



**TESI DEL TREBALL DE DOCTORAT
SOBRE INTOXICACIÓ MALÒNICA I LA
SEVA REPERCUSSIÓ SOBRE EL
REMODELAMENT OSSI DEL CONILL**

(ORYCTOLAGUS CUNICULUS)

Presentat per xavier miquel i padró

Igualada, gener del 2000

Als pares
amb perenne recordança
i a l'esposa i fills
pel seu imponderable
suport.

Han sigut consultats:

Harold De Luca (vit.D-citrat) MADISON
Albert Lehninger (fosfocitrat-mitocondris) BALTIMORE
Aaron Posner (ACP-hidroxiapatita) NEW YORK
Harold Krebs (malonat-TCA) OXFORD
Pierre Cartier (fosforilació-ATP) PARIS
Harold Fullmer (deshidrogenases-cítric) BETHESDA
Paul Srere (citrat-quelació) DALLAS
Gilbert Vaes (PTH-citrat os) LOUVAIN
William Neuman (citrat-solubilitat os) ROCHESTER
F. Dickens (cítric-tumors os) NEWCASTLE-upon-TYNE
B.E.C. Nordin (citrat-balanç càlcic) ADELAIDE
Sbigniew Szot (cítric-cristal.lització) VARSOVIA
A. Ascensi (os lamel.lar) ROMA
I. Zipkin (citrat-fluor) BETHESDA
O.S. Atwal (ozó-paratiroides) ONTARIO
Charles Pak (citrat-shell) BETHESDA
Melvin Glimcher (col.lagen-ACP) BOSTON
Danièle Gautheron (CoA-fosforilació) VILLEURBANA
A. Ruffo (citrat-glioxilat) PAVIA
Van R. POTTER (cítric-fluoroacetat) MADISON
J.C. Robison (fosfatases alcalines-os) BETHESDA
Enrico Bonucci (vit.C-col.lagen) ROMA

I amb relació personal:

- Prof. Julio Sánchez Lucas Anatomia Patològica
Universitat de BARCELONA.
Un home a recordar.
- Prof. Josep Trueta Nuffield Orthopaedic Center d'OXFORD.
Qui em va despertar l'interès per l'os.
- Prof. Stanislas De Sèze Centre de Reumatologia de l'Hospital
Lariboisière de PARIS.
Certament un Mestre.
- Prof. André Lichtwitz Centre Phosphocalcique Viggo-Petersen
de PARIS.
Crític valuós que em va emmenar a seguir
- Prof. Rodolfo Amprino Amic, a qui dec les ensenyances sobre os
d'aquest treball. Anatomia Umana Normale
Universitat de BARI.
- Prof. Gastone Marotti Anatomia Umana Normale, Universitat de
MODENA. Persona que va ajudar-me a pulir
les tècniques fines d'exploració òssia.
- Prof. Julio R. Villanueva Facultat de Farmàcia de SALAMANCA.
Qui sol·licit em va posar la microscòpia
electrònica a l'abast.
- Prof. Jordi Gras Immunoquímica, Hospital del Mar. Universitat
de BARCELONA.
A qui preo la seva llarga acollida, la qual
ha fet possible el sosteniment de l'experiència.
- Dr. Francesc Botet i Casadesús Company de mà oberta en la
meva estada a l'Hospital Comarcal d'IGUALADA.
- Prof. Josep M^a Adzet Doctor en Ciències i Director del Centre
d'Investigació AIICA.
Qui sota la seva direcció seriosa i magisteri ha dut a terme el resultat.
- Prof. Josep Laporte De tracte excepcional i contrafort de les
estones clivellades.

Foren persones úniques en el transcurs de la prova:

Rosa Paratge
Teresa Miquel
Núria Tuset
Rafel Paniagua

A tots ells el més profund agraïment.

HIPÒTESI

La HIPÒTESI sostinguda en aquesta experiència va sorgir de la coneixença de la participació decisiva de l'àcid cítric en la solubilització de la hidroxiapatita, component majoritari de les sals òssies. Admesa l'anterior exposició es pot argüir que augmentant el nivell d'àcid cítric a la sang, el material cristal·lí de l'os sofrirà les modificacions pròpies de la solubilització atribuïda a dit àcid.

Essent com és l'àcid cítric element copiós a l'os i també, l'intermediari més abundant del cicle tricarboxílic, dada aquesta coincidència es va creure que aquí era el lloc idoni per actuar.

Com a garant de la interrupció del cicle tricarboxílic amb l'intent d'acumular àcid cítric fou triat l'àcid malònic inhibidor competitiu de la deshidrogenasa succínica, enzim que regula el pas de l'àcid succínic a àcid fumàric i se li atribueix l'ésser el control del cicle de Krebs. Si es donés el condicionament pressentit, l'augment d'àcid cítric desmineralitzaria l'os.

El maneig d'una conjectura, esgarriada pel raonament científic, quan es troba amb la quimèrica realitat que la matèria viva ofereix a la nostra observació, és permès usar les idees que suposen, sense la rigurositat aritmètica exigida. Per tant, en una ciència podem tenir "els coneixements" però no saber les coses "les coses representades". Així, pot haver-hi una ciència de quelcom del nostre coneixement que no és un saber (KANT). O, que l'escala de fenòmens observats ultrapassi les categories de la nostra experiència immediata. Solament l'abstracció pot lenificar aquesta malaltia sense guarir-la (MONOD). I també es pot cogitar sobre si la història de la física i la química, així com totes les altres ciències poden ésser tingudes com a sèries progressives d'aproximacions, encara, que una llei general sigui anunciada. Després, anòmales desviacions de la idealització són remorejades i observades, i una nova i més precisa formulació és ideada empíricament. Finalment, les raons d'aquest excepcional comportament són reconegudes i, una llei reformada deriva vers a camps teòrics (NEUMAN).

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ.

En una experiència basada en l'efecte causat per l'acid malònic sobre el metabolisme de l'os viu, és inqüestionable el coneixement d'aquest.

Malgrat i voler tenir coneixença del teixit ossi, s'ha de dir que ara encara, molts fets del seu comportament, vaguen per la planura de l'embull.

També és crucial no passar de llarg, que els resultats obtinguts en l'animal complet pequen dels inconvenients de l'estadística biològica. I que en tota acció experimental inductiva mai no s'obté un enllestiment total, Ans, sempre queden uns escorcolls a fer que seran el feix de la crítica necessària.

Les dades següents volen aproximar els criteris d'altri al problema.

L'os, teixit connectiu especialitzat, d'estructura dura, no solament serveix de bastiment al cos, sinó que degut a la seva composició: orgànica (matriu) i inorgànica (mineral), en íntima relació amb la sang i els altres sistemes funcionals de l'organisme, fa que l'os, al llarg de la vida mantingui un ímpetuós i apassionat metabolisme de treure i posar.

La part orgànica, que constitueix la tercera part del pes de l'esquelet, està formada, principalment, per col.làgena de tipus I(2₁(1)-2), així com també, petites quantitats de proteoglicans, lípids i vàries proteïnes no-col.làgenes com són la osteocalcina, la fibronectina i algunes altres (ROBEY, 1988).

El col.lagen és una escleroproteïna, no exclusiva de l'os, sinó que també es troba a la pell i als cartílags, i està composta d'aminoàcids. Un 25 per cent de glicina i a més per prolina i hidroxiprolina (MEISTER, 1965). S'organitza en forma de fibres que s'arrangen en cordons de tres cadenes polipeptídiques. Cada cadena es cargola a l'esquerra. I les tres cadenes s'enrotllen entre si, per a formar una superhèlice retorçada a la dreta, i extremadament forta, que es manté unida gràcies als enllaços d'hidrògen entre una cadena i l'altra.

Quan les fibres del col.làgen s'examinen al microscopi electrònic, s'hi veuen unes bandes transversals que es repeteixen a intervals de 700 angstroms. BEAR, 1968, les explica dient, que com que la cadena molecular de la col.làgena consta d'unitats d'aminoàcids en una seqüència específica, aquesta fa que siguin repetides les bandes. De cadenes n'hi ha de curtes i de llargues. Les curtes s'emmetxen amb relatiu ordre. Al contrari, les cadenes laterals que són més llargues no s'ajusten tan bé i formen trossos menys ordenats. Les zones de desordre relatiu correspondrien a les bandes. La síntesi del col.lagen té lloc en els ribosomes. I, es degrada, en viu, a baix pH (Mc GILVERY). En les fibres de la col.làgena, encara no calcificada, existeix una substància inhibidora que ocupa els buits que en les fibres calcificades ocupa l'apatita (GLIMCHER, 1961) que podrien ser β -aminats. El col.lagen produït per cèl.lules obtingudes en el sdme. de MARFAN, no difereix del produït per cèl.lules de control (MARTIN, 1971)

La fracció inorgànica, o mineral, està constituïda, principalment per hidroxiapatita i com afegiment carbonats, citrats, fluor, sodi, potasi, magnesi i una quantitat de mineral amorf (POSNER, 1969). Però, segons QUINAUX (Tesi Doctoral, 1968, Liège) el calci amorf a l'os no existeix en absolut. I HOU-BEN i afegeix, que en efecte, el que passa, és que aquest mineral, dit amorf, és hidroxiapatita de cristalls tan petits que no és possible identificar-los amb l'anàlisi actual (1971).

L'ideal del cristall d'hidroxiapatita és imaginari. Perquè, en realitat, els cristalls tenen defectes de cristallització, que a la vegada augmenten la seva solubilitat (ARENDS, 1977).

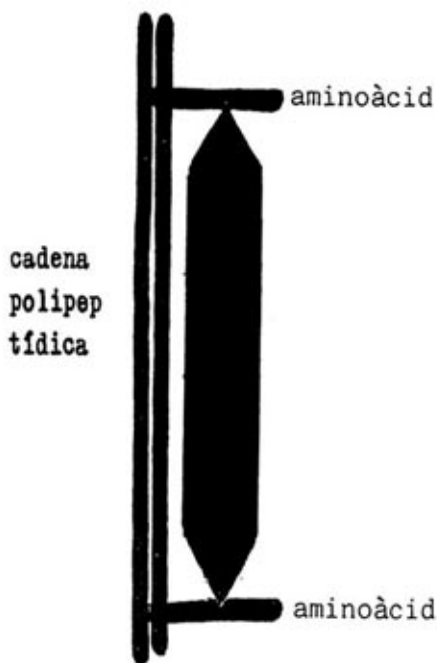
La fórmula general de l'apatita és $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

El cristall d'hidroxiapatita és excessivament petit: 200-30-70 Å. Però, aquest petit cristall presenta una superfície de bescanvi enorme. D'uns 100-200 m² gram d'os.

La distància que separa dos aminoàcids correspon a la longitud del gran eix del cristall de fosfat tricàlcic.

GLIMCHER avisa dient, que davant l'andàlax estructura de la hidroxiapatita, s'ha de tenir molt en compte a l'hora de treure conclusions experimentals, ja que l'edat de l'os mineral i l'edat de l'animal no són sinònims (1977). LEGROS, 1986, afegeix complicació a l'assegurar que l'estructura de l'os, en el que respecta la part fina mineral, resta desconeguda.

La superfície cristal·lina total del teixit ossi, és de l'ordre de 500.000 m². I el Ca/P=1,67 es considera normal. Però n'hi ha de 1,3 fins a 2.



L'examen amb raigs X confirma que el mineral de l'os cel.lular i el del os acel.lular són hidroxiapatita (WEISS, 1971). Els dipòsits calgèrics, donen igual difracció a raigs X que la hidroxiapatita (TUCHWEBER, 1967).

NORDIN, creu que la concentració d'hidrògen a la superfície dels cristalls és de 6,8. NEUMAN pensa que és inferior a aquesta xifra.

L'aigua que està unida al cristall ho és a raó de 0,8 gr. per gram de mineral.

El calci de l'os està distribuït en tres grans fraccions: iònica, cristal.lina i lligat a les proteïnes. Les tres estan en equilibri, i el trasbals de qualsevol d'elles afecta a les altres, de tal forma que canvia l'estructura química i morfològica de l'os (LEKAN, 1960).

Mentre dura la vida, hi ha un anar i venir d'ions i anions ben regulat pel procés de formació i destrucció òssia. Durant el creixement la formació excedeix a la reabsorció. Entre els 20-30 anys s'assoleix l'acmé. Dels quaranta als cinquanta la reabsorció guanya instaurant-se un remodelament, però, que intenta frenar la pèrdua sobtada.

Entremig d'aquest fer, desfer i remodelar, s'hi poden intercalar unes quantes dades que ratllen l'al.llegoria. A l'Helix Pomatia li succeix un fet curiós en la formació dels cristalls de la seva closca: durant la regeneració són de fosfat de calci, més tard es transformen en carbonat (BIEDERMAN, 1902). Certes closques són d'aragonita pura, que in vitro, no es pot obtenir per dessota dels 90°C, temperatura, evidentment incompatible amb la vida (KERVAN, 1903).

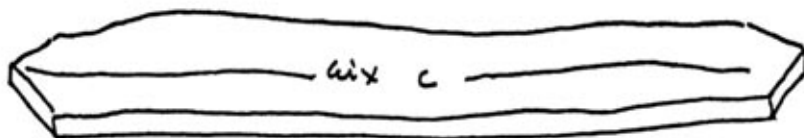
Segons KERVAN, en els animals i les plantes el calci té tres orígens: $K39-E1=Ca40$ $Mg24-O16=Ca40$ $Si28-C12=Ca40$.

En el mastodont, la taxa mitjana de formació òssia és idèntica a la de l'home (SCHUBECK, 1970)

A la visió del microscopi electrònic, els cristalls minerals de l'os, són unes petites agulles aplanades. Hi ha una considerable variació en les dimensions de l'hipotètica hidroxiapatita, però el que si és cert, en tots els casos, és que una dimensió és més petita que les dues. La mesura més llarga correspon a l'eix c, i està orientat paral·lelament a la fibra de la col·làgena.

Aquest cristall de l'os està compost d'un gran nombre de petites mol·lècules de fosfat tricàlcio. Les quals tenen incorporats OH i H, o sigui aigua d'estructura.

En la zona externa del cristall es troba la corona hidratant ionitzada: a) hidratant, perquè els ions de superfície retenen una proporció, no menyspreable, d'aigua lligada a ells; b) ionitzada, ja que en aquesta zona perifèrica es mouen els ions Ca, PO_4 , CO_3 , Mg, i també, el citrat que no entra en el reticle del cristall ossi, però que juga un rol molt important en el desplaçament dels ions càlcio. Entre la corona hidratant ionitzada i els líquids intersticials hi ha un àmbit, làbil, on els ions de la perifèrie perden tota cohesió entre ells i entren en contacte amb els líquids extracel·lulars, (LICHTWITZ, 1959).



La formació, reabsorció i el remodelament ossi va a càrrec, principalment, de dues cel·lules: l'osteoblast i l'osteoclast. A l'osteoblast se'l fa responsable de la síntesi de la matriu orgànica i de la calcificació. Així com també, de l'inici de la reabsorció, que és ultimada per l'osteoclast. L'osteoblast té receptors per a l PTH, $1.25(OH)_2D_3$, glucocorticoids i fosfatasa alcalina. També sintetitza varies substàncies reabsorbents com la interleuquina-6 (Mc SHEEHY, 1987) i la PGE2.

Es una cel·lula mononuclear rica, en estat actiu, en reticle endoplasmàtic i ribosomes; aparell de Golgi ben desenvolupat. Són abundants les mitocondries i la fosfatasa alcalina. El seu origen és mesenquimal (OWEN, 1980). El mecanisme exacte de com l'osteoblast transmet el seu missatge a l'osteoclast perquè comenci la reabsorció, no està elucidat.

Quan comença la nucleació del cristall, l'hidroxiapatita i l'aigua obren reciprocament en la matriu de l'os. La interacció entre cristall i el fluid que l'envolta és més aviat embrollada. Quan el mineral ossi s'instal·la, desplaça un volum d'aigua igual al seu. Alshores l'aigua que està entre els cristalls, o bé, entre els cristalls i les fibres adjacents del col·lagen, esdevé tan escassa que els ions no es poden espargir (NEUMAN, 1958). La mineralització mai és del 100%. Generalment es para al 80-85% (ROBINSON, 1964). L'edat de l'os i la seva reactivitat química, queden determinades pel contingut d'aigua (TIMMINS, 1977). Això, també ho diu MUELLER, 1966.

Distints mètodes han intentat mesurar l'aigua de l'os. Cao és òptim. Amb limitacions i limitacions, en gossos joves, l'aigua de la cortical és d'un 12-22 per cent; i la de l'os esponjós, d'un 30-52 per cent (BERENSEN, 1966). Com que l'aigua és un dipolo permanent que presenta varies formes iòniques: $H_2^{17}O$ (0,04%) - $H_2^{18}O$ (0,20%) - $H_2^{16}O$ (0,03%), la cosa encara es complica més a l'hora de la lectura experimental de la cristallització de la hidroxiapatita.

Temps ha, que està acceptat pels físics, que la superfície d'un sòlid, quan està en contacte amb un líquid, aquesta es cobreix d'una capa fina de solvent. El gruix d'aquesta capa no es coneix amb certitud, però s'estima pels voltants dels 100 Å. A les superfícies dels cristalls d'hidroxiapatita, com és natural, els hi passa el mateix, estan envoltats per dita capa capaç de dissoldre, i per aquest fet, s'hi desenvolupen unes forces físiques dependents de la carga asimètrica de la solució interfase.

L'estructura de l'os a nivell macroscòpic mostra dues formes predominants: os cortical i os trabecular. El primer es troba a les diàfisis dels ossos llargs i a les superfícies dels ossos plans i curts. El trabecular està a les metàfisis i a l'interior dels ossos plans i curts. L'os cortical apareix dens i amb cobertes primes: endosti i periosti. El trabecular està format per moltes espícules d'os que s'entrellacen i, que a la vegada li donen aspecte d'esponja. Microscòpicament, és necessari distingir, també, dos ordres diferents d'organització estructural: os plexiforme i os lamel.lar; a l'os plexiforme les fibres de col.lagen es disposen a l'atzari i l'apatita no està orientada al llarg de la renglera de fibres, com passa a l'os lamel.lar. Els osteocits, aquí, ocupen una cavitat de parets mal definides i canvien molt de forma i orientació. El nombre d'osteocits és major que a l'os lamel.lar. Aquest tipus d'os, solament es troba en animals joves i en creixement. En la maduresa és reemplaçat per os lamel.lar. Els osteocits d'aquesta mena d'os són molt més actius que en el lamel.lar. Aquí és on es dona l'osteolisi osteocítica.

L'os lamel.lar es caracteritza pel seu arranjament ordenat. Tant pel col.lagen com per les fibres. Les fibres col.làgenes estan disposades en diferents estrats, entre els quals hi viuen els osteocits. L'os haversià predomina en la cortical. I mai, és el primer de formar-se. I sempre és el resultat d'una invasió vascular.

Els osteoclasts són cel.lules directament responsables de la reabsorció. D'origen hematopoietic, provenen de la fusió de cel.lules mononuclears de la medul.la òssia (ROODMAN, 1987). Durant la reabsorció, a la membrana citoplasmàtica se li formen uns plecs que són la superfície on es desenvolupa l'activitat lítica. La cavitat que deixa l'osteoclast és el lloc on l'osteoblast hi deixa os nou. Una sola ronda entre reabsorció osteoclàstica i formació osteoblàstica, dura aproximadament uns vuit mesos (PARFITT, 1980).

Afegitó: les cel.lules del càncer de pulmó són capaces de reabsorbir, independentment, de l'actuació dels osteoclasts (MUNDY, 1978). Les cel.lules del sarcoma de WALKER segreguen un factor que estimula la reabsorció, in vitro. Aquest fenomen podria explicar la propensió del tumor a metastitzar l'os (FOWLES, 1955).

Quan l'osteoblast esdevé menys actiu en la formació de matriu orgànica, s'aplana, la fosfatasa alcalina declina i queda empotrat dins de la mateixa matriu mineralitzada; esdevenint osteocit. L'osteocit assentat en la seva llacuna i, envoltat d'os madur, continua contribuint a la dissolució del mineral veí. Uns altres osteoblasts inactius, estan en contacte amb els osteòcits, via senci-tal, i folren els canals ossis. La superfície de l'os recoberta per aquest folre d'osteoblasts, ocupa el 80% de l'esquelet i està quieta, respecte a la remodelació (PARFITT, 1987). Quan l'esquelet ha de corregir una desviació càlcica del sèrum, la regulació instantània, de moment a moment, és dirigida per l'extensa superfície fins ara quiescent i, no per l'activitat dels mecanismes de remodelació (NEUMAN, 1971). És un procés ràpid i de gran magnitud. Mou de 50-100 mml. de calci diaris. La solubilització del mineral a la zona pericanicular, feta probablement pels osteocits, deixa anar calci, que de l'interior a l'exterior de l'os va a parar al plasma (TALMAGE, 1977). En canvi, el procés de remodelació és lent i de petita quantitat (5-10 mml. per dia). Els osteoclasts tenen receptors per a la calcitonina. En contrast, no tenen resposta directa a la PTH(MINKIN, 1966).

El fosfat de calci amorf és un dels principals components de l'esquelet. TERMINE i POSNER suggereixen que el fosfat càlcic amorf és la primera forma de mineral que es diposita en el curs de la calcificació, resultant ésser un precursor metabòlic actiu metastable de l'apatita cristal·lina. Sembla, també, que aquest calci amorf pugui existir en forma , no tan sols metastable sinó, estable. BECKER (1974) descobreix una substància en el mitocondri de les cel·lules del fetge de rata, que inhibeix la calcificació del cartílag. HOWARD (1975) troba a l'orina normal humana un factor que priva la calcificació dels tendrums i la formació de càlculs renals. FEW i MAHLE, demostren, cromatogràficament que el factor mitocondrial i l'urinari són idèntics i que es tracta del fosfocitrat. LEHNINGER, (1980) el proposa com a protagonistes, d'extensas ramificacions, en la calcificació biològica.

El fluor està probat que s'incorpora, en viu, a l'interior del reticle cristal·lí de l'apatita (BAUD, 1962). El fluor paralitza l'aconitasa i impideix la metabolització subsegüent del citrat en el cicle de KREBS (LEIMBRUGER, 1959). A canvi, SHEARER (1971) va administrar en el menjar d'unes rates, 600 ppm. de fluor durant 14 dies i, no va trobar cap efecte sobre l'aconitasa. A l'os, hi ha una relació inversa entre la concentració de fluor i la de citrat. El perquè, no està clar (HAG, 1967) El fluor substitueix l'hidroxil de la xarxa cristal·lina (WEATHERELL, 1970). El fluorur sòdic augmenta el nombre d'osteoblasts i la fosfatasa alcalina, en viu (FARLEY, 1983).

L'osteogènesi i la fosfatasa van sempre juntes (ROBINSON, 1929). RASMUSSEN i BORDIER (1974) han demostrat que existeix un fort lligam entre la fosfatasa alcalina i la pirofosfatasa en el moment de la calcificació. La fosfatasa alcalina (ortofosfòric-monoèster fosfodidrolasa -EC 3.1.3.1- és una fosfomonoesterasa ubicua, sintetitzada per moltes cel·lules dels vertebrats. La prednisolona estimula la producció de fosfatasa alcalina. Fosfatases alcalines: os 67%; fetge 25% i intestí 8% (PLOWTEUX, 1980).

La gran capacitat del citrat per a quelar el calci, deixa especular sobre si la formació i la reabsorció estan implicades en la, dita, quelació del calci pel citrat (SRERE, 1965). NEUMAN(1956) exposa que la PTH augmenta l'acumulació d'àcid cítric a la superfície de l'os, i aquest i aquest dissol el mineral per l'efecte de la quelació. Tan sols una petita quantitat de calci està en forma quelada en la sang, però, això s'explica perquè els quelats produïts per l'os, són ràpidament oxidats extraesqueleticament, deixant lliure el calci iònic a la circulació (NEUMAN, 1958). El citrat per sota de pH 6,0 està menys ionitzat i el seu poder de quelació disminueix (MARTELL, 1952). El citrat competeix amb la tetraciclina, en els llocs de precipitació de cristalls d'hidroxiapatita, (IBSEN, 1964). El citrat presenta una gran afinitat per a quelar Ca, Sr, Mn, i Fe (SRERE, 1965). Entre les substàncies que poden actuar com a quelants hi ha: l'ésteracetil salicílic, l'adrenalina, la cortisona i la terramicina (SCHUBERT, 1966). És cert, que el citrat pot desmineralitzar l'os mitjançant la quelació del calci, però és necessari que aquest es produeixi en gran quantitat (WOLINSKY, 1969). Encara, que el citrat inhibeix fortament l'agregació de la hidroxiapatita, ho fa sense una significant dissolució dels cristalls. L'efecte, aparentment, no sembla degut a la quelació del calci (HANSEN, 1976).

Dels components fosforats l'ATP és el millor inductor de la calcificació (CARTIER, 1955). El 7-8% està en els dipòsits de fosfat càlcic amorf, al mitocondri, prevenint que aquest material es converteixi en apatita (BLUMENTAL, 1975). BETTS, BLUMENTAL, POSNER, BECKER i LEHNINGER, sostenen que l'ATP inhibeix la conversió, in vitro, del fosfat de calci amorf en hidroxiapatita. Les citrat sintases isolades dels mitocondris de fetge de rata i de la llimona són inhibides per l'ATP, (LEE, 1967).

La possibilitat de que l'ATP estabilitzi el fosfat càlcio amorf, insinua el que la similitud de la estructura química amb els pirofosfats i el difosfonats vedi el pas de l'ACP a HA (FRANCIS, 1959). CARTIER (1952) continua dient, que l'ATP és un dels principals elements de l'ossificació, degut a que quan una ATPase específica el desfosforilitza, fent-li perdre el seu pirofosfat terminal aquest es fixa a la matriu, donant-li la propietat calcafina. En una volta del cicle tricarboxílic, o sigui en l'oxidació d'un mol d'acetat, es produeixen 12 mols d'ATP.

L'hormona 1.25-dihidroxicolecalciferol procura l'absorció intestinal del calci i del fòsfor; la mobilització, també del calci i del fòsfor; la calcificació i el creixement (DeLUCA, 1976).

La relació entre la vitamina D i el metabolisme del citrat ha sigut clarament establerta per varis investigadors: DICKENS, F. Biochem. J. 35, 10/11, 1941

NICOLAYSEN, R. i NORDBO, R. Acta Physiol. Scand. 5/212, 1943

HARRISON, R. i HARRISON, H. E. Yale Biol. Med. 24/273, 1952

FREEMAN, S. i CHANG, T. S. Am. Physiol. 160/341, 1950

WAASJØ, E. i EEG-LARSEN, N. Acta Physiol. Scand., 1951

CARLSON, A. i HOLLUNGER, G. Acta Physiol. Scand. 31/317, 1954

L'excreció urinària de citrat, tant en les rates joves com en les adultes, augmenta quan se'ls administra quantitats fisiològiques de vitamina D (BELLIN, 1952). El contingut de citrat a l'os com al sèrum és baix en el raquitisme; tractat amb vitamina D, augmenta a l'os (NICOLAYSEN, 1971)

Sembla que la vitamina D pot transferir calci del teixit calcificat a l'osteoid per un efecte directe sobre els osteocits (BORDIER, 1970). La vitamina D i la PTH augmenten el calci al citosol cel·lular, però solament la PTH augmenta l'AMPc (RASMUSSEN, 1974). És obvi, que la vitamina D i la PTH són substàncies diferents i amb diferents repercussions, però, en certs aspectes, actuen d'una manera paral·lela i sinèrgica: ambdues puguen el producte Ca.HPO_4 , en el sèrum (NEUMAN, 1958)

Una interrelació directa entre la vitamina D i la PTH no existeix. Emperò, és subtil i complicada l'explicació del perquè en molts casos la seva acció fisiològica és tan semblant (NEUMAN, 1958) L'àcid calcotric ha estat identificat per ESVELT i DeLUCA (1976) com el metabolit més important de la 1.25-dihidroxivitamina D₃.

Les hormones tiroidees no afecten als osteocits, però s'augmenten la reabsorció osteoblàstica, tant de l'os trabecular com del cortical (MOSEKILDE, 1978). BLAHOS i BLAHOSOVA (1971) suposen que la tiroxina exerceix a l'os una acció similar a la parathormona; simés no, augmenta els nivells de citrat a la sang.

La producció d'acetil CoA es fa dins del mitocondri (KORACKER, 1965). In vitro, la CoA és activada pel citrat (DAKSHINAMURTI, 1969). El clofibrat (etil-2-(4 clorfenoxi)-2-metil propionat) puja la concentració de CoA hepàtica (VOLPPI, 1969).

La membrana interna del mitocondri conté un portador específic pel transport del citrat (ROBINSON; 1973 - FONYO, 1976). El citrat és transportat a través de la membrana mitocondrial en intercanvi amb el malat, un per un (PALMIERI, 1977). SWIERCZYSKI (1970) està d'acord amb CHANCE 1963, de que el citrat acidifica l'interior dels mitocondris.

En presència de concentracions de fòsfor creixents, els mitocondris acumulen enormes quantitats de calci (BORLE, 1970). El mitocondri és capaç d'acumular calci:

ARSENIS, Ch. Biochem. Biophys. Res. Comm. 46/1928, 1972

MARTIN, J.H. et al. Clin. Orthop. 68/273, 1970

HOHMAN, W. et al. J. Cell Biol. 30/317, 1966

BRITTON, G. J. Biol. Chem. 240/2729, 1965

WASINGTON, F.D. et al. J. Biol. Chem. 237/2670, 1962

SLATER, E.C. et al. Biochem. J. 55/566, 1953

DeLUCA, H. Proc. Natl. Acad. Sci. 48/1604, 1962

En aquest moment present (1972) l'evidència de que el mitocondri està involucrat directament en la calcificació, no és molt persuasiu (HANGCOX, 1972)

Analitzats els homogenat de fetge de rata, als mitocondris s'ho troba el 70% del citrat present a l'homogenat (SCHNEIDER, 1956). En mitocondris isolats, s'ha pogut veure que acumulen i mantenen grans quantitats de fosfat càlcic amorf (GREENWALT, 1964). Malgrat i les diferències quantitatives, l'augment de citrat a l'os degut a PTH dona resultats consistents (MARTIN, 1958). L'augment de calci sèric després de l'administració de PTH va precedir d'un increment del citrat, (FIRSCHEN, 1959). La parathormona acreix la producció dels àcids làctic i cítric en la relació de 20:1 a favor del làctic (YATES, 1965 - VAES, 1968). WALKER, (1961) s'atreveix a sostenir la hipòtesi de que la PTH, a dosis altes modifica profundament el cicle de KREBS dels osteoblasts; i a més, i en coincidència promou la conversió d'osteoblasts en osteoclasts.

La idea del citrat-like-substància que actua dissolvent les sals de l'os, és molt vella. Ja GREENWALT (1926) i KLINKE (1928) en els seus estudis preveuen l'existència d'una substància que directa o indirectament, lliga les glàndules paratiroides amb els citrats.

Si augmenta la funció paratiroidea es produeix un augment del contingut d'àcid cítric a la sang, (SJBSTRÖM, 1937). ALWALL, a l'any 1944, va demostrar que després de la injecció intramuscular de PTE_x a gossos, hi havia un correlatiu augment de calci i cítric al sèrum. Els nostres estudis en rates, no han pogut demostrar que el citrat del plasma es mogui abans de que ho faci el calci com a resposta a la PTH (COSTELLO, 1970). En viu, la vitamina A puja el nivell de parathormona sèrica (CHERTUN, 1977).

La succinodeshidrogenasa conté 4 àtoms de Fe, 4 sulfurs inorgànics i FAD, i és un exemple de proteïna fèrrica no hèmica. Aquest enzim es diferencia dels altres del cicle tricarbòxilic, en que és una part integrant de la membrana interna del mitocondri. SIH: 1.3.9.9.1.. L'activitat de la succinodeshidrogenasa està present a totes les cèl.lules aeròbiques (SINGER, 1966). L'àcid oxalacètic, in vitro, és un inhibidor competitiu de la SDH (PAPA, 1964). LOFRUMENTO (1967) afegeix que, no tan sols és un inhibidor sinó que és el més potent.

El mineral de l'os aferra un 0.9 % de citrat (WHEELER, 1981).

Totes les reaccions del cicle tricarbòxilic són reversibles, excepte la descarboxilació oxidativa de l' α -cetoglutaric. Això significa que el sentit del cicle no es pot invertir, encara que siguin reversibles alguns dels passos per separat: d'oxalat a succinat o de α -cetoglutarat a citrat.

Les dones excreten molt més citrat que els homes, almenys en els grups de persones sanes (TISELIUS, 1981). El citrat inhibeix la fosfofructoquinasa, enzim clau de la glucolisi (TOTTEGAARD, 1978). El 99,69% del citrat filtrat a nivell glomerular és reabsorbit (PELLET, 1973).

La part d'àcid cítric dèbilment lligat a l'os, és la fracció absorbida mitjançant forces de VAN der WAALS. I el cítric fortament lligat ho en forma de sals càlciques (SZOT, 1971). Les forces d'atracció que s'estableixen entre molècules neutres, s'agrupen sota la denominació de forces de Van der Waals. El trasplantament al·logènic d'os de rata desmineralitzada, inicia una cadena de reaccions, a la que responen els fibroblasts, la fosfatasa alcalina i més tard, l'àcid cítric amb un bon increment (REDD, 1972). BAKER et al. en el laboratori de l'hospital JOHNS HOPKINS, (1970) han vist que les preparacions de calci, que ordinàriament són von KOSSA negatives, si aquestes es precipitaven en presència d'àcid cítric, es tornaven von KOSSA positives. Pel grossor de la se a molècula, és improbable que el citrat participi en el recanvi intracristal·lí de l'apatita (NEUMAN, 1969). L'àcid cítric administrat intravenós desapareix ràpidament de la circulació (FRICK, 1970). Totes les cèl.lules de l'os posseeixen el total funcional del cicle tricarbòxilic; del cicle de les pentoses; a més, de la capacitat de metabolitzar els àcids grassos i els carbohidrats (FULLMER, 1964).

L'àcid malònic augmenta la excreció urinària de l'àcid cítric (KREBS, 1937 - KRUSTIUS, 1940 - FORSSMAN, 1941). El malonat no es metabolitza en els teixits animals (KREBS, 1938). Quan la succinndeshidrogenasa és blocada pel malonat, el quocient oxigen/piruvat és d'1, i l'acetil CoA és utilitzada fora del cicle tricarboxílic. Durant aquest temps, el succinat s'acumula, però a partir de certa concentració, aquest succinat tendeix a esborrar l'efecte competitiu del malonat sobre la SDH, ja que el succinar, via malonil CoA és utilitzat, progressivament per a la formació d'aceto-acetil CoA (GAUTHERON, 1970)

L'àcid malònic inhibeix la succinodeshidrogenasa, gràcies a una analogia estructural amb el substrat:



aquesta similitud permet, per engany,

que l'àcid malònic ocupi el centre actiu de la deshidrogenasa succínica i a l'ensem bloquegi la seva acció (GADJOS, 1967). KOOK (1968) exposa, que els seus experiments amb malonat marcat, indiquen que l'àcid malònic pot convertir-se en citrat al ronyó del gos i ésser excretat per l'orina. MENON i STEIN (1960) demostraren que el ronyó de la rata metabolitza ràpidament el malonat, via malonil-CoA que entra en el cicle tricarboxílic i, esdevé precursor de varis dels seus membres.

El malonat sòdic, en viu, es comporta com es preveia en els estudis in vitro. El primer que fa és interrompre el cicle tricarboxílic, en el punt de conversió del succinat en fumarat (Van der POTTER, 1951).

La calcitonina inhibeix la reabsorció òssia actuant sobre l'osteoclast (ZICHERNER, 1971 - KALLIO, 1972). La calcitonina no traspasa la barrera placentària (GAREL, 1968). Però, WESERMAN diu, que segons els resultats la calcitonina, sí pot travessar les membranes fetals i alterar els nivells de calci en el que ha de neixar (1969). FRANKLIN (1973) i col.laboradors han demostrat que la calcitonina té una acció directa de sentit hipocitrèmic, ja que redueix la producció de citrat d'origen esquelètic, com a conseqüència de la disminució de la reabsorció òssia. I d'altra banda favoreix l'eliminació del citrat per l'orina (VERRINA, 1981). La calcitonina remou el fosfat dintre de l'os (TALMAGE, 1981). La calcitonina disminueix la síntesi del col.lagen (KRANE, 1973). La calcitonina no altera la cristallització de les hepatites (MUZENBERG, 1970).

L'hormona del creixement és inhibida pel cortisol i l'estradiol (SHARMA, 1975). Els glucocorticoides emprats extensivament en terapèutica clínica i en investigació animal, frenen el creixement longitudinal dels ossos (HUILTA, 1963). Durant la maduració del mineral ossi de la granota temporal, els canvis observats són molt semblants als dels ocells i els mamífers (PILKINGTON, 1967).

Es conegut el dramàtic efecte inhibitori del fosfocitrat en la vitro-nucleació del cristall d'apatita. Això mena a la proposta de creure que el fosfocitrat deu tenir un cert rol en la calcificació (TEW, 1980). L'estructura del fosfocitrat (P-O-C) és similar a la dels bifosfonats (P-C-P) i dels pirofosfats (P-O-P) i tots in vitro, inhibeixen el creixement del cristall d'hidroxiapatita (KRUG, 1993). CARTIER (1968) ha demostrat que una part del fòsfor de l'os hi és en forma de pirofosfat càlcic. I que el dipòsit de fosfat tricàlcic va precedit de la fosforilació de la matriu proteica a la qual li dona les propietats calcafines. També és CARTIER (1968) qui es queixa, que moment no hi hagi cap explicació bioquímica que justifiqui la fixació massiva del calci i el fòsfor a la matriu. Tampoc ara (1996) existeix un aclariment satisfactori. D'una fàcil general, els carbonats són secretats pels invertebrats, mentre que, els fosfats ho són pels vertebrats (BRECEVIC, 1979).

Es una pura especulació, això de que el citrat facilita la desmineralització de l'os per quelació del calci (MECCA, 1963). El contingut de citrat a l'os no és fàcil d'entendre, si s'agrupen els raonaments del perquè està relacionat amb: la vitamina D (DICKENS, 1941 - CARLSON, 1954); amb la PTH FIRSCHEN, 1959); amb el calci (HARTLES, 1961) i amb el fluor (ZIPKIN, 1963).

L'àcid cítric a baixa concentració intensifica la calcificació, mentre que a altes, inhibeix aquest procés (HARTLES, 1961). Les cèl.lules roges dels mamífers contenen molt poc citrat, ja que és rudimentària l'activitat del cicle de KREBS (MOLLISON, 1958) - DAJANI, 1958). Els tres grups carboxílics del citrat, a pH fisiològic, estan ionitzats (NEUMAN, 1958). L'excreció de citrat per l'orina, pot variar sense cap canvi en el citrat plasmàtic (HARRISON, 1956). En la cortical de l'os de conill, el percentatge de citrat és alt (DIXON, 1952). L'àcid cítric es pot observar, no solament en espècimens d'os fresc, sinó també, en ossos que han estat enterrats durant centenes d'anys i exposats, com és natural als factors de descomposició (THUNBERG, 1947). El citrat no està distribuït uniformement per tota la substància òssia, sinó que la seva concentració és, especialment alta, en les parts dures (DICKENS, 1947).

Malgrat i la multiplicitat de funcions encomanades al citrat, és sorprenent la poca informació útil sobre el seu fer (SRERE, 1968)

El malonat inhibeix, competitivament, la succinodeshidrogenasa, en viu (KREBS et al. 1938). O sia que el grau d'inhibició no depèn, tan sols de l'absoluta concentració del malonat, i sí, de la relació succinat/malonat. ORTEN (1937) fou el primer en dir que la infusió de malonat en el gos produïa una marcada citraturia.

Les primeres consideracions a fer sobre l'efecte del citrat a l'os, provenen de si ho fa directament o indirectament.

Han contribuït a l'aclariment d'aquest planteig:

A.G. KUYPER, J. Biol. Chem. 159:411, 1945.

A.D. KENNI, D.R. DRASHKOCZY i P. GOLDBERGER, Am. J. Physiology, p. 197, 1950.

T.F. DIXON i H.R. PERKINS, Citric acid and Bone metabolism, p. 264, 1952.

D.M. LASKIN i M.B. ENGEL, Arch. Pathol. 62:296, 1952.

M. L'HEUREUX i G.J. ROTH, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 84:7, 1953.

W.F. NEUMAN, J. Amer. Chem. Soc. 78:3836, 1953.

P. CARTIER, Rev. Practicien, VII 8:803, 1957.

J.D. BORLE, A.V. NICHOLS i G. NICHOLS, J. Biol. Chem. 236:3323, 1960.

R.L. HARTLES i A.G. LEAVER, Arch. Oral Bio. 5:274, 1961.

Z. SZOT, Acta Physiol. Polonica XX 4:494, 1961.

G. VAES i G. NICHOLS, J. Biol. Chem. 237:2134, 1961.

C.F. MECCA, Proc. Soc. Biol. Med. 133:538, 1963.

H.M. FULLMER, J. Histochem. Citochem. vol. 3, 3:210, 1964.

G. VAES, Symp. Intern. Osteom. p. 30, 1965.

W.A. PECK, Clin. Orthop. Rel. Res. 48:243, 1966.

H.M. MURPHY, Calcif. Tiss. Res. 3:176, 1969.

I. WOLINSKY i D.V. COHN, Bone Respiration Citrate Metab. 84:28, 1969.

L.J. BRECEVIC i H. FUREDI-MILHOFER, J. Med. Sci. 7:3, 1971.

J.T. IRVING, Calcium and Phosphorus Metab. p. 69, 1973.

W.L. JONGEBLOED, P.J. van den BERG, i J. ARENDS, Calcif. Tiss. Res. 15:1, 1974.

S. BISAZ, Biochim. Biophys. Acta, 451:560, 1976.

demostrant que el citrat actua directament en el mecanisme bioquímic de l'os.

Addenda: LEHMAN, d'una manera oberta diu: " durant la formació de l'os el citrat alliberat pel metabolisme cel.lular, la major part d'ell, es diposita a la fase insoluble; si la producció de citrat continua i la concentració creix, es formen complexos de citrat càlcic soluble que remouen el calci iònic, cristal.lí, i les proteïnes lligades a ell; aquesta col.ligació de relacions propicia la disgregació de l'estructura òssia. LEHMAN, ENGEL i LASKIN Science, 130 (3399), 22, 1959.

Corol.lari: el rol del citrat en el metabolisme cel.lular ossi, amb igual significat en l'aposisió i en la resorció, advoca la unitat d'arranjament i funció.