



Reial Acadèmia de Medicina
de les Illes Balears

**DELS CÀLCULS RENALS A LES
CALCIFICACIONS CARDIOVASCULARS:**

**CAP A UNA TEORIA UNIFICADA DE LA
CALCIFICACIÓ PATOLÒGICA**

DISCURSO

DE INGRESO COMO ACADÉMICO NUMERARIO DEL
M.I.SR.DR. FÉLIX GRASES FREIXEDAS

Y

CONTESTACIÓN

POR EL

M.I.SR.DR. JOSÉ MIRÓ NICOLAU



Academia Asociada

Palma de Mallorca, Marzo 2008

Per na Glòria.

A la memòria dels meus pares.

*The greatest medicine of all is to teach
people how not to need it*

Discurso de ingreso en la Real Academia de Medicina
de les Illes Balears

del

M.I.Sr. Dr. Félix Grases Freixedas

**DELS CÀLCULS RENALS A LES
CALCIFICACIONS CARDIOVASCULARS:
CAP A UNA TEORIA UNIFICADA DE LA
CALCIFICACIÓ PATOLÒGICA**

Excel·lentíssim Sr. President, Digníssimes autoritats, Molt Il·lustres Senyores I Senyors Acadèmics, Senyores i Senyors,

Primerament vull agrair a tots els membres d'aquesta honorable corporació, que m'hagin fet l'honor d'admetre-me dins els seus membres, en particular a tots aquells que me concediren el seu vot i molt especialment al seu president l'excel·lentíssim Senyor Alfonso Ballesteros, i als membres que proposaren la meua candidatura. Voldria afegir que és per a mi un repte i una satisfacció tornar a col·laborar des d'un altre caire, amb persones que un dia aportaren el seu esforç a la creació de la Universitat de les Illes Balears.

Per un científic que creu amb fermesa que el coneixement profund i detallat del mecanisme dels processos patològics és una peça clau per poder aportar solucions definitives, l'admissió en una Institució com aquesta suposa un nou repte que espero no defraudar.

L'afició per la ciència sol ser un component de l'individu que està molt lligat a la seva estructura mental. Podríem dir que és vocacional. Però també s'ha de considerar que el fet de despertar una vocació està molt lligat, com tot allò que te una base genètica, a les condicions ambientals que envolten l'ésser humà. En el meu cas, he d'agrair profundament la paciència dels meus pares que em varen permetre desenvolupar la meua vocació, sense posar entrebancs al meu comportament, a vegades inquiet i agosarat, i també els savis consells d'una tia meua. Quan em vaig plantejar anar a la Universitat en una època convulsa per l'Estat Espanyol, tenia molt clar que volia estudiar tot allò que, fugint d'aspectes memorístics, em permetés entendre millor el misteri de la vida i que la química era el llenguatge de la vida. Per això vaig començar la llicenciatura de Ciències a la Universitat de Barcelona, creient que era una de les millors universitats de l'Estat. He de reconèixer que aquí vaig tenir una de les primeres grans decepcions de la meua vida.

Però la vocació és la vocació, i tenia clar que havia de seguir així com pogués i la sort em va dur a conèixer un catedràtic de la Universitat de Còrdova, el Dr. Miquel Valcárcel, que em va possibilitar desenvolupar la Tesis Doctoral en l'àmbit de la Química Analítica, que sens dubte es una eina fonamental per dur a terme estudis en Biomedicina. Més endavant, i després d'aconseguir la Càtedra a la UIB l'any 1987, vaig poder plantejar-me sense les limitacions que imposava la rígida estructura universitària, la dedicació plena a allò que sempre havia desitjat: la Biomedicina. Així, després d'un breu període de recerca relacionada amb la Medicina Nuclear, vaig entrar en contacte amb l'apassionant món de les pedres, les pedres de ronyó, a on, amb el Dr. Conte de l'Hospital Son Dureta, vàrem connectar el món del Laboratori d'Investigació amb el món de la Clínica. Després he tingut la sort de poder comptar amb un equip excel·lent de col·laboradors entre els que cal destacar la Dra. Antònia Costa i el Dr. Rafel Prieto, i amb més d'una vintena de doctorands, ara ja doctors. Tot això ens va permetre crear el Laboratori d'Investigació en Litiasi Renal a l'any 1998. Finalment, també he d'agrair especialment al Rector Llorenç Huguet la confiança que em va dipositar en encomanar-me la creació, l'any 2002, de l'Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut, el IUNICS. El IUNICS sorgeix de la necessitat d'unir i ordenar els esforços per impulsar la recerca de qualitat en ciències de la salut a les Illes Balears. La creació del IUNICS té com a objectiu fonamental estimular i facilitar l'obtenció de coneixements biomèdics per permetre l'eventual translació a la pràctica clínica habitual. Actualment, el IUNICS ja constitueix un referent quan es parla de recerca en Biomedicina, però encara hem d'exigir-li molt més.

La butaca de la que avui prenc possessió va ser ocupada pel Molt Il·lustre Senyor Carles Viader i Farré que ens va deixar el 28 de novembre de l'any 2005. El Dr. Viader va néixer a Barcelona el 1947 i es va llicenciar en Farmàcia el 1969 a la Universitat de Barcelona on, cinc anys després, va defensar la tesi doctoral. Especialista en anàlisis clíniques, va ser professor ajudant (1969-

1971) al Departament de Química Orgànica de la Facultat de Farmàcia de Barcelona i professor adjunt (1974-1975) al Departament de Microbiologia de la Facultat de Farmàcia de Granada. A Palma, incorporat al Centre d'Anàlisi Biològiques, introdueix a les Illes tècniques noves amb isòtops radioactius i, en immunologia, els marcadors tumorals i els receptors hormonals.

Va ser un dels fundadors, el 1990, de Balear Trasplant, associació responsable de la creació d'un dels primers bancs de còrnies a Espanya i impulsora a Mallorca de tècniques pioneres de reproducció assistida.

Va ingressar a la Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears el 1988 amb el discurs *Ingeniería genética y medicina (algunas aplicaciones)* i va llegir el discurs inaugural de l'any acadèmic 1998 *Enginyeria genètica i medicina II*.

És un honor i un repte ocupar el seient que fou el seu, i un plaer honorar a qui em va precedir en aquesta casa.

LES PEDRES DE RONYÓ EN EL CONTEXT DE LA HISTÓRIA

Les pedres de ronyó han atormentat a l'ésser humà des d'èpoques immemorials. Així, Elliot Smith en 1901, a una tomba de l'Alt Egipte de fa aproximadament 7000 anys, va trobar entre els ossos pèlvics d'un adolescent un càlcul vesical, groguenc, constituït per un nucli d'àcid úric i laminacions concèntriques d'oxalat càlcic i fosfat amònic magnèsic. Curiosament, fa pocs anys que coneixem que l'àcid úric és un nucleant heterogeni molt eficaç de l'oxalat càlcic.

La medicina hindú a l'antiguitat també deixa patent en els seus tractats més transcendents, com el *Susruta Samhita*, la importància dels càlculs renals i recomana una dieta vegetariana per a la seva prevenció. Aquesta recomanació podria ser molt adequada per càlculs d'àcid úric, però totalment contraproductiu per uns altres càlculs constituïts per hidroxiapatita.

La medicina xinesa en els manuscrits de l'emperador Shen-Nung, cap al 3000 a.C., planteja l'ús de plantes medicinals per al tractament dels càlculs. Aquí hem de dir que la relació entre fitoteràpia i litiasi renal no ha estat mai massa clara fins a dates molt recents i sembla que té molt a veure amb un tipus de calcificacions que anomenen intrapapil·lars.

També els turcs i armenis desenvoluparen manuscrits relacionats amb la malaltia litiàsica i, precisament cap a l'any 1628 a.C., troben uns documents que indiquen quan un càlcul obstrueix el flux de l'orina, és necessari evitar ingerir ous, carn fresca o bullida i peix, i es recomanava triturar llavors de meló i cogombre amb raves, naps i llavors de pastanaga i tot això s'ingereix amb puré de raves. Es diu que Galeno, així com metges turcs com Bokhara dissolvien amb èxit càlculs amb aquesta mescla. Probablement eren càlculs d'àcid úric i la pòcima tenia propietats basificants, antioxidants i contenia fitat.

L'any 384 a.C., Aristòtil encara que mai dissecà un cos humà, va fer estudis sobre anatomia i embriologia comparada i va afirmar que els càlculs només es desenvolupen a l'home i mai als animals i que les pedres es formen a la bufeta urinària com a resultat dels humors que venen dels ronyons. Òbviament, es va equivocar perquè la litiasi renal és freqüent en animals (rumiants, gossos, gats,...).

Avicena (980 d.C.) proposa que els càlculs renals i vesicals presenten la mateixa etiologia i diu que es formen amb un nucli viscos i dens juntament amb una sèrie de factors que conduïen a la precipitació com a conseqüència del calor excessiu. L'explicació comença molt bé, però acaba malament, ja que el calor no afavoreix la precipitació.

Rhazes (850 d.C.), que va practicar la medicina a Bagdad, el Caire i Còrdova, diu als seus manuscrits que els càlculs renals estan causats per un excés de sal i calor durant la força realitzada per la flexió durant la cavalcadura del cavall. Avui sabem que, efectivament, l'excés de sal condueix a una sobreexcreció de calci que pot afavorir la formació d'un càlcul, ara bé, la cavalcadura només pot influir en què el càlcul es desenganxi i provoqui un còlic nefrític.

Gui de Chauliac (1350), que va estudiar a Montpel·lier, metge del Papa Clemente VI, descriu que els càlculs han de ser tractats amb higiene, dieta vegetariana i una sèrie de medicaments recomanats per autors àrabs. El problema de tots aquests tractaments és que són totalment inespecífics i no consideren a quin tipus de càlcul van enfocats.

L'inici en el coneixement de la composició dels càlculs renals té lloc al voltant de l'any 1800 gràcies als treballs de Scheele (1742 – 1786) i Bergman (1734 – 1794), que van identificar per primera vegada càlculs d'àcid úric. En aquella època l'anàlisi química necessitava una quantitat considerable de mostra i de les diferents

mostres humanes disponibles, sols l'orina i els càlculs renals satisfien aquests requisits. Per tant, podem considerar que l'estudi dels càlculs renals va determinar l'inici de la moderna química clínica. Curiosament, malgrat aquest inici anticipat que permetia pressuposar que aquesta patologia renal seria una de les primeres en resoldre-se, la realitat ha estat ben diferent i, de fet, sols ara comencem a veure llum al final del llarg túnel. Aquesta estranya circumstància s'ha d'atribuir als factors especials que concorren en aquesta patologia, que inclou els fenòmens de cristal·lització com un aspecte fonamental a considerar i que, per tant, les seves bases i mecanismes s'allunyen bastant dels esquemes de la bioquímica i biologia molecular tradicional.

De fet, fins a la dècada dels anys 30 no es va descobrir que la presència de quantitats molt petites de determinades substàncies a l'aigua impedièn o dificultaven la cristal·lització de substàncies insolubles com el carbonat càlcic. A aquestes substàncies avui les coneixem com inhibidors de la cristal·lització. Malgrat aquest descobriment, no va ser fins el 1960 que es va plantejar que els inhibidors podien actuar com a reguladors naturals de la calcificació en condicions fisiològiques. Així, va ser Fleisch (1, 2) que va demostrar que el pirofosfat estava present al sèrum i a l'orina i podia prevenir la calcificació de l'hidroxiapatita. Els seus estudis van demostrar, mitjançant models animals, que el pirofosfat podia inhibir el desenvolupament de calcificacions cardiovasculars i renals, però sols quan era injectat per via venosa, ja que per via oral s'hidrolitzava al estómac. Sens cap dubte, aquest era l'inici del camí perdut per trobar la solució als càlculs renals.

Per acabar aquesta semblança històrica, caldria fer una referència a importants i coneguts personatges que han patit aquesta malaltia. Així, l'emperador romà Trajà va patir de càlculs renals, fins al punt de fer-se portar a Roma aigua d'una font d'Antequera coneguda com Fons Divinus, a causa de les seves propietats curatives del mal de pedra. Miquel Àngel (1475-1564) va patir gota i uns severos

atacs de dolor lumbar, anúria i expulsió de petits càlculs que, per la seva descripció, devien ser d'àcid úric. Martín Lutero també va patir de càlculs renals, els quals, considerant el seu sobrepès i l'afició al bon menjar i la beguda, també serien d'àcid úric. Beethoven també va patir de càlculs renals. Com a conseqüència dels seus mals de cap constants, dolor d'esquena i atacs reumàtics, abusava constantment de l'àcid salicílic com analgèsic (encara no es coneixia l'àcid acetilsalicílic, la popular Aspirina). Precisament, un dels pocs efectes secundaris d'aquests productes és el de provocar necrosi de la papil·la renal que, com sabem avui, dóna lloc a la formació dels temibles càlculs papil·lars d'oxalat càlcic monohidrat. Si ens traslладem a l'època actual, resulta sorprenent comprovar com aquesta patologia és especialment temuda pels astronautes, ja que ha afectat a molts d'ells, i no oblidem que un viatger com Cristòfol Colón també en va patir.

LA FORMACIÓ DELS CÀLCULS RENALS

Actualment la litiasi renal constitueix un seriós problema de salut, ja que afecta a una mitjana del 10% de la població a nivell mundial ³ i a un 12.4% de la població de les nostres Illes ⁴. A més, aquesta incidència s'està incrementant als països més desenvolupats i l'edat d'inici del primer episodi, que es solia situar entre els 25 i 30 anys, està davallant. També hem de tenir en compte que el còlic nefrític dona lloc a un dels dolors més aguts i terribles que pot experimentar un ésser humà. Malgrat tot això, segueix essent una gran desconeguda per a molts de professionals de la salut, que segueixen pensant que no hi ha solució o que és genètic, i això és degut a què fins fa poc no s'havia pogut plantejar un model de formació integral per a cada tipus de càlcul, fonamentat en els principals factors etiològics que condueixen al seu desenvolupament i que, com a conseqüència, permet identificar mesures eficaces per al seu tractament ^{5, 6}.

Els càlculs renals són concrecions sòlides que es formen en el tracte urinari superior (actualment sols en casos excepcionals es formen a la bufeta urinària) i generalment com a component majoritari poden tenir oxalat càlcic, fosfats càlcics, fosfat amònic magnèsic, àcid úric, urats, cistina o mesclades de dos o més d'aquests components. Totes aquestes substàncies han de passar a l'estat sòlid des d'una dissolució (orina) en el tracte urinari superior. Per tant, el requisit imprescindible per a la formació de càlculs és el que es coneix com a sobresaturació de l'orina en relació al component majoritari que ha donat lloc al càlcul, és a dir, a l'orina hi ha una quantitat del component en dissolució major de la que pot contenir considerant la seva solubilitat i precisament aquest excés s'elimina o bé mitjançant la formació de partícules sòlides o va disminuint lentament a causa del creixement dels cristalls ja presents. De fet, qualsevol orina està sempre sobresaturada respecte a l'oxalat càlcic i menys freqüentment també respecte als diferents tipus de fosfats o a l'àcid úric, en ambdós casos depenent del pH urinari: els fosfats

càlcics són insolubles per valors de pH > 6 i l'àcid úric és insoluble per valors de pH < 5.5. Així, com era d'esperar, els càlculs oxalocàlcics són el tipus més freqüent. De fet, aproximadament el 70-80% de tots els càlculs contenen oxalat càlcic com a component majoritari ^{6, 7}.

Per tant, el fet que l'orina estigui sobresaturada suposa una tendència natural a la formació de partícules sòlides i, al ser els càlculs concrecions constituïdes per agrupacions de partícules sòlides, la incidència de la litiasi renal hauria de ser molt superior a l'existent. Així, sorgeix la pregunta de per què sols un 10% de la població és propensa a la formació de càlculs. La resposta a aquesta qüestió està basada en el fet que la urolitiasi es un procés multifactorial que només pot tenir lloc si un número important de condicions necessàries es donen simultàniament, com es discutirà a continuació.

Ara entrarem precisament en un punt clau que probablement ha constituït una de les circumstàncies que ha dificultat el que molts d'aspectes relacionats amb la investigació bàsica no s'hagin traduït en resultats útils per a l'autèntic coneixement de la calculogènesi, i per tant en l'avanç del tractament de la litiasi renal. Així, sovint s'han plantejat estudis bàsics sense tenir en compte que l'objectiu fonamental ha de ser conèixer com i per què es forma el càlcul renal. La pedra és el cos del delictes i no podem esbrinar com es forma si no la coneixem a fons. Això, encara que sembli paradoxal, ha passat i segueix passant molt sovint en la recerca científica relacionada amb la litiasi renal. Si no, com s'explica, per exemple, que s'hagi dedicat i es segueix dedicant molt d'esforç a estudiar com s'uneixen mitjançant xocs els cristalls d'oxalat càlcic una vegada formats (agregació secundària) quan, si hem observat càlculs renals per microscopia electrònica, sabem que en tots ells podem veure que són els cristalls ja constituïts els que induïxen la formació d'altres nous (agregació primària) ^{8,9}.

Mai oblidaré les tardes senceres davant el microscopi electrònic amb el Dr. Otakar Söhnel, catedràtic de la República Txeca, observant l'interior dels càlculs renals i discutint com es podien generar aquelles estructures especialment espectaculars en molts casos. De fet, dels estudis *in vitro*, dels estudis de la composició de l'orina d'individus sans i de litiàsics, dels estudis amb animals d'experimentació, i no ho oblidem, dels estudis de centenars del càlculs renals, vàrem arribar a la conclusió que els càlculs, independentment de la seva composició química, es poden classificar en dos grans grups¹⁰, els càlculs formats damunt l'epiteli renal, units a ell, especialment la papil·la, i que es coneixen com a càlculs papil·lars, i els càlculs desenvolupats en cavitats renals (càlculs de cavitat). Tots els càlculs papil·lars presenten una zona d'unió a l'epiteli renal clarament observable, contràriament als càlculs de cavitat en els que aquesta zona no existeix.

Els càlculs papil·lars

El càlcul papil·lar es desenvolupa a partir d'un niu constituït per diversos cristalls i/o matèria orgànica fixats a l'epiteli renal. Aquest niu del càlcul es pot formar damunt zones de l'epiteli alterat de la papil·la (necrosat o lesionat), que en estat saludable té propietats antiadherents a causa de la capa protectora de glicosaminoglicans i glicoproteïnes en constant renovació, que per tant evita la formació d'aquests nius^{11, 12, 13}. Les cèl·lules de l'epiteli alterat tendeixen a acumular calci, creant així unes condicions favorables per a la formació de cristalls càlcics, és a dir, oxalat càlcic o fosfats càlcics. El niu generat pot evolucionar fins constituir un objecte més o menys esfèric, conegut com a cor del càlcul. Normalment el cor està situat a l'interior del càlcul (aprop de la zona d'unió) o fins i tot a la seva base, i actua com a guia per a la gènesi dels cristalls que constituïran el cos del càlcul.

En altres ocasions, el niu del càlcul es genera a l'interior de la papil·la, com a conseqüència de lesions que es poden produir a

zones properes a la nefrona, túbuls renals o senzillament dins el teixit papil·lar. Quan aquestes lesions calcifiquen (en forma d'hidroxiapatita) i arriben a la superfície de la papil·la, poden trencar l'epiteli i, com a conseqüència, entrar en contacte amb l'orina. Igual que en la situació anterior, induiran la formació de nous cristalls, constituint el cor i després la resta del càlcul. Aquesta calcificació intrapapil·lar es coneix com a placa de Randall en honor del seu descobridor^{14, 15}. S'ha de tenir en compte que l'origen d'aquest procés correspon a la calcificació d'un teixit tou. Precisament, com veurem més endavant, aquest procés segueix les mateixes pautes que les calcificacions cardiovasculars.

Per altre banda, s'ha de dir que un percentatge altíssim d'estudis actuals sobre litogènesi estan relacionats amb el desenvolupament de calcificacions intrapapil·lars i especialment les que es localitzen a la nefrona. En aquest sentit, cal dir que la nefrocalcinosi no pareix tenir cap relació amb la litiasi renal i que el càlculs papil·lars únicament representen el 12-14% de tots els càlculs renals⁶, malgrat sembla que, per a molts d'autors, tots els càlculs d'oxalat càlcic són papil·lars. Ara bé, sí és cert que el coneixement d'aquest tipus de calcificació aporta informació molt important per entendre la calcificació d'altres teixits tous com els cardiovasculars.

Per entendre tots aquests processos s'ha de considerar que el plasma humà (i de tots els mamífers) està sempre sobresaturat en hidroxiapatita, el fosfat càlcic que constitueix la majoria de calcificacions tisulars patològiques així com l'esquelet ossi. Hem de tenir en compte que si no fos així, els ossos no es podrien formar. Considerant aquest fet, també resulta sorprenent que les calcificacions tisulars no siguin més freqüents. Aquí hem de dir que, com veurem, són molt més freqüents del que creïem, encara que en molts de casos no ens adonem, malgrat les seves funestes conseqüències. Així doncs, com és que no calcifiquem de cap a peus si el plasma està permanentment sobresaturat en fosfat càlcic?. La resposta a aquesta qüestió l'hem de cercar, per una part, a la

naturalesa dels processos de cristal·lització i, per altra, a la pròpia naturalesa de la vida.

Així, s'ha de pensar que la formació de cristalls a partir d'un líquid no és gens fàcil. Suposa passar d'un sistema desordenat com és l'estat líquid, a un sistema totalment ordenat com és l'estat sòlid. En dissolucions pures aquest procés és molt difícil sota un punt de vista del seu mecanisme i només quan la sobresaturació és molt elevada es forma el sòlid en temps més o menys curts. Per tant, les dissolucions no gaire sobresaturades, encara que siguin estats metaestables, poden aguantar hores, dies i fins i tot anys sense cristal·litzar. Ara bé, quan en aquests casos les dissolucions no són pures, la presència d'alguns sòlids ja constituïts pot accelerar notablement el procés de cristal·lització. Aquests sòlids es coneixen com a nucleants heterogenis i, per tant, actuen com inductors de la cristal·lització.

El plasma, així com el líquid intersticial d'un teixit sa, és un mitjà a on no hi ha nucleants heterogenis eficaços. Com que la pròpia naturalesa de la vida implica canvi i renovació constants, els temps de permanència dels líquids esmentats dins el teixit no són suficientment llargs per donar lloc a processos de cristal·lització importants, especialment perquè, per prevenir aquests processos de manera extensiva, la pròpia naturalesa també disposa de la presència d'inhibidors de la cristal·lització que dificulten o impedeixen processos de cristal·lització patològica.

A la sang, des de l'època de Fleisch ja es sabia que el pirofosfat era un inhibidor potent de la cristal·lització de l'hidroxiapatita ^{1, 2} i recentment nosaltres hem demostrat que el fitat és un altre inhibidor molt potent a nivell tisular del desenvolupament de calcificacions patològiques ^{16, 17, 18}. Aquí, val la pena recordar que el pirofosfat plasmàtic és conseqüència del propi metabolisme i, com ja hem dit, no es pot controlar de forma exògena, mentre que el fitat, encara que es troba a dins les cèl·lules, a on sembla que

es pot sintetitzar, no s'exporta a l'exterior, de manera que la major part del fitat circulant és d'origen extern i es aportat per la dieta^{19, 20, 21}.

El fitat es troba en concentracions importants i en forma de la sal càlcico-magnèsica a les closques i germen de les llavors vegetals^{22, 23} i les úniques llavors senceres que l'humà consumeix (o consumia) de manera important són els llegums, els fruits secs i qualsevol producte fet amb cereals no refinats. Així, la famosa dieta mediterrània suposa un consum aproximat de 1 g de fitat al dia. Consums d'aquest ordre donen lloc a concentracions plasmàtiques i urinàries màximes, mentre que quan es deixen de consumir, en un terme de 15-20 dies es pot arribar a nivells tan baixos que siguin no-detectables²⁴.

Arribat a aquest punt, per poder descriure integralment el desenvolupament d'un càlcul papil·lar encara fa falta afegir un dels aspectes molt recentment trobats, i que per nosaltres constituïa la peça perduda, la que intuïem que faltava per entendre i completar els mecanismes implicats en la calculogènesi. Així, tant amb estudis d'altres autors²⁵ com nostres²⁶, s'ha pogut demostrar que el sistema immunitari també actua en els processos de calcificació de teixits i, per tant, és un factor més a considerar en la calculogènesi papil·lar.

Precisament aquest aspecte ens permet clarificar d'una vegada el paper, fins ara bastant confós, d'algunes proteïnes en la litiasi renal. Seguint la moda actual d'atribuir-ho tot als gens i a les proteïnes, s'havia assignat a una sèrie d'elles (algunes relacionades amb processos d'ossificació com l'osteopontina i altres segregades per la mateixa nefrona, com la glicoproteïna de Tamm-Horsfall) un important paper com inhibidors de la cristal·lització^{27, 28}.

Estudis desenvolupats per nosaltres no permetien demostrar que aquesta capacitat fos realment important, considerant els nivells de concentració en plasma i en orina, i fins i tot demostraven

que podien actuar com a nucleants heterogenis afavorint la cristallització²⁹. Precisament, aquests últims estudis posen les proteïnes al seu lloc. Les proteïnes, que a nivell plasmàtic es troben en molt baixa concentració, com l'osteopontina, s'uneixen mitjançant els seus grups fosfat al calci de l'hidroxiapatita, que és un mineral inert, senyalitzant-la i permetent així que els macròfags (o cèl·lules similars) la identifiquin i la puguin destruir^{30, 31}.

Per tant, inhibidors de la cristallització i sistema immunitari actuarien conjuntament, però de forma diferenciada, evitant el desenvolupament de la calcificació patològica del teixit. Altres proteïnes que també es troben en baixes concentracions tindrien funcions similars. Aquelles proteïnes segregades pel propi sistema renal a concentracions més elevades, com la glicoproteïna de Tamm-Horsfall, tindrien una funció clarament antiadherent que, com ja hem assenyalat, és prou important per protegir els epitelis.

Ara sí que ja estem en condicions de descriure detalladament com es forma un càlcul papil·lar: el procés s'inicia amb l'aparició d'una lesió, ja sigui de l'epiteli que recobreix la papil·la o del teixit tou interior a la papil·la. Aquesta lesió pot ser conseqüència de moltes causes diferents, com per exemple consum abusiu de citotòxics com l'àcid acetilsalicílic, cocaïna, inhalació de dissolvents orgànics (gasolines, pintures), també pot ser deguda a altres causes orgàniques com diabetis o al dèficit de vitamina A. Aquesta lesió actua com a promotora del procés de cristallització que, si és intern, serà en forma d'hidroxiapatita i, si és superficial, prodrà ser d'hidroxiapatita o també d'oxalat càlcic monohidrat. L'agrupació d'uns quants cristalls, si no es pot evitar o destruir per l'acció combinada d'inhibidors i sistema immunitari, donarà lloc a la formació del cor del càlcul, i sobre el cor es produirà el creixement columnar de l'oxalat càlcic que acabarà constituint el cos del càlcul.

Els càlculs de cavitat

Ara parlarem dels altres tipus de càlculs renals: els càlculs de cavitat ¹⁰. Els càlculs de cavitat també es desenvolupen a partir d'un petit niu constituït per partícules d'origen orgànic o inorgànic que apareixen o es formen dins l'orina en el tracte urinari superior. Algunes d'aquestes partícules queden atrapades i retingudes en algun lloc del ronyó on l'orina circula poc, és a dir, un lloc de baixa eficàcia urodinàmica, mentre d'altres passen a la bufeta urinària i finalment són eliminades com a cristalúria assintomàtica. De fet, tothom elimina petits cristalls en orinar.

Un lloc del ronyó amb baixa eficàcia urodinàmica, tal com un càlix inferior o una cavitat, conté orina durant un temps de residència que supera el valor mitjà de residència de l'orina dins el ronyó. El desenvolupament posterior de l'esmentat niu, té lloc mitjançant el creixement tant dels cristalls que el formen (si és de naturalesa cristal·lina) com dels que es formen sobre les seves superfícies. Novament, aquí el paper dels inhibidors de la cristal·lització pot ser molt important, impeding o dificultant el desenvolupament del niu inicial que per tant es podrà eliminar sense problemes.

Ara bé, en aquest cas s'ha de tenir molt clar que aquí el sistema immunològic no hi juga cap paper. Petites partícules sòlides d'hidroxiapatita, que es forma per valors de pH urinari superiors a 6.0, petites quantitats de cristalls d'àcid úric, formats per valors de pH urinari inferiors a 5.5, residus orgànics cel·lulars, agregats proteics, etc., poden actuar com a nucleants heterogenis molt eficaços de l'oxalat càlcic. En aquests casos, la fase que es formarà dependrà de la concentració de calci urinari. Si aquesta concentració no és molt elevada (normocalciúria), es formarà la fase termodinàmicament favorable, l'oxalat càlcic monohidrat. Si la concentració de calci és elevada (hipercalciúria), es formarà la fase cinèticament favorable que és l'oxalat càlcic dihidrat. En el primer cas, es formarà un càlcul marró obscur, arrodonit, molt compacte

i dur (16% de tots els càlculs), molt difícil de trencar per litotricia extracorpòria per ones de xoc. En el segon cas es formarà un càlcul groguenc, poc compacte i amb moltes puntes (34% de tots els càlculs), fràgil i molt fàcil de trencar per ones de xoc.

Com a inhibidors eficaços de la cristal·lització s'han identificat per aquestes situacions, el pirofosfat i el fitat (al igual que per els càlculs papil·lars), però també el citrat^{32, 33}, que en orina pot arribar a concentracions molt elevades. Cal dir que la importància del citrat en la litiasi renal es remunta a 1826, quan Sir Astley Cooper prescribia el que ell anomenava com a licor potàssic pel tractament d'alguns càlculs renals, que probablement eren d'àcid úric. Així, s'ha de tenir en compte que el citrat per via oral incrementa els valors de pH urinari, el que pot ser molt favorable per evitar la cristal·lització de l'àcid úric que, com ja hem dit, té lloc a valors de pH urinari inferiors a 5.5. Per altra banda, aquest augment de pH, en incrementar la dissociació del citrat i, per tant la seva càrrega elèctrica, dificulta la seva reabsorció tubular i tot això dóna lloc a un augment de la seva excreció³⁴, que pot actuar també com a inhibidor de la cristal·lització, efecte que pot ser important en algunes situacions de nucleació heterogènia de l'oxalat càlcic. Quan es prescriu citrat potàssic també és molt important tenir en compte que es pot produir un increment excessiu del pH urinari per damunt de 6.0, que podria donar lloc a la formació de càlculs de fosfats càlcics, que discutirem a continuació³⁵. Per tant, quan s'ingereix citrat és necessari el control periòdic dels valors de pH urinari.

Com acabo de comentar, per valors de pH urinari elevats, superiors a 6.0, en presència de matèria orgànica retinguda en cavitats, dèficit de magnesi i citrat urinaris, es formaran uns càlculs blanquinosos poc compactes d'hidroxiapatia (7% de tots els càlculs). Si a més d'aquestes condicions es presenta un excés de calci urinari (hipercalciúria), es poden formar també càlculs mixtes d'hidroxiapatita i oxalat càlcic (11% de tots els càlculs). Si el pH urinari no supera valors de 6.5, hi ha elevada concentració de

fosfats, el valors de magnesi urinari són elevats i hi ha dèficit de pirofosfat i fitat, tindrà lloc el desenvolupament d'uns càlculs petits, de color blanc, compactes i molt durs, de brushita (1% de tots els càlculs).

En presència d'infeccions per bacteris ureolítics es genera amoníac, que eleva considerablement els valors de pH urinari, es formen també importants quantitats de residus orgànics i mucoproteïnes i tot això condueix a la cristal·lització de fosfat amònic magnèsic (estruvita) i hidroxapatita, que juntament amb la matèria orgànica poden donar lloc a la formació de masses calculoses de gran dimensió, conegudes com a càlculs coraliforms, que poden ocupar tota la part buida del ronyó (4% de tots els càlculs).

Un altre tipus de càlculs típics de cavitat són els anomenats càlculs d'àcid úric³⁶ (8% de tots els càlculs). La formació d'aquest tipus de càlcul només té lloc quan la solubilitat de l'àcid úric a orina baixa considerablement, és a dir, per valors per davall de 5.5, i serà tant més favorable com més elevada sigui la concentració d'àcid úric urinari i més baixa sigui la concentració d'inhibidors de la cristal·lització de l'àcid úric. Aquí hem de dir que sobre aquest últim aspecte pràcticament no hi ha informació a la literatura científica i un dels pocs treballs que existeix és nostre³⁷, de manera que vàrem trobar que els glicosaminoglicans i les glicoproteïnes, en aquest cas sí, són bons inhibidors de la cristal·lització de l'àcid úric, encara que malauradament no podem controlar farmacològicament la seva excreció urinària. Si a l'orina hi ha un excés d'àcid úric (hiperuricuria) es forma la fase cinèticament favorable, que és l'àcid úric dihidrat. En cas de concentracions d'àcid úric no molt elevades, cristal·litza la forma termodinàmicament estable, que és l'àcid úric anhidre. És important destacar que els càlculs d'àcid úric són els únics que, si són de petita dimensió, es poden redissoldre en viu mitjançant teràpies basificants per via oral, que eleven el valors de pH urinari.

Qualsevol altre intent de dissoldre els càlculs dins el pacient, per via oral, és un engany, fruit de la ignorància o de la mala fe amb finalitat lucrativa.

Finalment, entre els càlculs de cavitat menys freqüents hem de considerar els càlculs de cistina (1% de tots els càlculs). Aquest és l'únic càlcul renal que es pot associar a una alteració genètica. Com a conseqüència d'aquesta alteració es produeix una excreció excessiva de cistina, aminoàcid que és insoluble per valor de pH urinari inferiors a 5.5, donant lloc a la formació de càlculs groguencs, arrodonits i de gran duresa ^{38, 39}.

Per acabar l'apartat de la calculogènesi, voldria ressaltar que mentre els càlculs papil·lars, malgrat poder tenir orígens molt diferents, tots ells estan integrats per un sol component majoritari, l'oxalat càlcic monohidrat. En canvi, els càlculs de cavitat, que també tenen orígens molt diferents, poden presentar molta més diversitat de components majoritaris.

EL DESENVOLUPAMENT DE LES CALCIFICACIONS CARDIOVASCULARS

Aquí no podem fer una semblança històrica com en el cas dels càlculs renals, ja que el coneixement de la importància d'aquest tipus de calcificació patològica és molt recent. Ara bé, sí podem dir que el famós *home de gel*, trobat momificat a una glacera dels Alps del Tirol l'any 1991 i que va ser datat en 5300 anys d'antiguitat, presentava calcificacions vasculars molt importants, malgrat s'ha calculat que quan va morir tenia entre 30 i 40 anys.

Les calcificacions cardiovasculars són un tipus de calcificació patològica que condueix a la degeneració del sistema cardiovascular en general. És una complicació molt important que freqüentment s'oblida, malgrat es pugi donar tant als vasos sanguinis com dins els propi cor (fonamentalment a les vàlvules). L'aparició de les calcificacions cardiovasculars pot començar a la segona dècada de la vida. Les calcificacions coronàries afecten el 50% de les persones entre 40-49 anys, i el 80% entre 60-69 anys⁴⁰⁻⁴¹.

Les calcificacions cardiovasculars presenten la mateixa estructura i morfologia que qualsevol calcificació de teixit tou, és a dir, corresponen a dipòsits patològics de fosfats càlcics, fonamentalment hidroxiapatita. En les lesions ateromatoses, la calcificació es localitza a la túnica íntima (zona propera a l'epiteli que recobreix la paret interior de les artèries) en forma de punts dispersos durant les primeres etapes de la malaltia i, a mesura que el procés progressa, es produeixen agregacions cristal·lines esferulítiques de major mida, que estan associades a les regions necròtiques dels ateromes. La segona localització histològica de la calcificació cardiovascular és la túnica mitjana (zona interna de la paret arterial que es troba sota la túnica íntima) i es coneix com a esclerosi de Mönckeberg. Aquesta calcificació es produeix independentment de la calcificació de l'íntima i està associada amb la matriu extracel·lular rica en elastina i colàgen. La morfologia típica d'aquesta calcificació durant

les primeres etapes de la malaltia és de dipòsits lineals al llarg de la làmina elàstica i, en les lesions avançades, la tònica mitjana es troba plena d'anells circulars de mineral. En alguns casos, en les darreres etapes de la malaltia s'ha observat la presència de matriu òssia amb medul·la òssia. La calcificació de la mitjana s'observa preferentment en persones majors, diabètics i urèmics i és la causa, almenys parcialment, de l'elevada mortalitat per problemes cardiovasculars en malalts amb malalties renals cròniques⁴². La calcificació de teixits cardíacs afecta principalment a les vàlvules. La vàlvula més freqüentment afectada és l'aòrtica, de manera que el desenvolupament de dipòsits d'hidroxiapatita condueix al seu enduriment que pot donar lloc a esqueixos responsables de la seva fallida⁴³. En general, les implicacions clíniques de les calcificacions cardiovasculars inclou un major risc d'infart de miocardi i un increment d'episodis isquèmics a lesions vasculars perifèriques.

És clar que la calcificació cardiovascular és un problema de salut molt seriós que afecta moltíssima gent, però què en sabem del mecanisme patològic que la genera? Jo els hi he de confessar que fins l'any 2003 en sabia poca cosa i va ser precisament durant una de les primeres reunions del IUNICS on, en una conversa amb els doctors Oriol Bonnin, Miquel Fiol i Carles Fernández-Palomeque, vàrem coincidir en què aquest era un tema d'interès comú, poc conegut però molt important i que, per tant, valia la pena obrir una línia de recerca conjunta. Vàrem seguir el mateix esquema que plantejàrem quan vàrem començar a estudiar els càlculs renals, és a dir, observar i estudiar la morfologia de mostres humanes de teixit cardiovascular calcificat que ens proporcionava el Dr. Bonnin, plantejar estudis *in vitro* utilitzant pericardi boví, que és un material biològic emprat per fabricar valves prostètiques per humans i desenvolupar estudis amb animals de laboratori mitjançant models que donen lloc a calcificacions cardiovasculars.

Fent un resum de tots els resultats obtinguts, cal destacar, en primer lloc, el fet que estructuralment la morfologia d'aquestes

calcificacions era la mateixa que l'observada per qualsevol altre calcificació de teixit tou, és a dir, hidroxiapatita en forma esferulítica o aspidínica, en funció de la seva extensió, juntament amb matèria orgànica. Els estudis amb animals d'experimentació també demostraren clarament que l'existència d'una lesió prèvia era la condició fonamental perquè es pogués iniciar un procés de calcificació. Així, en un dels estudis es demostraven els efectes indesitjables de la nicotina⁴⁴. També vàrem comprovar l'important paper protector dels inhibidors de la cristal·lització. Aquí, val la pena senyalar novament que Fleisch, allà pels anys 60, també va demostrar la importància del pirofosfat com inhibidor de la calcificació cardiovascular⁴⁵. Precisament, en comprovar que no es podia administrar oralment, ja que com hem comentat s'hidrolitza en el tracte gastrointestinal, va plantejar sintetitzar al laboratori composts anàlegs que no s'hidrolitzessin i així varen néixer els bisfosfonats⁴⁶. Probablement, els bisfosfonats són coneguts per molts de vostès, però no els situen aquí, sinó que els coneixen per la seva eficàcia en el tractament de l'osteoporosi. Així, en els estudis que es van plantejar per avaluar el seu efecte inhibidor de la cristal·lització patològica es va comprovar que, a la vegada, manifestaven un paper protector molt important de la dissolució del sistema ossi⁴⁶. Ara bé, a causa de la toxicitat i preus elevats d'aquests composts, a l'actualitat es coneixen quasi exclusivament pel seu ús en el tractament de l'osteoporosi.

Aquest comportament dual pot semblar contradictori, però es pot explicar perfectament si es consideren els corresponents processos a nivell molecular. S'ha de tenir en compte que mentre impedeix la formació de nuclis cristal·lins gràcies a la seva interacció amb el calci, dificulta la redissolució dels cristalls com a conseqüència de la seva adsorció sobre les seves cares.

Considerant les similituds estructurals entre bisfosfonats i fitat, i que aquesta substància té propietats com inhibidor de la cristal·lització de l'hidroxiapatita a teixits tous que ja s'ha comentat,

vàrem pensar que el fitat podria comportar-se com un potent inhibidor de la calcificació cardiovascular i així ho varen demostrar tant els estudis *in vitro*⁴⁷ com *in vivo* amb animals d'experimentació que vàrem desenvolupar^{44, 48}. Per tant, pirofosfat i fitat serien dos importants inhibidors de la cristallització per evitar les calcificacions cardiovasculars, tal com es dona en altres teixits tous.

I les proteïnes, quin paper hi juguen aquí?. Curiosament es reproduïxen els mateixos patrons que vàrem observar quan comentava el desenvolupament de calcificacions papil·lars. Aquí, hi ha unes proteïnes que es troben en concentracions considerables, com la fetuïna^{49, 50} i d'altres que es troben en molt baixa concentració, com l'osteopontina i l'osteonectina. Novament, estudis molt recents demostren que l'acció d'aquestes proteïnes correspon a dos tipus de mecanismes diferents i que, en cap cas, correspon fonamentalment a un procés d'inhibició de la cristallització. Així, les proteïnes que es troben en baixes concentracions actuarien a nivell de senyalització cel·lular i, per exemple, l'osteopontina, igual que en altres teixits tous, s'uniria a l'hidroxiapatita senyalitzant-la perquè el sistema immunitari, mitjançant els macròfags (o cèl·lules equivalents), la puguin identificar i destruir. Les glicoproteïnes que com la fetuïna es troben a elevades concentracions, a més de la seva funció antiadherent, molt recentment també s'ha descobert una interessant funció en la que la proteïna facilitaria la formació de microcol·loids de fosfat càlcic al plasma sanguini⁴⁹. D'aquesta manera es podria reduir els nivells de fosfat plasmàtic i la sobresaturació en fosfat càlcic disminuiria notablement. De fet, pels malalts amb fallida renal que es sotmeten a diàlisi, la calcificació cardiovascular suposa un greu problema. Precisament aquests malalts presenten valors anormalment baixos de fetuïna⁵¹ i, a la vegada, els seus nivells plasmàtics de pirofosfat són també inferiors als dels individus sans⁵². Actualment, i gràcies al suport de la Fundació Barceló, estem desenvolupant un projecte enfocat a conèixer millor aquests processos i, en conseqüència, poder aportar-hi solucions.

Així doncs, considerant tot el que hem comentat, podríem plantejar el següent mecanisme general de desenvolupament d'una calcificació cardiovascular. El procés s'ha d'iniciar, forçosament, com a conseqüència de l'existència d'una lesió, que aportarà els nucleants heterogenis necessaris per iniciar el procés de cristallització de l'hidroxiapatita. Les causes que poden desencadenar la gènesi de la lesió poden ser molt diverses, tal com el colesterol plasmàtic elevat (disminució del colesterol associat a lipoproteïnes d'alta densitat i increment del colesterol associat a lipoproteïnes de baixa densitat), agents citotòxics (tabaquisme), diabetis, hipertensió, obesitat, insuficiència renal terminal, edat avançada, infeccions bacterianes, etc. L'acció conjunta d'inhibidors de la cristallització i sistema immunitari poden evitar i/o revertir el procés de calcificació quan aquest encara no ha adquirit una massa crítica important que el fa ja irreversible. De fet, quan una calcificació adquireix una determinada massa, acaba per comportar-se com a teixit ossi, el que no es gens estrany si considerem que es troba en un entorn que li aporta els senyalitzadors i cèl·lules mare necessàries.

RECAPITULACIÓ

Tota calcificació patològica en els mamífers necessita un inductor, un nucleant heterogeni, que inestabilitzi el fluid corresponent que es sol trobar en estat metaestable. Per protegir l'organisme d'aquests processos indesitjables, es disposa de forma natural dels anomenats inhibidors de la cristallització, que són substàncies que els impedeixen o retarden. Si a més, la cristallització patològica té lloc en un entorn cel·lular (dins un teixit), també podrà actuar el sistema immunitari, destruint la calcificació, ja que existeixen proteïnes senyalitzadores. Si la cristallització patològica té lloc dins l'orina, aquesta última possibilitat no existeix, ja que no hi pot haver intervenció del sistema immunitari, ara bé, s'ha de tenir en compte que hi ha càlculs renals (els anomenats papil·lars) que inicien la seva formació dins el teixit papil·lar, i en aquests casos òbviament sí que podrà participar el sistema immunitari.

En totes les situacions és clar que el procés sols es pot impedir, aturar o revertir a les etapes inicials, per tant, en qualsevol cristal·lització patològica queda ben palès que la prevenció és fonamental i és necessari tenir en compte tots aquells factors que permeten donar pautes adequades amb aquesta finalitat. Així, citotòxics i antioxidants poden jugar un paper molt important en aquests processos, uns com a inductors, afavorint el desenvolupament de la lesió i els altres com a protectors, evitant-la. És molt important considerar que en les etapes inicials tots aquests processos són silencis, s'inicien durant la joventut i quan es manifesten ja és massa tard per evitar-los. Així, l'educació en hàbits saludables des de la infantesa és una peça clau.

I per acabar, voldria ressaltar que l'estudi a nivell molecular d'una patologia t'ajuda molt a entendre millor el misteri de la vida: qui som, d'on venim i a on anem. Així, espero poder seguir dedicant-me a aquests estudis des d'aquesta Acadèmia.

Moltes gràcies per la seva atenció.

He dit.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Fleisch H, Bisaz S. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am J Physiol* 1962; 203:671-675.
- 2.-Fleisch H, Bisaz S. Mechanism of calcification: inhibitory role of pyrophosphate. *Nature* 1962; 195:911.
- 3.-Ramello A, Vitale C, Marangella M. Epidemiology of nephrolithiasis. *J Nephrol* 2000; (13 suppl) 3:S45-S50.
- 4.-Grases F, Conte A, March JG, Genestar C, Costa-Bauzá A, Martin M, Vallescar R. Epidemiology of urinary stone disease in the Balearic Islands Community. *Int Urol Nephrol* 1994; 26:145-150.
- 5.-Daudon M, Bader CA, Jungers P. Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology. *Scanning Microsc* 1993; 7:1081-1106.
- 6.-Grases F, Costa-Bauzá A, Ramis M, Montesinos V, Conte A. Simple classification of renal calculi closely related to their micromorphology and etiology. *Clin Chim Acta* 2002; 322:29-36.
- 7.-Costa-Bauzá A, Ramis M, Montesinos V, Conte A, Piza P, Pieras E, Grases F. Type of renal calculi: variation with age and sex. *World J Urol* 2007; 25:415-421.
- 8.-Grases F, Masarova L, Söhnel O, Costa-Bauzá a. Agglomeration of calcium oxalate monohydrate in synthetic urine. *Brit J Urol* 1992; 70:240-246.
- 9.-Söhnel O, Grases F, Garcia-Ferragut L. Role of agglomeration in the early stages of papillar stone formation. *Scanning Microsc* 1994; 8:513-522.
- 10.-Grases F, Costa-Bauzá A, Garcia-Ferragut L. Biopathological crystallization: a general view about the mechanisms of renal stone formation. *Adv Colloid Interface Sci* 1998; 74:169-194.
- 11.-Gill WB, Jones KW, Ruggiero KJ. Protective effects of heparin and other sulfated glycosaminoglycans on crystal adhesion to injured urothelium. *J Urol* 1982; 127:152-154.
- 12.-See WA, Williams RD. Urothelial injury and clotting cascade activation: common denominators in particulate adherence

- to urothelial surfaces. *J Urol* 1992; 147:541-548.
- 13.-Grases F, Garcia-Ferragut L, Costa-Bauzá A. Study of the early stages of renal stone formation: experimental model using urothelium of pig urinary bladder. *Urol Res* 1996; 24:305-311.
 - 14.-Randall A. The origin and growth of renal calculi. *Ann Surg* 1937; 105:1009-1027.
 - 15.-Randall A. Papillary pathology as a precursor of primary renal calculus. *J Urol* 1940; 44:580-589.
 - 16.-Grases F, Prieto RM, Simonet BM, March JG. Phytate prevents tissue calcifications in female rats. *Biofactors* 2000; 11:171-177.
 - 17.-Grases F, Perello J, Prieto RM, Simonet BM, Torres JJ. Dietary myo-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues: a pilot study in Wistar rats. *Life Sci* 2004; 75:11-19.
 - 18.-Grases F, Isern B, Sanchis P, Perello J, Torres JJ, Costa-Bauzá A. Phytate acts as an inhibitor in formation of renal calculi. *Front. Biosci.* 2007; 12:2580-2587.
 - 19.-Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG. Phytate levels in diverse rat tissues: influence of dietary phytate. *Br J Nutr* 2001; 86:225-231.
 - 20.-Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG. Variation of InsP₄, InsP₅ and InsP₆ levels in tissues and biological fluids depending on dietary phytate. *J Nutr Biochem* 2001; 12:595-601.
 - 21.-Grases F, Simonet BM, Vucenik I, Prieto RM, Costa-Bauzá A, March JG, Shamsuddin AM. Adsorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP₆ or phytate) in humans. *BioFactors* 2001; 15:53-61.
 - 22.-Reddy NR. Occurrence, Distribution, Content and Dietary Intake of Phytate. En: Reddy NR y Sathe SK, editores. *Foods Phytate*. Boca Raton: CRC Press; 2002; p. 36-63.
 - 23.-Reddy NR, Sathe SK, Salunke DK. Phytate in legumes and cereals. *Adv Food Res* 1982; 28:1-92.

- 24.-Grases F, Simonet BM, March JG, Prieto RM. Inositol hexakisphosphate in urine: the relationship between oral intake and urinary excretion. *BJU Int* 2000; 85:138-142.
- 25.-Gadeau AP, Chaulet H, Daret D, Kockx M, Daniel-Lamaziere JM, Desgranges C. Time course of osteopontin, osteocalcin, and osteonectin accumulation and calcification after acute vessel wall injury. *J Histochem Cytochem* 2001; 49:79-86.
- 26.-Grases F, Prieto RM, Sanchis P, Saus C, de Francisco T. Role of phytate and osteopontin in the mechanism of soft tissue calcification. *J Nephrol*, en prensa.
- 27.-Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: Inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner.* 1993; 22:147-159.
- 28.-Grover PK, Moritz RL, Simpson RJ, Ryall RL. Inhibition of growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro—a comparison of four human proteins. *Eur J Biochem* 1998; 253:637-644.
- 29.-Grases F, Isern B, Perello J, Costa-Bauzá A. The role of glycoproteins in calcium oxalate crystal development. *BJU Int* 2004; 94:177-181.
- 30.-Redey SA, Razzouk S, Rey C, Bernache-Assollant D, Leroy G, Nardin M, Cournot G. Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies. *J Biomed Mater Res* 1999; 45:140-147.
- 31.-Shen M, Marie P, Farge D, Carpentier S, De Pollak C, Hott M, Chen L, Martinet B, Carpentier A. Osteopontin is associated with bioprosthetic heart valve calcification in humans. *C R Acad Sci III* 1997; 320:49-57.
- 32.-Pak CY, Fuller C, Sakhaee K, Preminger GM, Britton F. Long-term treatment of calcium nephrolithiasis with potassium citrate. *J Urol* 1985; 134:11-19.
- 33.-Pak CY. Citrate and renal calculi: new insights and future directions. *Am J Kidney Dis* 1991; 17:420-425.

- 34.-Hamm LL. Renal handling of citrate. *Kidney Int* 1990; 38:728-735.
- 35.-Grases F, Söhnel O, Villacampa AI, March JG. Phosphates precipitating from artificial urine and fine structure of phosphate renal calculi. *Clin Chim Acta* 1996; 244:45-67.
- 36.-Grases F, Villacampa AI, Costa-Bauzá A, Söhnel O. Uric acid calculi: types, etiology and mechanisms of formation. *Clin Chim Acta* 2000; 302:89-104.
- 37.-Grases F, Ramis M, Villacampa AI, Costa-Bauzá A. Uric acid urolithiasis and crystallization inhibitors. *Urol Int* 1999; 62:201-204.
- 38.-Shekarriz B, Stoller ML. Cystinuria and other noncalcareous calculi. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2002; 31:951-977.
- 39.-Rousaud F, Gracia S, Palacin M, Nunes V, Millan F, Oliver A, Rousaud A. Cystinuria and cystine kidney lithiasis. Diagnosis and therapeutic approach. *Arch Esp Urol* 2001; 54:989-996.
- 40.-Wexler L, Brundage B, Crouse J, Detrano R, Fuster V, Maddahi J, Rumberger J, Stanford W, White R, Taubert K. Coronary artery calcification: Pathophysiology, epidemiology, imaging methods and clinical implications. *Circulation* 1996; 94:1175-1192.
- 41.-Tintut Y, Demer LL. Recent advances in multifactorial regulation of vascular calcification. *Lipidol* 2001; 12:555-560.
- 42.-Speer MY, Giachelli CM. Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc Pathol* 2004; 13:63-70.
- 43.-Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Shanahan C, Weissberg PL. Vascular and valvar calcification: recent advances. *Heart* 2001; 85:13-17.
- 44.-Grases F, Sanchis P, Perello J, Isern B, Prieto RM, Fernandez-Palomeque C, Fiol M, Bonnin O, Torres JJ. Phytate (Myo-inositol hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats. *Front Biosci* 2006; 11:136-142.
- 45.-Fleisch H, Bisaz S. Isolation from the plasma of pyrophosphate, an inhibitor of calcification. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 1962; 20:C52-C53.

- 46.-Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocrin Rev* 1998; 19:80-100.
- 47.-Grases F, Sanchis P, Costa-Bauzá A, Bonnín O, Isern B, Perello J, Prieto RM. Phytate inhibits bovine pericardium calcification in vitro. *Cardiovasc Pathol*, en prensa.
- 48.-Grases F, Sanchis P, Perelló J, Isern B, Prieto RM, Fernández-Palomeque C, Torres JJ. Effect of crystallization inhibitors on vascular calcifications induced by vitamin D: a pilot study in Sprague-Dawley rats. *Circ J* 2007; 71:1152-1156.
- 49.-Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grötzinger J, Yamamoto K, Renné T, Jahnen-Dechent W. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem* 2003; 278:13333-13341.
- 50.-Reynolds JL, Skepper JN, McNair R, Kasama T, Gupta K, Weissberg PL, Jahnen-Dechent W, Shanahan CM. Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2920-2930.
- 51.-Westenfeld R, Jahnen-Dechent W, Ketteler M. Vascular calcification and fetuin-A deficiency in chronic kidney disease. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17:124-128.
- 52.-Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:1392-1401.

