



**Universitat**  
de les Illes Balears

## **TREBALL DE FI DE GRAU**

# **EFFECTE INHIBIDOR DELS DIFERENTS MIOINOSITOLS FOSFATS SOBRE LA CRISTAL·LITZACIÓ DE SALS CÀLCIQUES**

**Jaume Dietrich Trias**

**Grau de: Química**

**Facultat de: Ciències**

**Any acadèmic 2021-22**

# **EFFECTE INHIBIDOR DELS DIFERENTS MIOINOSITOLS FOSFATS SOBRE LA CRISTAL·LITZACIÓ DE SALS CÀLCIQUES**

**Jaume Dietrich Trias**

**Treball de Fi de Grau**

**Facultat de: Ciències**

**Universitat de les Illes Balears**

**Any acadèmic 2021-22**

Paraules clau del treball:

Inositol hexafosfat (InsP6, fitat), inositol fosfats (InsPs), inhibidors de cristal·lització, oxalat de càlci.

*Nom del tutor / la tutora del treball: Maria del Pilar Sanchís Cortés*

*Nom del tutor / la tutora (si escau)*

Autoritz la Universitat a incloure aquest treball en el repositori institucional per consultar-lo en accés obert i difondre'l en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor/a		Tutor/a	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Resum

**Abstract:** Recent research showed that phytate (inositol-hexaphosphate, InsP6) consumption may prevent pathological calcifications, such as kidney stones and cardiovascular calcifications. However, many exogenous enzymes can hydrolyze phytate to lower inositol phosphates (InsPs) that also have biological activity. We performed a controlled hydrolysis of phytate and identified the products (InsPs) using tandem mass spectrometry (MS/MS). The total level of all InsPs was measured. In addition, we evaluated the effects of the InsP6 hydrolysates on calcium oxalate (OxCa) crystallization using scanning electron microscopy and measuring the time needed for induction of crystallization. Our results indicated that InsP6 and its hydrolysis products functioned as effective inhibitors of calcium oxalate crystallization and suggest that the higher the proportion of the more phosphorylated InsPs, the greater their inhibitory effect on OxCa crystallization.

**Resumen:** Estudios recientes han demostrado que el fitato (inositol-hexafosfato, InsP6) puede prevenir la calcificación patológica, como en el caso de las piedras de riñón o las calcificaciones vasculares. Sin embargo, algunas enzimas exógenas pueden hidrolizar el fitato a menores inositol fosfatos (InsPs) que también presentan actividad biológica. En este estudio hemos realizado una serie de hidrolisis controladas de fitato y identificado los productos (InsPs) utilizando una espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Los niveles totales de todos los InsPs fueron medidos. Adicionalmente, evaluamos los efectos de los derivados de la hidrolisis del InsP6 en cristalizaciones de oxalato de calcio utilizando microscopía de escaneo electrónico y midiendo el tiempo requerido para la inducción de la cristalización. Los resultados indican que el InsP6 y sus derivados de hidrólisis funcionan como unos inhibidores efectivos de la cristalización del oxalato de calcio (OxCa) y sugieren que a mayor proporción de los InsPs más fosforilados, mayor es su efecto inhibitor sobre la cristalización de OxCa.

**Resum:** Estudis recents han demostrat que el fitat (inositol-hexafosfat, InsP6) pot prevenir la calcificació patològica, com en el cas de les pedres de ronyó o les calcificacions vasculares. Per altra banda, alguns enzims exògens poden hidrolitzar el fitat a menors inositol fosfats (InsPs) que també presenten activitat biològica. En aquest estudi hem realitzat una sèrie d'hidròlisis controlades de fitat i identificat els productes (InsPs) utilitzant una espectrometria de masses en tàndem (MS/MS). Els nivells totals de tots els InsPs es mesuraren. Addicionalment, avaluàrem els efectes dels derivats de la hidròlisi de l'InsP6 en crist·litzacions d'oxalat càlcic utilitzant microscòpia d'escaneig electrònic i mesurant el temps requerit per la inducció de la cristal·lització. Els resultats indiquen que l'InsP6 i els seus derivats d'hidròlisi funcionen com inhibidors efectius de la cristal·lització de l'oxalat càlcic (OxCa) i suggereixen que a major proporció dels InsPs més fosforilats, major és el seu efecte inhibitor sobre la cristal·lització d'OxCa.

# Índex

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>5</b>
1.1 Calcificacions patològiques.....	5
1.1.1 Sialolitiasi.....	6
1.1.2 Calcificacions vasculars.....	6
1.1.3 Litiasi renal.....	7
1.2 Fitat com a inhibidor de la calcificació .....	8
1.2.1 Localització natural del fitat .....	10
1.2.2 Absorció i excreció del fitat .....	11
1.2.3 Efectes beneficiosos del fitat.....	12
1.2.4 El fitat com a inhibidor de la litiasi renal .....	12
1.3 Els mioinositols fosfat.....	14
<b>2. OBJECTIUS</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERIALS I MÈTODES</b> .....	<b>16</b>
3.1 Preparació de les hidròlisis del InsP6 .....	16
3.2 Identificació dels InsPs per espectrometria de masses (MS/MS).....	17
3.3 Cristal·litzacions .....	17
3.4 Microscòpia electrònica d'escombrat (SEM) .....	18
3.5 Quantificació dels ions fosfat lliures .....	18
3.6 Quantificació totals dels InsPs.....	21
3.7 Anàlisi estadístic.....	23
<b>4. RESULTATS</b> .....	<b>23</b>
4.1 Anàlisi dels InsPs per MS/MS.....	23
4.2 Quantificació dels InsPs i quantificació dels ions fosfat lliures .....	25
4.3 Cristal·litzacions i turbidimetries .....	28
4.4 Microscòpia electrònica d'escombrat (SEM) .....	30
<b>5. DISCUSIÓ</b> .....	<b>31</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>33</b>

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1 CALCIFICACIONS PATOLÒGIQUES

Uns dels fenòmens de cristal·lització més presents al cos humà, sent essencials pel funcionament i desenvolupament d'aquest en la majoria de casos, és el procés de la calcificació, la qual pot ser fisiològica (com la formació òssia) o patològica (com la litiasi renal o la calcificació vascular).

Quan un sistema conté quantitats superiors de solut que la quantitat permessa per la solubilitat de l'espècie en el medi, es troba en una situació inestable des del punt de vista termodinàmic, coneguda com a sobresaturació, que indueix la cristal·lització de la substància per arribar a l'equilibri. El temps en que un sistema sobresaturat tarda en precipitar es variable ja que depèn de factors cinètics, podent destacar tres aspectes principals que s'han de considerar per explicar les cristal·litzacions patològiques: un estat de sobresaturació superior al valor habitual (factor termodinàmic), presència de nucleants heterogenis promotors de la cristal·lització (factor cinètic) i dèficit d'inhibidors de la cristal·lització (factor cinètic).

En condicions fisiològiques aquests factors normalment es troben regulats, evitant així la formació de cristalls no desitjats, però la gran influència d'aquests aspectes cinètics i termodinàmics implica que una lleugera modificació en algun d'ells pot provocar que es rompi el balanç i es produeixin cristal·litzacions indiscriminades que acaben generant processos patològics.

Les calcificacions patològiques s'entenen com a depòsits anormals de sals de calci en determinats teixits, normalment junt a la presència, en menor quantitat, d'altres espècies com ferro, magnesi i altres sals minerals. Es tracta d'un procés freqüent que ocorre en diverses situacions patològiques concretes i ben conegudes com la hipercalcèmia, l'hiperparatiroidisme, la patologia valvular cardíaca o la insuficiència renal.

Es poden distingir dos grans grups de calcificacions: la calcificació distròfica, aquella que es dona en teixits no viables o morts com a conseqüència de la necrosi d'aquests mateixos, i la calcificació metastàtica, aquella que es dona en teixits vius com a conseqüència d'alteracions a nivell sistèmic que provoquen l'acumulació d'alts nivells de calci i altres espècies.

Tenint en compte que el calci es un element essencial per l'organisme, on es troba de manera abundant, i que es l'espècie més present en els biominerals fisiològics, les calcificacions representen el tipus de cristal·litzacions patològiques més comuns als humans,

pel qual han estat objecte d'estudi des del seu descobriment. Algunes de les calcificacions patològiques mes estudiades son la sialolitiasi, les calcificacions vasculars i la litiasi renal càlcica.

### · 1.1.1 SIALOLITIASI

La sialolitiasis es una entitat patològica que consta de la obstrucció de la glàndula salival o del seu conducte excretor per formació de càlculs en el parènquima coneguts com sialòlits, i la seva presència d'aquests pot provocar infecció de la glàndula salival. Aquestes formacions calcàries poden ser úniques o múltiples, i la seva forma pot variar entre ovalada o arrodonida.



Figura 1: Càlculs de glàndules salivars<sup>[1]</sup>

### · 1.1.2 CALCIFICACIONS VASCULARS

Les calcificacions vasculars son un altre tipus de calcificacions patològiques molt comuns. En aquestes, el fosfat càlcic es deposita en forma de cristalls de hidroxapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) en els vasos sanguinis i en les vàlvules cardíques, pel qual suposa un gran factor en quant a la presència de risc d'alteracions i malalties cardiovasculars.

Ha estat postulat que la calcificació vascular es produeix en la majoria de casos quan es modifica l'activitat de factors que indueixen la calcificació, com dels receptors activadors dels factors nuclears  $\kappa B$  i els seus lligands, de la osteoprotegerina, de la proteïna morfogenètica òssia (BMP) i de determinats factors de transcripció i els seus inhibidors o reguladors com la proteïna Gla de Matriu (MGP), osteopontina (OPN), pirofosfat, fitat, etc.

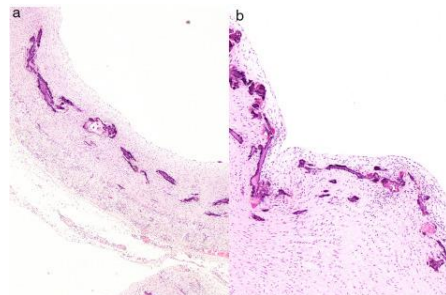


Figura 2: Càlculs vasculars<sup>[2]</sup>

### · 1.1.3 LITIASI RENAL

La litiasi renal es una de les patologies associades a calcificacions més presents i comuns a la població, sent causa d'important morbiditat degut al dolor, hematúria o infecció que pot originar l'eliminació d'un càlcul, afectant fins a un 15 % de la població<sup>[3]</sup>.

Els càlculs renals son concrecions de diferents sals minerals incorporades en una matriu orgànica, originades en el ronyó o en vies urinàries superiors. Principalment es tracten de calcificacions, de manera que els càlculs càlcics suposen un 75-80 % dels casos totals, i es componen predominantment d'oxalat càlcic (OxCa) i, en menor percentatge, fosfat de calci. El 20-25 % restant es tracta de càlculs no càlcics, comunament corresponents a àcid úric, fosfats d'amoni magnesiàns o, en casos menys freqüents, càlculs d'apatita.

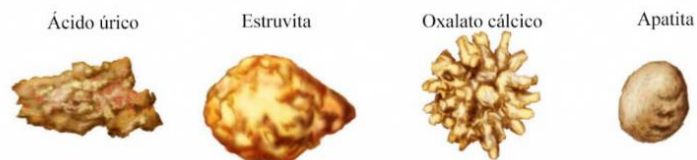


Figura 3: Representació de les formes d'alguns dels càlculs renals més comuns<sup>[4]</sup>

Es pot definir una etapa inicial per la formació del càlcul, basada en l'aparició d'una fase sòlida o niu de cristalls de la respectiva sal, la qual al formar-se en una solució complexa com es l'orina, els cristalls formats en una primera instància poden induir la formació de cristalls d'altres sals presents en la solució, tractant-se per tant de nucleacions heterogènies. El principal cas de nucleació heterogènia es dona amb la precipitació de cristalls d'oxalat càlcic induïda per cristalls d'urat monosòdic o de fosfat de calci. Un cop s'ha format el niu, aquest arriba a una mida suficient per allotjar-se en el tracte urinari gracies a l'agregació de cristalls i interaccions d'aquests amb les parets cel·lulars.

La litogènesi renal es pot induir per tres factors principals: El primer factor és el dèficit de inhibidors de la cristal·lització, causant de les calcificacions al ronyó i vies urinàries. Aquests inhibidors son substàncies presents normalment a la orina que actuen interaccionant amb els centres actius dels cristalls, inhibint el desenvolupament de qualsevol de les etapes de la litogènesi. El citrat i el magnesi protagonitzen alguns dels inhibidors que han demostrat major eficàcia en aquest àmbit. El segon factor és la presència de promotors de la cristal·lització, com pugui ser una elevada sobresaturació. Per altra banda, com a tercer factor trobem una sèrie de causes que suposen l'origen de gran part dels càlculs renals, com anomalies anatòmiques, infeccions o drogues (fàrmacs) poc solubles. La patogènia de la litiasi renal es multifactorial, involucrant alteracions en mecanismes fisicoquímics i biològics que regulen la solubilitat de l'orina, pel qual una anomalia en algun procés que pugui afectar als

factors implicats en el correcte funcionament d'aquests mecanismes pot ser origen de l'aparició de càlculs renals. Alguns dels factors de risc més comuns per la litiasi renal son la hipercalciúria, la hiperuricosúria, la hipocitratúria, alteracions del pH urinari, una reducció del volum urinari, la hipomagnesúria, la hiperoxal·lúria i la cistinúria.

El tractament dels pacients amb litiasi renal pot variar depenent de l'historial analític i del tipus de càlcul que presentin, aplicant des de modificacions permanents de la dieta fins a maneig específic de cirurgia en hiperparatiroidisme i tractaments especialitzats.

## 1.2 FITAT COM A INHIBIDOR DE LA CALCIFICACIÓ

Respecte a les calcificacions patològiques, s'ha demostrat l'existència d'una sèrie de composts d'origen natural que poden inhibir o dificultar la formació i precipitació d'aquestes sals càlciques als organismes biològics. Un dels composts que reuneix aquestes característiques de més rellevància actual es va descobrir a finals del segle XIX, quan els estudis de Pfeiffer determinaren la presència d'un compost de naturalesa orgànica a una sèrie de llavors vegetals que contenia nombrosos grups fosfat a la seva estructura, denominant-se inicialment com fosfat orgànic, tot i que no fou fins a principis del segle XX quan Anderson va descriure l'estructura química del que actualment es coneix com el fitat (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrogenfosfat).

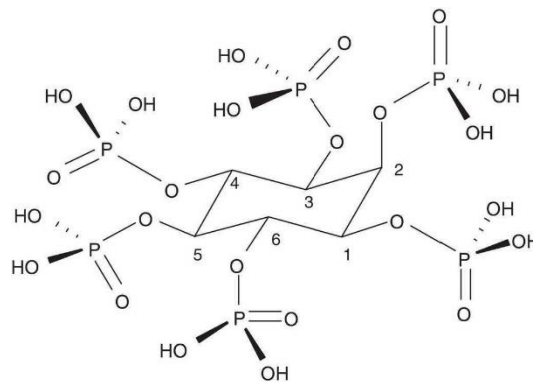


Figura 4: Representació de l'estructura química del fitat (InsP6)<sup>[5]</sup>

L'estructura del fitat (o InsP6) quedà definida com la base de l'àcid fític, sent un component natural àmpliament distribuït al regne vegetal. Es pot considerar un magatzem de fosfat i de minerals que conté fins el 75% del fosfat total present en les llavors (especialment cereals, fruits secs i llegums), situat a les capes aleuròniques i als cossos de l'endosperma o el cotilèdon. Normalment es troba en forma de la sal de fitat càlcic-magnèsic, i durant la germinació de les llavors la seva funció es basa en una hidròlisi que permet l'alliberació de fosfat, magnesi i calci pel desenvolupament de la planta.



Tot i conèixer-se la seva estructura química, els estudis que revelaren el seu potencial us clínic es dugueren a terme per part de Mellanby als anys 30<sup>[6]</sup>, a partir d'unes investigacions nutricionals basades en l'alimentació de cans amb fitat sòdic, determinant que aquest inhibia l'absorció correcta de calci arribant a provocar raquitisme. Va ser degut a aquests resultats<sup>[7]</sup> que inicialment es va recomanar l'eliminació de les llavors i tota font de fitat natural de la dieta, per tal d'evitar problemes d'absorció de determinats elements essencials, i es va classificar com anti-nutrient, fins que estudis posteriors on es variava la concentració de fitat i la sal atribuïda determinaren resultats importants, arribant a observar una eliminació del raquitisme provocat i determinant la gran influència que exerceix el fitat sobre els fenòmens i mecanismes d'absorció intestinal, desmentint les acusacions errònies sobre les propietats anti-nutrients assignades inicialment al fitat, provocades per una concentració superior a la recomanable per obtenir els beneficis atribuïts per la seva actuació (< 2 g per dia)<sup>[8]</sup>, junt a una ingesta de dietes no equilibrades en concentracions de continguts minerals.

L'acció realitzada pel fitat a l'organisme suposà un ventall de possibilitats clíniques i farmacològiques que es seguiren estudiant. Així, durant els darrers 40 anys s'han demostrat importants efectes positius del fitat a la salut, particularment referents a la seva capacitat d'actuació com antioxidant, les seves propietats anticancerígenes, prevenció de la litiasi renal i calcificacions patològiques, reducció de l'índex glucèmic i estabilització dels nivells de glucosa i colesterol.

Diversos estudis han profunditzar més en la capacitat inhibidora del fitat per les calcificacions degut al ventall de possibilitats clíniques que suposa. Aquests han permès observar que la capacitat inhibidora de les sals càlciques del fitat es deu principalment a l'alta afinitat dels grups fosfats pel calci en els llocs actius del creixement cristal·lí, evitant el desenvolupament d'aquestes calcificacions al impedir l'agregació dels ions requerits per les seves formacions. Els estudis duts a terme<sup>[9]</sup> també permeteren determinar que el fitat presenta una especial capacitat de inhibició de la precipitació de les sals càlciques basades en l'oxalat i en els sulfats. Alguns d'aquests estudis es dugueren a terme simulant medis que reproduïen les condicions baix les que es formen les conegudes "pedres de ronyó" o calcificacions patològiques formades al teixit del sistema renal, com en un estudi de la fase inicial de la formació de càlculs renals<sup>[10]</sup> on va examinar l'uroteli de la bufeta urinària del porc baix diverses condicions, com l'eliminació de la capa protectora de glicosaminoglicans i utilitzant radicals lliures per generar lesions als teixits. En tots els casos es va demostrar que el fitat inhibia el desenvolupament dels cristalls d'oxalat càlcic.

Finalment, mitjançant anàlisis termodinàmic i cinètic del fitat com a inhibidor de cristal·litzacions es pogué determinar que l'InsP6 alterava la cinètica de les cristal·litzacions

però no la termodinàmica, permetent aproximar que l'actuació del fitat es dona sobre el procés de nucleació dels cristalls.

Factors que dificulten els estudis amb aquesta molècula poden ser el baix pes molecular, les baixes concentracions en les que es troba present als organismes biològics, la dificultat de determinar-lo i quantificar-lo, ja que la seva hidròlisi (relativament senzilla) ofereix una gran quantitat de productes de desfosforilació, coneguts com Inositols fosfats (InsPs).

### · 1.2.1 LOCALITZACIÓ NATURAL DEL FITAT

El fitat o myo-inositol hexafosfat, com ha estat comentat prèviament, es troba de forma natural present en concentracions elevades a una sèrie de llavors com cereals, llegums, fruits secs i altres, on representa el major depòsit de fòsfor per la llavor durant la fase de germinació, i arribant a emmagatzemar fins al 80 % del fòsfor total.

En aquestes llavors vegetals, el fitat es troba situat en forma de depòsits insolubles localitzats en inclusions globulars enllaçades a la membrana, on queden disposats per exercir la seva funció com a font de reserva de fosfats. Al germen de les llavors es localitza el contingut més elevat de fitat, seguit de l'endosperma amb quantitats lleugerament menors, i finalment les arrels amb presència de baixes quantitats de fitat. Per altre banda, a altres zones de la planta com són el tronc, fulles o fruites, el contingut de fitat es considera nul al ser pràcticament indetectable. A la taula 1 es poden comparar els continguts en fitat de les llavors de diferents espècies vegetals.

Espècie	Fitat (%)
Blat de moro	2 - 6.4
Blat	1.1 – 4.8
Mongetes	2.5
Cacauets	1.9
Arròs	2.2
Girasol	1.9
Ordi	1.0
Pèsol	0.9
Avena	0.8

Taula 1: continguts en fitat de les llavors de diverses espècies vegetals<sup>[11]</sup>

També s'ha comprovat l'existència de fitat intracel·lular en cèl·lules animals, especialment en mamífers. En aquests casos, la major part del fitat extracel·lular prové de l'aportació exògena, mentre que la presència de fitat intracel·lular detectada pot tenir un origen sintètic. Tot i que s'ha determinat la presència de fitat en aquestes cèl·lules, el seu vertader origen es difícil de determinar i encara no s'ha definit una ruta sintètica que pugui ser

acceptada amb seguretat, degut a que les quantitats de fitat presents son quantitativament baixes, dificultant aquests tipus d'estudis.

### · 1.2.2 ABSORCIÓ I EXCRECIÓ DEL FITAT

El fitat és una de les principals formes d'administració de fòsfor a les dietes basades especialment en el consum vegetal de llegums i altres llavors. Generalment, el fòsfor d'origen animal s'absorbeix considerablement fins a un 60 % del fòsfor ingerit, metre que el fòsfor d'origen vegetal (fitat i derivats) pareix ser menys absorbible.

Aquest fenomen ha estat objecte d'estudi, determinant que el problema es dona al tracte gastrointestinal: al arribar els aliments al tub digestiu, es requereixen mecanismes d'hidròlisis que alliberin els fosfats del fitat perquè aquests puguin ser absorbits. En el cas dels humans i de gran part de mamífers, es manca de fitases endògenes que puguin catalitzar aquests processos, pel qual la presència d'aquests enzims al tracte digestiu dependrà de la ingesta d'aliments vegetals que contenguin fitases actives. En el cas del fitat, en condicions de pH fisiològic (6-7) l'InsP6 es troba carregat negativament, i degut a que no s'han descobert transportadors transcel·lulars d'InsP6, el fet de que pugui travessar la bicapa lipídica de les membranes cel·lulars es veu altament dificultat pel qual es considera improbable, de manera que la seva absorció intestinal queda restringida a un mecanisme passiu via paracel·lular, provocant que l'InsP6 intacte s'absorbeixi en una quantitat menor al 2 % de la quantitat ingerida<sup>[12]</sup>.

A partir d'aquests estudis s'ha pogut determinar que els nivells de fitat presents en un organisme es basen amb una relació directa i proporcional amb la dieta seguida, sent necessària la seva ingestió per mantenir uns nivells adequats perquè aquest pugui actuar notablement, degut a que l'organisme ha demostrat no ser capaç de sintetitzar-lo en quantitats notables, requerint junt a la seva ingesta una dieta rica i variada en quant a elements essencials constituents dels principals biominerals per tal d'evitar inconvenients en quant a l'absorció necessària d'aquests. A més, al provenir directament de la dieta, la quantitat de fitat present a l'organisme es fàcilment determinable a través de la orina i de la sang.

### · 1.2.3 EFECTES BENEFICIOSOS DEL FITAT

Apart de la importància que adquireix el fitat per la regulació del balanç de fosfats a l'organisme, ha demostrat oferir una sèrie de qualitats beneficioses, presentant una especial capacitat d'inhibició per les calcificacions patològiques, unes bones propietats com a agent antioxidant i una potencial capacitat de prevenció de determinats càncers:

- Efecte antioxidant: les propietats antioxidants de l'InsP6 son una de les seves qualitats més destacables, basant-se principalment amb la seva capacitat per formar complexos altament estables amb ferro<sup>[13]</sup>.
- Activitat anticancerígena: El fitat presenta una sèrie de mecanismes d'acció anticancerígens basats en l'alteració genètica (influeix en gens reguladors del cicle cel·lular i gens supressors de tumors)<sup>[14]</sup>, exaltació immunitària<sup>[15]</sup> i en les seves propietat antioxidants (capacitat de formar quelats amb el ferro evitant l'acció catalitzadora d'aquest)<sup>[16]</sup>.
- Paper del fitat en la osteoporosis: l'InsP6 podria tenir un paper en la protecció contra la osteoporosi degut a mecanismes fisicoquímics basats en la adsorció a les cares dels cristalls de hidroxiapatita, dificultant així la seva dissolució<sup>[17]</sup>. A més, l'InsP6 va demostrar un gran efecte sobre les cèl·lules òssies; en un estudi amb cultius d'osteoblasts MC3T3-E1<sup>[18]</sup> va determinar que l'InsP6 pot regular la mineralització fisiològica de l'os actuant directament a nivell extracel·lular i servint de senyal específica a nivell cel·lular per la regulació de l'expressió gènica de l'osteopontina.

### · 1.2.4 EL FITAT COM A INHIBIDOR DE LA LITIASI RENAL

La patologia més àmpliament estudiada i en la que existeix major evidència científica de la relació directa entre el consum de fitat i la seva presència i efecte sobre les calcificacions patològiques és la litiasi renal. Els primers estudis que es dugueren a terme respecte a l'efecte de l'InsP6 sobre les calcificacions renals s'iniciaren als anys 90, i, tot i que avui en dia es poden considerar certament incomplets, obtingueren resultats que ja deixaven constància del potencial del fitat com a inhibidor d'aquestes calcificacions patològiques, de manera que s'han anat desenvolupant una gran quantitat d'estudis variats per tractar de determinar com optimitzar de la millor manera el potencial d'aquesta substància natural.

Dins aquesta gran quantitat d'estudis realitzats sobre l'efecte inhibitori del fitat, trobem estudis realitzats in vitro, estudis realitzats en animals d'experimentació i estudis realitzats en humans:

- En quant als estudis in vitro, s'han comparat els efectes inhibitoris en la formació de cristalls d'hidroxiapatita del fitat front als d'altres substàncies com el citrat. Els resultats mostren que el citrat aconsegueix una lleugera reducció dels cristalls, mentre que el fitat produeix una eliminació total. Estudis posteriors també han relacionat el consum de fitat amb un descens de la formació d'altres cristalls fisiològics com l'oxalat càlcic; la capacitat del fitat per disminuir la cristallització de l'oxalat càlcic s'atribueix a la combinació de la seva capacitat inhibidora de la cristallització de calcificacions patològiques junt a la seva acció antioxidant. Finalment, també s'ha comparat l'efecte del fitat front al de altres pirofosfats en la formació de cristalls d'hidroxiapatita, obtenint resultats que indiquen de nou la superior capacitat inhibidora del fitat<sup>[11]</sup>.
- En quant a estudis en animals d'experimentació, es valoraren en varies ocasions l'efecte inhibitor del fitat en la formació de càlculs renals. En un dels estudis, s'observà que a les rates tractades amb fitat es produïa una disminució significativa en les calcificacions papil·lars, el qual va ser confirmat per estudis posteriors on, a més, es determinà que tan sols les rates a les que s'administrava una dieta sense presència de fitat mostraves calcificacions intrarenals i importants depòsits de calci tant en els ronyons com a les papil·les i túbuls renals, posant així de manifest que l'acció inhibidora de la cristallització exercida pel fitat es produïa tant a nivell intrapapilar com a l'orina<sup>[12]</sup>.
- Respecte als estudis en humans, un assaig clínic basat en la comparació del risc de formació de càlculs urinaris de calci en 96.000 dones tractades amb fitat<sup>[19]</sup>, va demostrar que s'obtenia un descens en el risc de la formació d'aquestes calcificacions, considerant així el fitat com un important element en la prevenció de la patologia. També s'avaluaren els nivells de fitat presents en persones amb cristalls formats d'oxalat càlcic, comparant-los amb els nivells de fitat que presentaven persones sanes sense tendència a generar aquestes calcificacions, observant que els nivells d'InsP6 eren significativament menors en les persones que tendien a cristallitzar calcificacions renals. Per tant, a partir d'aquests resultats es pogué considerar que l'excreció de quantitats baixes de fitat podria ser un factor de risc en el desenvolupament d'aquest tipus de càlculs renals<sup>[20]</sup>.

El citrat actua com un potent inhibidor de l'agregació de cristalls preformats d'oxalat càlcic, mitjançant la unió a la superfície dels cristalls formant complexos de OxCa-Citrat que impedeixen l'agregació dels nous cristalls, i per tant inhibint la formació i desenvolupament del càlcul.

Per aquests motius, els coneixements sobre els modes d'acció del citrat sobre la inhibició de la formació de càlculs renals han servit de base per molts d'estudis sobre l'efecte del fitat, especialment per comparar els efectes i mecanismes d'actuació dels dos inhibidors en front a les calcificacions.

### 1.3 ELS MIOINOSITOLS FOSFAT

La presència del fitat a l'organisme no es troba únicament en forma d'InsP6, sinó que es determina com tot un conjunt de productes derivats d'aquest basats en la hidròlisi dels diferents grups fosfats de la seva estructura, trobant per tant InsP5, InsP4, InsP3, InsP2 i InsP1.

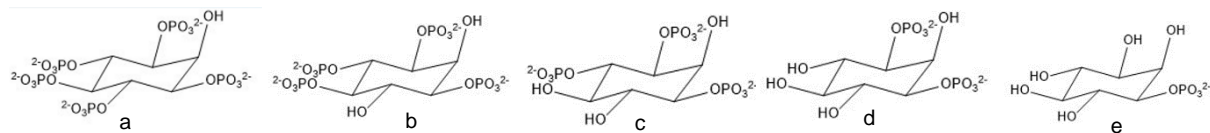


Figura 5: Representació de l'estructura química de a) InsP5 b) InsP4 c) InsP3 d) InsP2 e) InsP1

En molts de casos la hidròlisi d'aquest compost natural es produeix amb l'objectiu principal d'alliberar fosfats al medi, tenint en compte que el fitat es un dels principals magatzems de fòsfor en molts d'organismes, especialment en plantes, de manera que en etapes de creixement i desenvolupament com en el cas de la germinació de les llavors s'indueix l'alliberació d'aquests grups fosfats. Per altra banda, organismes com el cos humà obtenen els productes de la hidròlisi de l'InsP6 com a conseqüència principal del metabolisme de la molècula per la inositol polifosfat 5-fosfatasa (PIP2) i diferents enzims quinases exògenes ingerides amb la dieta<sup>[21]</sup>.

Així, l'InsP6 es troba a l'organisme hidrolitzat en tota la sèrie de productes de la desfosforilació, dels quals alguns d'ells contenen propietats i funcions més desenvolupades i complexes que la d'inhibició de cristal·litzacions patològiques. El major exemple es el cas de l'inositol 3-fosfat (InsP3), el qual actua com a un important segon missatger cel·lular, alliberant-se a partir de lípids de membrana en resposta a determinades senyals extracel·lulars i produint l'alliberació de calci en el reticle endoplasmàtic<sup>[22]</sup>, o els InsP4 i InsP5, els quals actuen

favorablement en el tractament de la diabetis i en la proliferació del carcinoma de còlon inhibint l'activació de la proteïna AKT<sup>[23]</sup>.

A l'estudi de la descomposició de l'InsP6 en els seus diferents productes d'hidròlisi s'han dut a terme dos principals estudis amb rates Wistar que han permès un major enteniment de l'absorció i metabolisme del fitat:

En el primer cas, es va dur a terme un estudi d'avaluació de la presència dels diferents inositol fosfats en orina després d'una administració tòpica de mio-inositol hexafosfat en forma de gel a rates Wistar femelles<sup>[24]</sup>. Els resultats revelaren en primer lloc que amb la supressió del InsP6 de la dieta, les rates tan sols excretaren InsP2 en orina, sense que es detectes presència de cap altre InsPs. Les rates que reberen un tractament tòpic d'altres dosis durant 7 dies excretaren alts nivells d'InsP6, però també excretaren nivells considerables d'altres InsPs en orina, especialment d'InsP5 i InsP4. Per altra banda, les rates que reberen el tractament de dosis baixes demostraren un inicial creixement de l'excreció d'InsP2 com l'espècie més present, seguida de l'InsP3 i l'InsP4, que anaren decreixent fins demostrar una prevalença de l'InsP6. Per tant, l'estudi realitzat pogué concloure que en absència d'administració d'InsP6 tan sols s'excreta via orina InsP2, que l'InsP6 pot ser absorbit via tòpica al ser administrat en forma de gel i que l'InsP6 es excretat via orina junt amb presència d'altres InsPs (InsP5, InsP4, InsP3 i InsP2).

El segon estudi es dugué a terme amb la finalitat d'avaluar els nivells urinaris dels diferents InsPs en rates que reberen diferents sals d'InsP6 via administració oral en forma de sals de Na o Ca/Mg<sup>[25]</sup>. Els resultats dels primers sense administració d'InsP6 concorden amb els de l'estudi anterior, detectant tan sols InsP2 en les mostres urinàries. Després de l'administració de les sals de Na durant 15 dies, es determinaren uns nivells majors d'excreció urinària d'InsPs que en els determinats per administració tòpica, detectant amb espectrometria de masses alta presència d'InsP2, seguida de l'InsP3, InsP4, InsP5 i en darrer lloc InsP6. Les rates a les quals s'administraren les sals de Ca/Mg presentaren uns nivells generals inferiors del contingut d'InsPs en orina, havent prevalença d'InsP2 seguida de l'InsP1. Per tant, l'estudi permeté deduir que una administració via oral, tot i ser la mes senzilla i fàcil de dur a terme, condueix a una menor absorció de l'InsP6 que en administració tòpica, que el tipus de sal influeix considerablement en l'absorció general i de cada InsPs, i que la complementació de l'administració oral amb sucre permet una major absorció de l'InsP6.

## 2. OBJECTIUS

Els objectius particulars d'aquesta memòria formen part d'una contribució als objectius generals del Laboratori d'Investigació de Litiasi renal de la Universitat de les Illes Balears, amb la finalitat d'estudiar les molècules i mecanismes implicats en la formació de càlculs renals.

Així, l'estudi descrit a aquesta memòria pretén profunditzar a l'estudi i investigació de l'efecte de les diferents formes hidrolitzades del mioinositol fosfat sobre la cristal·lització de l'oxalat càlcic. L'aportació a la investigació realitzada mitjançant aquest estudi es basa en la coneguda capacitat inhibidora de calcificacions patològiques dels mioinositols fosfat, i s'ha dut a terme amb la finalitat de determinar quines són les principals formes hidrolítiques del mioinositol fosfat que actuen sobre la precipitació de les sals oxàliques i quina de les formes és la que demostra una major capacitat d'inhibició.

## 3. MATERIALS I MÈTODES

Per realitzar l'estudi sobre l'efecte inhibidor dels InsPs sobre les calcificacions patològiques es dugueren a terme les següents proves analítiques amb la finalitat de poder discutir i interpretar els resultats obtinguts en cada una d'elles de forma precisa i poder relacionar-los entre ells per extreure una sèrie de conclusions generals que satisfacin els objectius proposats:

### 3.1 [Preparació de les hidròlisis del InsP6](#)

Per realitzar l'estudi de l'acció dels diferents InsPs va ser necessari realitzar hidròlisis a diferents temps per obtenir a partir del InsP6 una sèrie de dissolucions basades en mesclades dels diferents productes d'hidròlisis de l'inositol fosfat seguint la hipòtesi de que com major temps estigui la dissolució sotmesa a condicions d'hidròlisis, trobarem una major hidròlisis dels InsP6.

Per l'obtenció dels diferents productes de l'InsP6 hidrolitzats es va partir de la preparació de 100 mL d'una dissolució stock de fitat 1.12 mM a partir de sal sòdica hidratada d'àcid fític (68388, Sigma Aldrich) i es va ajustar a un pH 2 amb HCl 0,5 M.

A partir de la dissolució stock, es van prendre alíquotes de 5 mL les quals es deixaren en repòs en un bany sec durant 6, 9, 16, 24, 48 i 72 h, per duplicat.



### 3.2 Identificació dels InsPs per espectrometria de masses (MS/MS)

Les diferents alíquotes s'injectaren a un espectròmetre de masses Q Exactive Orbitrap d'alta resolució equipat amb ionització per electrospray encalentit (HESI) probe (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), amb el qual es va operar en mode de ionització negativa.

Les condicions programades per la realització de les mesures de les mostres hidrolitzades a l'espectrofotòmetre de masses foren les següents:

La temperatura del capil·lar de transferència de ions es situà a 320 °C, i el voltatge de l'esprai es situà a 2.9 kV en mode negatiu i S-lens RF level 50 AU. Es va dur a terme una injecció directe en mode Full scan acquisition en un rang entre 150-700 m/z realitzat a una resolució de 140 000.

### 3.3 Cristal·litzacions

Per avaluar l'efecte de cada producte de la hidròlisis del fitat es varen dur a terme una sèrie d'experiments implicant la inducció de cristal·lització de l'oxalat càlcic a partir de orina sintètica en absència i en presència de 200 µL de les diferents mostres hidrolitzades.

Les dissolucions sintètiques A i B utilitzades per obtenir l'orina artificial (Taula 2) es prepararen amb aigua desionitzada i seguint les quantitats de reactius indicades, es van filtrar, sonicar i es van ajustar a pH 6 utilitzant NaOH 1 M per la dissolució A i NaOH 6 M per la dissolució B. Un cop preparades les dissolucions, 100 mL de cada una s'introduïa a un vas de cristal·lització submergit al bany termostàtic. Un cop la dissolució d'orina sintètica s'estabilitzava a 37 °C, s'introduïen 2 mL de dissolució stock de oxalat de sodi (5 g/L) per induir l'inici de la cristal·lització.

Dissolució A		Dissolució B	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·10H <sub>2</sub> O	19.34 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	15.45 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5.92 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	15.64 mM
NH <sub>4</sub> Cl	86.75 mM	NaCl	223.31 mM
KCl	162.69 mM	Na <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0.6 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM		

Taula 2: Composició de l'orina artificial. Es prepararen volums equivalents de les dues dissolucions.

L'efecte de les diferents mostres referent a la capacitat d'inhibició de la cristal·lització de l'oxalat càlcic es determinaren estudiant el temps de precipitació en cada assaig utilitzant un sistema turbidimètric cinètic, consistent en un espectròmetre equipat amb una cel·la de mesura de guia de llum de fibra òptica (AvaSpec-ULS2048CL-EVO). La cristal·lització s'avaluà en un vas cilíndric de vidre de 250 mL submergit en un bany termostàtic a una

temperatura constant (37 °C) i amb agitació magnètica, registrant contínuament la corba absorbància-temps per poder determinar el temps d'inducció.

A l'inici de cada mesura es determinava el pH inicial de la dissolució a analitzar. L'absorbància de la dissolució es va mesurar en funció del temps des de la introducció de les dissolucions A i B, fins el final de l'assaig cinètic.

### 3.4 Microscòpia electrònica d'escombrat (SEM)

L'estructura morfològica i característiques estructurals dels cristalls de OxCa obtinguts a l'orina sintètica en absència i presència d'InsP6 i els productes d'hidròlisi es varen examinar utilitzant una microscòpia electrònica d'escombrat (SEM, Hitachi S-3400N) acoblada amb energia dispersiva RX de microanàlisi (Bruker AXS XFlash Detector 4010).

### 3.5 Quantificació dels ions fosfat lliures

S'analitzaren els ions fosfats lliures corresponents a cada una de les mostres hidrolitzades als diferent temps per determinar la quantitat d'ió fosfat que es trobava lliure en dissolució, per tal de relacionar la variació de concentracions de fosfats lliures amb el grau d'hidròlisis dels InsPs.

El mètode seleccionat per dur a terme l'assaig de determinació dels ions fosfats lliures va ser el mètode colorimètric de l'àcid ascòrbic. Aquest mètode es basa en la reacció del molibdat amònic i el tartrat d'antimoni i potassi en medi àcid amb l'ortofosfat, donant lloc a l'heteropoliàcid fosfomolibdic, que es reduït per l'àcid ascòrbic al complex blau de molibdè, oferint una coloració intensa. El prototip dels heteropoliàcids es l'àcid molibdofosfòric ( $H_3[PO_4 \cdot 12MoO_3]$ ), on les 12 molècules de  $MoO_3$  es situen coordinades al voltant dels ions fosfat, unint-se tres àtoms de molibdè a cada un dels oxígens com a ponts d'unió entre dos àtoms de molibdè.

Els reactius utilitzats foren: àcid sulfúric, tartrat d'antimoni i potassi, molibdat amònic, àcid ascòrbic i dihidrogenfosfat de potassi.

Les quantitats exactes d'àcid sulfúric i molibdat amònic exerceixen un gran efecte sobre la formació de l'àcid molibdofosfòric i damunt la reducció d'aquests heteropoliàcids i damunt del propi ió molibdat.

Per dur a terme la realització del mètode colorimètric de l'àcid ascòrbic es va seguir el següent procediment: en primer lloc es necessari preparar el reactiu combinat constituït per una mescla

dels diferents reactius utilitzats. Per elaborar-lo es prepararen 2 dissolucions dels reactius a utilitzar, que més avant seran mesclades en les proporcions corresponents. Les dissolucions a preparar son:

1) Dissolució àcid ascòrbic (79,31 mM):

Es dissolen 0,70 g d'àcid ascòrbic (99%) en 50 mL d'H<sub>2</sub>O (miliQ). S'introdueix la dissolució en un recipient tintat i es guarda en gelera fins a la seva utilització. Aquesta dissolució tan sols es estable durant un màxim de 7 dies degut a la sensibilitat de l'àcid ascòrbic a les condicions de llum ambientals, de manera que es necessari que la dissolució s'emmagatzemi a una gelera i en un recipient de color obscur o recobert amb paper d'alumini per evitar el contacte directe amb la llum. En aquestes condicions la dissolució podrà ser utilitzada durant els pròxims 6-7 dies a partir de la seva preparació, posteriorment caldrà preparar una nova dissolució per realitzar l'assaig.

2) Dissolució molibdat (5,88 mM)/tartrat (0,294 mM) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,54 M):

Per preparar aquesta dissolució caldrà la preparació de 3 dissolucions de partida;

2.1. S'introdueixen 21 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%) en un vas de precipitats (equivalent a 1,54 M en 250 mL de dissolució final).

2.2. Es dissolen 1,84 g d'heptamolibdat amònic tetrahidrat en 50 mL d'H<sub>2</sub>O (miliQ). S'afegeixen unes gotes dels 21 mL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat per facilitar la dissolució del sòlid.

2.3. Es dissolen 0,049 g de tartrat d'antimoni i potassi en 50 mL de H<sub>2</sub>O (miliQ).

Un cop preparades les 3 dissolucions, en un matràs aforat de 250 mL s'introdueixen uns 100 mL d'H<sub>2</sub>O (miliQ), unes gotes de la dissolució d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat (2.1), posteriorment s'introdueix la dissolució d'heptamolibdat amònic (2.2), s'afegeixen unes gotes més de la dissolució d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat (2.1) i finalment s'introdueix la dissolució de tartrat d'antimoni i potassi. S'afegeix l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat (2.2) restant dels 21 mL preparats inicialment i s'enrasa el matràs amb H<sub>2</sub>O (miliQ). La dissolució s'introdueix a un recipient de 250 mL i es guarda en gelera fins a la seva utilització.

Un cop s'han preparat les dues dissolucions de reactius, es prepararan diferents patrons amb l'objectiu d'obtenir la recta de calibrat, i seguidament es prepararan les diferents mostres a analitzar, cada mesura, tant dels patrons com de les mostres, per duplicat.

· Preparació dels patrons:

Es prepararen una sèrie de patrons de concentracions de fosfat conegudes per obtenir una recta de calibratge a la qual poder interpolar les senyals obtingudes pels assaigs i poder determinar la concentració de fòsfor inorgànic en ells. Per preparar els patrons, cal preparar una sèrie de dissolucions que contenguin diferents concentracions de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , les quals es prepararan a partir d'una dissolució comú de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  500  $\mu\text{M}$ . Per preparar la dissolució  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  500  $\mu\text{M}$  es partirà d'una sèrie de dilucions a partir d'una dissolució més concentrada:

1. Dissolució mare de dihidrògen fosfat de potassi 50 mM en  $\text{H}_2\text{O}$  (miliQ): Es dissolen 0,68 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  (miliQ).
2. Dissolució dihidrògen fosfat de potassi 1 mM en  $\text{H}_2\text{O}$  (miliQ): S'introdueixen 2 mL de la dissolució mare (1) en un matràs aforat de 100 mL i s'enrasa amb  $\text{H}_2\text{O}$  (miliQ).
3. Dissolució dihidrògen fosfat de potassi 500  $\mu\text{M}$  en  $\text{H}_2\text{O}$  (miliQ): S'introdueixen 50 mL de la dissolució (2) en un matràs aforat de 100 mL i s'enrasa amb  $\text{H}_2\text{O}$  (miliQ).

A partir de la dissolució (3) es podran preparar 6 patrons de concentracions de fòsfor inorgànic ([Pi]) conegudes mitjançant la introducció de diferents quantitats de la dissolució (3) a cada patró:

- Recta de calibratge: 0, 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{M}$  de Pi

Patrons (5mL)	[Pi] ( $\mu\text{M}$ )	Volum $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 500 $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{L}$ )	Volum $\text{H}_2\text{O}$ miliQ (mL)
P0	0	0	5
P1	10	100	4,9
P2	20	200	4,8
P3	30	300	4,7
P4	40	400	4,6
P5	50	500	4,5

Taula 3: Preparació de patrons per la quantificació dels ions fosfat lliures (Pi).

D'aquesta manera, a cada patró l'ortofosfat reacciona amb el molibdat d'amoni i amb el tartat d'antimoni i potassi, donant lloc a un heteropoliàcid fosfomolibdic que es redueix a blau de molibdè per acció de l'àcid ascòrbic, tintant les dissolucions d'un color intens, podent apreciar la concentració de fosfats en cada cas depenent del grau coloració que obté la dissolució.

· Anàlisi dels patrons i mostres:

Un cop preparat els patrons, a una placa microtituladora de 96 pous es pot dur a terme l'anàlisi d'aquests per obtenir la recta de calibratge l'anàlisi de les pròpies mostres. Per poder dur a terme l'anàlisi, cal seguir el següent procediment (mesures per duplicat tant pels patrons com per les mostres):

1. Ajustar el pH de la mostra entre 3 i 10.
2. Introduir a cada pou de la placa (amb l'ordre indicat):

Ordre	Substància	Volum ( $\mu\text{L}$ )
1 <sup>o</sup>	Dissolució àcid ascòrbic	50
2 <sup>o</sup>	Dissolució molibdat/tartrat	50
3 <sup>o</sup>	Patró/mostra	250

Taula 4: Ordre d'introducció de dissolucions per la preparació de la placa microtituladora.

3. Agitar la placa (amb l'opció "shake" de l'espectrofotòmetre UV-Vis) i deixar reposar durant 30 minuts (en alguns casos, com en el de l'espectrofotòmetre utilitzat, el protocol ja està programat perquè es comenci la lectura de la placa al haver passat aquest temps).
4. Passats els 30 minuts es mesura l'absorbància a 880 nm.

### 3.6 Quantificació total dels InsPs

Es va realitzar una quantificació dels InsPs total basada en la capacitat dels InsPs de formar complexos amb Al(III), i desplaçar-lo de la formació dels complexos taronges d'alumini-xilenol. Per realitzar l'assaig es va dur a terme la separació utilitzant una resina AG 1-X8.

Per analitzar les diferents mostres hidrolitzades va ser necessari realitzar una dilució prèvia de les mostres de fitat 1.12 mM obtingudes degut a l'alt ordre que suposava aquesta concentració. Les mostres a analitzar en cada cas foren diluïdes a un factor de 1:1000 obtenint 250 mL de les dissolucions 1.12  $\mu\text{M}$ , a les quals ja es pogué aplicar el procés de preparació i determinació dels InsPs.

Per preparar els eluats de les mostres es va seguir el següent procediment d'extracció amb resina aniònica AG1-X8:

1. S'introdueixen 20 mL de la mostra 1.12  $\mu\text{M}$  amb 20 mL d' $\text{H}_2\text{O}$  (miliQ) en vasos de precipitats petits.
2. S'ajusta el pH a 3 i es transfereix a un vas de precipitats de 150 mL (Fisher-Brand), el qual conté 0,5 g de resina aniònica AG1-X8 sense condicionar.
3. S'agita durant 15 minuts a 160 rpm a un agitador orbital per facilitar l'adsorció del fitat a la resina.
4. Un cop passat el temps d'agitació, tant la mostra com la resina es traspassen quantitativament a una columna per extracció en fase sòlida de 20 mL equipada amb una frita.
5. El filtrat a través de la frita es rebutja, mentre que la resina amb el fitat unit a ella queda disposada sobre la frita.

6. La resina es renta amb 100 mL d'HCl 2M mitjançant 4 rentades de 25 mL deixant en cada una d'elles que es filtri tot l'àcid.
7. Posteriorment es renta dos cops amb 5 mL d'H<sub>2</sub>O (miliQ) per eliminar l'excés d'àcid.
8. El fitat restant present a la resina s'elueix amb 4 mL de NaCl 2 M, mitjançant 4 extraccions de 1 mL cada una. En cada una de les extraccions, es deixa en agitació durant 5 minuts a 180 rpm amb l'agitador orbital. El total dels 4 eluats es recull a un tub d'assaig i s'homogeneïtza amb un agitador vòrtex.

Per dur a terme l'assaig es requereixen les següents dissolucions:

- Xilenol Orange 4 mM: 0,076 g de xilenol en 25 mL d'H<sub>2</sub>O (miliQ).
- Nitrat d'alumini nonahidrat 4 mM: 0,0374 g en 25 mL d'H<sub>2</sub>O (miliQ).
- Tampó acetat/acètic 0,7 M a pH = 5,2: 5,74 g d'acetat sòdic en 90 mL d'H<sub>2</sub>O (miliQ). S'ajusta el pH i s'enrasa a 100 mL.
- NaCl 2 M: 116,88g de NaCl en 1L d'H<sub>2</sub>O (miliQ).
- Fitat sòdic 1 mM: 0,033 g en 50 mL d'H<sub>2</sub>O (miliQ).
- Dilució fitat sòdic 100 µL en NaCl 2 M: pipetejar 5 mL de la dissolució de fitat 1 mM i enrasar a 50 mL amb NaCl 2 M.

Preparació dels patrons de fitat a utilitzar:

Patró	Conc. Fitat (µM)	Volum fitat 100 µM (µL)	Volum NaCl 2 M (mL)
0	0	0	5
1	2	100	4,90
2	4	200	4,80
3	7	350	4,65
4	10	500	4,50
5	12	600	4,40

Taula 5: Preparació de les dissolucions per l'assaig de quantificació dels diferents InsPs.

També cal preparar els reactius R1 i R2 per la determinació de fitat abans del seu ús de la següent manera:

- R1: 0,6 mL de nitrat d'alumini nonahidrat (Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O) 4 mM + 4,4 mL de tampó acètic/acetat 0,7 M a pH 5,2.
- R2: 0,6 mL de taronja de xilenol 4 mM + 4,4 mL d'H<sub>2</sub>O (miliQ).

Els assaigs es realitzen a una placa microtituladora de 96 pous mesclant 50 µL de R1 i 250 µL de patró o eluat (es fa ús de pipetes multicanal de 8 canals per major facilitat). S'esperen 30 segons i s'afegeixen 50 µL de R2. Posteriorment s'agita la placa amb la pròpia opció de

pipeteig + mescla de les pipetes automàtiques multicanal. Després de l'agitació es deixa reposar 25 min i es llegeix l'absorbància a 550 nm.

### 3.7 Anàlisi estadístic

Els valors dels InsPs i Pi s'expressen com a mitjana i desviacions estàndard en unitats de mM o percentatges. Els valors dels temps d'inducció a la cristallització s'expressen com a mitjana i desviacions estàndard en hores, min i/p seg. La comparació dels valors d'InsPs, Pi i temps d'inducció entre els diferents temps d'hidròlisi es va realitzar amb la prova ANOVA fent servir el test de Bonferroni com a post-hoc.

## **4. RESULTATS**

### 4.1 Anàlisi dels InsPs per MS/MS

Les mesures amb el l'espectròmetre de masses (MS/MS) d'una dissolució recent de fitat (InsP6) prèviament a induir la hidròlisi ens va indicar que principalment es trobava presència d'InsP5, sent un 54.82% dels InsPs totals presents en dissolució, mentre que l'InsP6 es trobava tan sols com el 30.23% dels InsPs totals, sent el 14.95% restant una mescla dels productes d'hidròlisi més avançades.

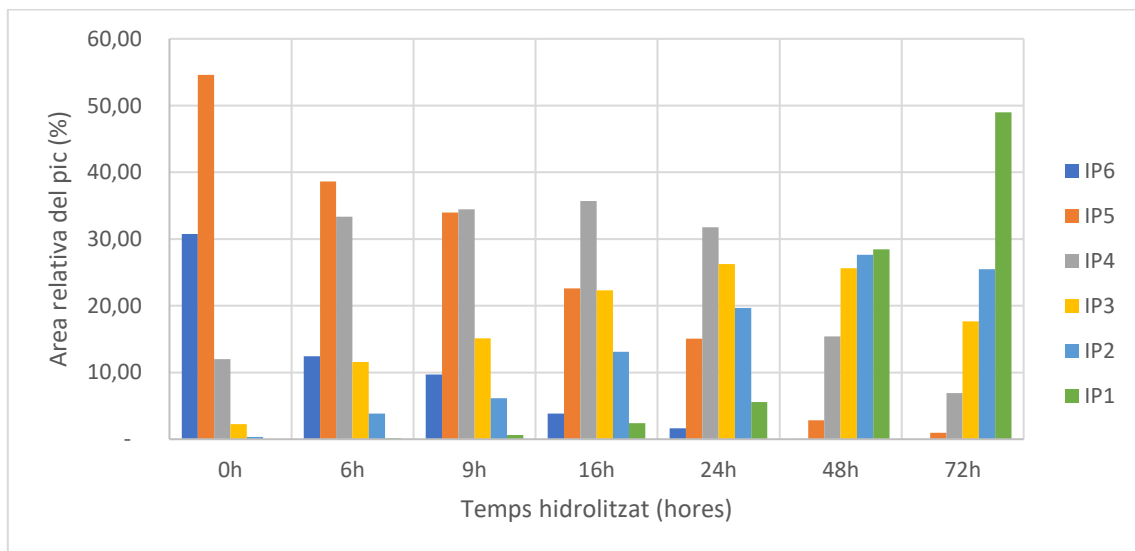
Les dissolucions de fitat induïdes a hidròlisi a diferents temps en medi àcid (pH 2) presentaren canvis en els nivells dels sis diferents InsPs:

- A les 6 h d'hidròlisi el nivell d'InsP6 va disminuir fins un valor pròxim al corresponent a un terç del valor inicial (a la dissolució no hidrolitzada), mentre que l'InsP4 i els altres productes inferiors presentaren majors percentatges sobre el total d'InsPs. L'InsP5, tot i que el seu nivell va decreïxer respecte a la mostra no hidrolitzada, seguia presentant el major percentatge de tots els InsPs.
- A les 9 h d'hidròlisi, la concentració d'InsP6 era lleugerament inferior, el nivell d'InsP5 es va mantenir constant i els nivells de la resta d'InsPs creixeren lleugerament, especialment pel cas de l'InsP4, adquirint un nivell similar al de l'InsP5.

- A les 16 h, els nivells d'InsP6 i InsP5 eren molt menors, passant a ser l'espècie predominant l'InsP4. La resta dels InsPs seguien presentant concentracions lleugerament majors, especialment pel cas de l'InsP1, que presentà un augment considerable del seu nivell.
- A les 48 h ja no es detectava presència d'InsP6, la concentració d'InsP1 augmentà fins arribar a nivells similars als InsP3 i InsP2, i els nivells d'InsP5 i InsP4 disminuïren notablement.
- Finalment, a les 72 h l'espècie predominant era l'InsP1, seguida d'InsP2, InsP3 i InsP4, mentre que el nivell d'InsP5 present era mínim.

Es varen realitzar proves de detecció de valors anòmals (prova G) i prova ANOVA per determinar les diferències significatives entre els diferents valors. Es va determinar que es presenten diferències significatives ( $p < 0.001$ ) entre els valors de les mostres als diferents temps d'hidròlisi.

A la gràfica 1 i a la taula 6 es poden observar els diferents % presents de cada InsP a cada mostra hidrolitzada respecte al valor total dels InsPs quantificats a partir de les àrees dels pics determinats amb el MS/MS.

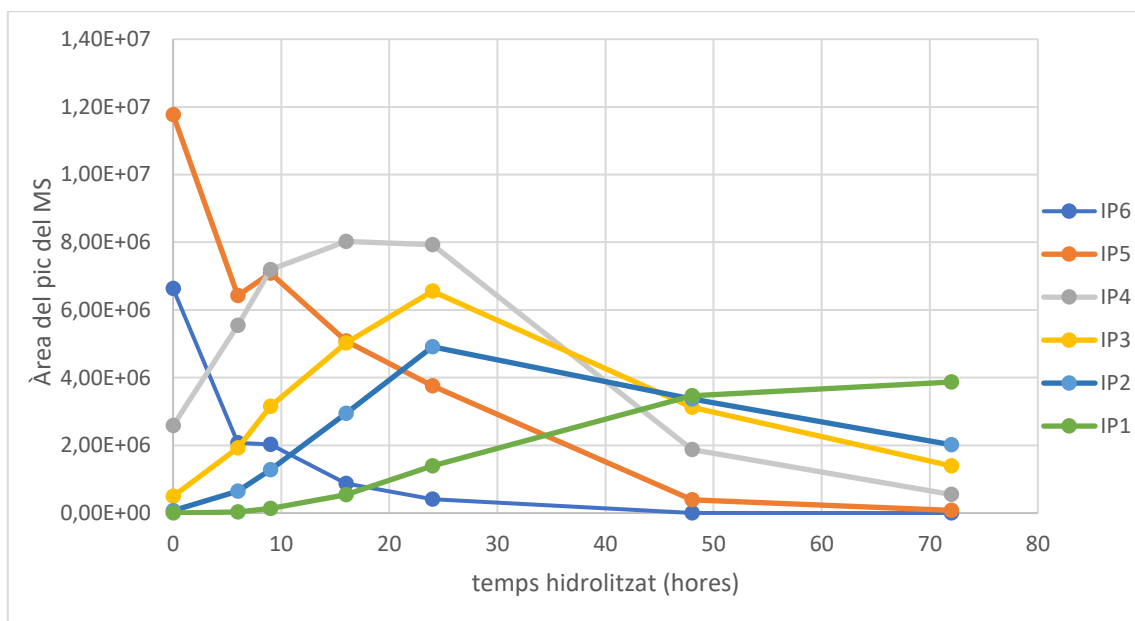


**Gràfica 1: nivells (%) dels sis InsPs després de diferents temps d'hidròlisi (0 a 72 h).** Mesures realitzades amb MS/MS. La concentració d'InsP6 a 0 h era de 1.12  $\mu\text{M}$  i a partir de 48 h va ser indetectable.



	0 h	6 h	9 h	16 h	24 h	48 h	72 h
InsP6	30.2 ± 5.0	13.0 ± 6.0 <sup>a</sup>	10.0 ± 3.7 <sup>a</sup>	3.9 ± 2.2 <sup>a,b,c</sup>	1.7 ± 1.0 <sup>a,b,c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b,c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b,c</sup>
InsP5	54.8 ± 2.3	38.4 ± 5.4 <sup>a</sup>	34.2 ± 3.3 <sup>a</sup>	22.9 ± 4.3 <sup>a,b,c</sup>	15.2 ± 2.7 <sup>a,b,c,d</sup>	3.2 ± 1.4 <sup>a,b,c,d,e</sup>	1.0 ± 0.2 <sup>a,b,c,d,e</sup>
InsP4	12.3 ± 2.3	33.2 ± 6.2 <sup>a</sup>	34.2 ± 3.3 <sup>a</sup>	35.7 ± 1.6 <sup>a</sup>	31.9 ± 1.3 <sup>a</sup>	15.5 ± 2.0 <sup>b,c,d,e</sup>	7.2 ± 0.8 <sup>a,b,c,d,e,f</sup>
InsP3	2.4 ± 0.5	11.5 ± 3.0 <sup>a</sup>	15.0 ± 2.2 <sup>a,b</sup>	22.3 ± 1.8 <sup>a,b,c</sup>	26.3 ± 1.4 <sup>a,b,c,d</sup>	26.3 ± 2.7 <sup>a,b,c,d</sup>	18.2 ± 1.6 <sup>a,b,c,d,e,f</sup>
InsP2	0.3 ± 0.1	3.8 ± 1.4 <sup>a</sup>	5.9 ± 1.5 <sup>a</sup>	12.7 ± 3.1 <sup>a,b,c</sup>	19.4 ± 3.1 <sup>a,b,c,d</sup>	26.3 ± 6.1 <sup>a,b,c,d,e</sup>	23.8 ± 5.2 <sup>a,b,c,d</sup>
InsP1	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1	2.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.6 <sup>a,b,c,d</sup>	28.6 ± 2.3 <sup>a,b,c,d,e</sup>	49.8 ± 3.7 <sup>a,b,c,d,e,f</sup>

**Taula 6: valors (%) ± desviacions estàndard dels sis InsPs després dels diferents temps d'hidròlisi (0 a 72 h).** Mesures realitzades amb Ms/Ms. La concentració d'InsP6 a 0 h era de 1.12 µM i a partir de 48 h va ser indetectable. La prova ANOVA ens va indicar que hi havia diferències significatives ( $p < 0.001$ ) en els valors dels InsPs i Pi entre els diferents grups dels temps d'hidròlisi. El test Bonferroni es va fer servir com a post-hoc. a:  $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 0 h. b:  $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 6 h. c:  $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 9 h. d:  $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 16 h. e:  $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 24 h. f:  $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 48 h.



**Gràfica 2: progressió de les senyals dels pics de cada InsP a través dels diferents temps hidrolitzats.** Mesures realitzades amb Ms/Ms. La concentració d'InsP6 a 0 h era de 1.12 µM.

#### 4.2 Quantificació dels InsPs i quantificació dels ions fosfat lliures

Per corroborar els resultats obtinguts amb el MS/MS i poder comparar amb estudis anteriors duguerem a terme una quantificació dels diferents InsPs en cada un dels diferents temps d'hidròlisi, basada en la capacitat dels InsPs de formar complexos amb Al(III), i desplaçar-lo de la formació dels complexos taronges d'alumini-xilenol i una separació amb resina.

A la mostra corresponent a una hidròlisi de 0 h, on la quantitat d'InsP6 era la màxima de les mostres, es troba una concentració d'InsPs de 0.82 mM. Aquesta concentració va decreixent a través de les diferents mostres hidrolitzades, de manera que a major temps d'hidròlisi menor concentració d'InsPs es trobem present. Així, a la dissolució hidrolitzada durant 6 h presenta un nivell d'InsPs de 0.71 mM, la mostra hidrolitzada durant 9 h presenta un nivell de 0.60 mM, la mostra de 16 h un nivell de 0.53 mM i la mostra de 24 h un nivell de 0.39 mM. A les mostres de 48 i 72 h també es detectaren nivells baixos d'InsPs, tot i que d'acord amb els resultats obtinguts amb el MS/MS no trobem presència d'InsP6, de manera que es pot afirmar que, encara que l'InsP6 és el compost que forma els complexos amb Al(III) més estables, la resta dels productes d'hidròlisi també tenen la capacitat de complexar.

Per completar els valors obtinguts amb la quantificació total dels InsPs, duguerem a terme una quantificació del fòsfor inorgànic lliure (Pi) present en cada una de les mostres hidrolitzades a diferents temps mitjançant el mètode colorimètric de l'àcid ascòrbic.

A la mostra no hidrolitzada (0 h) no es detectaren ions fosfats lliures, de manera que es correspon amb una concentració màxima d'InsPs no hidrolitzats. A la mostra hidrolitzada durant 6 h, el nivell de Pi detectat era de 0.45 mM, i a partir d'aquesta, a les següents mostres es mantingué una tendència lineal d'augment de la concentració de Pi a mesura que augmentava el temps d'hidròlisi, concordant amb la tendència de disminució lineal dels resultats obtinguts amb la quantificació no específica dels InsPs, de manera que com menor concentració d'InsPs, major hidròlisi s'ha produït i, per tant, majors nivells de ions fosfats lliures.

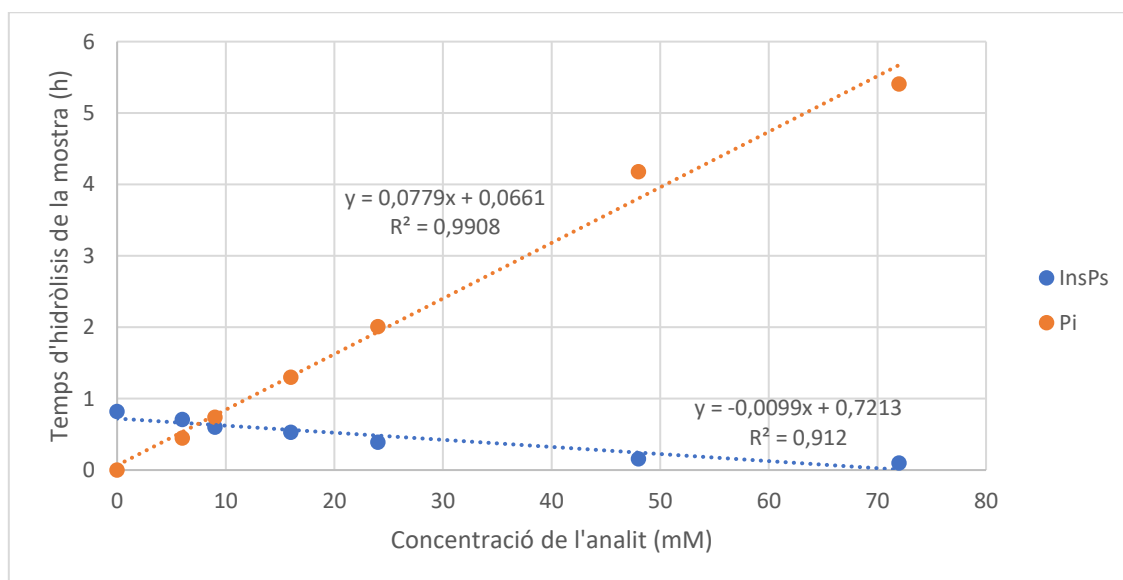
Així, amb aquests assaigs es pot observar com a mesura que la concentració d'InsP6 decreix degut a la seva hidròlisi, també decreix la concentració total d'InsPs i augmenta la concentració de fosfats lliures. Com es pot observar, a la mostra no hidrolitzada la concentració d'InsPs determinada es inferior als 1.12 mM de la dissolució preparada, degut a que durant la conservació i tractament de les mostres es pot anar hidrolitzant l'InsP6 degut al pH àcid de la mostra. També es pot observar com a la mostra més hidrolitzada (72 h), la concentració de ions fosfats lliures (5.41 mM) és unes 5 vegades superior a la concentració d'InsPs (1.12 mM) de partida, el qual concorda amb la desfosforilació dels diferents InsPs fins a l'obtenció de l'InsP1, alliberant per tant 5 fosfats per molècula d'InsP6 inicial.

En els dos anàlisis es dugueren a terme mètodes analítics de detecció de valors anòmals i es dugué a terme una prova ANOVA per determinar les diferències significatives entre els diferents valors. Es determinaren diferències significatives ( $p < 0.001$ ) entre els valors de les mostres a diferents temps d'hidròlisi entre valors dels InsPs i entre els valors dels Pi.

Els resultats obtinguts es poden veure resumits a la Taula 7, i la interpretació de la disminució dels nivells d'InsPs i augment dels nivells de Pi detectats es poden comparar a la gràfica 3.

Temps d'hidròlisi de la mostra (h)	InsPs (mM)	Pi (mM)
	Mitjana ± DesvEst	Mitjana ± DesvEst
0	0.82 ± 0.55	0.00 ± 0.03
6	0.71 ± 0.53 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.25 <sup>a</sup>
9	0.60 ± 0.41 <sup>a,b</sup>	0.74 ± 0.75 <sup>a,b</sup>
16	0.53 ± 0.33 <sup>a,b,c</sup>	1.30 ± 0.28 <sup>a,b,c</sup>
24	0.39 ± 0.17 <sup>a,b,c,d</sup>	2.01 ± 0.54 <sup>a,b,c,d</sup>
48	0.16 ± 0.18 <sup>a,b,c,d,e</sup>	4.18 ± 0.36 <sup>a,b,c,d,e</sup>
72	0.10 ± 0.08 <sup>a,b,c,d,e,f</sup>	5.41 ± 0.90 <sup>a,b,c,d,e,f</sup>

**Taula 7: Nivells totals de les quantificacions d'InsPs i Pi després d'hidròlisi de les mostres a diferents temps.** La prova ANOVA ens va indicar que hi havia diferències significatives ( $p < 0.001$ ) en els valors dels InsPs i Pi entre els diferents grups dels temps d'hidròlisi. El test Bonferroni es va fer servir com a post-hoc. a:  $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 0 h. b:  $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 6 h. c:  $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 9 h. d:  $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 16 h. e:  $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 24 h. f:  $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 48 h.



**Gràfica 3: representació comparativa dels nivells quantificats d'InsPs i fosfat inorgànic (Pi) durant les hidròlisis de les mostres a diferents temps.** S'obtenen tendències certament lineals pels dos casos, tendència de disminució en el cas dels InsPs i d'augment en el cas dels fosfats lliures.

### 4.3 Cristal·litzacions i turbidimetries

Per avaluar l'efecte d'inhibició de l'InsP6 i les mescles dels seus productes d'hidròlisi davant la cristal·lització de sals càlciques duquem a terme la inducció de cristal·lització d'oxalat càlcic a partir de orina sintètica en absència i en presència de 200 µL de les diferents mostres hidrolitzades, examinant el temps que tardava a començar la cristal·lització en presència de les diferents mostres hidrolitzades. També s'estudià l'efecte d'inhibició amb diferents concentracions de mostres no hidrolitzades (1.12, 0.56 i 0.28 µM) per poder comparar la capacitat inhibidora de les diferents concentracions d'InsP6 amb la de les diferents mostres hidrolitzades (totes elles amb concentracions de 1.12 µM).

Els resultats obtinguts mostraren que el fitat no hidrolitzat (0 h, concentració d'InsP6 màxima) a una concentració de 1.12 µM ofereix la màxima inhibició de la cristal·lització, permetent prolongar l'homogeneïtat de la dissolució fins a 17 minuts.

Les mostres hidrolitzades a 6, 9 i 16 h produïren inhibicions similars (8-9 min), tot i que la presència de l'InsP6 en cada una d'aquestes era diferent i considerablement baixa (entre un 30 % i un 10 % del valor inicial d'InsP6 a la mostra no hidrolitzada). Les inhibicions provocades per aquestes mostres foren majors a la inhibició produïda per la mostra no hidrolitzada de 0.56 µM, però molt inferiors a la inhibició oferta per la mostra no hidrolitzada de 1.12 µM. Per altra banda, les inhibicions obtingudes en les mostres de 9 i 16 h foren lleugerament superiors a la corresponent a la mostra de 6 h, el qual pot venir donat degut a una major capacitat inhibidora dels InsPs presents en les mostres 9 i 16 h o degut a petits errors experimentals en les mesures.

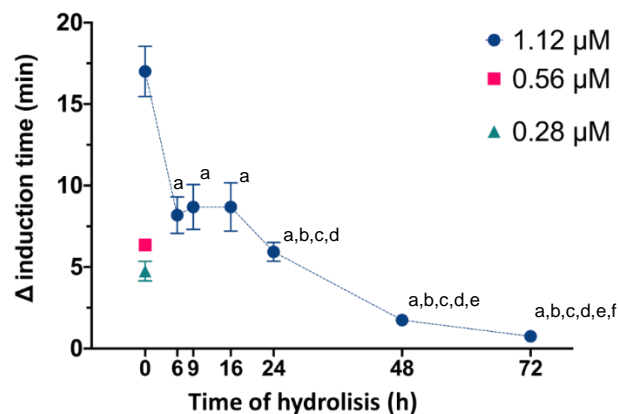
La mostra sotmesa a un temps d'hidròlisi de 24 h presentà una certa inhibició (6 min), tot i que lleugerament inferior a la inhibició donada per la mostra no hidrolitzada de 0.56 µM.

Les mostres hidrolitzades a 48 h i 72 h encara presentaren lleugeres inhibicions (2 min i 1 min), però els seus efectes foren significativament inferiors a la inhibició oferta per la mostra hidrolitzada a 24 h, sent inclòs menors que la inhibició de la mostra no hidrolitzada de 0.28 µM.

Es va realitzar una prova ANOVA per determinar les diferències significatives. Els resultats indicaren diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre els diferents resultats, excepte entre els punts a 6, 9 i 16 h 1.12 µM.

Mostra de fitat hidrolitzada (h)	Cristal·litzacions Temps d'inducció ± DesvEst (min)
0 h (0.28 µM)	4'41" ± 1'15"
0 h (0.56 µM)	6'32" ± 0'30"
0 h (1.12 µM)	17'27" ± 3'08"
6 h (1.12 µM)	8'26" ± 2'17" <sup>a</sup>
9 h (1.12 µM)	8'54" ± 3'50" <sup>a</sup>
16 h (1.12 µM)	8'56" ± 3'05" <sup>a</sup>
24 h (1.12 µM)	6'07" ± 1'13" <sup>a,b,c,d</sup>
48 h (1.12 µM)	1'49" ± 0'20" <sup>a,b,c,d,e</sup>
72 h (1.12 µM)	0'47" ± 0'20" <sup>a,b,c,d,e,f</sup>

**Taula 8: Valors dels diferents efectes de les mostres hidrolitzades d'InsP6 (0 a 72 h) sobre el temps requerit per induir la cristal·lització de OxCa en orina sintètica.** S'analitzaren mostres de 0.28, 0.56 i 1.12 µM per les mostres de 0 h, i 1.12 µM per les mostres restants. Es dugueren a terme 3 rèpliques de cada mesura. La prova ANOVA ens va indicar que hi havia diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en els valors dels temps d'inducció pels diferents grups de temps d'hidròlisi estudiats.. El test Bonferroni es va fer servir com a post-hoc. a: $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 0 h 1.12 µM. b: $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 6 h 1.12 µM. c: $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 9 h 1.12 µM. d: $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 16 h 1.12 µM. e: $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 24 h 1.12 µM. f: $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 48 h 1.12 µM.



**Gràfica 4: Efecte de les diferents mostres hidrolitzades d'InsP6 (0 a 72 h) sobre el temps requerit per induir la cristal·lització de OxCa en orina sintètica.** S'analitzaren mostres de 0.28, 0.56 i 1.12 µM per les mostres de 0 h, i 1.12 µM per les mostres restants. Es dugueren a terme 3 rèpliques de cada mesura. La prova ANOVA ens va indicar que hi havia diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en els valors dels temps d'inducció pels diferents grups de temps d'hidròlisi estudiats.. El test Bonferroni es va fer servir com a post-hoc. a: $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 0 h 1.12 µM. b: $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 6 h 1.12 µM. c: $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 9 h 1.12 µM. d: $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 16 h 1.12 µM. e: $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 24 h 1.12 µM. f: $p < 0.05$  vs valor corresponent a temps 48 h 1.12 µM.

#### 4.4 Microscòpia electrònica d'escombrat (SEM)

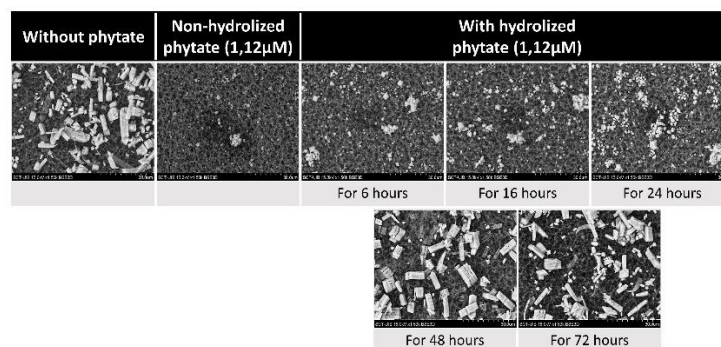
Es realitzà un anàlisi mitjançant una microscòpia electrònica d'escombrat (SEM) per observar les estructures dels diferents tipus d'oxalat càlcic cristal·litzats obtinguts a l'orina sintètica en presència dels diferents InsP hidrolitzats.

Els resultats obtinguts indicaren que en absència d'InsP6 o els seus derivats hidrolitzats es detectà una predominança de cristalls d'oxalat de calci dihidratat (COD). Aquest producte es veu cinèticament afavorit, tenint en compte que la forma més estable termodinàmicament es l'oxalat càlcic monohidratat (COM), del qual també es va detectar presència en forma de traces.

Per altre banda, en presència de les mostres hidrolitzades a 0, 6, 9 i 16 h no es formen cristalls de COD, indicant una notable inhibició per part de la presència de l'InsP6.

En presència de les mostres hidrolitzades a 48 i 72 h, on no es detectava presència d'InsP6, es formaren cristalls de COD amb una inhibició considerablement petita.

Aquests resultats es poden observar clarament a les imatges obtingudes per resolució dels anàlisis mitjançant la SEM, on es pot distingir que l'estructura dels cristalls obtinguts en absència de fitat concorden amb les estructures dels cristalls obtinguts pels anàlisis amb presència de mostres de fitat hidrolitzades a 48 i 72 h.



**Figura 4:** Imatges dels cristalls obtinguts als assaigs de cristal·litzacions en absència de dissolució de fitat, en presència de dissolució de fitat no hidrolitzada i en presència de dissolució de fitat hidrolitzada a 6, 16, 24, 48 i 72 h.

## 5. DISCUSIÓ

Des del descobriment dels potencials efectes del fitat en la inhibició de les calcificacions patològiques, no s'havia investigat profundament sobre si l'efecte aconseguit s'atribuïa a l'acció de l'InsP6 o bé als seus productes d'hidròlisis. Aquest dubte sorgí al descobrir que la presència del fitat a l'organisme no es basa en una totalitat amb InsP6, sinó que, tot i que les fosfatases alcalines humanes aparentment no tenen la capacitat de degradar, la ingesta del fitat a través de la dieta inclou que s'ingereixi junt a una sèrie de fosfatases d'origen vegetal o bacterià que si que son capaces de provocar la seva hidròlisis en diferents graus, a més d'ingerir mescles dels diferents InsPs ja hidrolitzats.

D'aquesta manera, mitjançant la ingesta i la degradació del fitat i els seus derivats d'hidròlisis, trobem present en sang, als teixits i en orina uns nivells molt diversos dels diferents InsPs. Aquesta variació dels diferents composts podria explicar el per què el consum del fitat presenta diferents efectes beneficiosos per la salut. Particularment, es pot concloure que cada InsPs pot presentar diferents activitats específiques a les dels altres, com l'actuació comentada de l'InsP3 com a segon missatger o les activitats dels InsP4 i InsP5 pel tractament de la diabetis de tipus II i de la proliferació del carcinoma de còlon al inhibir l'activació de la proteïna AKT.

L'estudi dut a terme s'ha basat en estudis previs realitzats en animals i en humans que demostraren que l'administració d'InsP6 per via oral o tòpica redueix el desenvolupament de calcificacions patològiques, com el cas de les calcificacions cardiovasculars, calcificacions dels teixits blans, i de pedres de ronyó càlciques. Considerant que la concentració de fitat present en l'organisme es basa en una combinació de tots els InsPs derivats hidrolitzats, no es pot atribuir la totalitat del caràcter inhibidor de calcificacions a l'InsP6, de manera que es necessari valorar l'activitat dels derivats com a inhibidors de les cristal·litzacions.

A més, aquesta hipòtesis es veu reforçada amb la informació coneguda sobre la inhibició d'aquestes calcificacions, basada en la gran afinitat dels grups fosfats pel  $\text{Ca}^{2+}$ , impeding el creixement i desenvolupament del cristall i de la seva nucleació, incloent els polifosfats amb dos grups fosfats, com el pirofosfat i els bisfosfonats, els quals presenten un potent efecte inhibidor de les cristal·litzacions de sals de càlciques en sang i orina. Seguint el mecanisme d'actuació plantejat per la inhibició del desenvolupament de les calcificacions dels fosfats, la nostra hipòtesi és que els diferents InsPs tocarien presentar inhibicions més potents que els composts que presenten dos o menys grups fosfats, i dins dels propis InsPs, aquells amb major nombre de fosfats tocarien proporcionar la major inhibició de les calcificacions.

Cal afegir que quan es va realitzar aquest estudi ja s'havien dut a terme estudis referents a certes mostres hidrolitzades no controlades d'InsP6, determinant que aquestes exercien una potent funció com a inhibidors *in vitro* de la cristal·lització d'hidroxiapatita<sup>[26]</sup> i de calcificacions al cartílag de rata, a més de que una injecció via parenteral d'InsP6 parcialment hidrolitzat prevenia processos de calcificació aòrtica<sup>[27]</sup>. De totes maneres, aquests estudis son del 1972, i no hi ha hagut estudis recents sobre aquests fenòmens o estudis relacionats amb els efectes dels diferents InsPs damunt la cristal·lització del OxCa. Així, el nostre us del MS/MS proveeix nova informació damunt els efectes d'aquestes mescles d'InsPs de forma quantificada.

Per tant, a partir dels diferents assaigs duts a terme s'ha tractat de determinar quin es l'efecte de cada InsP damunt la inhibició dels processos de cristal·lització de sals càlciques a l'organisme, principalment basant-nos en la litiasi renal d'oxalat càlcic.

Els resultats obtinguts en aquest estudi demostren que l'InsP6 presenta la millor capacitat d'inhibició de les calcificacions patològiques referents a la cristal·lització d'oxalat càlcic, però les mescles dels productes de la seva hidròlisi que encara presenten un nombre significatiu de grups fosfat, com l'InsP5, InsP4 o InsP3, també actuen com a potents inhibidors de les cristal·litzacions: els resultats obtinguts a partir de simulacions turbidimètriques de cristal·litzacions patològiques amb orina sintètica han confirmat que les mescles dels diferents InsPs inhibeixen les cristal·litzacions de l'oxalat càlcic, inclòs quan en aquestes mescles es troba una baixa presència d'InsP6, tot i que també s'ha comprovat que l'InsP6 presenta la major capacitat inhibidora i les mescles que major quantitat d'aquest son les que permeten una major inhibició de la cristal·lització, a més de determinar que a major concentració d'InsPs major es l'efecte d'inhibició aconseguit.

Per tant, tal i com es pot observar a la taula 8 i a la gràfica 4, les mescles dels InsPs que presenten una major inhibició sobre la cristal·lització d'OxCa són aquelles que han estat induïdes a menors temps d'hidròlisis i presenten una major proporció dels InsPs més fosforilats. D'aquesta manera, la capacitat inhibidora disminueix a mesura que el temps d'hidròlisi aplicat augmenta, fins arribar a obtenir capacitats inhibidores similars a la des bisfosfonats estudiats en altres investigacions pel cas de les mostres que presenten una alta quantitat d'InsP3 i InsP2. Aquests resultats concorden amb la hipòtesi principal que atribueix la capacitat inhibidora del fitat i els seus derivats d'hidròlisis a la presència dels grups fosfats, els quals tenen la capacitat d'interaccionar fortament amb els ions  $Ca^{2+}$  i incapacitar el creixement del cristall mitjançant la interacció amb la seva superfície.



Així, com a conclusió final de l'estudi podem dir que tots els derivats InsPs que continguin un nombre significatiu de fosfats podran actuar com inhibidors, de tal manera que aquells que en continguin una major quantitat seran els més efectius en quant a inhibició, ja que presenten una major capacitat d'adsorbir-se sobre la superfície del cristall càlcic en formació.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Capaccio P, Torretta S, Ottavian F, Sambataro G, Pignataro L (2007). Modern management of obstructive salivary diseases. *Acta Otorhinolaryngologica Italica* **27**, 161–72.
- [2] Arbide del Río N, Danel J, García M, Sarasola E (2020). Calcificación arterial generalizada idiopática de la infancia: a propósito de un caso. *Revista Española de Patología* **53**, 193-196.
- [3] Nigwekar SU, Kroshinsky D, Nazarian RM, Goverman J, Malhotra R, Jackson VA, et al. Calciphylaxis: Risk factors, diagnosis, and treatment. *Am J Kidney Dis.* **66**,133–146.
- [4] Defilippo M (2017). Cálculos renales: tipos, causas y complicaciones. *Fisioterapia para todos*.
- [5] Buades J M, Sanchís P, Perelló J, Grases F (2017). Plant phosphates, phytate and pathological calcifications in chronic kidney disease. *Nefrología* **37**, 20-28.
- [6] Mellanby E, (1949). The rickets-producing and anti-calcifying action of phytate. *The Journal of Physiology* **109**, 488-533.
- [7] Erdman LW (1979) Oilseed phytate: nutritional implications. *J Am Oil Chem Soc* **56**, 736-741.
- [8] 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.
- [9] Grases F, March P (1989). A study about some phosphate derivatives as inhibitors of calcium oxalate crystal growth. *J Crystal Growth* **96**, 993-995.
- [10] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A (1998). Development of calcium oxalate crystals on urothelium: effect of free radicals. *Nephron* **78**,296-301.
- [11] González, Á. A. L., Freixedas, F. G., Bauzá, A. C., Monroy, N., Herrero, M. T. V., & Jaume, M. A. (2009). Fitato y su utilidad en la práctica clínica. *Medicina balear* **24**, 39-46.
- [12] 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.
- [13] Graf E, Empson KC, Eaton JW (1987) Phytic acid. A natural antioxidant. *J Biol Chem* **262**, 11647-11650.

- [14] Shamsuddin AM, Vucenik I, Cole KE (1997) IP<sub>6</sub>: a novel anticancer agent. *Life Sci* **61**, 343-354.
- [15] 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.
- [16] Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton JW (1984) Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *J Biol Chem* **259**, 3620-3624.
- [17] López-González AA, Grases F, Roca P, Marí B, Vicente-Herrero MT, Costa-Bauzá A (2008). Phytate (myo-inositol hexaphosphate) and risk factors for osteoporosis. *Journal of Medicinal Food* **11**, 747-752.
- [18] Addison WN, McKee MD (2010). Inositol hexakisphosphate inhibits mineralization of MC3T3-E1 osteoblast cultures. *Bone* **46**, 1100-1107.
- [19] Curhan GC, Willett WC, Knight EL, Stampfer MJ (2004). Dietary factors and the risk of incident kidney stones in younger women: Nurses' Health Study II. *Arch Intern Med* **164**, 885-891.
- [20] Fernandez-Palomeque C, Grau A, Perello J, Sanchis P, Isern B, Prieto RM (2015). Relationship between urinary level of phytate and valvular calcification in an elderly population: A cross-sectional study. *PLoS One* **10**.
- [21] Schlemmer U, Frolich W, Prieto R, Grases F (2009). Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and abakysis. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 330-375.
- [22] Bosanac I, Michikawa T, Mikoshiba K, Ikura M (2004). Structural insights into the regulatory mechanism of IP<sub>3</sub> receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1742**, 89-102.
- [23] Ferry S, Matsuda M, Yoshida H, Hirata M (2002). Inositol hexakisphosphate blocks tumor cell growth by activating apoptotic machinery as well as by inhibiting the Akt/NFκB-mediated cell survival pathway. *Carcinogenesis* **23**, 2031-2041.
- [24] Grases F, Costa-Bauzá A, Berga F, Rodríguez A, Gomila R, Martorell G, Martínez-cignoni M (2018). Evaluation of inositol phosphates in urine after topical administration of myo-inositol hexaphosphate to female Wistar rats. *Life Sciences* **192**, 33-37.
- [25] Grases F, Costa-Bauzá A, Berga F, Gomila RM, Martorell G, Martínez-Cignoni MR (2019). Intake of myo-inositol hexaphosphate and urinary excretion of inositol phosphates in Wistar rats: Gavage vs. oral administration with sugar. *PLoS One* **14**.
- [26] Thomas W, Tilden M (1972). Inhibition of mineralization by hydrolysates of phytic acid. *Johns Hopkins Med* **131**, 133-142.
- [27] Van den Berg J, Hill L, Stanbury S (1972). Inositol phosphates and phytic acid as inhibitors of biological calcification in the rat. *Clin. Sci.* **43**, 377-383.