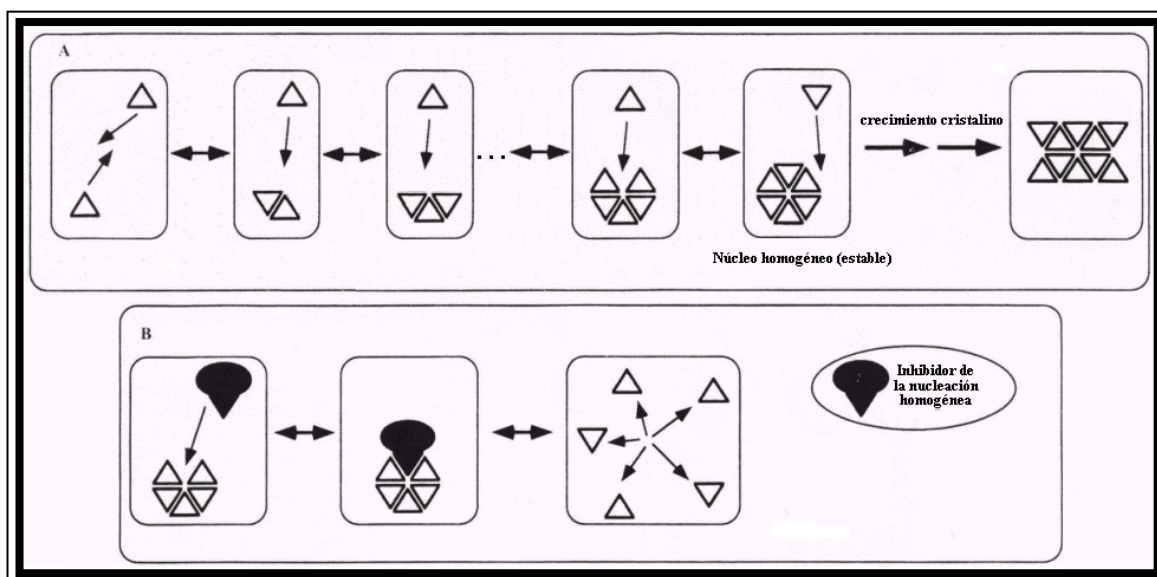


Figura 3.1.- A. Formación de un núcleo homogéneo. B. Acción de un inhibidor en la nucleación homogénea.

El mecanismo normal de nucleación heterogénea se esquematiza en la figura 3.2.A, mostrándose a continuación (figura 3.2.B) como un inhibidor de la nucleación heterogénea es capaz de inhibir esta etapa uniéndose a la superficie del núcleo heterogéneo, impidiendo o dificultando la posterior unión de las especies que han de constituir el futuro cristal.

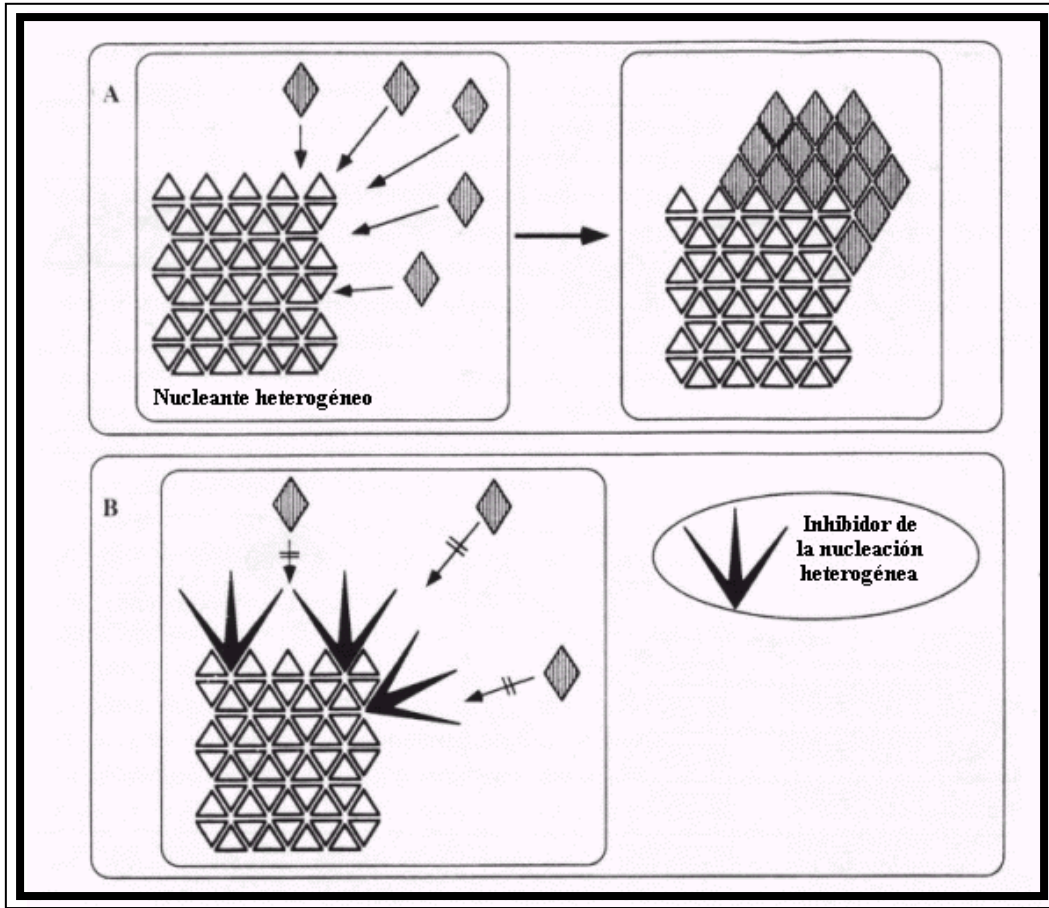


Figura 3.2.- A. Mecanismo normal de nucleación heterogénea. B. Acción de un inhibidor en la nucleación heterogénea.

En la figura 3.3.A. se esquematiza el crecimiento cristalino normal de un cristal en formación, mientras que en la figura 3.3.B. se muestra la acción de un inhibidor del crecimiento cristalino, que evita o dificulta el crecimiento del cristal uniéndose a las caras en crecimiento.

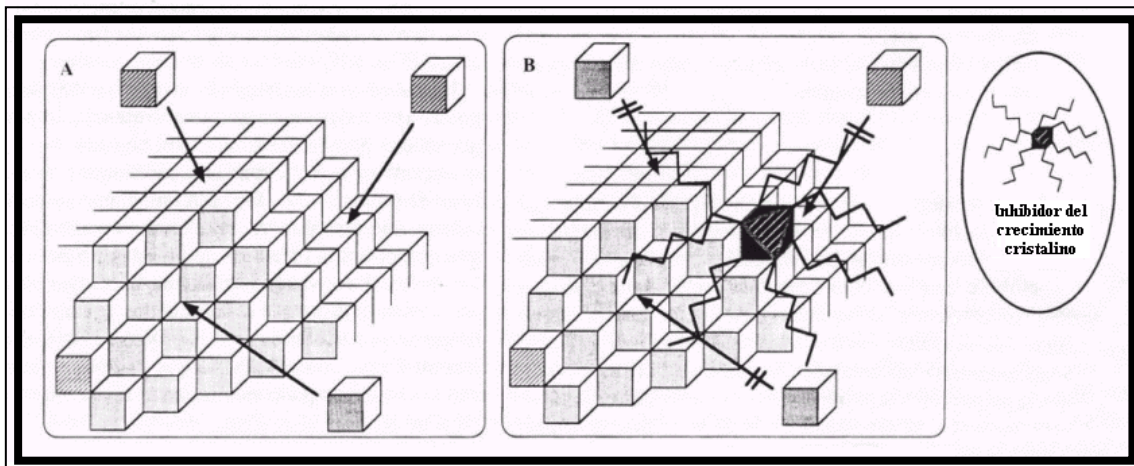


Figura 3.3.- A. Cristal en crecimiento. B. Acción de un inhibidor en la etapa del crecimiento cristalino.

El fitato es un potente inhibidor de la nucleación heterogénea del oxalato cálcico (*Grases et al., 1994; Grases & Costa-Bauzá, 1991*), de la nucleación homogénea de los fosfatos cálcicos (*Grases et al., 1996*) y del crecimiento cristalino del oxalato cálcico (*Grases & March, 1989*).

Las condiciones de sobresaturación de la orina respecto al oxalato cálcico, incluso en individuos hipercalcémicos o hiperoxalémicos, hacen que la nucleación homogénea del oxalato cálcico sea prácticamente imposible (*Finlayson, 1978*).

Observando la estructura del fitato, se puede explicar su actividad inhibidora como consecuencia de la afinidad de los grupos fosfato por el ión calcio. La fuerte adsorción de moléculas de fitato sobre la superficie de núcleos y/o cristales de oxalato cálcico impedirá su posterior desarrollo y/o crecimiento.

Efecto sobre la agregación de las plaquetas

Un estudio utilizando sangre humana de 10 individuos demostró que la agregación de las plaquetas activadas, incubadas con fitato, se inhibía de forma significativa, encontrándose un efecto dosis-respuesta positivo. Este hecho podría apuntar un papel del fitato en la reducción de enfermedades cardiovasculares (*Vucenik et al., 1999*).

Por otra parte, el inositol trifosfato (InsP_3) es una molécula central en la transducción de señales celulares y su forma totalmente fosforilada (InsP_6) se absorbe a través de la dieta. Por este motivo se decidió investigar los niveles de InsP_3 e InsP_6 en diversos tejidos y fluidos corporales de ratas bajo una dieta pobre en InsP_6 y una dieta suficiente en InsP_6 . Se analizaron por GC-MS fracciones cromatográficas de HPLC de las diferentes muestras, entre ellas muestras de tejido cerebral de rata, ya que los receptores de InsP_6 y la unión con el receptor están bien caracterizados en este caso (*Theibert et al., 1991*), y además se sabe que los niveles de InsP_6 en cerebro son 10 veces superiores a los de otros órganos (*Grases et al., 2001b*).

Además, se ha demostrado que el InsP_6 inhibe la proliferación celular e induce diferenciación celular (*Shamsuddin et al., 1997; Shamsuddin, 1999*). Se sabe, además, que el tratamiento *in vitro* con InsP_6 de células leucémicas K562 usando [^3H]-inositol provoca un incremento del 41% en el nivel de InsP_6 (*Shamsuddin et al., 1992*).

En este capítulo se presenta un estudio de los niveles intracelulares de $InsP_3$ e $InsP_6$ en células cancerígenas después de tratarlas con $InsP_6$ con el fin de profundizar en el mecanismo de acción del $InsP_6$. Se utilizaron líneas celulares de diferente naturaleza y con características de crecimiento diferentes para analizar los contenidos intracelulares de $InsP_3$ e $InsP_6$ antes y después de la exposición a $InsP_6$ exógeno. Las células MDA-MB 231 son células cancerígenas de mama humanas, de origen epitelial que proliferan como un cultivo adherente en forma de monocapa, de forma dependiente al anclaje, como prerrequisito para su proliferación. Las células K562 son células humanas leucémicas, de forma independiente de anclaje, una capacidad restringida a células hemopoiéticas.

Bibliografía

Baten A, Ullah A, Tomazic VJ, Shamsuddin AM (1989) Inositol-phosphate-induced enhancement of natural killer cell activity correlates with tumor suppression. *Carcinogenesis* **10**, 1595-1598.

Finlayson B (1978) Physicochemical aspects of urolithiasis. *Kidney Int* **13**, 344-360.

Graf E, Eaton JW (1990) Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radic Biol Med* **8**, 61-69.

Grases F, March JG (1989) A study about some phosphate derivatives as inhibitors of calcium oxalate crystal growth. *J Cristal Growth* **96**, 993-995.

Grases F, Costa-Bauzá A (1991) Potentiometric study of the nucleation of calcium oxalate in presence of several additives. *Clin Chem Enzym Comms* **3**, 319-328.

Grases F, Kroupa M, Costa-Bauzá A (1994) Studies on calcium oxalate monohydrate crystallization. Influence of inhibitors. *Urol Res* **22**, 39-43.

Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A, March JG (1996) Study of the effects of different substances on the early stages of papillary stone formation. *Nephron* **73**, 561-568.

Grases F, Costa-Bauzá A (1999) Phytate (IP_6) is a powerful agent preventing calcifications in biological fluids: usefulness in renal lithiasis treatment. *Anticancer Res* **19**, 3717-3722.

Grases F, Simonet BM, Vucenik I, Prieto RM, Costa-Bauzá A, March JG, Shamsuddin AM (2001a) Absorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP_6 or phytate) in humans. *BioFactors* **15**, 53-61.

Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001b) Phytate levels in diverse rat tissues: Influence of dietary phytate. *Br J Nutr* **86**, 225-231.

Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001c) Variation of InsP_4 , InsP_5 and InsP_6 levels in tissues and biological fluids depending on dietary phytate. *J Nutr Biochem* **12**, 595-601.

Grases F, Perelló J, Prieto RM, Simonet BM, Torres JJ (2004) Dietary *myo*-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues in a pilot study in Wistar rats. *Life Sci* **75**, 11-19.

Huang C, Ma WY, Hecht SS, Dong Z (1997) Inositol hexaphosphate inhibits cell transformation and activator protein 1 activation by targeting phosphatidylinositol-3' kinase. *Cancer Res* **57**, 2873-2878.

Midorikawa K, Murata M, Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi S (2001) Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 552-557.

Reddy BS (1999) Prevention of colon carcinogenesis by components of dietary fiber. *Anticancer Res* **19**, 3681.-3683.

Sakamoto K, Vucenik I, Shamsuddin AM (1993) [3H]Phytic acid (inositol hexaphosphate) is absorbed and distributed to various tissues in rats. *J Nutr* **123**, 713-720.

Shamsuddin AM, Baten A, Lalwani ND (1992) Effects of inositol hexaphosphate on growth and differentiation in K562 erythroleukemia cell line. *Cancer Lett* **64**, 195-202.

Shamsuddin AM, Vucenik I, Cole KE (1997) IP_6 : a novel anti-cancer agent. *Life Sci* **61**, 343-354.

Shamsuddin AM (1999) Metabolism and cellular functions of IP_6 : A review. *Anticancer Res* **19**, 3733-3736.

Theibert AB, Estevez VA, Ferris CD, Danoff SK, Barrow RK, Prestwich GD, Snyder SH (1991) Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and inositol hexakisphosphate receptor proteins: Isolation and characterization from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 3165-3169.

Urbano G, Lopez-Jurado M, Aranda P, Vidal-Valverde C, Tenorio E, Porres J (2000) The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? *J Physiol Biochem* **56**, 283-294.

Vucenik I, Podczasy JJ, Shamsuddin AM (1999) Antiplatelet activity of inositol hexaphosphate (IP_6). *Anticancer Res* **19**, 3689-3694.

Resultados y discusión: Artículo original

Grases F., Simonet B.M., Vucenik I., Perelló J., Shamsuddin A.M., Prieto R.M., Cole K.E. Effects of exogenous inositol hexakisphosphate (InsP₆) on the levels of InsP₆ and of inositol trisphosphate (InsP₃) in malignant cells, tissues and biological fluids. Life Sciences 71, 1535-1546 (2002).

Conclusiones

Conclusiones

1. Los valores de $InsP_3$ e $InsP_6$ en cerebro de rata son alrededor de 100 veces superiores a los de plasma, bajo una dieta normal en $InsP_6$.
2. Después del tratamiento con una dieta pobre en $InsP_6$ los niveles de $InsP_3$ e $InsP_6$ son similares, tanto en plasma como en cerebro de rata.
3. Después del tratamiento con una dieta suficiente en $InsP_6$, los niveles de $InsP_6$ son notablemente superiores a los de $InsP_3$, tanto en plasma como en cerebro de rata.
4. Los niveles de $InsP_6$ en plasma y cerebro de rata son muy sensibles a su presencia en la dieta.
5. Los niveles de $InsP_3$ en plasma y cerebro de rata son independientes de la presencia de $InsP_6$ en la dieta.
6. Los niveles intracelulares basales de $InsP_6$ en células MDA-MB 231 y K562 son unas tres veces superiores a los de $InsP_3$.
7. Los niveles intracelulares basales de $InsP_6$ en células MDA-MB 231 y K562 son similares, y no sufren variaciones significativas después de una exposición a $InsP_6$ exógeno.
8. Los niveles intracelulares basales de $InsP_3$ en células K562 son ligeramente superiores a los de las células MDA-MB 231 y en ambos tipos de células estos valores se duplican después de una exposición a $InsP_6$ exógeno.
9. La presencia de $InsP_6$ en las células no tratadas indica que éstas pueden sintetizarlo a partir del *myo*-inositol del medio de cultivo.

Capítulo 4

Absorción de fitato

Introducción

Introducción

La absorción consiste en la asimilación de una sustancia por parte del organismo, hasta que llega al torrente sanguíneo.

Los mecanismos de absorción, por orden de importancia son la difusión pasiva, el transporte convectivo, el transporte activo, el transporte facilitado, el transporte por ión-pareado y la endocitosis o pinocitosis. Todos ellos son mecanismos generales que pueden darse en la absorción de sustancias a través de las distintas vías de administración. Las vías más empleadas son la oral, peroral, intramuscular, intradérmica, rectal y externa o tópica. En este capítulo, se estudiarán aspectos de interés sobre la absorción de fitato administrado por vía oral y por vía dérmica (tópica).

Absorción de sustancias administradas oralmente

Dicha absorción se da básicamente a nivel gastrointestinal. La absorción es el paso de nutrientes, agua y electrolitos desde el lumen intestinal o estomacal hasta la sangre. Ciertas sustancias, como por ejemplo aquellas que presentan propiedades ácidas, pueden absorberse favorablemente a nivel estomacal debido a que el pH es muy bajo ($\approx 1-2$) y se pueden absorber en forma protonada, pues así aumenta considerablemente su liposolubilidad y pueden atravesar la membrana lipídica (*Costanzo, 1998*).

Existen dos vías diferentes de absorción:

- ❑ Vía celular: la sustancia que debe atravesar la membrana luminal penetra en las células epiteliales intestinales y después llega al torrente sanguíneo cruzando la membrana basolateral.

- ❑ Vía paracelular: las sustancias llegan al torrente sanguíneo a través de las *uniones estrechas* que dejan las células epiteliales. Si se da este mecanismo los nutrientes no entran en la célula.

Absorción de fitato administrado oralmente. Mecanismo

En el caso del fitato, la bibliografía describe algunos aspectos concernientes a su grado de absorción y distribución, aunque otros aspectos sobre el mecanismo exacto de absorción deben ser estudiados en mayor profundidad.

➤ Características de la absorción de fitato: se han llevado a cabo estudios tanto con ratas como con humanos, llegándose en ambos casos a conclusiones análogas.

☐ En estudios realizados utilizando ratas como animales de experimentación (*Grases et al., 2000a*) se observan dos aspectos de gran interés:

- En primer lugar, se encontró la existencia de una relación dependiente de la dosis entre la cantidad de fitato expulsado en la orina y su ingesta oral. Además, la eliminación del fitato dietético conduce a unos valores urinarios prácticamente indetectables, corroborando así que la excreción de fitato depende de su ingesta oral y que su síntesis *de novo* por parte del organismo es prácticamente nula.
- En segundo lugar, se vio que a partir de un cierto valor de fitato ingerido (20.9 mg/kg) no se incrementa más su excreción en orina, demostrándose así que existe una cantidad ingerida óptima. En estas condiciones, la absorción de fitato es del 2 % respecto al total ingerido (el resto se expulsa a través de las heces). Esta cantidad está limitada, al menos en parte, por el área de la mucosa estomacal.

☐ De estudios realizados en humanos se obtienen conclusiones paralelas a las obtenidas en los estudios con ratas:

- En estudios sobre el efecto de la dieta sobre los niveles urinarios de fitato en humanos (*Grases et al., 2000b*) se observó como la ingesta durante 36 horas de una dieta carente en fitato disminuye la excreción urinaria al 50 % del valor original.
- Por otra parte (*Grases et al., 2001a*), se observa que no existen diferencias en la excreción de fitato urinario tanto si se suministran 308 mg de fitato (en forma de fitina) como si se ingieren 2470 mg (en forma de fitato sódico). Ello está de acuerdo con los resultados obtenidos con animales de experimentación, en los que se

concluye que hay una cantidad de fitato ingerida máxima. Además, la absorción no depende del tipo de sal suministrada.

➤ Distribución de fitato: una vez absorbido, el fitato se distribuye desde la sangre hasta los órganos y tejidos, donde la cantidad de fitato también depende claramente de su ingesta a través de la dieta (*Grases et al., 2001b*). El incremento de la cantidad de fitato en órganos y tejidos después de un aumento de su ingesta se atribuye principalmente al aumento del fitato extracelular, mientras que poco o nada se sabe de cómo y en qué forma éste penetra en el interior de las células.

➤ Farmacocinética: en lo referente a aspectos de farmacocinética, de un estudio realizado en humanos, se sabe que el fitato se absorbe rápidamente, aunque en pequeña extensión, y que presenta un máximo de absorción a las cuatro horas de su ingesta (*Grases et al., 2001a*).

➤ Mecanismo de absorción de fitato: a pesar de todo lo que se ha comentado en este capítulo y considerando la estructura y propiedades químicas del fitato, existen dudas sobre el mecanismo de absorción de dicha molécula. ¿Se absorbe preferentemente a nivel estomacal? ¿O por contra lo hace básicamente a nivel intestinal? ¿Quizá en ambas partes del tracto gastrointestinal?

❑ Por una parte, parecería lógico pensar que la absorción fuera básicamente a nivel estomacal. A pH fisiológicos ordinarios, el fitato presenta entre 6 y 7 cargas, lo cual dificultaría mucho su absorción debido a su baja liposolubilidad. Los valores de pH presentes en el estómago ($\text{pH} \approx 1-2$) hacen pensar que el fitato podría absorberse en forma protonada. Sin embargo, observando los valores más bajos de pKa del fitato ($\text{pKa}_1 = -0.15$, $\text{pKa}_2 = 0.41$, $\text{pKa}_3 = 0.85$, $\text{pKa}_4 = 1.84$) (*Brigando et al., 1995*) se plantean serias dudas en este sentido. Incluso a $\text{pH} = 1$ el fitato conserva como mínimo 3 cargas negativas, por lo que su liposolubilidad sigue siendo extremadamente baja.

❑ Otra posible alternativa sería que la absorción de fitato pudiera darse vía paracelular, es decir, que difundiera por gradiente de concentración, desde el lumen del estómago o intestino hasta la sangre atravesando las *uniones estrechas* que dejan entre ellas las células epiteliales del tracto gastrointestinal. A pesar de que ello podría resultar a priori bastante difícil (debido,

nuevamente, a la elevada carga del fitato), podría justificar el hecho de que la absorción se diera en tan pequeña cantidad. De hecho, ello explicaría, simultáneamente, porqué los difosfonatos (que se usan para el tratamiento de la osteoporosis) presentan, igual que el fitato, unos valores de absorción reducidos, del orden del 3 % (*Fraser et al., 1972*).

□ Finalmente, otra posibilidad que podría explicar como una molécula con tan baja liposolubilidad puede atravesar una barrera lipídica es la formación de una especie neutra que fuera soluble tanto en medio polar (acuoso) como en medio apolar. Ello supondría, en cierta manera, aceptar la existencia de un transportador de fitato que facilitara el paso desde el intestino y/o el estómago hasta la sangre. A pesar de que no hay ninguna evidencia definitiva, existen ciertas referencias que apuntan posibilidades reales para permitir que el fitato atravesase membranas biológicas:

- Recientemente, estudios *in vitro* han demostrado que el fitato puede penetrar en el interior de los glóbulos rojos por formación de un *asociado iónico* con cationes alquilamonio (*Vincent et al., 2002*). La justificación teórica de este hecho se basa en la formación de una especie que contenga en su estructura una parte hidrosoluble (fitato) y una parte liposoluble (catión alquilamonio de cadena media). El *asociado iónico* contendría tantos cationes alquilamonio como fueran necesarios para la neutralización total (o quizás parcial) de la carga del fitato.
- El mecanismo de absorción de fitato podría estar relacionado con la formación de una especie neutra con una proteína. Está descrito (*Wise, 1986*) que en presencia de cationes multivalentes como el calcio se pueden formar complejos solubles proteína/catión/fitato.

Sin embargo, ninguna de estas posibilidades ha sido demostrada.

Por tanto, podemos concluir, como resumen a todo lo dicho, que el fitato se absorbe en pequeña cantidad y pasa a la sangre, desde donde llega a los órganos y tejidos en la misma forma original (antes de entrar en la célula no sufre defosforilaciones para convertirse en algún inositol polifosfato inferior, por lo menos de forma significativa). Sin embargo, se ignora el mecanismo exacto por el que el fitato pasa al interior del organismo.

Absorción de sustancias administradas tópicamente

En la bibliografía se describe la piel como un órgano no diseñado para la absorción de sustancias útiles para el organismo. Esto se debe a que, a diferencia del intestino, la piel es un órgano muy grueso, formado por varias capas y, además, los vasos sanguíneos solamente irrigan la piel en sus capas más internas (ver capítulo 6). Se trata, pues, de una barrera, aunque no infranqueable, al paso del agua y otras sustancias. La capa más difícil de atravesar es el estrato córneo, capa más externa, formado por células queratinizadas que se hallan embebidas en múltiples bicapas lipídicas (*Sweeny & Downing, 1970*).

Una sustancia que llega a la sangre por vía tópica, debe difundirse a través del estrato córneo y atravesar las diferentes capas de la epidermis. Una vez llega a la dermis puede contactar con el sistema vascular y pasar al torrente sanguíneo (*Moore & Dalley, 2002*).

Las sustancias que mejor se absorben a través de la piel son aquellas que tienen naturaleza hidrófila y lipófila a la vez (sin ionizar), frente a las que son solamente hidrosolubles, únicamente liposolubles o bien están disociadas. Además, la vía tópica es la única donde la sustancia a absorber y la base o vehículo que la acompaña tienen igual importancia.

En la piel, la absorción se lleva a cabo por difusión pasiva, ya que este órgano carece de mecanismos de transporte activo (receptores específicos para la sustancia a absorber). Este mecanismo de absorción se rige por las leyes de difusión de Fick, según las cuales la difusión es proporcional a la diferencia de concentraciones a cada lado de la membrana interpuesta y la constante de proporcionalidad es, en este caso, la constante de permeabilidad de la membrana.

Las vías de penetración son básicamente tres (figura 4.1) (*Hadgraft, 2001; Potts et al., 1992; Saunal, 1988*):

- ❑ Transcelular (1): es la vía más importante, especialmente para sustancias hidrofóbicas. Las sustancias a absorber entran atravesando las células epiteliales del estrato córneo, disolviéndose en su membrana de acuerdo a su liposolubilidad y coeficiente de partición.
- ❑ Intercelular (2): la sustancia entra a través de las uniones e intersticios que hay entre las células epiteliales.
- ❑ A través de los anexos: las sustancias se absorben a través de la pared de las glándulas sudoríparas (3), folículos pilosos (4) y glándulas sebáceas (5). Es la que se da en menor extensión.

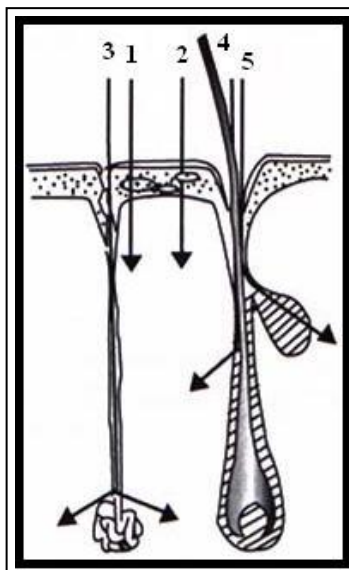


Figura 4.1.- Vías de penetración a través de la piel

Para hacer una aproximación de la importancia de las distintas vías de penetración, en la tabla 4.1 se muestran las difusividades y volúmenes relativos para algunas vías de absorción. Se observa como, a pesar de que la vía transcelular no es la que presenta valores mayores de constante de difusividad, su elevado volumen fraccional hace que sea una vía de penetración muy importante (Scheuplein & Blank, 1971). Por otra parte, resulta claro que la difusión a través de los anexos es más rápida que la vía transepidérmica, pero su abundancia es menor.

Tabla 4.1.- Importancia relativa de las distintas vías de penetración a través de la piel.

Vía de penetración	Volumen fraccional	Constante de difusión (cm ² /s)
Transcelular	0.999	5-10 · 10 ⁻¹⁰
Intercelular	-	1-10 · 10 ⁻¹¹
Folículo piloso	1-2 · 10 ⁻³	5-20 · 10 ⁻⁸
Glándula sudorípara	3-5 · 10 ⁻⁴	1-20 · 10 ⁻⁶

En el caso del fitato, se han descrito varias aplicaciones superficiales de uso tópico. La mayoría de estas aplicaciones se refieren a su acción contra el envejecimiento prematuro o como agente despigmentante (Uezen et al., 1998). Algunos estudios también parecen demostrar una capacidad del fitato para inhibir el cáncer de piel (Ishikawa et al., 1999; Gupta et al., 2003), pero en ningún caso se ha demostrado su absorción por parte del organismo, llegando a la sangre y siendo eliminado a través de la orina, y cuál es el mecanismo exacto de absorción.

Bibliografía

Brigando C, Mossoyan JC, Favier F, Benlian D (1995) Conformational preferences and protonation sequence of myo-inositol hexaphosphate in aqueous solution: potentiometric and multinuclear magnetic resonance studies. *J Chem Soc Dalton Trans* **4**, 575-578.

Costanzo LS (1998) En *Fisiología*. McGraw-Hill Interamericana, México.

Fraser D, Russell RGG, Pohler O, Robertson WG, Fleisch H (1972) The influence of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) on the development of experimentally induced urinary stones in rats. *Clin Sci* **42**, 197-207.

Grases F, Simonet BM, March JG, Prieto RM (2000a) Inositol hexakisphosphate in urine: the relationship between oral intake and urinary excretion. *BJU Int* **85**, 138-142.

Grases F, March JG, Prieto RM, Simonet BM, Costa-Bauzá A, García Raja A, Conte A (2000b) Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people. *Scand J Urol Nephrol* **34**, 162-164.

Grases F, Simonet BM, Vucenik I, Prieto RM, Costa-Bauzá A, March JG, Shamsuddin AM (2001a) Absorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP₆ or phytate) in humans. *BioFactors* **15**, 53-61.

Grases F, Simonet BM, Prieto RM, Prieto RM (2001b) Phytate levels in diverse rat tissues. Influence of dietary intake. *Br J Nutr* **86**, 225-231.

Gupta KP, Singh J, Bharathi R (2003) Suppression of DMBA-induced mouse skin tumor development by inositol hexaphosphate and its mode of action. *Nutr Cancer* **46**, 66-72.

Hadgraft J (2001) Skin, the final frontier. *Int J Pharm* **224**, 1-18.

Ishikawa T, Nakatsuru Y, Zarkovic M, Shamsuddin AM (1999). Inhibition of skin cancer by IP₆ in vivo: initiation-promotion model. *Anticancer Res* **19**, 3749-3752.

Moore KL, Dalley AF (2002) En *Anatomía con orientación clínica*. Editorial médica panamericana, Madrid.

Potts RO, Bommannan D, Bommi G, Richard H (1992) Percutaneous absorption. *Pharmacol Skin*, 13-27.

Saunal H (1988) Skin absorption promoters. *Bull Techn Gattefosse* **81**, 11-15.

Scheuplein RJ, Blank IH (1971) Permeability of the skin. *Physiol Rev* **51**, 702-747.

Sweeny TM, Downing DT (1970) The role of the lipids in the epidermal barrier to water diffusion. *J Invest Dermatol* **55**, 135-140.

Uezen C, Posternak ME, Bustelo O, Graz S (1998) Ácido fítico en dermatología. *Act Terap Dermatol*, 1-3.

Vincent SP, Lehn JM, Lazarte J, Nicolau C (2002) Transport of the highly charged myo-inositol hexakisphosphate molecule across the red blood cell membrane: a phase transfer and biological study. *Bioorg Med Chem* **10**, 2825-2834.

Wise A (1986) En *Phytic acid chemistry and applications*. Pilatus Press, Minneapolis.

Resultados y discusión: Artículo original I

Grases F., Costa-Bauza A., Perello J., Isern B., Vucenik I., Valiente M., Muñoz J.A., Prieto R.M. Influence of concomitant food intake on the excretion of orally administered myo-inositol hexaphosphate (InsP₆) in humans. *Journal of Medicinal Food* 9, 72-76 (2006).

Resultados y discusión: Artículo original II

Grases F., Perelló J., Isern B., Prieto R.M. Study of the absorption of myo-inositol hexakisphosphate (InsP₆) through the skin. Biological and Pharmaceutical Bulletin 28, 764-767 (2005).

Conclusiones

Conclusiones

Estudio de la absorción de fitato ingerido oralmente

1. Los valores urinarios basales de fitato después de seguir durante 15 días una dieta pobre en fitato son claramente inferiores a los encontrados cuando se consume una dieta normal en fitato.
2. No existen diferencias estadísticas en los valores de excreción de fitato al comparar tres condiciones de estómago diferentes: a. estómago vacío, b. estómago vacío y pH basificado y c. estómago lleno.
3. Este último resultado indica que la absorción de fitato no tiene lugar solamente a nivel estomacal, así como se creía, sino que también ocurre durante el tránsito intestinal, independientemente de la existencia o no de un transportador específico.

Estudio de la absorción de fitato administrado tópicamente

1. El fitato aplicado tópicamente se absorbe a través de la piel, llega al torrente sanguíneo y es expulsado, finalmente, a través de la orina.
2. Existe una relación entre la concentración de fitato en la crema y la concentración de fitato excretado en la orina.
3. El fitato administrado en forma de sal sódica se adsorbe en mayor cantidad que la fitina (sal cálcico-magnésica) debido a su mayor solubilidad.
4. Para ambas sales, existe un máximo de absorción por encima del cual ya no se excreta más fitato a través de la orina.
5. Una vez cesa la aplicación tópica de fitato sus valores urinarios descienden rápidamente (si bien siguen siendo valores detectables) durante unos 10 días y después se estabilizan.
6. Los niveles urinarios de fitato alcanzados mediante la administración tópica son unas diez veces superiores a los que se consiguen mediante la administración de fitato dietético.

Capítulo 5

*Estudio a largo plazo de una dosis elevada de
fitato y biodisponibilidad de elementos
minerales*

Introducción

Introducción

La importancia de la biodisponibilidad de minerales es tal que la exposición a situaciones de carencia provoca estados de enfermedad, los cuales pueden incluso conducir a la muerte. Para poder comprender cómo y por qué ciertas sustancias pueden afectar a esta biodisponibilidad de elementos minerales es necesario primero conocer la manera en que estos elementos pasan a formar parte del organismo.

Evidentemente, la fuente de procedencia más importante de los elementos minerales que se encuentran en el organismo es la ingesta, es decir, el agua y la comida. Entonces, es necesario saber como estos bioelementos son absorbidos por el organismo. En primer lugar, se hará una breve descripción de la fisiología del tubo digestivo, y después se describirán los mecanismos de absorción de calcio, magnesio, hierro, zinc y manganeso, comentando, además, su función e importancia.

Aspectos básicos de la fisiología del aparato digestivo

El tubo digestivo está formado por la boca, esófago, estómago, intestino delgado (formado por el duodeno, yeyuno e íleon), intestino grueso (formado por el ciego, colon y recto) y ano. Otras estructuras del tubo digestivo son las glándulas salivales, páncreas, hígado y vesícula biliar, todas ellas con funciones de secreción de diversas sustancias. La finalidad última del aparato digestivo es la digestión (el objetivo de la cual es convertir los alimentos en moléculas absorbibles por el organismo) y absorción de los alimentos (que es el movimiento de nutrientes, agua y electrolitos desde el lumen del intestino hasta la sangre).

En la boca los alimentos son masticados y mediante las enzimas de la *saliva*, tiene lugar la digestión inicial de almidones y lípidos. Además, los alimentos son diluídos y amortiguados, ya que en ciertos casos pueden ser nocivos. También ha de considerarse que la lubricación con moco de los citados alimentos ayuda a su desplazamiento a través del esófago.

Mediante el esófago, el bolo alimenticio pasa desde la boca, a través de una serie de movimientos peristálticos, hasta el estómago.

En el estómago, las células de la mucosa gástrica secretan el *jugo* gástrico, formado principalmente por cuatro componentes: ácido clorhídrico (HCl), pepsinógeno, factor intrínseco

y moco. El pepsinógeno es una enzima que se encuentra en su forma inactiva, y que gracias al HCl, que da lugar a valores de pH del orden de 1-2, pasa a su forma activa, la pepsina, que es una proteasa que empieza la digestión de las proteínas. El factor intrínseco es necesario para absorber la vitamina B₁₂ en el íleon y el moco protege la mucosa gástrica de la acción corrosiva del HCl y además lubrica el contenido gastrointestinal.

El punto siguiente en el tubo digestivo es el intestino delgado, que comienza en el duodeno; allí, el páncreas secreta aproximadamente 1l de líquido diario. Este líquido pancreático tiene dos porciones: una acuosa, rica en bicarbonato (HCO₃⁻), que tiene por objetivo neutralizar el ácido clorhídrico procedente del estómago, y la otra es una porción enzimática para poder digerir los hidratos de carbono, proteínas y lípidos, y convertirlos en moléculas absorbibles. Además, para la digestión y absorción de lípidos es necesaria la *bilis*, producida por el hígado. Los ácidos biliares emulsifican los lípidos y los preparan para la digestión; después solubilizan los productos de la digestión de los lípidos por formación de micelas. Todos los nutrientes absorbidos pasan al torrente sanguíneo y desde allí se reparten hasta los diferentes órganos y tejidos.

Finalmente, todo lo que no ha podido ser absorbido llega al ano y es expulsado a través de las heces.

Absorción

Ya se ha comentado que la absorción es el paso de nutrientes, agua y electrolitos desde el lumen del intestino hasta la sangre.

La mayor parte de los nutrientes son absorbidos en el intestino, pero ciertas sustancias, como por ejemplo ácidos orgánicos, pueden ser absorbidos en el estómago. Este es el caso de la aspirina (figura 5.1.), que tiene un valor de pKa de 3.5 y dentro del estómago (pH ≈ 1-2) se halla en forma no ionizada, y por tanto es liposoluble y puede difundir a través de la membrana lipídica. Una vez atravesada esta barrera el pH del entorno es prácticamente neutro y la forma en que se halla el ácido acetilsalicílico es la desprotonada y por lo tanto no es posible que vuelva a entrar en el lumen estomacal. Además, el hecho de que se desprotone hace que la difusión de la forma protonada desde el estómago en todo momento mantenga un gradiente positivo y la aspirina pueda continuar siendo absorbida.

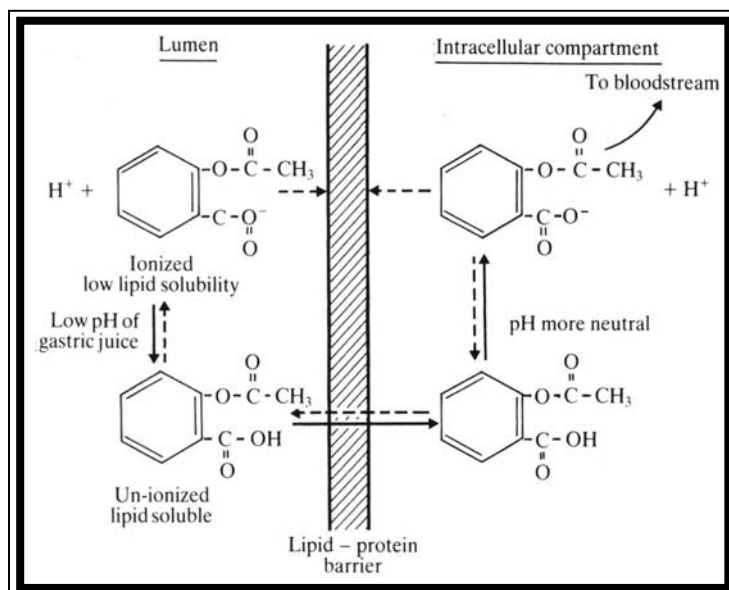


Figura 5.1.- Absorción de la aspirina desde el lumen estomacal.

Las vías de absorción son dos:

- Vía celular: la sustancia en cuestión ha de atravesar la membrana luminal, entrar en la célula epitelial del intestino y desde allí pasar al torrente sanguíneo atravesando la membrana basolateral. En ambas membranas, los transportadores se encargan del proceso de absorción.
- Vía paracelular: no es necesario que las sustancias entren dentro de las células epiteliales intestinales para llegar al torrente sanguíneo, sino que pasan a través de las llamadas *uniones estrechas* entre los espacios intersticiales de las células epiteliales.

La estructura de la mucosa intestinal es ideal para absorber grandes cantidades de nutrientes, ya que se consigue aumentar el área aparente hasta 600 veces mediante un sistema de *pliegues*, *vellosidades* y *microvellosidades* (estos pliegues se ven en la figura 5.2.). La superficie del intestino delgado se dispone en una serie de pliegues longitudinales, llamados *pliegues de Kerckring*. De estos pliegues se proyectan unas vellosidades digiformes recubiertas de células epiteliales, cuya superficie apical se amplia aún más gracias a otros pliegues llamados *microvellosidades*.

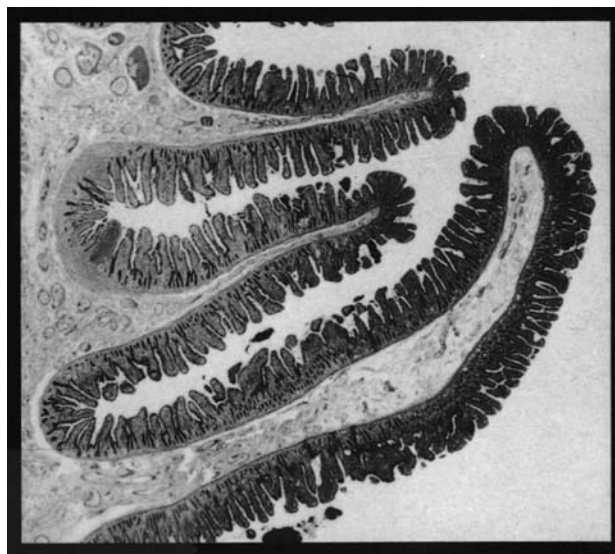


Figura 5.2.- Estructura de la mucosa intestinal. Imagen obtenida por micrografía de luz.

Los procesos que intervienen en la absorción de minerales son complejos y multifactoriales. Esta absorción depende del estado de oxidación del metal y de la presencia de elementos competitivos, ligandos o agentes quelatantes. Así, por ejemplo, el hierro se absorbe principalmente en forma de Fe^{2+} . Muchos agentes quelatantes tienen como misión estabilizar un determinado estado de oxidación. Otros ligandos, pueden formar complejos insolubles disminuyendo la absorción del metal en cuestión.

Absorción de calcio

El calcio es el catión más abundante del organismo y el quinto elemento inorgánico más abundante del cuerpo humano y sirve como componente principal del esqueleto. Además, juega un papel muy importante en muchos procesos fisiológicos y bioquímicos, hasta tal punto que el mantenimiento de su concentración plasmática dentro de un estrecho intervalo de concentraciones es crítico para la vida. Una absorción inadecuada de calcio produce raquitismo. La homeostasis del calcio, con la finalidad de mantener estos niveles plasmáticos se explica en el capítulo 7.

La absorción de calcio en humanos tiene lugar principalmente en el intestino delgado, siendo los mecanismos más efectivos en el duodeno. No obstante, también tienen lugar importantes absorciones en otras porciones del intestino.

La absorción intestinal de calcio depende de la presencia de la forma activa de la vitamina D (1,25-dihidroxicolecalciferol) (ver capítulo 7). La vitamina D promueve la absorción intestinal favoreciendo la síntesis de *calbindina D28K*, una proteína de unión a calcio (calcium-binding-protein, CaBP), en las células epiteliales del intestino.

Absorción de magnesio

El magnesio es el cuarto catión más abundante del cuerpo y el catión divalente intracelular más abundante, hecho que apunta su esencial función celular, como cofactor para una variedad de reacciones enzimáticas, tales como las transferencia de grupos fosfato procedentes de nucleótidos trifosfato de alta energía. También está implicado en el mantenimiento de potenciales eléctricos de membrana, transmisión del código genético a través de su acción sobre la estructura y función del ADN y ARN, neurotransmisión y contracción muscular. Su déficit da lugar a contracturas musculares, temblores en los músculos, intranquilidad...

La absorción de magnesio se da principalmente en el colon, en el caso de las ratas, mientras que en humanos el lugar principal de absorción es el íleon y el yeyuno. Los procesos que regulan la absorción intestinal de magnesio todavía no se comprenden en su globalidad. Se han comentado tanto mecanismos de difusión pasiva como de transporte activo. A pesar de que en ocasiones se ha asociado la vitamina D con la absorción de magnesio, parece que éste no es más que un efecto indirecto debido a cambios en el transporte de calcio y fosfato, ya que se han descrito interacciones complejas entre ambos y el magnesio (en el capítulo 7 se comenta el efecto de la vitamina D sobre el calcio y el fosfato).

Absorción de hierro

El hierro actúa en el transporte de oxígeno en la sangre y en el almacenamiento de oxígeno en los músculos y en las enzimas energéticas. Estados de déficit de este elemento conducen a anemia, cansancio, trastornos en el metabolismo energético, trastorno del sistema inmune, aumento del riesgo de infecciones...

Se absorbe a través de la membrana apical de las células epiteliales del intestino delgado (principalmente en el duodeno) mediante dos mecanismos diferentes:

- Mecanismos de transporte de hierro hemo: el grupo hemo se libera en el intestino delgado procedente de la hemoglobina o mioglobina. Este grupo hemo captura el hierro por formación de un quelato el cual o bien se liga a un receptor hemo en la superficie de las microvellosidades o bien entra directamente en la membrana lipídica debido a su elevada liposolubilidad. Ambos mecanismos están descritos y comprobados. Una vez dentro de la célula, una hemo oxigenasa liga el grupo hemo y libera el hierro, el cual se asocia a ferritina y se transporta a la superficie basolateral.
- Mecanismos de absorción de hierro libre: el mecanismo exacto de absorción de hierro no unido a un grupo hemo no se conoce, pero se conocen ciertos mecanismos que controlan el transporte de hierro a través de la mucosa. El esquema de la absorción intestinal de hierro se presenta en la figura 5.3. En la parte superior se muestran las fuentes de hierro procedentes de la dieta (Fe^{2+} , Fe^{3+} , hierro hemo y lactoferrina). La apotransferrina (Apo T_f) se transporta a unos lugares receptores de transferrina (TfR, rectángulos de negro). El hierro, presumiblemente en forma de ferritina, se dirige a través del receptor a la Apo T_f para formar una molécula de transferrina saturada de hierro (T_f-Fe , círculo parcialmente rellenado). En tamaño grande se muestra una célula con los dos mecanismos de absorción de hierro. Los supuestos receptores luminales de hierro no hemo (círculo negro) y de hierro hemo (triángulo negro) se muestran en esta célula. El mecanismo A dirige el hierro libre a la ferritina. El número de moléculas de TfR es regulado por el hierro. Como ya se ha dicho en el punto anterior, la absorción de hierro hemo es controlada por la actividad de la hemo oxigenasa, que libera el hierro.

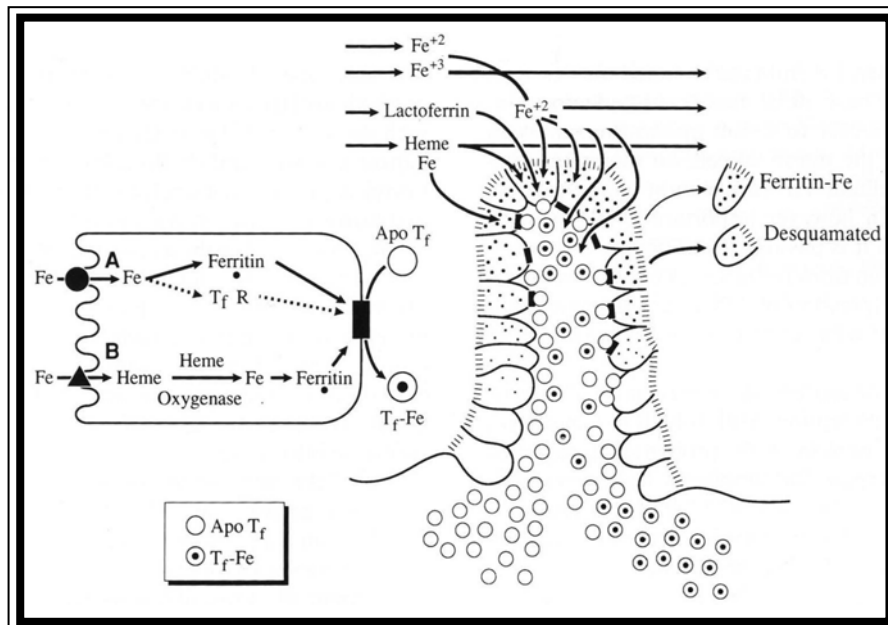


Figura 5.3.- Absorción intestinal de hierro.

Absorción de zinc

El zinc participa en los procesos de crecimiento, en el aparato reproductor, en el sistema inmune, en la síntesis de proteínas, en el proceso de cicatrización de heridas y además es un componente importante de muchas enzimas. Estados de carencia de zinc se han relacionado con la anorexia, dermatitis, alteraciones del sentido del gusto, retraso en el crecimiento...

Parece que la absorción de zinc a bajas concentraciones ocurre mediante algún transportador, ya que la absorción es saturable; a altas concentraciones de zinc la absorción no es saturable, cosa que hace pensar en un proceso de difusión pasiva. Durante la digestión el zinc se libera en el intestino, y allí forma complejos de bajo peso molecular con varios ligandos, como puedan ser aminoácidos, fosfatos y ácidos orgánicos. Estos complejos facilitan el reparto hacia la superficie luminal de las células de la mucosa. Una vez dentro de la célula, el zinc se asocia a proteínas de transporte, tales como la metalotioneína. Se sabe poco del transporte de zinc dentro de la célula, lo que sí se sabe es que su transporte a través de la superficie basolateral es un proceso dependiente de energía. Es posible que el zinc absorbido se pierda por descamación de las células de las microvellosidades.

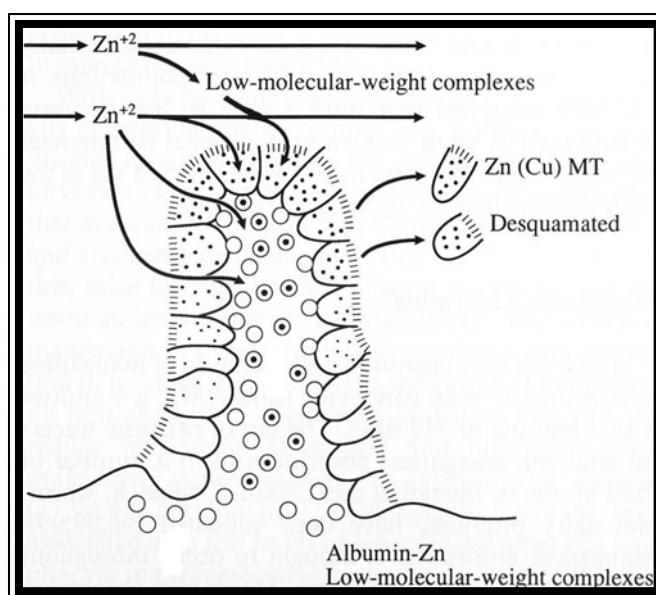


Figura 5.4.- Absorción intestinal de zinc.

Absorción de manganeso

El hecho de que se haya sugerido que el manganeso puede contribuir a ciertas enfermedades tales como la epilepsia, diabetes, osteoporosis y otras, ha despertado el interés por este elemento traza. Su toxicidad también es reconocida por el hecho de que puede causar importantes alteraciones en el sistema nervioso central.

Se cree que la absorción de manganeso tiene lugar a lo largo de todo el intestino delgado. A diferencia de otros minerales, no parece que la cantidad absorbida dependa de la cantidad ingerida, motivo por el cual se piensa que su homeostasis se regula principalmente a través de la excreción. No se tienen muy claros los mecanismos de absorción de manganeso, pero debido a la similitud con el hierro en lo referente a propiedades fisicoquímicas, parece que ambos oligoelementos podrían compartir mecanismos de absorción y transporte. Así, estudios con ratas han demostrado que una mayor ingesta de hierro a través de la dieta disminuye la absorción de manganeso, mientras que elevados niveles de manganeso en la dieta perjudican la absorción de hierro libre.

Bibliografía

Costanzo LS (1998). En *Fisiología*. McGraw-Hill Interamericana, México.

Johnson LR (1994). En *Physiology of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York.

Negretti V, Brätter P & Mohn L (1997). En *Minerales y oligoelementos*. Editorial Fundación Bertelsmann, Gütersloh.

Sanford PA (1992). En *Physiological Principles of Medicine Series. Digestive System Physiology*. Edward Arnold. A division of Hodder & Stoughton, London, Melbourne, Auckland.

Resultados y discusión: Artículo original

Grases F., Simonet B. M., Perelló J., Costa-Bauzá A., Prieto R. M. Effect of phytate on element bioavailability in the second generation of rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 17, 229-234 (2004).

Conclusiones

Conclusiones

1. El contenido óseo de zinc es significativamente menor en el grupo tratado con la dieta AIN-76A + fitato sódico (tanto en el caso de los machos como las hembras) comparado con el grupo tratado solamente con la dieta AIN-76A.
2. A pesar de esta disminución en el contenido en el hueso de zinc, esto no supone un problema de biodisponibilidad. El contenido óseo de zinc puede sufrir importantes variaciones dependiendo de las cantidades de calcio, zinc, fosfato y probablemente otros componentes de la dieta. A partir de la determinación de zinc en hueso de ratas que consumían una dieta normal estándar (UAR-A04) se obtuvieron valores 10 veces inferiores a los encontrados con la dieta AIN-76A (valores que además coinciden con los dados por otros autores). Por tanto, la disminución de zinc en el hueso del grupo de ratas tratadas con fitato sódico podría suponer un efecto regulador por parte del fitato sobre la biodisponibilidad de zinc.
3. A pesar de que se encontraron diferencias estadísticas en los contenidos de zinc en el resto de órganos (en el caso de las hembras) y sólo en los testículos (en el caso de los machos), observando los valores concretos se puede concluir que estas diferencias no son en ningún caso importantes.
4. Existen diferencias estadísticas del grupo tratado con la dieta AIN-76A + fitato sódico respecto al control (sólo dieta AIN-76A) en el manganeso del corazón de las hembras, así como en el magnesio óseo y el hierro hepático de los machos. No se puede hablar, sin embargo, de un problema de biodisponibilidad, ya que, por ejemplo, en el caso del manganeso, la cantidad excretada a través de la orina es mayor en el grupo tratado que en el control.
5. En general, se puede considerar que los resultados del presente estudio demuestran que una dieta con un 1 % de fitato (en forma de fitato sódico) no causan alteraciones en la biodisponibilidad mineral en la segunda generación de ratas.

Capítulo 6

*El myo-inositol hexafosfato previene
calcificaciones distróficas en tejidos blandos*

Introducción

Introducción

Podemos considerar la piel como el órgano más extenso del cuerpo, y está clasificada como una membrana, la *membrana cutánea*, que rodea las estructuras orgánicas (tejidos y órganos) y las sustancias vitales (sobre todo, líquidos).

La piel ofrece:

1. Protección al organismo frente al medio exterior.
2. Regulación térmica a través de las glándulas sudoríparas y de los vasos sanguíneos.
3. Sensibilidad a través de los nervios superficiales y sus terminaciones sensitivas.

En la figura 6.1. se muestra la estructura de la piel, la cual se describe a continuación.

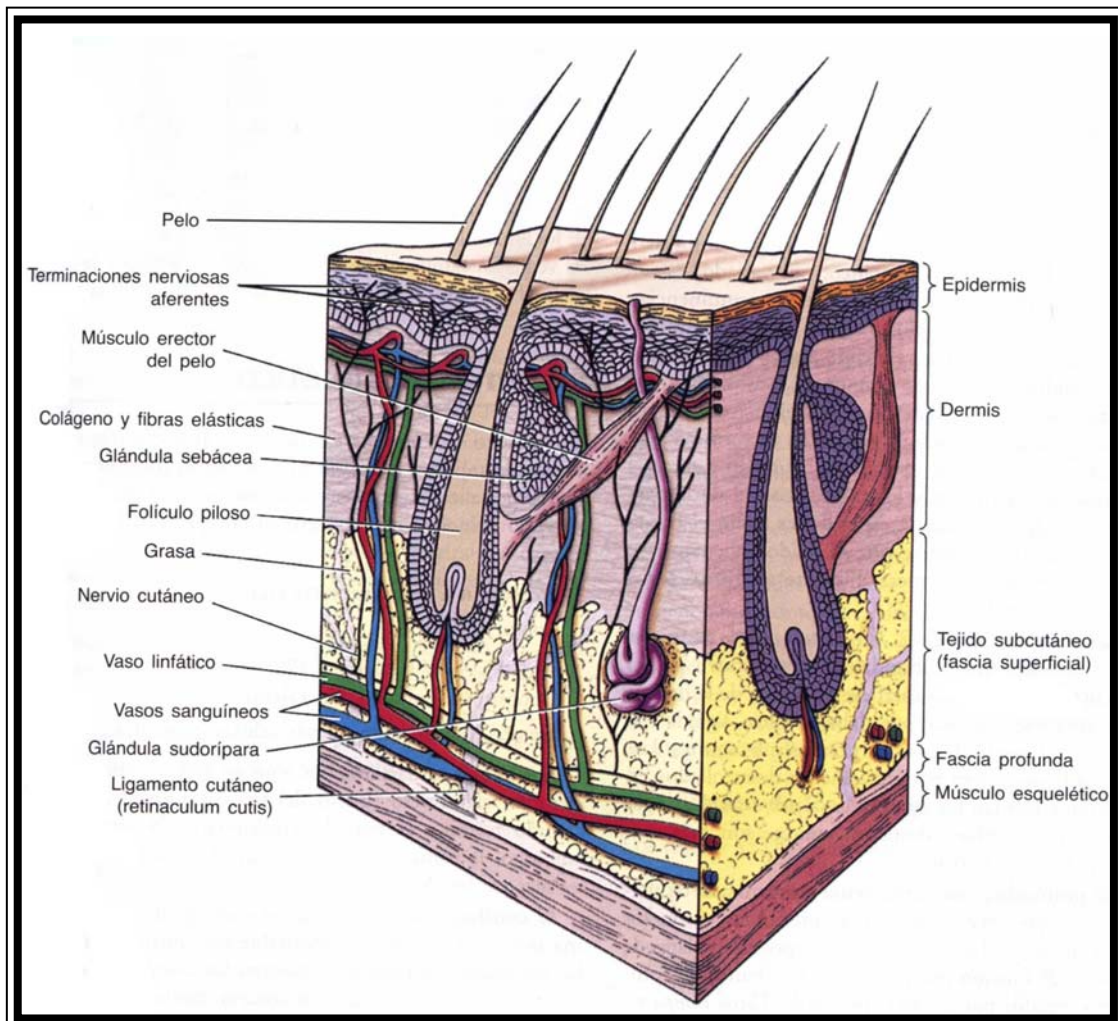


Figura 6.1.- Estructura de la piel

Estructura general de la piel

La piel o integumento está formada por tres capas: la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo. Las dos primeras capas forman el cutis, mientras que la tercera constituye lo que se llama el subcutis.

Epidermis

Se trata de una capa superficial de células y es totalmente avascular (no tiene vasos sanguíneos ni linfáticos) y se nutre de la capa inferior, la dermis, la cual sí está irrigada por vasos sanguíneos. A esta capa llegan terminaciones nerviosas aferentes, que la hacen sensible al tacto, al dolor y a la temperatura.

En la epidermis se distinguen tres capas: la *capa regenerativa*, que es la capa basal (la más interna), la *capa queratinizada* i la *capa córnea (estrato córneo)*, formada por las células epiteliales superficiales y que se van desprendiendo por descamación, siendo la mayor parte de ellas células muertas.

Dermis o corion

La dermis es una capa más profunda de tejido conjuntivo. Contiene folículos pilosos, con sus músculos lisos y glándulas sebáceas. También encontramos las glándulas sudoríparas (que llegan hasta la epidermis) y que mediante la evaporación de agua mantienen la temperatura corporal.

En la dermis encontramos fibras de colágeno y elásticas entrelazadas que dan a la piel una tensión característica y elasticidad. Según la disposición de las fibras, encontramos una *capa o estrato papilar* (que limita con la epidermis) y una *capa reticular* (que es la capa más profunda).

Tejido subcutáneo o subcutis

Por debajo de la dermis encontramos el tejido subcutáneo, que se compone de tejido conjuntivo laxo y adiposo. Se trata de un tejido regulador de la temperatura, además de protector (por ejemplo de las prominencias óseas en las nalgas). Este tejido contiene nervios cutáneos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y glándulas sudoríparas. En toda la extensión del tejido subcutáneo encontramos los ligamentos de la piel, que son unas pequeñas bandas fibrosas y abundantes, y su función es unir la superficie profunda de la dermis con la fascia profunda. Son precisamente estos ligamentos los que permiten mover la piel sobre las estructuras que hay por debajo de ella.

Por debajo del tejido subcutáneo se halla la fascia profunda; se trata de una capa densa de tejido conjuntivo que rodea las capas inferiores de músculo esquelético y que ya no se considera parte de la piel. Dentro de la estructura de la fascia profunda se crean *compartimentos fasciales*, que pueden contener o dirigir, por ejemplo, la propagación de una infección o de un tumor.

El proceso de calcificación subcutánea

En los dos trabajos que integran el presente capítulo, se llevan a cabo dos inyecciones subcutáneas, una a cada lado de la región interscapular en ratas Wistar. En la figura 6.2. se muestra una representación esquemática de una inyección subcutánea; el líquido, 200 μ l de KMnO_4 al 0.1 %, es inyectado en el subcutis, justo por debajo de la epidermis y la dermis.

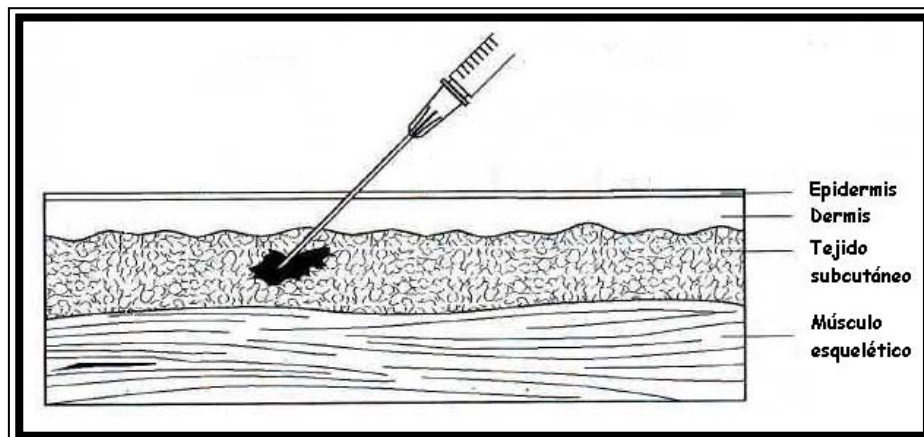


Figura 6.2.- Inyección subcutánea

Como es bien sabido, el permanganato es un poderoso oxidante y provoca una necrosis celular local donde es inyectado. Las células muertas son materia orgánica que actúa como un potente nucleante heterogéneo de la cristalización, y por lo tanto, acaban formándose placas de fosfato cálcico (hidroxiapatita), como se ve en la figura 6.3, que quedan insertadas dentro de la capa de tejido subcutáneo (posiblemente invadiendo también parte de la dermis) y que son totalmente visibles para su escisión una vez concluido el estudio.

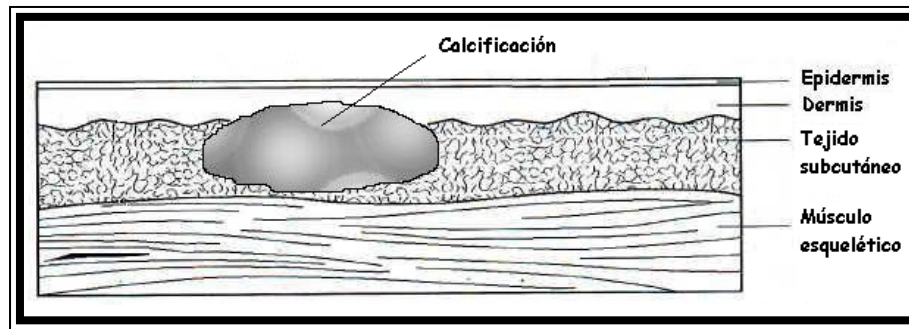


Figura 6.3.- Calcificación de hidroxiapatita que ha crecido sobre las células necrosadas.

Hipótesis

Se ha comentado reiteradamente en esta tesis que el fitato, debido a su afinidad por los iones calcio y a su capacidad para adsorberse sobre los cristales o núcleos cristalinos en crecimiento, es un potente inhibidor de la cristalización de sales cálcicas. También ya se ha explicado que las placas inducidas en estos dos estudios por la inyección de permanganato potásico se generan por la nucleación heterogénea de fosfato cálcico sobre la materia orgánica necrosada presente en la región donde se inyecta el permanganato. Entonces, la hipótesis planteada es que el fitato, suministrado a través de dos vías diferentes, sería capaz de inhibir el desarrollo de dichas placas.

□ Se ha demostrado tanto en ratas (*Grases et al., 2000*) como en humanos (*Grases et al., 2001*) que existe una relación entre la ingesta oral de fitato y su excreción urinaria. Se ha demostrado también que existe una buena correlación entre los niveles plasmáticos de fitato y su excreción urinaria dos horas antes de la recogida de la muestra sanguínea, quedando así claro que la concentración de fitato en orina es un buen indicador del estatus de fitato del organismo. Conociendo estos aspectos, en el primer trabajo de este capítulo se pretende averiguar si el fitato dietético, suministrado en una dosis del 1 %, es capaz de inhibir el desarrollo de las calcificaciones distróficas antes explicadas.

□ Al resultar satisfactorios los resultados del experimento anterior se planteó la siguiente duda: si el fitato dietético puede inhibir el desarrollo de calcificaciones subcutáneas, debido a que se absorbe en el tracto gastrointestinal y pasa a la sangre, desde donde es capaz de llegar a la región afectada, ¿podría mostrar el mismo efecto al suministrarse a través de una crema por vía tópica? Como ya sabemos (ver capítulo 4), el fitato puede atravesar las diferentes capas de la piel y, en consecuencia, también podría inhibir de forma importante el desarrollo de las calcificaciones subepiteliales mostrando de esta manera un efecto local.

Bibliografía

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.

Grases F, Simonet BM, Vucenik I, Prieto RM, Costa-Bauzá A, March JG, Shamsuddin AM (2001) Absorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP6 or phytate) in humans. *BioFactors* **15**, 53-61.

Krstic RV (1989). En *Los tejidos del hombre y de los mamíferos*. Editorial Interamericana, McGraw Hill, Madrid.

Leonhard H (1991). En *Atlas de Anatomía*. Ediciones Omega, Barcelona.

López M (1986). En *Nou Atlas d'Anatomia Humana*. Editorial Ariel, Barcelona.

Moore KL, Dalley AF (2002). En *Anatomía con orientación clínica*. Editorial médica panamericana, Madrid.

Thibodeau GA, Patton KT (2000). En *Panatomía y fisiología*. Ediciones Harcourt, Madrid.

Resultados y discusión: Artículo original I

Grases F., Perelló J., Prieto R. M., Simonet B. M., Torres J. J. Dietary myo-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues in a pilot study in Wistar rats. *Life Sciences* 75, 11-19 (2004).

Resultados y discusión: Artículo original II

Grases F., Perelló J., Isern B., Prieto R.M. Study of a myo-inositol hexaphosphate based cream to prevent dystrophic calcinosis cutis. *British Journal of Dermatology* 152, 1022-1025 (2005).

Conclusiones

Conclusiones

Estudio del efecto inhibidor del fitato dietético

1. Los niveles plasmáticos de InsP_6 para el grupo control (dieta 4068.02) y el grupo tratado con la misma dieta y etidronato son más de 10 veces inferiores a los de los grupos tratados con InsP_6 (en forma de sal sódica, 1 % de la dieta) y con germen de garrofín (6 % de germen que corresponde a un 0.12 % de InsP_6).
2. Se observa que los niveles plasmáticos de InsP_6 son similares en el grupo tratado con InsP_6 y el grupo tratado con germen de garrofín (diferentes formas de administrar fitato) aspecto que confirma que existe un valor máximo en tejidos y fluidos biológicos por encima del cual no se absorbe más fitato a nivel intestinal, y que hay, por lo tanto, una cantidad de InsP_6 ingerida óptima.
3. El tamaño de las placas de hidroxapatita es significativamente inferior en el caso de los grupos tratados con InsP_6 (en forma de sal sódica) y con germen de garrofín respecto a los grupos control y tratado con etidronato.
4. Este último hecho implica que el InsP_6 a concentraciones plasmáticas normales puede inhibir la cristalización de la hidroxapatita en tejidos blandos y ello se debe atribuir a la capacidad inhibidora de la cristalización de sales cálcicas por parte del InsP_6 , demostrándose así claramente la importancia de esta sustancia en la prevención de calcificaciones patológicas.

Estudio del efecto inhibidor del fitato suministrado por vía tópica

1. Los niveles urinarios de InsP_6 para el grupo tratado con la crema rica en fitato son mucho mayores a los niveles encontrados en el grupo control, hecho que demuestra de una forma clara e indiscutible que el fitato puede absorberse a través de la piel, igual que lo hace a través de las células epiteliales intestinales.
2. Los valores urinarios encontrados para el grupo tratado con la crema rica en fitato son un orden de magnitud superiores a los encontrados para ratas tratadas con una dieta con un 1 % de fitato.
3. El tamaño de las placas de hidroxiapatita es significativamente inferior en el caso del grupo tratado con la crema rica en fitato, siendo los efectos muchos más importantes en comparación con los resultados encontrados cuando el fitato se administra por vía oral.
4. Este último hecho implica que el InsP_6 suministrado por vía tópica presenta un efecto inhibidor local y por tanto reduce de forma drástica el tamaño de las placas de hidroxiapatita inducidas a nivel subcutáneo.

Capítulo 7

*Estudio de los efectos del fitato potásico sobre
la disminución del calcio urinario en ratas*

Introducción

Introducción

Homeostasis del calcio

La homeostasis del Ca^{2+} es el resultado de la acción coordinada de tres órganos (hueso, riñón e intestino) y de tres hormonas (la hormona paratiroidea -PTH-, la calcitonina y la vitamina D) (Costanzo, 1998). Esta relación es la que se muestra en la figura 7.1.

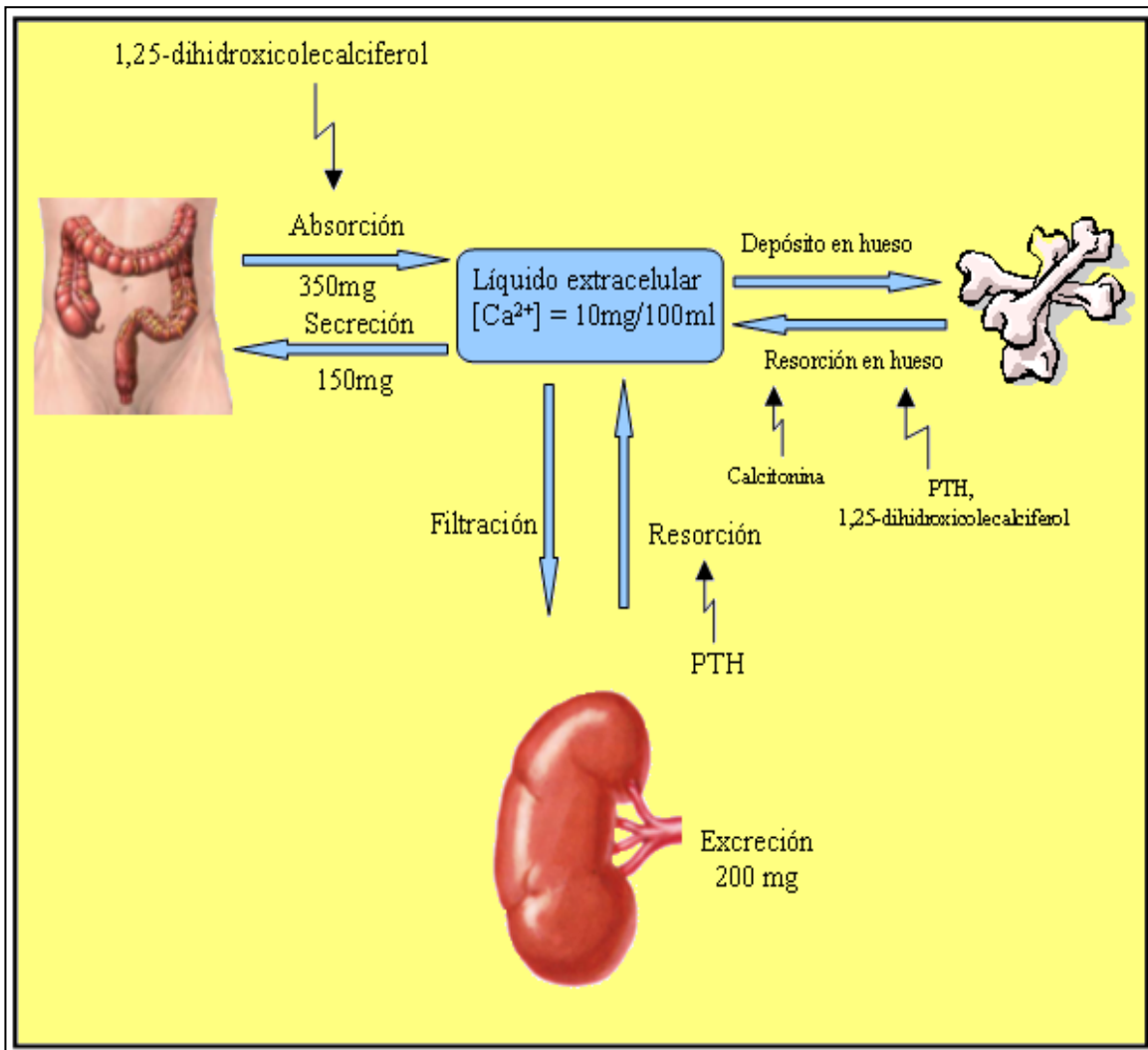


Figura 7.1.- Homeostasis del Ca^{2+} en un adulto que ingiere 1000 mg/día de Ca^{2+} elemental. Se muestran los efectos de las hormonas sobre la absorción de Ca^{2+} en el tubo digestivo, remodelación ósea y resorción de Ca^{2+} en el riñón.

La figura correspondería a una persona con un equilibrio correcto de calcio, donde la cantidad absorbida es igual a la excretada. Si suponemos un individuo que ingiere 1000 mg de calcio por día, sólo 350 mg son absorbidos en el intestino y además unos 150 mg son secretados (ya que las secreciones digestivas contienen calcio).

Luego, globalmente sólo el 20% del calcio de la dieta es absorbido por el organismo; es lo que se conoce como absorción real. El resto se excreta a través de las heces.

Para mantener una buena homeostasis del calcio, la cantidad de calcio expulsada por los riñones a través de la orina debe ser igual a la absorción intestinal real; a pesar de ello, la remodelación ósea es continua, con formación de hueso nuevo y resorción del hueso viejo.

La acción de las tres hormonas antes citadas se comenta brevemente.

➤ Hormona paratiroidea: tiene por función la regulación de la concentración de Ca^{2+} en el líquido extracelular (plasma o suero). Cuando la concentración plasmática de Ca^{2+} libre (ya que también hay calcio ligado a proteínas o formando complejos solubles) 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.

Como se puede observar en la figura 7.2., cuando la concentración plasmática de calcio disminuye por debajo de los 10mg/100ml la producción de PTH se estimula notablemente, hasta llegar a una tasa máxima para un valor de 7.5mg/100ml.

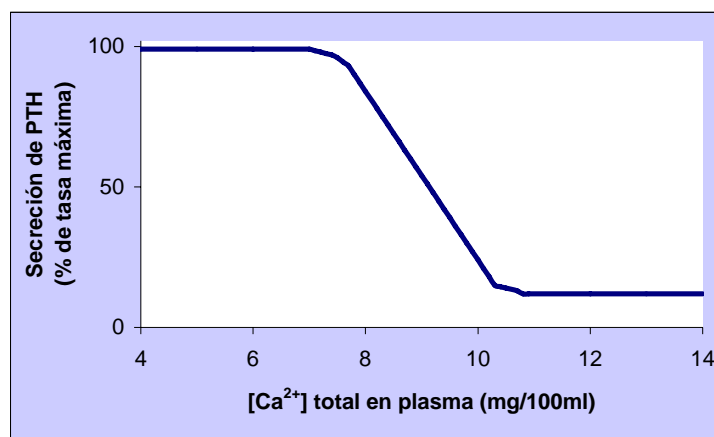


Figura 7.2- Relación entre la concentración plasmática de Ca^{2+} y la secreción de PTH.

1. *Acción de la PTH sobre el hueso:* la PTH estimula la osteólisis en los osteocitos y provoca la disolución de la superficie del hueso por estimulación de los osteoclastos y la supresión de la función de los osteoblastos. Así, se libera calcio y fosfato en el líquido extracelular. Los efectos de la PTH no pueden explicarse por sí solos el aumento de la concentración de calcio plasmático, ya que el fosfato liberado forma complejos con el calcio y limita el aumento de la concentración de calcio ionizado, por lo tanto debe haber un mecanismo coordinado (acción fosfatúrica de la PTH) a la resorción del hueso.
2. *Acción de la PTH sobre el riñón:* la hormona paratiroidea aumenta la resorción de Ca^{2+} en el tubo contorneado distal, aumentando la calcemia.
3. *Acción de la PTH en el intestino delgado:* no tiene ninguna acción directa, pero sí tiene una acción indirecta estimuladora de la absorción intestinal de Ca^{2+} a través de la activación de la vitamina D, ya que la PTH estimula la 1α -hidroxilasa renal, que convierte el 25-hidroxicoalciferol en 1,25-dihidroxicoalciferol (forma activa de la vitamina D). A su vez, la vitamina D estimula la absorción intestinal de Ca^{2+} .

Como proceso global se ha de decir que aumenta la calciuria, ya que a pesar de que se reabsorbe más calcio a nivel renal, también se filtra más ya que en la sangre hay más debido a la resorción ósea y al aumento de la absorción intestinal. En la figura 7.3. se muestra el esquema de la acción de la PTH.

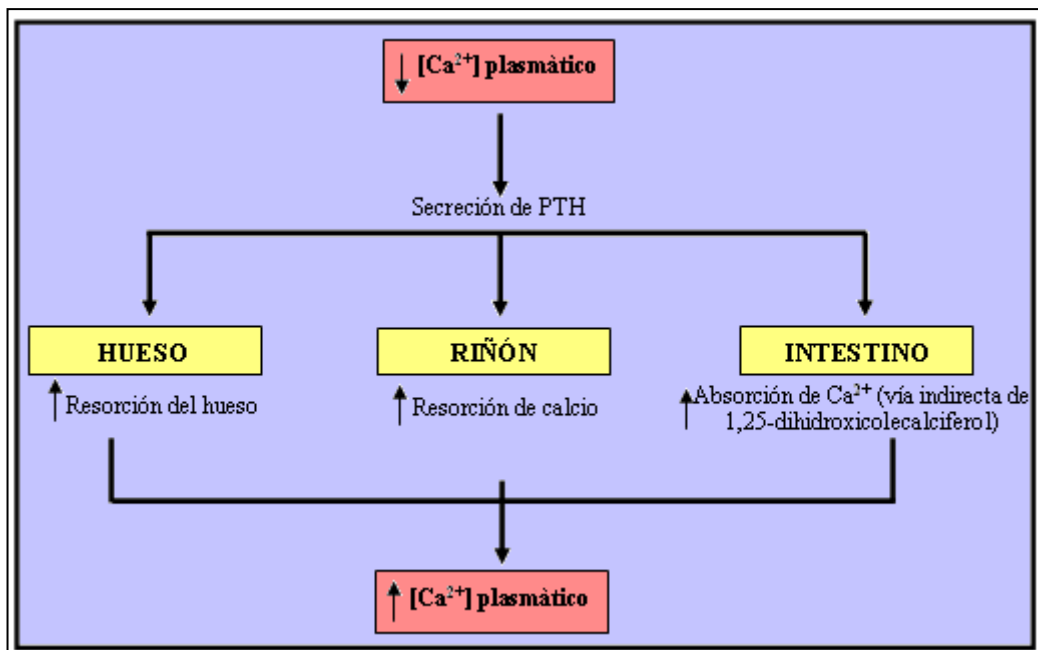


Figura 7.3.- Regulación de la secreción de PTH y las acciones de la PTH sobre hueso, riñón e intestino.

➤ Calcitonina: es una hormona sintetizada en las células parafoliculares de la glándula tiroides, y su principal función es la disminución de la calcemia a través de la inhibición de los osteoclastos del hueso, evitando así la resorción ósea.

➤ Vitamina D: tal y como se muestra en la figura 7.4., la vitamina D (colecalfiferol) tiene dos procedencias: puede venir directamente a través de la dieta, o puede ser sintetizada en la piel a partir del 7-dehidrocolesterol (en presencia de luz ultravioletada). En el hígado, la vitamina D se hidroxila en el carbono 25, dando 25-hidroxicolecalciferol (forma inactiva). En el riñón, la 1α -hidroxilasa hidroxila el carbono 1 dando 1,25-dihidroxicolecalciferol, forma activa de la vitamina D.

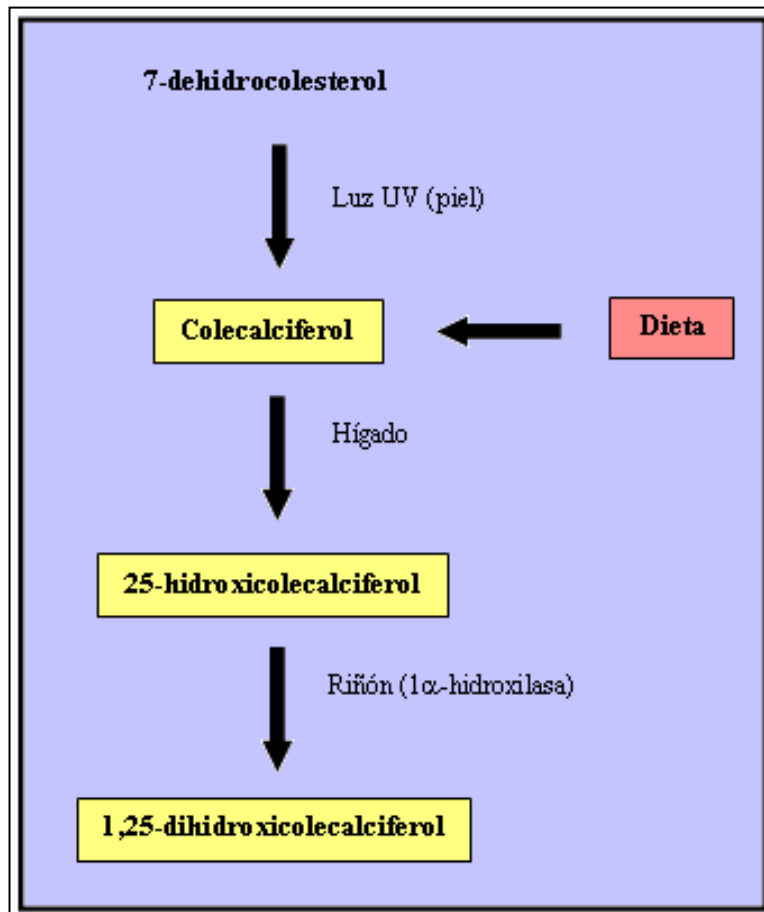


Figura 7.4.- Pasos implicados en la síntesis de 1,25-dihidroxicolecalciferol.

La acción de la vitamina D se puede resumir en los tres puntos siguientes:

1. *Acción de la vitamina D sobre el hueso:* igual que la PTH aumenta la actividad de los osteoclastos y por tanto la resorción del hueso, aumentando la concentración plasmática de calcio.
2. *Acción de la vitamina D en el riñón:* aumenta la resorción de Ca^{2+} aumentando la calcemia.
3. *Acción de la vitamina D en el intestino:* estimula la absorción intestinal de Ca^{2+} .

Igual que en el caso de la PTH, se ha de decir que globalmente aumenta la calciuria, ya que a pesar de que se reabsorbe más calcio a nivel renal, también se filtra más ya que en la sangre hay más debido a la resorción ósea y al aumento de la absorción intestinal.

Hipercalcemia

La hipercalcemia es un síndrome biológico definido como la excreción en orina de más de 0.1 mmol/kg/24 h de calcio en ausencia de restricciones dietéticas (*Audran & Legrand, 2000*). Un elevado número de enfermedades endocrinas, renales y óseas pueden causar hipercalcemia.

Son varios los tipos existentes de hipercalcemias:

Hipercalcemias secundarias

Hipercalcemia dietética

Se trata de una hipercalcemia debida a algún tipo de descontrol en la dieta. Son muchas las sustancias que, en situaciones de ingesta descontrolada pueden dar lugar a un aumento del calcio en la orina, desde el propio calcio, hasta el sodio, proteínas, azúcares, alcohol...

- La excreción urinaria de calcio es dependiente del calcio ingerido, ya que se admite que el 6-7 % del calcio alimenticio se excreta a través de la orina; entonces, a mayor ingesta, mayor excreción.

- A pesar de esto, las cosas no son tan elementales, ya que muchos otros factores juegan un papel importante. Por ejemplo, el cloruro sódico ingerido puede hacer aumentar la hipercalcemia, ya que el sodio disminuye la reabsorción tubular de calcio, haciendo que este se acumule en la orina.

- También existe una relación directa entre la hipercalcemia y la ingesta de proteínas animales. Los aminoácidos que contienen azufre (particularmente la metionina) son degradados y acaban dando sulfato. Éste prácticamente no se reabsorbe en los riñones, y forma productos insolubles con el calcio, previniendo así la reabsorción tubular de calcio. Además, los aminoácidos con azufre tienen un efecto directo en el túbulo renal que disminuye la reabsorción de calcio.

- La ingesta de grandes cantidades de carbohidratos y alcohol provoca un puntual incremento en los niveles de insulina en sangre, motivo por el cual disminuye la reabsorción tubular de calcio, provocando una hipercalcemia transitoria.

- Una deficiencia importante de fosfatos está asociada con la producción por parte del riñón de la forma activa de la vitamina D ($1,25[\text{OH}]_2$ vitamina D), que aumenta la absorción intestinal de calcio. Además, aparece un aumento de la resorción ósea en enfermos que presentan deficiencias tanto de fosfato como de calcio.

Existen otras formas de hipercalcemia secundaria, que aumentan el calcio urinario debido a que provocan un aumento en la absorción intestinal de calcio, de la velocidad de resorción ósea o una disminución de la reabsorción tubular de calcio.

Hipercalcemia idiopática

Se define así a la hipercalcemia que persiste después de la corrección de los desequilibrios alimenticios y que no presenta otra causa detectable o explicable.

En el año 1980 Pak propone una clasificación esquemática para la hipercalcemia idiopática:

Hipercalcemia absorptiva

Se puede clasificar en tres tipos:

- Tipo I: es debida a un aumento de la absorción intestinal de calcio causado por un incremento en la síntesis de vitamina D, cosa que conduce a una acumulación plasmática de calcio. Entonces, se bloquea la hormona paratiroidea (PTH) y disminuye la reabsorción tubular de calcio en el riñón, produciéndose entonces la hipercalcemia.
- Tipo II: se trata de la misma idea, pero en este caso el aumento en la absorción intestinal de calcio se provoca por un aumento en la sensibilidad a la vitamina D.
- Tipo III: una disminución en la reabsorción tubular renal de fosfato, da lugar a una hipofosfatemia (y consecuentemente a un aumento del fosfato urinario). Este hecho provoca una sobreproducción de vitamina D, la cual, a través de un aumento en la actividad osteoclástica, una disminución de la actividad osteoblástica y un aumento de la absorción intestinal de calcio, causa un aumento del calcio plasmático. Esto desencadena en una disminución de la producción de PTH la cual, mediante una disminución de la reabsorción tubular de calcio acaba dando lugar a hipercalcemia.

Hipercalcemia renal

Su causa es una disminución de la reabsorción tubular de calcio, provocando simultáneamente hipercalcemia e hipocalcemia. La respuesta del organismo para recuperar la homeostasis es aumentar la producción de parathormona. Esta disminuye la reabsorción tubular de fosfato provocando un aumento en la síntesis de vitamina D. Todos estos hechos acaban provocando un incremento de la absorción intestinal de calcio y de la resorción ósea, recuperando así la normocalcemia.

Hiperparatiroidismo primario

Si por algún motivo (hiperplasia, adenoma paratiroideo) aumenta de manera importante la producción de PTH, directa e indirectamente (a través de la disminución de la reabsorción de fosfato) aumenta la síntesis de vitamina D. Ambas hormonas conjuntamente son causa de una mayor absorción intestinal y resorción ósea de calcio, apareciendo entonces una concentración elevada de calcio en la sangre. Luego, cuando esta sangre se filtra en el glomérulo de la nefrona aporta más calcio (aumenta la carga filtrada de calcio) y ello es causa de hipercalcemia.

Actualmente, como tratamiento dietético de la hipercalcemia no se recomiendan restricciones severas en la ingesta de calcio, sino más bien una dieta normal en calcio, acompañada por un aumento de la ingesta de fluidos y una restricción en la ingesta de proteínas animales y sal (*Curhan et al., 1993; Curhan et al. 1997; Borghi et al. 2002*). Estas sencillas medidas pueden ser suficientes en el caso de una hipercalcemia dietética, pero en un número importante de casos es necesario recurrir al tratamiento farmacológico.

Hasta ahora, el tratamiento farmacológico más aceptado es el uso de diuréticos como las tiazidas (hidroclorotiazida, triclorotiazida, bendroflumetiazida) (*Yend & Cohanin, 1978; Brocks et al., 1981; Mortensen et al., 1986; Ettinger et al., 1988; Borghi et al., 1993; Martins et al., 1996*), indicadas en casos de hipercalcemia absorptiva de tipo I y II y para hipercalcemia renal. Éstas hacen disminuir el volumen de líquido extracelular. Luego, disminuye el índice de filtración glomerular y la carga filtrada, aumenta la reabsorción fraccional de calcio en el túbulo contorneado proximal y cae el calcio urinario (*Seldin & Giebisch, 1999a*). De todas formas, todo apunta que las tiazidas no afectan a la absorción intestinal de calcio, con lo cual se generan dudas sobre el destino del calcio retenido y sobre la efectividad a largo plazo de las tiazidas en el tratamiento de la hipercalcemia. Sin embargo, el mayor inconveniente que tienen estas sustancias reside en los efectos secundarios (hipopotasemia, hipocitraturia, hiperuricemia, uricosuria, impotencia).

También se han recomendado otros diuréticos como la indapamida (*Seldin & Giebisch, 1999b*). Un estudio revela el efecto hipocalcémico de esta sustancia. Además, parece que la lista de efectos secundarios de la indapamida no es tan severa como en el caso de las tiazidas.

Otros tratamientos pueden ser con ortofosfato o con fosfato de celulosa (*Ettinger, 1976; Breslau et al., 1998; Hautmann et al., 1978; Pak, 1979; Backman et al., 1980*):

- Ortofosfatos: disminuyen la síntesis de la vitamina D y además aumentan los inhibidores urinarios. Están indicados en el caso de hipercalcemia absorptiva pero efectos secundarios como aerofagia, diarrea y el hecho de que producen hiperocalcemia hacen que sea necesario continuar buscando nuevas alternativas.
- Fosfato de celulosa: fija el calcio intestinal evitando así que sea absorbido por parte del organismo. Está indicada para hipercalcemia absorptiva de tipo I, pero conduce a hipomagnesuria, hiperocalcemia y estreñimiento.

En los últimos años se han descrito efectos hipocalciúricos de la fibra procedente de la dieta (*Shah et al., 1980; Ohkawa et al., 1983; Ebisuno et al., 1986; Ebisuno et al., 1991*). Estos efectos se han asignado a la presencia del fitato (myo-inositol hexakisfosfato). El fitato es una molécula de peso molecular relativamente bajo y se trata de una sustancia polianiónica, motivo por el cual puede formar sales insolubles con iones divalentes como el calcio en el intestino, evitando así su absorción. Debemos tener en cuenta, sin embargo, que el fitato en la naturaleza se halla en forma de fitina (que es la sal magnésico cálcica). Si tenemos en cuenta este aspecto, se hace complicado entender el mecanismo de reducción de la absorción de calcio. Algunos autores (*Wu et al., 1994*) afirman que este supuesto efecto es debido a un intercambio del magnesio de la fitina por el calcio dietético, el cual desplazaría el magnesio y se absorbiría éste en vez del calcio.

También se ha utilizado el fitato en forma de sal sódica a elevadas dosis (8.8g/día) en pacientes litiasicos con hipercalcemia idiopática (*Henneman et al., 1958*), pero este hecho implica la ingesta no sólo de fitato, sino también de grandes cantidades de sodio, el cual es capaz de provocar hipertensión y además aumenta la hipercalcemia disminuyendo la reabsorción tubular de calcio, y contrarrestando así parte del efecto del fitato a nivel intestinal. Como consecuencia del interés adicional del fitato debido a su importante capacidad como agente inhibidor de la cristalización de sales cálcicas de oxalato y fosfato (*Grases & Costa-Bauzá, 1999; Grases et al., 2000a; Grases et al., 2000b*), en este capítulo se presenta un estudio del efecto del fitato potásico sobre la excreción de calcio urinario, comparándolo con otras sales de fitato.

Bibliografía

Audran M, Legrand E (2000) Hypercalciuria. *Joint Bone Spine* **67**, 509-515.

Backman U, Danielson BG, Johansson G, Ljunghall S, Wikstrom B (1980) Treatment of recurrent calcium stone formation with cellulose phosphate. *J Urol* **123**, 9-13.

Borghi L, Meschi T, Guerra A, Novanni A (1993) Randomized prospective study of a nonthiazide diuretic, indapamide, in preventing calcium stones recurrences. *J Cardiovasc Pharmacol* **22**, 78-86.

Borghi L, Schianchi T, Meschi T, Guerra A, Allegri F, Maggiore U, Novarini A (2002) Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med* **346**, 77-84.

Breslau NA, Heller HJ, Reza-Albarran AA, Pak CYC (1998) Physiological effects of slow release potassium phosphate for absorptive hypercalciuria: a randomized double-blind trial. *J Urol* **160**, 664-668.

Brocks P, Dahl C, Wolf H, Transbol I (1981) Do thiazides prevent recurrent idiopathic renal calcium stones? *Lancet* **2**, 124-125.

Costanzo LS (1998). In *Fisiología*, pp. 419-427. McGraw-Hill Interamericana, México.

Curhan GC, Willet WC, Rimm EB, Stampfer MJ (1993) A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N Engl J Med* **328**, 833-838.

Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Spiegelman D, Stampfer MJ (1997) Comparison of dietary calcium with supplemental calcium and other nutrients as factors affecting the risk for kidney stones in women. *Ann Intern Med* **126**, 497-504.

Ebisuno S, Morimoto S, Yoshida T, Fukatani T, Yasukawa S, Ohkawa T (1986) Rice bran treatment for calcium stone formers with idiopathic hypercalciuria. *Br J Urol* **58**, 592-595.

Ebisuno S, Morimoto S, Yasukawa S, Ohkawa T (1991) Results of long-term rice bran treatment on stone recurrence in hypercalciuric patients. *Br J Urol* **67**, 237-240.

Ettinger B (1976) Recurrent nephrolithiasis: natural history and effect of phosphate therapy. A double-blind control study. *Am J Med* **61**, 200-206.

Ettinger B, Citron JT, Livermore B, Dolman LI (1988) Chlorthalidone reduces calcium oxalate calculous recurrences but magnesium does not. *J Urol* **139**, 679-684.

Grases F, Costa-Bauzá A (1999) Phytate (IP6) is a powerful agent for preventing calcifications in biological fluids: usefulness in renal lithiasis treatment. *Anticancer Res* **19**, 3717-3722.

Grases F, Prieto RM, Simonet BM, March JG (2000a) Phytate prevents tissue calcifications in female rats. *BioFactors* **11**, 171-177.

Grases F, March JG, Prieto RM, Simonet BM, Costa-Bauza A, Garcia-Raja A, Conte A (2000b) Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people. Dietary effects on phytate excretion. *Scand J Urol Nephrol* **34**, 162-164.

Hautmann R, Hering FJ, Lutzeyer W (1978) Calcium oxalate stone disease: effects and side effects of cellulose phosphate and succinate in long-term treatment of absorptive hypercalciuria and hyperoxaluria. *J Urol* **120**, 712-715.

Henneman PH, Benedict PH, Forbes AP, Dudley HR (1958) Idiopathic hypercalciuria. *N Eng J Med* **17**, 802-807.

Martins MC, Meyers AM, Whalley NA, Margolius LP, Buys ME (1996) Indapamide (NatriliX): the agent of choice in the treatment of recurrent renal calculi associated with idiopathic hypercalciuria. *Br J Urol* **78**, 176-180.

Mortensen JT, Schultz A, Ostergaard AH (1986) Thiazides in the prophylactic treatment of recurrent idiopathic kidney stones. *Int Urol Nephrol* **18**, 265-269.

Ohkawa T, Ebisuno S, Kitagawa M, Morimoto S, Miyazaki Y (1983) Rice bran treatment for hypercalciuric patients with calculous disease. *J Urol* **129**, 1009-1011.

Pak CYC (1979): Clinical pharmacology of sodium cellulose phosphate. *J Clin Pharmacol* **19**, 451-457.

Seldin D, Giebisch G (1999a) In *Agentes diuréticos. Fisiología clínica y farmacológica*, pp. 599-601. Harcourt Brace, Madrid.

Seldin D, Giebisch G (1999b) In *Agentes diuréticos. Fisiología clínica y farmacológica*, pp. 508. Harcourt Brace, Madrid.

Shah PJ, Williams G, Green NA (1980) Idiopathic hypercalciuria: its control with unprocessed bran. *Br J Urol* **52**, 426-429.

Wu N, Thon F, Schlick T, Jonas U (1994) Effects of magnesium citrate and phytin on reducing urinary calcium excretion in rats. *World J Urol* **12**, 323-328.

Yendt ER, Cohanin M (1978) Prevention of calcium stones with thiazides. *Kidney Int* **13**, 397-409.

Resultados y discusión: Artículo original

Grases F., Perelló J., Simonet B. M., Prieto R. M. Study of potassium phytate effects on decreasing urinary calcium in rats. Urologia Internationalis 72, 237-243 (2004).

Conclusiones

Conclusiones

1. Los efectos del fitato sobre los diferentes parámetros urinarios, especialmente el calcio, dependen del tipo de sal utilizada.
2. La fitina (fitato cálcico magnésico) no presenta efecto alguno sobre el calcio urinario, debido a que ya se trata de una sal bastante insoluble y además lleva incorporado calcio, por lo que no puede capturar el calcio dietético a nivel intestinal para impedir su absorción.
3. La fitina conduce a un aumento en la excreción de magnesio, que además es más significativo a dosis elevadas de calcio.
4. Todas las demás sales de fitato ensayadas (fitato magnésico potásico, fitato sódico y fitato potásico) dan lugar a una disminución de la excreción y concentración de calcio en orina, siendo denominador común para todas ellas el hecho de que los efectos son más significativos cuando se consumen dosis elevadas de calcio.
5. De todas las sales estudiadas el fitato potásico es la que provoca un efecto más importante en la reducción del calcio urinario.
6. El estudio de la dosis de fitato (en forma de fitato potásico) revela que a medida que se incrementa la dosis de fitato, los efectos sobre la calciuria son más significativos, siendo máximos para un 1 % de fitato.
7. El efecto del fitato potásico en la reducción del calcio urinario es más notable cuanto mayor sea el calcio de la dieta.
8. Ninguno de los fitatos suministrados provoca un incremento de la oxaluria (refiriendo cada grupo a su control), haciendo que el fitato (principalmente en forma potásica) sea una buena alternativa a las tiazidas, ortofosfatos y fosfato de celulosa para el tratamiento de la hipercalciuria absorbiva.