

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 L'INFLUENZA DEI FATTORI GEO-AMBIENTALI SULLA SALUTE UMANA

Le scienze della terra sembrano essere distanti dalla salute umana ma se consideriamo che rocce, minerali ed acque superficiali costituiscono la gran parte del pianeta con cui interagiamo e contengono la maggioranza degli elementi chimici che assumiamo attraverso il cibo, l'acqua e l'aria, ne comprendiamo l'importanza.

Le masse rocciose degradano per erosione fisica e per attacco chimico e vanno a costituire i suoli sui quali interagiscono la flora e la fauna.

L'acqua potabile viaggia attraverso il suolo ed il sottosuolo come parte del ciclo idrologico e la maggioranza della polvere e dei gas contenuti nell'atmosfera sono di origine "geologica" e raggiungono l'uomo attraverso la catena alimentare e/o l'inalazione.

L'eruzione vulcanica del Monte Pinatubo è uno dei tanti esempi degli effetti drammatici dell'influenza geologica sull'uomo. In soli due giorni, nel giugno del 1991, il vulcano Pinatubo ha eruttato 10 bilioni di tonnellate di magma e 20 milioni di tonnellate di SO_2 ; i gas prodotti hanno influenzato il clima mondiale per tre anni. Questo singolo evento vulcanico ha introdotto nell'ambiente molti elementi tossici (come arsenico, berillio, cadmio, mercurio, etc.) con effetti nocivi evidenti. Ma molti altri elementi furono eruttati con non ben noti effetti biologici.

Considerato che 60 vulcani sono in eruzione contemporaneamente sulla Terra, si può solo immaginare i quantitativi di elementi chimici rilasciati nell'ambiente.

Varie culture antiche fanno riferimento alla relazione ambiente e salute. In molti casi i problemi di salute sono legati all'ambiente di lavoro ma una stretta relazione con l'ambiente naturale era già stata presa in considerazione. Diversi test della medicina cinese datati al terzo secolo A.C. contengono riferimenti alla relazione ambiente e salute.

Durante le dinastie Song (1000 A.C.) e Ming (XIV-XVII secolo D.C.) furono riconosciuti problemi legati alla frantumazione di alcuni tipi di roccia e sintomi di avvelenamento da piombo in ambiente di lavoro.

La gotta, per esempio, risultato di una carenza di iodio, era ampiamente presente nell'antica Cina, Grecia ed Egitto, come anche tra gli Inca nel Perù. Il fatto che questa condizione fosse poi accompagnata da un cambiamento delle abitudini alimentari, indica un certo grado di conoscenza del problema.

Già 1500 anni fa, erano note alcune relazioni tra qualità delle acque e salute umana:

"Whoever wishes to investigate medicine properly, should proceed thus.... We must

also consider the quality of the waters, for as they differ from one another in taste and weight, so also do they differ much in their quality”

(Ippocrate, 460-377 A.C.)

E così Ippocrate diceva sulle acque: «Non è possibile che un’acqua assomigli a un’altra; alcune sono dolci, altre salate e astringenti, altre ancora derivano da sorgenti calde». Ma egli non si limitava a concetti generali, perché scendeva nel particolare rilevando le varie qualità delle singole acque e poi facendone un paragone con le popolazioni che ne facevano uso continuato. Pessime, a suo dire, sono le acque paludose («di serbatoio e di stagno») che apportano agli utenti «milza ingrossata e congesta e ventre duro, piano e caldo». Né di eccessivo valore sono le acque ricche di minerali («ferro, rame, argento, oro, solfo o allume, o bitume o nitro»), come enunciato nel suo trattato *Dell’aere, dell’acqua e de’ luoghi* [sec. V / IV a.C.].

Una descrizione successiva del legame tra geologia e salute è raccontata da Marco Polo; nel 1270, attraversando il grande deserto del Lop scrisse:

“Vero è che li viandanti che passano de lì non ardiscono andare a que’ monti con altre bestie che di quella contrada, perché vi nasce un’erba velenosa, di sorte che, se le bestie ne mangiano, perdono l’unghie, ma quelle di detta contrada conoscono l’erba e la schifano di mangiare”

(Il Milione, cap. XLIX)

La patologia degli animali osservata da Marco Polo è simile ad una condizione che noi oggi conosciamo essere causata dal consumo di piante in cui si è accumulato il selenio. Questo racconto di viaggio può essere definito come il primo rapporto sulla sua tossicità.

Problemi di salute risultanti dall’esposizione ai metalli, sono riconosciuti in gran parte del mondo. L’uso comune di questi metalli anche nell’antichità è testimoniato dai loro effetti tossici. Profili psicologici di imperatori romani vissuti tra il 50 ed il 250 A.C. suggeriscono che la maggioranza soffriva di avvelenamento da piombo, usato per conservare frutta e verdura ed aggiunto al vino per fermarne la fermentazione o solo per colorarlo [Nriagu 1983].

La rivoluzione industriale in Europa ed nel nord America ha esposto molti

lavoratori ad alti livelli di elementi chimici e composti con cui non erano mai entrati in contatto.

Lo sviluppo delle moderne scienze geologiche associate all'incremento di tecniche analitiche sempre più potenti, ha consentito di determinare la natura e l'abbondanza di numerosi elementi, presenti soprattutto in tracce, nelle rocce e nei suoli. Le scienze mediche hanno fornito i dati clinici per comprendere le conseguenze sull'uomo e sugli animali di una eccessiva esposizione agli elementi presenti nell'ambiente.

Per citare una tra le tante scoperte nella geologia medica, dobbiamo andare in Norvegia. Per molto tempo i medici norvegesi riscontrarono una forma particolare di malattia delle ossa (osteomalacia) tra gli animali domestici di un certo distretto. Cercarono di curarla somministrando ossa frantumate al cibo degli animali malati. Iniziarono a sospettare che la malattia derivasse dal consumo di una pianta diffusa in quella zona, detta *Granum ossifragum* (la pianta che frantuma le ossa). Cento anni dopo, il geologo J.H.L. Vogt studiò questa pratica. Con sorpresa ritrovò scarsa quantità di apatite nelle rocce del luogo e giunse alla conclusione che era la carenza di fosforo la causa della osteomalacia.

Una volta determinata la causa della malattia, divenne facile capire che per prevenirla era sufficiente aggiungere del fertilizzante ricco in fosforo al suolo [Låg 1990].

Per alcune importanti malattie le cause sono quasi o del tutto sconosciute e le cure ed i controlli, incerti. Quando l'incidenza o la prevalenza di queste malattie vengono inserite su supporti cartografici, si osservano delle differenze da luogo a luogo; differenze che non possono essere sempre giustificate da diverse caratteristiche genetiche, sociali o dietetiche.

L'influenza geo-ambientale sembra essere a questo punto coinvolta in queste malattie ed il ruolo del "geologo" appare quanto mai indispensabile. Se si riscontra una associazione positiva in un'area, allora si può ipotizzare che si rinvenga la medesima associazione anche in aree geologicamente simili.

Vista l'importanza dello studio geo-ambientale nelle problematiche connesse alla salute umana, in diverse parti del mondo si sono recentemente registrate numerose iniziative come congressi internazionali, workshop, associazionismo.

Queste iniziative sono accompagnate poi dalla comparsa nel panorama scientifico internazionale di diverse pubblicazioni su riviste dedicate come *Environmental Geochemistry and Health*, *Journal of Geochemical Exploration*, *International journal of environment and pollution*, *Journal of Environmental Monitoring*, o su edizioni speciali di riviste ampiamente note come *Applied Clay Science*, *Review in Mineralogy and Geochemistry*, *Elements*.

1.2 IL PROCESSO DI MINERALIZZAZIONE DELL'ORGANISMO E LE PATOLOGIE ASSOCIATE

Il processo mediante il quale gli organismi formano dei materiali composti, costituiti da macromolecole e minerali, con una grande varietà di proprietà adeguate alle funzioni che debbono svolgere, è definito biomineralizzazione [Boskey 1981; Dove et al. 2003; Lowenstam & Weiner 1989].

A fronte di 3600 specie di minerali, i biominerali conosciuti sono circa 80, appartenenti prevalentemente al gruppo dei fosfati (25%) e dei carbonati di calcio (50%) [Mann 2001; Menni Turbanti 2002; Simkiss & Wilbur 1989].

Il calcio risulta, quindi, essere l'elemento predominante in molti biominerali e ciò non deve sorprendere perché partecipa a molte delle funzioni fondamentali nel metabolismo cellulare [Lowenstam & Margulis 1980]. Da qui deriva anche la consuetudine di utilizzare il termine "calcificazioni" quando si parla di biomineralizzazioni che comportano la formazione di minerali di calcio, come fosfati, carbonati, ossalati e altri tipi.

Generalmente il 99% del calcio presente nell'organismo si incontra sotto forma di solido formato da cristalli di idrossapatite ed il restante 1% rimane nel sangue.

Nel sangue si concentra per il 50% come ione calcio libero, in un 10% legato a ioni (citrato, bicarbonato) ed il restante 40% legato a proteine (soprattutto albumina).

La concentrazione del calcio intracellulare è dell'ordine di 10^{-6} M contro il 10^{-3} M del liquido extracellulare [Manolagas & Olefski 1988].

Nel metabolismo del calcio intervengono tre ormoni (paratormone, calcitonina e vitamina D) e tre organi (ossa, reni ed intestino) [Costanzo 1998; Devlin 1986; Manolagas & Olefski 1988].

Per mantenere un equilibrio corretto nella omeostasi del calcio, la quantità di calcio espulsa dai reni deve essere uguale a quella assorbita realmente dall'intestino.

Nell'organismo umano, in condizioni fisiologiche e controllate, si formano delle calcificazione dette fisiologiche. La cosa che sorprende e che questo tipo di processo di cristallizzazione si verifica solo in alcuni specifici punti e che, una volta iniziato, questo non si propaghi in tutto l'organismo [LeGeros 1999; Skinner 1987].

Questo fa sì che lo studio dei fattori che regolano il processo di cristallizzazione e l'equilibrio che esiste tra i diversi fattori coinvolti, sia molto importante.

La modificazione di uno di questi fattori, potrebbe provocare l'alterazione del normale processo di cristallizzazione, dando luogo a tutta una serie di calcificazioni anomale.

Nelle biomineralizzazioni fisiologiche (ossa, dentina e smalto), si ritiene che la fase minerale consista, principalmente, di idrossapatite $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ [Bigi et

al. 1997; Gross & Berndt 2002; LeGeros 1999; Skinner 1987; Thompson et al. 2001], che è un minerale contenente gruppi OH⁻ con una specifica composizione e struttura.

Questa fase minerale si differenzia, per adattarsi alla natura e alla funzione (meccanica o fisiologica) del tessuto in cui si trova, per forma, dimensione, orientazione e concentrazione di elementi minori (area della superficie specifica, sostituzioni ioniche e proprietà di dissoluzione) [Daculsi et al. 1997; Skinner 2000; Wopenka et al. 2005].

In particolare, nel tessuto osseo, il processo di biomineralizzazione consiste nella deposizione ordinata di cristalli di fosfato di calcio su una matrice collagenosa, con un processo controllato biologicamente, e mineralizzazione extracellulare [Elliott 2002; Lowenstam & Weiner 1989; Veis 2003].

Alla luce di nuove ricerche e applicazione di nuove tecniche analitiche (diffrazione e spettroscopia) per lo studio della composizione mineralogica delle ossa, si è osservato che il minerale costituente le ossa è strutturalmente molto simile all'idrossapatite, ma ci sono differenze visibili nella forma e posizione dei picchi diffrattometrici e nel contenuto di elementi chimici se paragonata ad un minerale d'idrossapatite di natura geologica o sintetica [Elliott 2002; Wopenka & Pasteris 2005].

Alcuni elementi chimici, infatti, possono entrare a far parte della struttura minerale delle ossa e denti attraverso le sostituzioni ioniche, che si traducono in una modificazione delle caratteristiche cristallografiche e/o fisico-meccaniche del minerale (variazione della solubilità, della resistenza, della forma e della dimensione) che può dare origine a patologie umane.

La bibliografia scientifica è ricca di esempi a riguardo, come il caso della malattia Itai-Itai, riscontrata nel 1946 in una zona del Giappone, dovuta ad una intossicazione cronica da cadmio di origine alimentare, per la contaminazione industriale delle acque e dei cibi [Friberg et al. 1975; Murata et al. 1970; Tsuchiya 1978].

La patologia consiste in un danno renale ed alterazioni, secondarie al danno, del metabolismo del calcio e fosforo. In pratica, alcuni ioni Ca²⁺ delle ossa vengono sostituiti da ioni Cd²⁺, che hanno la stessa carica elettrica e circa le stesse dimensioni.

La conseguenza è che le ossa assumono, con il tempo, un aspetto poroso (perdita di densità dell'osso= osteoporosi) e possono fratturarsi [Miyahara et al. 1988; Staessen et al. 1999]. L'assunzione del cadmio da parte dei pazienti affetti da Itai-Itai fu stimata pari a circa 600 microgrammi al giorno, si consideri che il valore accettabile nell'acqua potabile per il cadmio è di 0.003mg/l [WHO 2006].

Altre sostituzioni cationiche, invece, possono essere favorevoli. Una maggiore

sostituzione dello ione calcio con il magnesio sembra prevenire le fratture e ha come risultato un significativo incremento della densità dell'osso [Bigi et al. 1992; Sojka & Weaver 1995; Vaananen 1991].

Tra le altre sostituzioni ioniche note nelle ossa e nei denti ricordiamo F^- , Cl^- , Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , citrati e carbonati [Elliott 2002; Gross & Berndt 2002; LeGeros 1991; Skinner 1987]. Anche alcuni elementi metallici e/o semi-metallici, come piombo [Pounds et al. 1991] o arsenico, possono essere incorporati nella struttura dell'apatite biologica con forti ripercussioni cliniche sulle ossa e sui denti, quali perdita di densità [Elliott 2002; Trueman & Tuross 2002].

Oltre ad un effetto sulle caratteristiche cristallografiche e/o fisico-meccaniche dei biominerali, gli elementi che vengono scambiati e successivamente incorporati nella struttura cristallina, si comportano come promotori e/o inibitori della crescita di cristalli di apatite, ma possono essere anche coinvolti, come inibitori e/o promotori, nella trasformazione di un fosfato di calcio in un altro [Boskey & Poster 1974; LeGeros 1991; LeGeros et al. 1995; Posner 1985].

Nel corpo umano ritroviamo anche delle cristallizzazioni che, al contrario delle fisiologiche, non assolvono ad un ruolo ben preciso nell'organismo, anzi la loro formazione rappresenta una vera e propria patologia. Tali cristallizzazioni sono perciò definite patologiche.

In funzione dell'organo o parte del corpo colpito, distinguiamo:

- ⇒ Litiasi renale: patologia causata dalla presenza di calcoli nei reni o nelle vie urinarie. I calcoli renali variano in funzione della loro composizione come ossalato e fosfato di calcio, struvite, acido urico e cistina.
- ⇒ Calcificazioni cardiovascolari: patologia caratterizzata dalla deposizione di fosfato di calcio (idrossapatite) nei tessuti cardiovascolari: vasi sanguigni, miocardio e valvole cardiache.
- ⇒ Sialolitiasi: malattia caratterizzata dalla formazione di calcoli o depositi cristallini nelle ghiandole o condotti salivari.
- ⇒ Formazione di tartaro: formazione di depositi calcificati nei denti derivanti dalla mineralizzazione della placca.
- ⇒ Condrocalsinosi: malattia caratterizzata da depositi di sale di calcio (pirofosfato calcico) nella cartilagine.
- ⇒ Gotta: deposizione di acido urico, in forma di urato sodico, nelle articolazioni e periarticolazioni come conseguenza dell'alto livello di acido urico nel sangue (iperuricemia).
- ⇒ Altri tipi di cristallizzazioni patologiche si sviluppano nel condotto biliare (calcoli biliari), stomaco (gastolito), intestino (entrolito), ghiandole mammarie (galactolito), etc.

1.3 I BIOMINERALI PATOLOGICI NELLA NEFROLITIASI

Per calcolosi renale o nefrolitiasi si intende la presenza nelle cavità dei reni di formazioni cristalline denominate calcoli, derivanti dalla precipitazione e dall'aggregazione di soluti presenti nelle urine (fig. 1.1).

Lo stesso fenomeno riferito ad un segmento qualsiasi delle vie urinarie (calici, pelvi, uretere, vescica, uretra), si definisce calcolosi urinaria o urolitiasi. E' solito riferirsi alla nefrolitiasi includendo anche i calcoli di questo tipo.

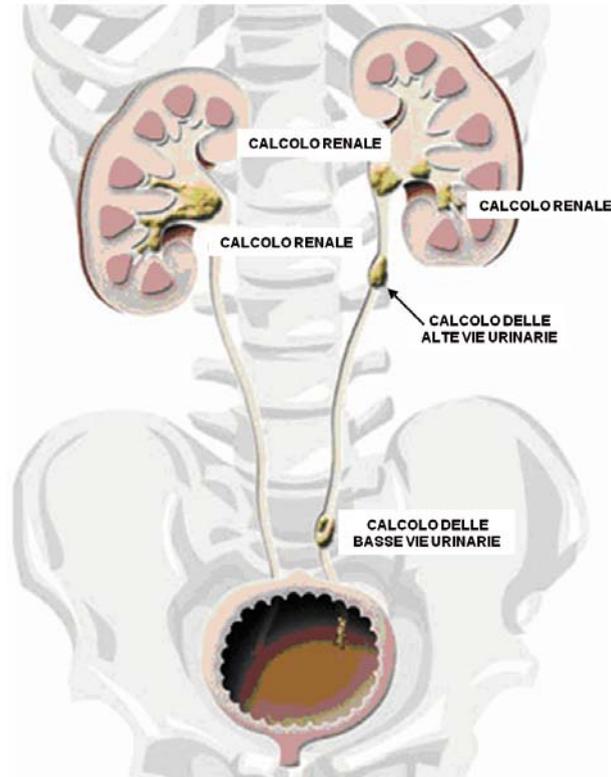


Figura 1.1 Schema delle possibili sedi di formazione dei calcoli
Scheme of possible sites of kidney stones formation

Questa è una malattia molto frequente che affligge dall'1% al 15% della popolazione mondiale [Kim 2002; Ramello et al. 2000; Schneider 1985; Scott 1985].

La prevalenza di litiasi renale differisce molto nelle diverse parti del mondo: in Asia è pari al 1-5%, in Europa al 5-9%, nel Nord America 13-15% ed in Arabia Sudita 18-20% [Hess 2003; Lee 2002; Serio & Fraioli 1999].

In Italia, negli ultimi dieci anni questa patologia ha registrato un incremento, particolarmente accentuato nel Mezzogiorno [Baggio 1999; Serio & Fraioli 1999].

La sintomatologia di un paziente affetto da calcoli renale può essere assente o sfumata, oppure essere conclamata con il manifestarsi della classica colica renale.

La litiasi renale è stata sempre presente, praticamente dall'inizio dell'umanità. Già gli antichi Babilonesi e gli Egiziani avevano frequenti esperienze di coliche renali e calcoli renali. Le mummie arrivate sino ai nostri giorni ne presentano sia nei reni che in vescica.

Il calcolo più antico di cui si è a conoscenza è datato al 4800 a.C., ed è stato ritrovato in una tomba preistorica di El Amrah [Desnos 1972].

Il primo studio sulla composizione di un calcolo renale fu realizzato intorno al 1800 da Schellee (1742–1786) e Bergman (1734–1794), che identificarono un calcolo di acido urico.

Sino a venti anni or sono si aveva pochissima cognizione medica delle cause e della terapia della nefrolitiasi e molti atteggiamenti terapeutici si avvalevano di rimedi di tipo empirico, talvolta avvolti da un'aura di mistero.

Negli ultimi tempi il progresso scientifico ha chiarito molti aspetti fisico-chimici, ambientali e metabolici della origine e formazione dei calcoli renali.

Oggi la terapia medica delle anomalie urinarie che sono presenti nei soggetti afflitti da calcolosi permette di prevenire nuovi eventi in circa il 95% dei soggetti. Tra le diverse terapie possibili ritroviamo la terapia idroponica che consiste nell'assunzione abbondante e ripetuta di acqua durante la giornata (fino a 3 litri), associata ad una dieta normo o moderatamente ipoproteica e iposodica. In associazione a questa terapia troviamo la terapia farmacologica che dipende dal tipo di calcolo e mira a favorire la disgregazione del biominerale e l'escrezione del materiale, e/o a fermarne la formazione. Questa terapia necessita di una conoscenza approfondita delle componenti mineralogiche del calcolo.

Al progresso nella prevenzione si è aggiunta la litotrixxia extra-corporea ad onde d'urto (*Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy*), che ha cambiato completamente l'orizzonte e la prognosi clinica dei soggetti con calcoli renali. Si tratta di onde d'urto generate da una macchina e trasmesse ai tessuti molli dell'organismo; tali onde si infrangono sulla superficie solida del calcolo, inducendone la polverizzazione. Il "puntamento" del calcolo, avviene tramite l'ecografia o un apparecchio radiologico. Tale metodica è efficace in caso di calcoli renali non superiori ad 1,5 cm e in molti calcoli delle vie urinarie.

Ci sono anche terapie più aggressive come l'ureteroscopia, che consiste nel raggiungere il calcolo nelle vie urinarie (in anestesia) con uno strumento che

permette la visualizzazione del calcolo che potrà essere frantumato (applicando energia laser) o estratto con appositi strumenti. E' possibile applicare anche la chirurgia, se i calcoli sono di notevoli dimensioni, o quando siano insorte complicazioni settiche, quindi si rimuove il calcolo e/o si drena, quando sia necessario, il focolaio d'infezione.

Tuttavia, nonostante gli studi su questa patologia si siano estesi ed approfonditi, al giorno d'oggi rimane ancora una patologia ad alta percentuale di recidive (il 75% nei 10 anni che seguono, Uribarri 1989) dovute al fatto che, nella maggior parte dei casi, non viene attuato un trattamento terapeutico efficace ed adatto al tipo di calcolo in esame.

La motivazione si deve al fatto che, questa patologia essendo multifattoriale deve essere affrontata con conoscenze diversificate come: la mineralogia, la cristallografia, la fisiologia renale, la biochimica e la chimica analitica.

Attualmente, le analisi e lo studio dei calcoli renali sono ad uno stadio molto avanzato, tale da poter stabilire dei criteri di diagnosi e di trattamento terapeutico adeguato ad ogni tipologia di calcolo, anche perchè grazie alle maggiori conoscenze ottenute sulla composizione dei calcoli, possiamo stabilire i meccanismi di formazione e i fattori che li hanno influenzati.

Queste informazioni permettono di classificare il paziente secondo una forma clinica ben definita per poter, di conseguenza, stabilire un trattamento terapeutico adatto basandosi sulla modificazione di alcuni fattori quali: pH, calciuria, uricosuria, inibitori della cristallizzazione, etc.

1.3.1 TIPO DI CALCOLI RENALI

Il calcolo renale è una massa dura che si sviluppa da cristalli che, dalle urine "sovrassature", si separano e crescono a formarlo già all'interno dei tubuli renali.

Normalmente nelle urine si concentrano una quantità di sostanze chimiche che partecipano alla formazione dei cristalli (in termini tecnici queste sostanze vengono chiamate: promotrici), contrastate da altre sostanze chimiche, che inibiscono la precipitazione dei cristalli delle sostanze promotrici (inibitrici). E' il gioco tra inibitori e promotori che impedisce in condizioni normali, cioè in soggetti normali, la formazione dei calcoli renali, anche in condizioni critiche.

La formazione di calcoli è lo stesso processo chimico che comporta la precipitazione dello zucchero nella tazzina di caffè oppure quando si forma il sale nelle saline: se la sostanza contenuta nelle urine è più concentrata del normale, rischia di precipitare.

I calcoli renali possono essere costituiti da varie componenti chimiche, singole o in combinazione quali ossalati e fosfati di calcio, acido urico e cistina [Daudon

et al. 1993]. Queste diverse fasi mineralogiche sono state subito individuate per grandi linee, anche se sorprende la scarsità di studi in merito se paragonata alla letteratura scientifica sulle ricerche epidemiologiche.

La prima grande differenziazione tra i calcoli renali viene fatta proprio sulla base dei suoi componenti maggiori, distinguendo i calcoli inorganici da quelli organici (fig. 1.2).

Questa prima semplice classificazione è ancora oggi considerata nella prassi medica, che fa capire come informazioni derivanti dalla struttura interna del calcolo e del suo meccanismo di formazione sono omesse nella diagnosi della nefrolitiasi.



Figura 1.2 Schema classificativo classico dei calcoli renali

Classical classification of kidney stones

Il miglioramento delle tecniche analitiche ha consentito in seguito di sviluppare questa semplice classificazione composizionale aggiungendo dati sulla struttura interna dei calcoli ed informazioni sui meccanismi di formazione (fig. 1.3) [Grases et al. 1998a].

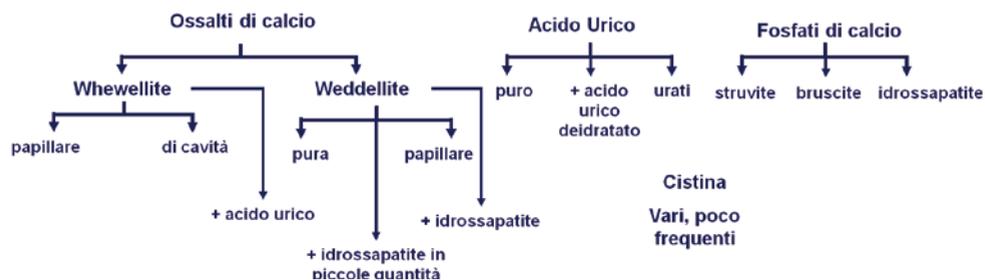


Figura 1.3 Classificazione morfo-composizionale dei calcoli renali

Morpho-compositional classification of kidney stones

CALCOLI DI OSSALATO DI CALCIO

I calcoli di ossalato di calcio sono quelli che hanno una maggiore incidenza rappresentando, approssimativamente, il 70% del totale.

In questo tipo di calcoli è importante tener conto che, anche la condizione di un'urina sovrassatura in ossalato di calcio, non è sufficiente per indurre, da sola, la formazione di cristalli di ossalato di calcio [Brown et al. 1991; Finlayson 1978a; Finlayson & Reid 1978b; Lieske et al. 1997]. Questo tipo di calcoli necessita di una composizione dell'urina differente, capace di formare un nucleo sopra il quale i cristalli di ossalato di calcio possano svilupparsi [Brown et al. 1991; Finlayson 1978a; Finlayson & Reid 1978b].

I calcoli di ossalato di calcio, in funzione della loro composizione, si possono dividere in due grandi gruppi: calcoli di ossalato di calcio mono-idrato ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e calcolo di ossalato di calcio bi-idrato ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) [Kim 1982].

I calcoli di ossalato di calcio mono-idrato solitamente si presentano in casi di calciuria normale e con una bassa concentrazione di inibitori [Conte et al. 1990; Galán et al. 1996; Pierratos et al. 1994].

In funzione del loro processo di formazione, i calcoli di whewellite si possono dividere in due diversi gruppi: papillari e di cavità.

- Calcoli di whewellite papillari

Struttura: Un tipico calcolo di whewellite papillare si presenta con una forma conica e con un ben evidente punto di contatto con l'epitelio. Di solito è formato da tre parti: un nucleo di composizione variabile (decentrato), una parte intermedia striata radialmente ed uno strato periferico concentrico con struttura laminata [Iwata et al. 1985].

Meccanismo di formazione: Si forma sulla papilla renale nella zona in cui lo strato antiaderente di glicosaminoglicani¹ (GAGs) risulta danneggiato per qualche disfunzione cellulare, attacco esterno (inquinamento ambientale) o per l'esistenza di calcificazione intrapapillare (placche di Randall) [Gill et al. 1982; Grases et al. 1993a, 1999; Lieske et al. 1997; Pieras et al. 2006; See & Williams 1992; Söhnel et al. 1993].

Quando lo strato di GAGs risulta molto danneggiato è il suo detrito cellulare (risultato dell'aggressione) che può fungere da nucleo ed indurre la formazione e l'accrescimento dei cristalli di whewellite sulla sua superficie (fig. 1.4).

Talvolta, anche quando lo strato di GAGs non risulta danneggiato, possono

¹ I glicosaminoglicani, o glicosamminglicani, (noti anche come GAGs o mucopolisaccaridi), sono lunghe catene non ramificate formate da unità disaccaridiche che continuano a ripetersi in ordine determinato alternando un amminosaccaride ad un monosaccaride in genere acido. I GAG svolgono prevalentemente funzioni di sostegno e protezione della maggior parte dei tessuti.

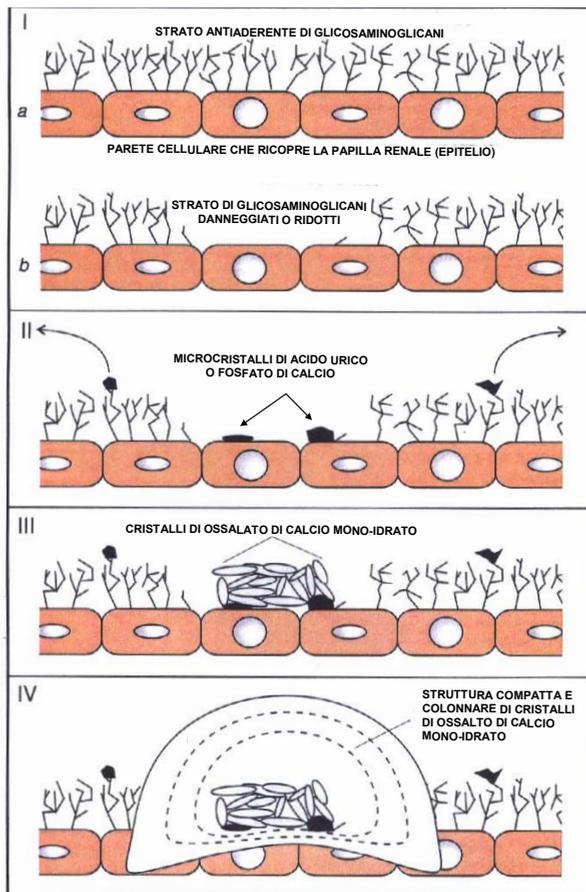


Figura 1.4 Schema del meccanismo di formazione dei calcoli di ossalato di calcio mono-idrato papillare [Söhnel & Grases 1995]

Scheme of the papillar calcium oxalate monohydrate kidney stone formation

aderire sopra questa zona, determinate sostanze che sono in grado di fungere da nucleo ed indurre la formazione e l'accrescimento di cristalli di ossalato di calcio come il caso precedente [Grases et al. 1993a, 1993b, 1994a, 1994b; Söhnel et al. 1993; Söhnel & Grases 1995].

- Calcoli di whewellite di cavità

Struttura: Un tipico calcolo di whewellite di cavità è formato da due zone differenti: un nucleo o zona centrale di composizione variabile (che contiene il o gli elementi eterogenei che hanno funto da nucleanti per la formazione di tutto il calcolo) e una zona periferica costituita da cristalli colonnari di whewellite che si sono accresciuti perpendicolarmente alla superficie del nucleo [Grases et al. 1998b].

Meccanismo di formazione: Si generano in determinate zone del rene dove è assente o scarso il flusso urodinamico [Chandhoke & May 1996], come può essere il calice renale inferiore, dove la soluzione urinaria permane per un periodo di tempo superiore al tempo di residenza nell'intero rene.

La sola sovrassaturazione urinaria in calcio ed ossalato non è sufficiente a giustificare la formazione di cristalli di whewellite [Brown et al. 1991; Finlayson 1978a; Finlayson & Reid 1978b], circostanza che rende imprescindibile la presenza di promotori della cristallizzazione.

Questi promotori possono essere i medesimi della whewellite papillare (fosfato di calcio, acido urico, detriti) [Cifuentes 1984; Elliot 1973].

La forma bi-idrata è la fase termodinamicamente instabile e cineticamente favorevole dell'ossalato di calcio; la fase termodinamicamente stabile è la forma monoidrata [Nakai et al. 1996; Skrtic et al. 1987].

La formazione dell'ossalato di calcio bi-idrato avverrà solo considerando i fattori cinetici.

La presenza di ipercalciuria e/o iperossaluria, forza ionica elevata, notevoli quantità di citrato e la presenza di fosfato di calcio a $\text{pH} < 6.0$ [Grases et al. 1990] consentono, quindi, la formazione di ossalato di calcio bi-idrato.

Questi tipi di calcoli si possono dividere in tre gruppi: calcoli di weddellite papillari, calcoli di weddellite di cavità e calcoli misti di weddellite e idrossapatite.

- Calcoli di weddellite papillari

Struttura: Sono poco frequenti. Presentano due zone chiaramente differenti: una zona centrale costituita o da un piccolo calcolo papillare di whewellite o da un deposito papillare di idrossapatite. L'altra zona è periferica ed è costituita da grandi cristalli bi-piramidali di weddellite che si attaccano alla zona centrale. I cristalli di weddellite, a causa della loro forma bi-piramidale, non possono crescere parallelamente ma si sovrappongono gli uni sugli altri a formare una struttura disordinata.

Meccanismo di formazione: Il meccanismo di formazione di questo tipo di calcolo è uguale a quello descritto per i calcoli di whewellite papillare. Solo che, in questo caso, una volta formatosi il piccolo calcolo papillare di whewellite, i cristalli che si formano sulla superficie sono di weddellite per le diverse condizioni urinarie (una calciuria e/o ossaluria elevata e valori di pH superiori a 6.0).

- Calcoli di weddellite di cavità

Struttura: Questi calcoli sono formati da cristalli bi-piramidali di weddellite

e alcuni cristalli di dimensioni variabili di whewellite quale risultato della trasformazione da weddellite in whewellite. Anche questi calcoli possono presentare piccole quantità di idrossapatite distribuita irregolarmente.

Meccanismo di formazione: Questo tipo di calcolo si forma in cavità con bassa energia urodinamica. La sedimentazione di alcune particelle solide (principalmente materia organica e idrossapatite) in queste cavità, induce la formazione sulla loro superficie di cristalli di ossalato di calcio bi-idrato.

- Calcoli misti di weddellite / idrossapatite

Struttura: Questi calcoli sono composti da cristalli di weddellite e possono esserci quantità di whewellite quale risultato di trasformazione di cristalli di weddellite, ma soprattutto importanti quantità di idrossapatite e materia organica che, frequentemente, si dispongono alternativamente a formare strati differenziati [Cifuentes 1984].

Meccanismo di formazione: Questi calcoli si presentano normalmente in pazienti ipercalcemici (calcio urinario superiore a 250–300 mg/24h) e si formano in cavità con bassa energia urodinamica. La sedimentazione di materia organica e la sua formazione di idrossapatite è dovuta ad un pH urinario superiore a 6.0, e può indurre la formazione di cristalli di weddellite quando l'urina presenta alti livelli di calcio. La presenza di strati di idrossapatite e weddellite è stata attribuita ad un cambio di composizione dell'urina dovuto a modificazioni delle abitudini alimentari [Cifuentes 1984].

CALCOLI DI FOSFATO

I tre tipi di calcoli di fosfato più frequenti sono: idrossapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$), bruscite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e struvite o fosfato-ammonio-magnesio ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) [Murphy & Pyrah 1962; Prien & Frondel 1947].

La fase termodinamicamente stabile in soluzione acquosa è la bruscite per pH inferiori a 5.0 e l'idrossapatite per pH superiori a 5.0 [Kemenade & Bruyn 1987; Nancollas & Koutsoukos 1980]. In questo modo, i fosfati si trasformano in idrossapatite o bruscite in funzione del pH della soluzione.

I calcoli di fosfato si possono dividere in due categorie: calcoli di fosfato non da infezioni (i quali sono composti principalmente di idrossapatite e bruscite) e calcoli di fosfato da infezioni (che sono formati da struvite con quantità variabile di idrossapatite) [Daudon et al. 1993].

- Calcoli di fosfato da infezioni

Struttura: Contengono sempre struvite, la quale rappresenta dal 20% al 60% della massa del calcolo di fosfato. La restante percentuale può essere costituita

da idrossapatite e/o idrossapatite deficitaria in calcio secondo la relazione Ca/P (tra 1.3 e 1.6).

Questi calcoli hanno di solito dimensioni considerevoli e non presentano una struttura interna regolare. Vengono anche detti calcoli coralliformi o a stampo [Heilberg & Schor 2006]. Al SEM è visibile, sulla superficie dei cristalli, una incisione a forma di “Y” molto caratteristica.

I cristalli di struvite che si osservano in questi calcoli, hanno dimensioni che possono raggiungere i 100 µm, disseminati in tutto il calcolo e legati a materia organica o a sfere individuali di idrossapatite, che di frequente si accumulano nelle cavità del calcolo.

Meccanismo di formazione: L'infezione batterica del tratto urinario è la causa più comune di questo tipo di calcolo. I germi urinari (Proteus, Ureoplasma, etc.) provocano un notevole innalzamento del pH urinario (superiore a 7.0) e della concentrazione di ammonio, favorendo così la precipitazione di struvite e idrossapatite [Rieu 2005].

La massa cristallina che si forma, legata al detrito organico (es. residui cellulari, batteri, mucoproteine) per semplice sedimentazione, può dare origine ad importanti depositi che, con la perdita dell'acqua, si trasformano nei calcoli.

Tra i calcoli di fosfato non da infezioni ritroviamo l'idrossapatite e la bruscite.

- Calcoli di idrossapatite

Struttura: La struttura interna dei calcoli di idrossapatite, è caratterizzata da una serie di strati di materiale amorfo che sono conosciuti come strati aspidinici di idrossapatite [Cifuentes 1984], caratteristici perchè, pur non presentando una struttura definita macroscopicamente, microscopicamente si possono riconoscere delle piccole sfere di 0.1 µm di materiale amorfo di cui sono composti.

Le sfere di idrossapatite si accumulano in gran parte nelle cavità con bassa energia urodinamica come entità individuali o formando degli aggregati con diametro di 50 µm. Questi calcoli contengono una grande quantità di materia organica.

Meccanismo di formazione: È richiesta l'esistenza di cavità renali con bassa energia urodinamica, combinata a valori di pH superiori a 6.0, ipercalciuria e ipomagnesuria [Bushinsky et al. 2000; Gault et al. 1991; Parks et al. 2004; Peacock 2002]. In queste condizioni si generano nell'urina dei microcristalli di idrossapatite, probabilmente indotti dalla presenza di materia organica.

La compattazione di tutto questo materiale a causa della perdita di acqua, può portare alla formazione del calcolo.

- Calcoli di bruscite

Struttura: Non sono calcoli con struttura compatta, però contengono numerose cavità riempite da sfere di idrossapatite e materia organica. I cristalli di bruscite presentano dimensioni considerevoli e si dispongono in modo parallelo gli uni con gli altri a formare una struttura colonnare.

Meccanismo di formazione: Il meccanismo di formazione di questi tipi di calcoli, è uguale a quello dei calcoli di idrossapatite e quindi richiedono cavità renali con bassa energia urodinamica. In questo caso il contenuto di magnesio delle urine è normale, ed il pH oscilla tra 6-7 ed è frequente avere un deficit di inibitori della cristallizzazione [Grases et al. 1996a]. In questi tipi di calcoli si combinano fenomeni di sedimentazione ed accrescimento cristallino.

CALCOLI DI ACIDO URICO

I calcoli composti maggiormente da acido urico rappresentano l'8-13% di tutti i calcoli renali [Grases et al. 2002; Leusmann 1991].

L'acido urico in soluzione acquosa a pH inferiore a 5.5, può cristallizzare nella sua forma anidra, deidratata o come un miscuglio di entrambi, in funzione delle condizioni di dissoluzione [Babic-Ivancic et al. 1987].

Studi in vitro hanno dimostrato che l'acido urico anidro è la forma termodinamicamente più stabile rispetto all'acido urico deidratato, il quale si forma con sovrassaturazione molto più elevata. Quest'ultima è una fase molto instabile che tende a trasformarsi nella fase anidra, perdendo l'acqua e generando una struttura fragile con fessure e crepe [Hesse et al. 1975, 1979].

Per queste motivazioni, nei calcoli renali prevale l'acido urico anidro piuttosto che l'acido urico deidratato e in molti casi entrambi le forme. È anche frequente rilevare la presenza di cristalli di ossalato di calcio, soprattutto whewellite, tra i cristalli di acido urico; a testimoniare l'abilità dei cristalli di acido urico di fungere da agenti nucleanti dell'ossalato di calcio.

I calcoli di acido urico si possono classificare, in base alla loro struttura, in due tipi diversi [Grases et al. 2000a]: compatti e porosi.

- Calcoli di acido urico compatti

Struttura: Sono principalmente costituiti da cristalli di acido urico anidro generati per accrescimento cristallino lento (bassa sovrassaturazione) o per ricristallizzazione. Possono anche essere presenti depositi di piccole particelle che provengono dall'urina.

Meccanismo di formazione: Si formano a partire dalla nucleazione di una parte centrale costituita da grandi cristalli di acido urico anidro, concrezioni di origine sedimentaria relativamente grandi composte da numerosi cristalli o piccole

concrezioni di whewellite. Questo nucleo è situato in cavità renali aperte, dove l'urina fresca può entrare facilmente. In questo modo, sopra il nucleo, che sta in continuo contatto con l'urina fresca, si accresce uno strato cristallino compatto, composto maggiormente da acido urico anidro. I cristalli colonnari che costituiscono questo strato, formano la parte maggiore dell'interno del calcolo. Questo significa che una relativamente bassa sovrassaturazione rispetto all'acido urico, prevale durante la formazione del calcolo, e che conseguentemente si ha un lento accrescimento cristallino. Senza dubbio, la presenza di una laminazione concentrica composta da piccoli cristalli disorientati, implica l'esistenza di episodi di sovrassaturazione urinaria.

Lunghi periodi di elevata sovrassaturazione, provocano la formazione di nuovi cristalli di acido urico anidro ed acido urico deidratato, i quali possono provocare la rottura della struttura colonnare.

- Calcolo di acido urico porosi

Struttura: L'accrescimento cristallino combinato alla sedimentazione, sono i due importanti processi che portano alla formazione di questo tipo di calcoli. Si possono suddividere in due gruppi differenti in funzione della struttura dello strato superficiale:

- Calcoli che presentano una parte interna porosa, formata da materiale di origine organica, cristalli di acido urico anidro e whewellite di forma e dimensioni caratteristiche come appaiono nell'urina durante la cristalluria. La parte più esterna del calcolo è costituita da un sottile strato compatto di materiale cristallino. Il principale componente di questo tipo di calcolo di acido urico anidro, si presenta associato a cristalli di whewellite disseminati nella massa del calcolo e a grandi blocchi originariamente di acido urico deidratato che si sono trasformati in acido urico anidro dando vita alle caratteristiche crepe parallele longitudinali.
- Calcoli formati da uno strato esterno ben sviluppato, composto maggiormente da grandi blocchi originariamente di acido urico deidratato che si sono trasformati in acido urico anidro dando luogo alle caratteristiche crepe. Questo strato è come una specie di guscio. La parte interna del calcolo è pieno o parzialmente pieno di particelle che si sono depositate durante la calcologenesi.

Meccanismo di formazione: Si generano a partire dallo sviluppo di un deposito cristallino nella parete di una cavità renale a bassa energia urodinamica. Le particelle presenti nell'urina (cristalli di acido urico, ossalato di calcio o detrito organico) si depositano in condizioni ottime nella cavità.

Queste particelle rimangono a contatto con l'urina e favoriscono l'accrescimento dei cristalli di acido urico anidro e acido urico deidratato. La cavità interiore si

riempie di cristalli di acido urico anidro, particelle di whewellite e di materia organica. L'interno del calcolo è poroso ed ha una struttura disordinata. Quando la cavità diventa piena, lo strato compatto che ricopre la superficie del calcolo continua a crescere fino a che non ricopre completamente la superficie del calcolo.

CALCOLI DI CISTINA

Struttura. I calcoli di cistina sono poco frequenti (rappresentano approssimativamente l'1-2% del totale, Grases et al. 2002) e si caratterizzano per il loro aspetto, la durezza e la difficile frammentazione.

Meccanismo di formazione. Questo tipo di calcolo si ottiene quando ci sono le condizioni di una eliminazione renale di cistina anormalmente elevata dovuta ad una alterazione genetica ed ad un pH urinario acido (la cistina è un aminoacido che è molto poco solubile in un mezzo acido). Questi calcoli non sono di solito papillari e la loro formazione è data dalla combinazione di processi di sedimentazione ed accrescimento cristallino.

CALCOLI POCO FREQUENTI

I calcoli poco frequenti rappresentano l'1-2% dei calcoli totali [Grases et al. 2002] e sono, di solito, dovuti all'ingestione abbondante e continuativa di alcuni prodotti come, per esempio alcuni tipi di farmaci.

In questo tipo di calcoli citiamo quelli formati da silice, glefamina, sulfamidi, etc. Altri calcoli poco frequenti, ma di origine non farmacologica, sono quelli di carbonato di calcio (frequenti nei ruminanti), quelli di urato calcico e quelli composti interamente da materia organica.

Tra i calcoli poco frequenti rientrano anche degli artefatti. Infatti, talvolta vengono scambiati per calcoli, pezzi di rocce o semi.

1.3.2 LE FASI DEL PROCESSO DI CRISTALLIZZAZIONE

E' noto che la cristallizzazione avviene attraverso tappe: nucleazione, accrescimento cristallino ed aggregazione. Questi processi combinati anche con i fattori di rischio della nefrolitiasi determinano il processo di cristallizzazione.

Di seguito vengono mostrati alcuni schemi rappresentativi del processo di cristallizzazione per evidenziare come, pur avendo in tutti gli stessi elementi e fasi, questi vengono combinati tra di loro in vario modo a formare degli algoritmi di calcogenesi molto diversi, a rappresentare la complessità del fenomeno

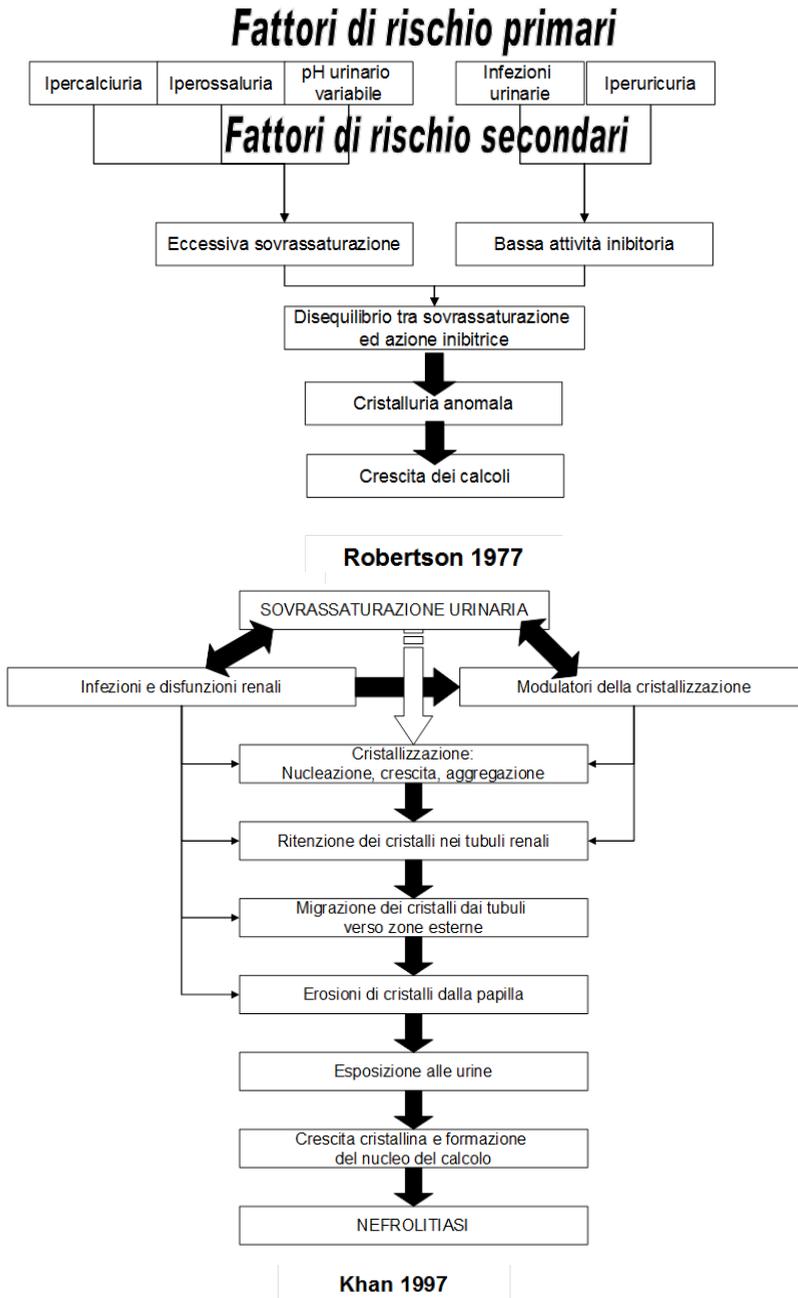


Figura 1.4 bis Esempi di schemi del processo di cristallizzazione

Examples of crystallization processes

NUCLEAZIONE

La nucleazione implica la formazione di una massa cristallina minima capace di seguire l'accrescimento ed è, senza dubbio, lo stadio iniziale più importante di tutto il processo di cristallizzazione.

Occorre distinguere che dal punto di vista della dissoluzione, le microparticelle si disgregano e si ri-aggregano in maniera che gli aggregati di dimensioni inferiori a certi valori critici, risulteranno instabili e si disintegreranno, al contrario quelle di dimensioni superiori risulteranno instabili e precipiteranno, formando così uno strato minimo capace di seguire la cristallizzazione seguente.

La nucleazione può essere fondamentalmente di due tipi: omogenea ed eterogenea.

Nella nucleazione omogenea, la particella elementare è costituita dalla stessa specie che andrà a costituire il futuro cristallo (fig. 1.5).

Questo tipo di nucleazione è un processo difficile e poco probabile che necessita di una sovrassaturazione molto elevata [Finlayson 1978a].

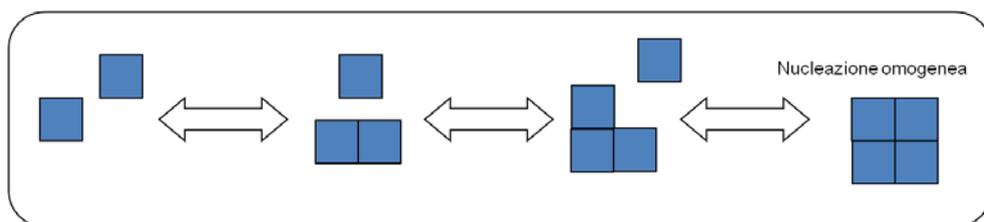


Figura 1.5 Illustrazione della nucleazione omogenea

Figure of homogeneous nucleation

La nucleazione eterogenea è molto più frequente di quella omogenea, dal momento che necessita unicamente della presenza di particelle solide che siano capaci di attrarre e trattenere sulla superficie, le specie che andranno a costituire il futuro cristallo (fig. 1.6).

In questo caso, il nucleo presenta una composizione differente dal resto del cristallo.

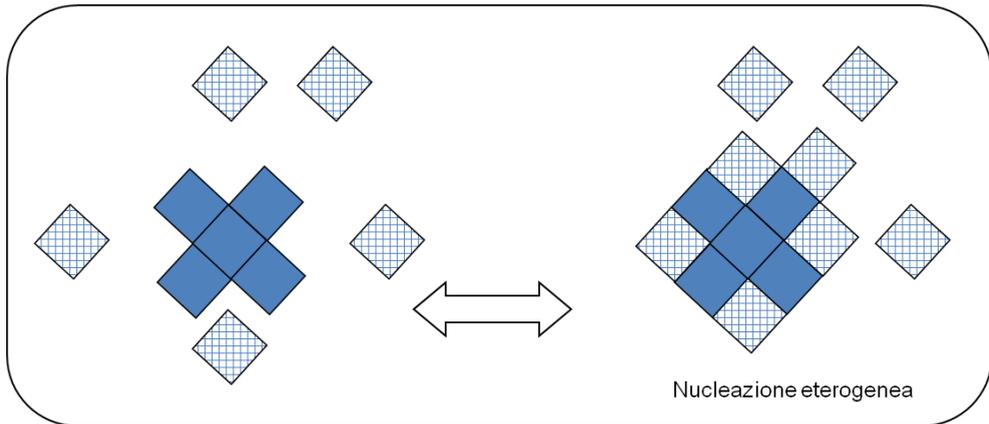


Figura 1.6 Illustrazione della nucleazione eterogenea

Figure of heterogeneous nucleation

Una volta formatosi il nucleo, la successiva formazione del cristallo implica la combinazione di due processi: l'accrescimento cristallino e l'aggregazione.

La nucleazione e la crescita cristallina sono regolate dal bilancio di energia prodotta dalla sovrassaturazione urinaria e consumata dalla formazione dei cristalli. I due processi hanno però bisogno di una differente quantità di energia, molto elevata è quella richiesta per la nucleazione spontanea [Finlayson 1978a].

ACCRESIMENTO CRISTALLINO

L'accrescimento cristallino prevede la incorporazione graduale delle unità che vanno a costituire il futuro cristallo sopra la parte esterna (faccia) dello stesso, nella posizione più favorevole (fig. 1.7). L'accrescimento cristallino avviene attraverso tre processi:

Trasporto di materia: dalla soluzione sovrassatura verso il cristallo per diffusione e/o convezione.

Reazione superficiale: che prevede la incorporazione graduale dalle unità elementari al cristallo.

Evacuazione del calore della cristallizzazione verso il cristallo fino al cuore della soluzione. Nelle soluzioni sovrassaturate, questo processo è molto favorito e si ottiene con molta facilità.

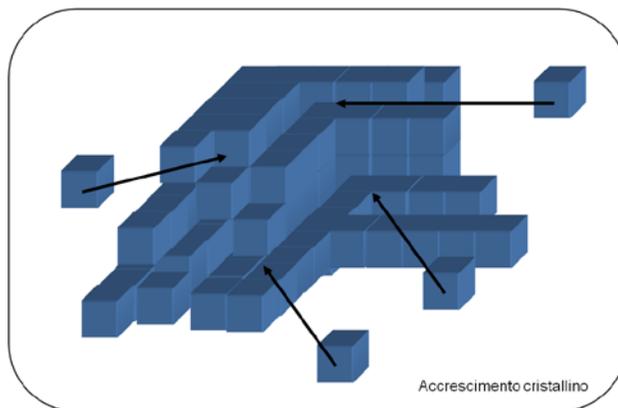


Figura 1.7 Illustrazione dell'accrescimento cristallino

Figure of crystalline growth

AGGREGAZIONE

L'aggregazione di cristalli è principalmente governata da forze di attrazione di tre tipi diversi: Van der Waals, legami viscosi e repulsione elettrostatiche [Finlayson 1978a].

L'aggregazione può essere di due tipi: primaria e secondaria.

L'aggregazione primaria implica la formazione di nuovi cristalli (cristalli figli) sopra le facce dei cristalli già esistenti (cristalli padre) [Jones 1989].

Questo tipo di aggregazione si ha con molta o poca facilità a seconda della natura dei cristalli, ad esempio nel caso dell'ossalato di calcio, questo è un processo molto favorevole (fig. 1.8) [Grases et al. 1989a, 1989b, 1992a, 1992b, 1992c; Millan et al. 1992].

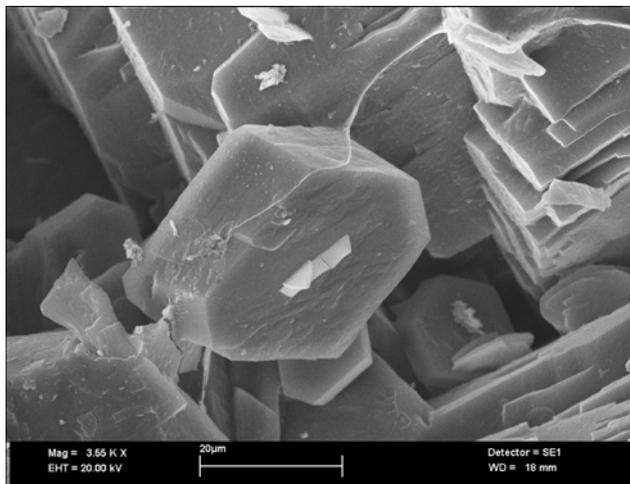


Figura 1.8 Immagine di un aggregato primario di ossalato di calcio monoidrato (whewellite)

Figure of a primary aggregate of calcium oxalate monohydrate

L'aggregazione secondaria consiste nell'unione di cristalli già formati mediante legami deboli (fig. 1.9). Esistono delle sostanze che agiscono come ponti di unione fra i vari cristalli, favorendo il processo menzionato.

L'aggregazione secondaria ha un ruolo importante nei mezzi dove esiste una grande quantità di cristalli (es., la litiasi da infezione o da fosfato di calcio).

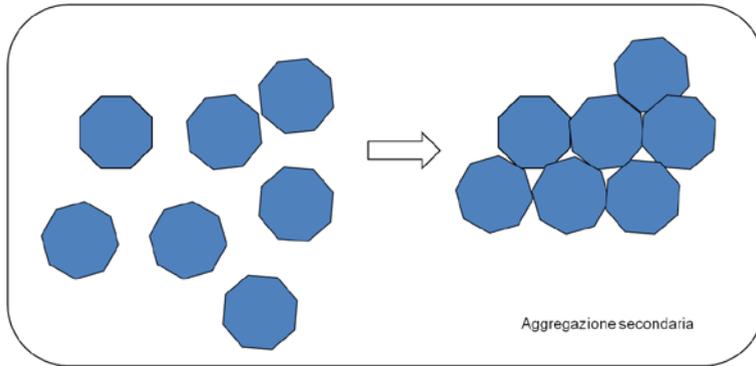


Figura 1.9 Illustrazione dell'aggregazione secondaria

Figure of secondary aggregation

1.3.3 I FATTORI DETERMINANTI IL PROCESSO DI BIOMINERALIZZAZIONE

I fattori etiologici da considerare nello studio delle cristallizzazioni patologiche, si possono classificare in due grandi gruppi (fig. 1.10):

Fattori relativi alla composizione dell'urina ed alla morfo-anatomia del sistema urinario
Fattori demografici, ambientali e comportamentali

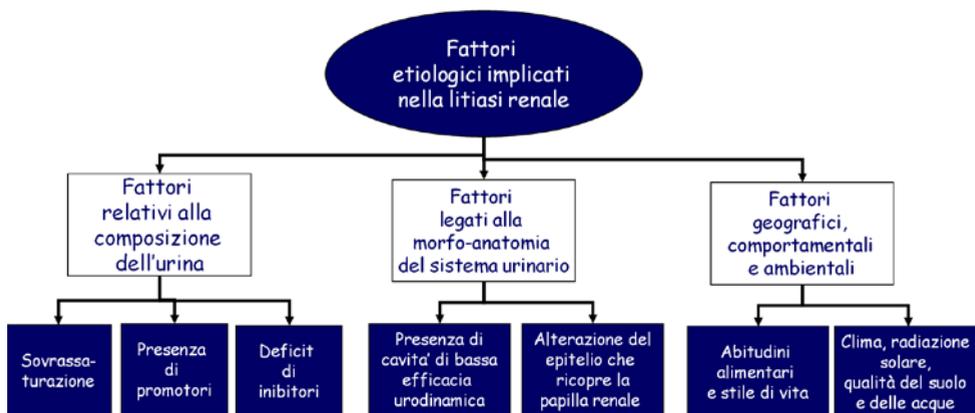


Figura 1.10 Schema dei fattori etiologici implicati nella litiasi renale

Scheme of the etiological factors involved in nephrolithiasis

COMPOSIZIONE DELLA SOLUZIONE URINARIA E MORFO-ANATOMIA DEL RENE

La cristallizzazione di calcoli renali è dovuta principalmente ad un'anomala composizione della soluzione urinaria; anomalie dovute o a fattori metabolici o ambientali. Questo fattore di rischio è il primo ad essere ricercato nella fase di diagnosi della patologia della nefrolitiasi. Diverse anomalie di composizione possono coesistere nello stesso sito di biomineralizzazione.

La sovrassaturazione dell'urina in un elemento in particolare, favorisce la litiasi renale. La sovrassaturazione è il meccanismo scatenante della cristallizzazione, e quindi quando una soluzione è sovrassatura di componente, dal punto di vista termodinamico risulta instabile ed è solo questione di tempo che il componente precipiti.

Nel caso dell'urina, questo è un mezzo che è quasi sempre sovrassaturato rispetto all'ossalato di calcio e, in funzione del pH, può essere sovrassaturato anche rispetto all'acido urico (pH < 5.5) o al fosfato di calcio (pH > 6).

L'ipercalcemia è ritrovata nel 50% dei pazienti con calcoli, e contribuisce alla loro formazione, incrementando la saturazione dell'urina per il calcio e rallentando l'effetto degli inibitori. La causa principale dell'ipercalcemia è un aumento

dell'assorbimento del calcio a livello intestinale per motivi ancora non chiari ma forse legati all'aumento di proteine o di vitamina D. Questa anomalia è spesso associata con una diminuzione di densità delle ossa.

L'ipocitraturia è un'altra anomalia riscontrata in soggetti con calcoli renali e si riferisce al basso contenuto di citrati dell'urine. I citrati sono considerati delle sostanze che inibiscono la cristallizzazione urinaria.

Per iperuricosuria si intende un contenuto eccessivo di acido urico nella soluzione urinaria, responsabile della formazione dei relativi calcoli ma influenzante anche la formazione dei calcoli di ossalato di calcio.

Questi ultimi sono sicuramente ancor più favoriti se è presente una situazione di iperossaluria, anomalia che può essere genetica o acquisita. La prima forma è più rara, mentre la seconda colpisce il 10% dei pazienti colpiti da litiasi ossalocalcica quale conseguenza di un maggior assorbimento intestinale di ossalato.

Il pH urinario è un altro dei fattori di rischio di nefrolitiasi in quanto influenza la solubilità dei cristalli.

La cistina ha una solubilità molto variabile ed è influenzata dalla solubilità degli elettroliti e macromolecole. La sua solubilità incrementa in modo modesto se il pH raggiunge il valore di 7.5, invece incrementa più velocemente superando tale limite.

L'acido urico risulta stabile solo con $\text{pH} < 5.5$ al contrario i fosfati hanno bisogno di un pH elevato > 7 .

La presenza di infezioni in tutte le vie urinarie è un altro fattore di rischio per la formazione di calcoli soprattutto per quelli composti da struvite, il fosfato di ammonio magnesio.

Come detto precedentemente, il processo di formazione di un cristallo si può avvenire a partire da un nucleo di composizione differente dal resto del cristallo (nucleazione eterogenea). In questo modo, i promotori della cristallizzazione o nucleanti eterogenei sono tutte quelle sostanze che possono comportarsi come nuclei a partire dai quali si possono formare e/o accrescere i futuri cristalli che costituiranno il calcolo.

Qualunque sostanza che ha un'affinità con gli ioni che formano i cristalli dei calcoli possono essere definiti promotori capaci di ridurre l'energia di superficie richiesta per la cristallizzazione.

Per la formazione dei calcoli di ossalato di calcio, i nucleanti eterogenei hanno una grande importanza perchè ricordiamo che, in condizioni normali, l'ossalato di calcio non predilige la nucleazione omogenea.

Tra le sostanze che possono considerarsi come nucleanti eterogenei della litiasi ossalocalcica ci sono i fosfati di calcio (bruscite e idrossapatite) per valori di $\text{pH} > 6$, e l'acido urico per valori di $\text{pH} < 5.5$.

Altre sostanze di interesse sono le proteine, il detrito cellulare, aggregati di glicoproteine, carbonato di calcio e farmaci.

Gli inibitori della cristallizzazione sono sostanze che rendono difficile o impediscono lo sviluppo dei cristalli.

Possono agire sia nel momento della nucleazione (adsorbendosi sopra il nucleo in formazione), sia durante l'accrescimento cristallino (adsorbendosi sopra le facce del cristallo in formazione), ma anche in entrambi i processi.

Gli inibitori della nucleazione omogenea saranno quelle sostanze capaci di unirsi alle microparticelle di dimensioni inferiori al valore critico, impedendo che si formi la particella elementare capace di continuare a crescere. Gli inibitori della nucleazione eterogenea saranno quelle sostanze che evitano che i possibili nuclei eterogenei diventino tali, o impedendo la loro formazione o rendendo difficile l'unione con le specie che costituiranno il futuro nuovo cristallo.

Gli inibitori dell'accrescimento cristallino sono quelle sostanze che vengono assorbite sulla superficie del cristallo già formato, impedendo o rendendo difficile l'incorporazione di nuove unità cristalline. Riguardo agli inibitori dell'aggregazione primaria, non ci sono molti studi a proposito, ma considerato che questo processo è molto simile all'accrescimento cristallino, il comportamento degli inibitori dell'accrescimento cristallino ricalca quello dell'aggregazione primaria.

Gli inibitori dell'aggregazione secondaria sono sostanze cariche che vengono assorbite sulle superfici dei cristalli, conferendogli carica elettrica dello stesso segno. In questo modo, si generano repulsione tra i cristalli e il processo di unione, per formare l'aggregazione secondaria, viene impedito o reso difficile.

Con i processi della polimerizzazione [Scurr & Robertson 1986] e della immobilizzazione sulla superficie [Nancollas et al. 1989], alcune macromolecole presenti nel sito di biomineralizzazione possono convertire degli inibitori in promotori della cristallizzazione.

I primi indizi dell'esistenza di inibitori della cristallizzazione, risalgono agli anni 60.

Bliznakov dimostrò che alcune molecole potevano ridurre il grado di accrescimento di alcune sostanze, dovuto al fatto che si adsorbivano sopra la superficie in accrescimento [Bliznakov 1965].

Il primo inibitore biologico riconosciuto fu il pirofosfato, il quale, a concentrazioni molto basse, inibisce la precipitazione nell'urina dell'ossalato di calcio [Fleisch & Bisaz 1962a, 1962b, 1964].

Dopo il pirofosfato, anche altre molecole presenti naturalmente nell'urina sono state descritte come inibitori, alcune di queste con basso peso molecolare come il magnesio o il citrato [Li et al. 1985; Meyer 1985; Ryall et al. 1981; Pak 1987].

Nell'ultima decade si è osservata una tendenza a considerare le proteine come gli agenti inibitori più importanti, però l'apparizione di articoli scientifici contraddittori (uno descrive gli effetti inibitori mentre altri evidenziano le proprietà chiaramente promotrici della cristallizzazione, Ryall et al. 1997) toglie forza a questa idea, sebbene è chiara la loro azione come sostanze antiaderenti (lubrificanti) di particelle solide sopra l'uroepitelio [Grases et al. 1996a, 1996b; See & Williams 1992]. In qualche caso, non si deve confondere l'effetto lubrificante con la capacità inibitrice che può avere questa sostanza.

Studi recenti hanno dimostrato che il fitato, una sostanza di peso molecolare relativamente basso che è presente naturalmente nei liquidi fisiologici del nostro organismo (sangue, urina e fluidi interstiziali e intracellulari) [Bunce et al. 1993; Grases et al. 1996c], presenta una capacità inibitrice straordinaria per la litiasi calcica, con un effetto molto più importante di quello del citrato [Grases et al. 2000b; Grases & Llobera 1998b].

Per quel che riguarda la litiasi urica, le sostanze con maggiore azione inibitrice sono le glicoproteine, gli glicosaminoglicani e sostanze come l'escina, l'acido glicirretinico e il laurilsolfato. Bisogna precisare che il fitato non ha azione inibitrice su questo tipo di litiasi [Grases et al. 1999].

La cristalluria è tutt'altro che un sinonimo di calcoli. La presenza di cristalli nelle urine corrisponde a un episodio pericoloso della sovrassaturazione urinaria ma che non necessariamente è collegata alla formazione di calcoli. La formazione di un gran numero di cristalli nelle urine non significa che rimarranno nel sito di biomineralizzazione ma spesso vengono "lavati" via e quindi allontanati.

La cristalluria è stata riscontrata sia in persone sane che in soggetti affetti da nefrolitiasi. Anche se in quest'ultimi la cristalluria è più frequente, non esiste ancora una diretta corrispondenza con la nefrolitiasi. L'utilizzo della cristalluria per predire la composizione dei calcoli è stata proposta da Cohen et al. [1992] confrontando i frammenti di calcoli post-litotrissia e la cristalluria urinaria osservata prima del trattamento. E' possibile però solo differenziare le specie chimiche (ossalato senza distinzione tra whewellite e weddellite) e i calcoli puri da quelli misti. Questi ultimi sono identificati anche perché non risultano ben frammentati a causa di una diversa risposta al bombardamento delle diverse fasi cristalline presenti.

Siamo ancora lontani per poter definire la cristalluria il metodo di valutazione del rischio di nefrolitiasi soprattutto perché l'analisi dei cristalli urinari non è ancora una pratica standardizzata sia per le tecniche analizzate (la microscopia ottica è la tecnica ancora più utilizzata), sia per la tipologia di urine campionate ed i metodi di conservazione.

I fattori morfo-anatomici hanno un ruolo importante nella formazione

dei calcoli urinari [Schulz et al. 1989a, 1989b] almeno quanto la composizione dell'urina (fig. 1.11).

Considerando il meccanismo di formazione dei calcoli si può concludere che una situazione di rischio si instaura quando l'epitelio della papilla renale risulta danneggiato (a seguito di una qualsiasi disfunzione cellulare, attacco esterno o calcificazione intrapapillare) in modo da permettere la formazione del cuore primario sopra il quale si formerà il calcolo.

Tutti i calcoli papillari presentano un punto di contatto con la papilla, molto ben evidente.

Anche la presenza di cavità renali sono una condizione di rischio per la calcogenesi.

In queste cavità, l'elevato tempo di residenza dell'urina favorisce l'accumulo e sedimentazione di particelle solide permettendo la formazione del nucleo primario sopra il quale si svilupperà il calcolo.

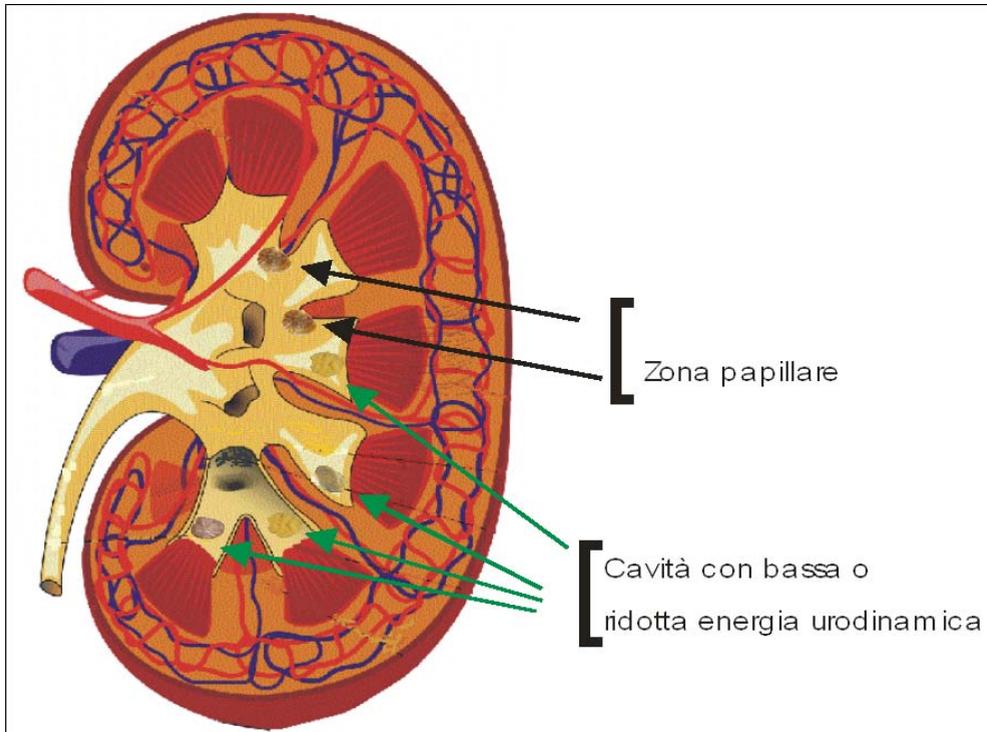


Figura 1.11 Morfologia del rene con indicazione dei comuni siti di biom mineralizzazione
Kidney morphology plus common biom mineralization sites

FATTORI DEMOGRAFICI

È ben noto che la frequenza della nefrolitiasi, oltre a variare sensibilmente da Paese a Paese, si presenta in maniera difforme da Regione a Regione al variare delle condizioni ambientali e per il modificarsi delle condizioni di familiarità, di professione, dell'alimentazione, dello stato sociale e così via.

Tutto ciò da un lato porta a difficoltà negli interventi di prevenzione, dall'altro rende più stimolante la ricerca di fattori favorenti la formazione dei calcoli nelle vie urinarie.

La nefrolitiasi è più diffusa tra gli uomini che tra le donne [Robertson et al. 1983; Scott et al. 1977; Serio & Fraioli 1999] ed entro una fascia di età compresa tra i 30 ed i 60 anni [Johnson et al. 1979]. Non è ancora chiaro il perché di questa differenza di genere, una delle ipotesi potrebbe essere che le donne hanno una maggiore concentrazione di citrati nelle urine, che agiscono come forti inibitori [Fan et al. 1999; Parks & Coe 1986].

L'ereditarietà della patologia è anche uno degli importanti fattori di predisposizione genetica alla calcolosi. La presenza di alcuni geni, tramandabili da genitori a figli, regolano l'assorbimento e la sintesi del calcio e degli ossalati nell'organismo [Curhan et al. 1997a; Ljunghall et al. 1985; Wasserstein et al. 1987].

L'incidenza della calcolosi varia anche con la razza all'interno dello stesso stato. Le popolazioni africane sembrano avere una naturale immunità da questa malattia [Modlin 1967; Muskat 1951]. Anche altre razze sembrano avere una minore incidenza da calcolosi rispetto alla razza bianca, come gli eschimesi, gli aborigeni e gli afroamericani [Bateson 1977; Rodgers 1991].

FATTORI AMBIENTALI E COMPORTAMENTALI

Tutti i fattori citati sono definiti fattori di rischio demografico e rappresentano solo uno dei gruppi di determinanti la nefrolitiasi. Nel tempo hanno assunto una grande importanza i fattori definiti ambientali e comportamentali [Schwille et al. 1992].

L'organismo umano interagisce con i fattori ambientali, sia che questi siano riferiti all'ambiente in generale, sia che invece siano limitati a luoghi confinati.

Fattori ambientali in generale sono quelli legati alla personale condizione di vita, del tipo: località geografica e relativo clima, residenza, fattori abitativi (caratteristiche degli stabili e del quartiere).

Fanno parte dei fattori di rischio ambientale parametri riferiti al clima, alla qualità delle acque e del suolo, ad agenti fisici e chimici propri dell'inquinamento urbano come radiazioni, elementi chimici tossici e/o potenzialmente nocivi.

Nell'ambiente di lavoro invece i parametri di rischio sono legati a fattori conseguenti alle caratteristiche strutturali dell'ambiente, alle condizioni microclimatiche, alla presenza di agenti fisici e chimici presenti nel ciclo di lavoro, infine alla tipologia lavorativa particolare.

I fattori microclimatici ambientali che condizionano l'ambiente di lavoro sono: temperatura dell'aria, umidità relativa in ambiente, ventilazione, intensità dell'impegno fisico (dispendio energetico), abbigliamento (impedenza termica del vestiario). Tali fattori inducono nell'uomo una serie di risposte biologiche graduate.

La prevalenza di nefrolitiasi mostra considerevoli differenze in relazione alla posizione geografica [Chen et al. 2000; Hesse et al. 2003; Komatina 2004; Lee et al. 2002].

Da dati del 1993-1994, in Italia risulta un tasso di prevalenza più elevato nel meridione e nelle isole, nella media per la parte centrale e valori molto più bassi per il settentrione (circa la metà del tasso corrispondente al meridione) [Serio & Fraioli 1999].

Negli Stati Uniti la differenza tra aree è ancora più netta in relazione a forti differenze climatiche.

Una più alta temperatura media registrata nelle regioni meridionali porta ad una sensibile diminuzione del volume delle urine. In più una maggiore esposizione ai raggi solari porta ad una maggiore produzione di vitamina D con il risultato di avere un incremento dell'assorbimento di calcio nel tratto gastrointestinale ed un aumento nelle urine [Curhan et al. 1994; Parry et al. 1975].

I fattori climatici, ed in particolare la temperatura, rientrano tra le concause di nefrolitiasi per i motivi già citati, e sono stati ampiamente studiati in varie aree. Esiste, anche, una significativa variazione stagionale nella presenza di calcoli, con un incremento del 50% dei casi nei mesi estivi rispetto a quelli invernali, variazione attribuita ad un decremento del volume delle urine ma anche ad un cambio di composizione [Robertson et al. 1974, 1975].

Il tasso di prevalenza di nefrolitiasi varia anche in relazione al livello di educazione scolastica e della professione. La prevalenza è alta tra le persone prive di educazione scolastica o con un livello basso [Serio & Fraioli 1999]. Le professioni più a rischio sono quelle che prevedono di assumere, per lunghi periodi di tempo, posizioni sedentarie o di sostare in ambienti surriscaldati, quest'ultimi per le stesse motivazioni viste per i fattori climatici [Borghi et al. 1993; Ferrie & Scott 1984; Zheng et al. 2002].

Tra i fattori di rischio comportamentali rientrano le abitudini alimentari [Goldfarb et al. 2005]. Se per alcuni cibi e bevande è ormai chiaro che favoriscono

lo sviluppo di calcoli, per altri si richiedono studi di approfondimento.

Le persone che soffrono di nefrolitiasi dovrebbero bere molto (l'acqua diluisce i minerali, che vengono così espulsi molto più facilmente assieme alle urine) e limitare l'assunzione di alimenti molto ricchi dei tre elementi fondamentali costituenti dei calcoli e cioè calcio, fosforo e ossalati.

Alcuni studi hanno dimostrato che una dieta ricca in carne conduce più frequentemente allo sviluppo di calcoli. A causa dell'eccessivo consumo di proteine l'urina diviene più acida ed aumenta la quota d'eliminazione di ossalati, calcio e acido urico, mentre si abbassa quella dei citrati (sostanze che impediscono la precipitazione di questi sali; Pak 1987). In questo caso va invece incoraggiata l'assunzione di alcalinizzanti urinari come il citrato di potassio o il bicarbonato di sodio [Robertson et al. 1981].

Essendo ricchi di metionina (un aminoacido precursore della cistina) i prodotti ricchi di proteine andrebbero limitati anche in presenza di calcoli renali di origine cistinica.

Il ruolo del calcio nella formazione dei calcoli è stato da sempre oggetto di numerosi studi e ricerche. In passato era particolarmente diffusa la convinzione che una dieta priva o estremamente povera di latte e derivati fosse una valida arma nei confronti delle recidive [Bellizzi et al. 1999; Drach 1986].

Oggi si è giunti alla conclusione che una dieta ricca di calcio non solo non predispone alla calcolosi delle vie urinarie ma la previene riducendo l'assorbimento di ossalato di calcio [Curhan et al. 1993, 1997a]. Viene perciò raccomandato un apporto giornaliero di 1200 mg di calcio di cui 800 mg forniti da latticini [Curhan et al. 1994], per non incorrere nel problema opposto [Curhan et al. 1997b].

Un eccesso di ossalato si è invece dimostrato particolarmente dannoso in quanto fattore predisponente alla formazione di calcoli (specie se accompagnato ad un ridotto consumo di liquidi). L'ossalato è ubiquitario (si trova un po' dappertutto), ma alcuni alimenti ne sono particolarmente ricchi: cioccolata, nocciole, coca-cola e bevande gassate in genere, succhi di frutta, the, cavoli, piselli, asparagi, spinaci e rabarbaro [Brinkley et al. 1990].

Gli ossalati sono acidi grassi che si legano ai sali minerali, soprattutto al calcio, impedendone l'assorbimento e formando composti insolubili (gli ossalati di calcio, appunto) che tendono ad accumularsi [Borsatti 1991; Curhan et al. 1993].

Bisogna comunque sottolineare che in caso di iperproduzione fisiologica di ossalato, ridurre il consumo di questi alimenti previene i calcoli renali, ma lo fa soltanto in maniera marginale. Ciò che conta, ancora una volta, non è tanto l'introduzione assoluta di ossalati quanto la relativa quantità di liquidi presenti nella dieta.

In presenza di calcoli delle vie urinarie è consigliata una dieta ricca di fibre in quanto l'acido fitico contenuto negli alimenti di origine vegetale (verdura, frutta e cereali integrali) si lega con il calcio formando composti insolubili e non assorbibili. Frutta e verdura aumentano inoltre l'eliminazione di citrati, sostanze molto efficaci nell'impedire la formazione dei calcoli. Per questo motivo il succo di limone, che contiene circa il 5-7% di acido citrico, è l'alimento ideale per chi soffre di calcoli renali [Curhan et al. 1996; Seltzer et al. 1996].

Secondo alcuni autori gli alimenti ricchi di potassio (fagioli, albicocche, piselli, patate, aglio e frutta secca) ridurrebbero l'escrezione urinaria di calcio senza interferire con l'assorbimento intestinale dello ione, come anche una corretta dose di magnesio ha benefici effetti sulla calcolosi per i suoi effetti inibitori [Rodgers 1997].

Tutta la letteratura scientifica è concorde nel ritenere che è importante valutare la quantità di acqua, e più in generale di liquidi, assunti con la dieta (brodo, tisane, succhi di frutta, etc). Le persone predisposte ai calcoli renali dovrebbero pertanto sforzarsi di bere abbondantemente e ripetutamente nel corso della giornata (almeno 2 litri di acqua) [Messa et al. 1997; Leonetti et al. 1988; Hesse et al. 1993].

In particolare, però, oltre che la quantità complessiva di liquidi è importante scegliere la qualità giusta. Vanno evitate, per esempio, alcune bevande come il thè concentrato (ricco di ossalati), coca cola (molto acida; Rodgers 1999) ed alcolici (innalzano i livelli d'escrezione dell'acido ossalico e dell'acido urico; Vahlensieck 1986), mentre sono favorite le spremute di mela ed il thè verde [Hesse et al. 1993; Vahlensieck 1986].

Per ciò che concerne la tipologia di acqua, nonostante alcuni studi recenti abbiano dimostrato che anche le acque minerali ricche di calcio possono costituire un fattore protettivo [Ackermann et al. 1988; Rodgers 1997], in presenza di calcolosi si consiglia l'utilizzo di acque minimamente mineralizzate che, in quanto povere di sali minerali, favoriscono la diuresi e facilitano l'espulsione di piccoli calcoli renali [Curhan et al. 1993, 1997a, 1997b].

Il dibattito è ancora aperto [Borghi et al. 1996; Candarella et al. 1998; Churchill et al. 1978] e la questione sembra essere legata anche al tempo di assunzione dell'acqua cioè se è correttamente ripartita nell'arco della giornata [Bellizzi et al. 1999; Marangella et al. 1996].

Esistono anche altri fattori di rischio per lo sviluppo di calcoli legati alla presenza di altre malattie. Questi fattori vengono definiti fisiopatologici. Ad esempio, in caso di ipertensione a causa di una dieta ricca di sale, aumenta l'escrezione urinaria di calcio favorendo la formazione dei calcoli renali.

Patologie come l'ipercalcemia (eccesso di calcio nel sangue) e l'ipercalciuria (eccesso di calcio nelle urine), favorite entrambe anche da un eccesso di vitamina D nella dieta perché favorisce l'assorbimento intestinale di calcio, sono legate alla calcolosi. Tale evenienza potrebbe verificarsi in un paziente che assume regolarmente integratori di calcio e vitamina D per combattere o prevenire, ad esempio, l'osteoporosi.

Un aumento delle dimensioni corporee favorisce un maggior accumulo di calcio, ossalati e acido urico nelle urine, cosa che incrementa il rischio di formazione di calcoli [Ekeruo et al. 2004].

1.4 BIBLIOGRAFIA

- Ackermann D, Baumann JM, Futterlieb A & Zingg EJ (1988). Influence of calcium content in mineral water on chemistry and crystallization conditions in urine of calcium stone formers. *Eur Urol.* 14: 305-308.
- Babic-Ivancic V, Furedi-Milhofer, Brown WE & Gregory TM (1987). Precipitation diagrams and solubility of uric acid dihydrate. *J Cryst Growth* 83: 581-587.
- Baggio B (1999). Genetic and dietary factors in idiopathic calcium nephrolithiasis. What do we have, what do we need?. *J Nephrol* 12: 371-374.
- Bateson EM (1977). Do Australian Aborigines suffer from renal tract calculi? *Aust NZ J Med.* 7: 381-381.
- Bellizzi V, De Nicola L & Minutolo R (1999). Effects of water hardness on urinary risk factors for kidney stones in patients with idiopathic nephrolithiasis. *Nephron.* 81(suppl. 1): 66-70.
- Bigi A, Foresti E, Gregorini R, Ripamonti A, Roveri N & Shah JS (1992). The role of magnesium on the structure of biological apatites. *Calcif Tissue Int,* 50: 439-444.
- Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Ripamonti A, Roveri N, Ravello M, Noris Suarez K & Moro L (1997). Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone. *J Inorg Biochem.* 68: 45-51.
- Bliznakov G (1965). Sur le mecanisme de l'action des additifs adsorbants dans la croissance cristalline. En: *Adsorption et Croissance Cristalline*, pp 291-301. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- Borghi L, Meschi T, Amato F, Novarini A, Romanelli A & Cigala F (1993). Hot occupation and nephrolithiasis. *Journal of Urology* 150: 1757-1760.
- Borghi L, Meschi T, Amato F, Briganti A, Novarini A & Giannini A (1996). Urinary volume, water and recurrences in idiopathic calcium nephrolithiasis: a 5-year randomized prospective study. *Journal of Urology* 155: 839-843.
- Borsatti A (1991). Calcium oxalate nephrolithiasis: defective oxalate transport. *Kidney Int.* 39: 1283-1298.
- Boskey AL & Poster AS (1974). Magnesium stabilization of amorphous calcium phosphate: A kinetic study. *Mater Res Bull.* 9: 907-916.
- Boskey AL (1981). Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 157: 225-257.
- Brinkley LJ, Gregory J & Pak CYC (1990). A further study of oxalate bioavailability in foods. *J Urol.* 144: 94-96.
- Brown CM, Ackerman DK, Purich DL & Finlayson B (1991). Nucleation of calcium oxalate monohydrate: use of turbidity measurements and computer-

- assisted simulations in characterizing early events in crystal formation. *J Cryst Growth* 108: 455-464.
- Bunce CM, French PJ, Allen P, Mountford JC, Moor B, Greaves MF, Michel RH & Brown G (1993). Comparison of the levels of inositol metabolites in transformed haemopoietic cells and their normal counterparts. *Biochem J* 289:667-673.
 - Bushinsky DA, Parker WR & Asplin JR (2000). Calcium phosphate supersaturation regulates stone formation in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Kidney Int* 57, 550-560.
 - Candarella R, Rizzoli E, Buffa A, Bottura A & Stefoni S (1998). Comparative study of the influence of 3 types of mineral water in patients with idiopathic calcium lithiasis. *J Urol.* 159: 658-663.
 - Chandhoke PS & May DJ (1996). *Proc VII Int Symp Urol*, p 50. Dallas.
 - Chen Y, Roseman JM, Devivo MJ & Huang C (2000). Geographic variation and environmental risk factors for the incidence of initial kidney stones in patients with spinal cord injury. *Journal of urology* 164: 21-26.
 - Churchill D, Bryant D, Fodor G & Gault MH (1978). Drinking water hardness and urolithiasis. *Ann Inter Med.* 88: 513-514.
 - Cifuentes LD (1984). *Composición y estructura de los cálculos renales*. Salvat, Barcelona.
 - Cohen NP, Parkhouse H, Scott ML, Bowsher WG, Crocker P & Whitfield HN (1992). Prediction of response to lithotripsy - the use of scanning electron microscopy and X-ray energy dispersive spectroscopy. *Br. J. Urol.* 70, 469-473.
 - Conte A, Genestar C & Grases F (1990). Relation between calcium oxalate hydrate form found in renal calculi and some urinary parameters. *Urol Int* 45: 25-27.
 - Costanzo LS (1998). *Fisiología*, pp 419-427. McGraw-Hill Interamericana, México.
 - Curhan GC, Willett WC, Rimm EB & Stampfer MJ (1993). A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N Engl J Med* 328: 833-838.
 - Curhan GC & Curhan SG (1994). Dietary factors and kidney stone formation. *Compr Ther.* 20: 485-489.
 - Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Spiegelman D & Stampfer MJ (1996). Prospective study of beverage use and the risk of kidney stones. *Am J Epidemiol.* 143: 240-247.
 - Curhan GC, Willett WC, Rimm EB & Stampfer MJ (1997a). Family History

- and Risk of Kidney Stones. *J Am Soc Nephro* 18: 1568-1573.
- Curhan GC, Willet WC, Speizer FE, Spiegelman D & Stampfer MJ (1997b). Comparison of dietary calcium with supplemental calcium and other nutrients as factors affecting the risk for kidney stones in women. *Ann Inter Med.* 126: 497-504.
 - Daculsi G, Bouler JM & LeGeros RZ (1997). Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials. *International Review of Cytology* 172: 129-191.
 - Daudon M, Bader CA & Jungers P (1993). Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology. *Scanning Microscopy* 7, 1081-1106.
 - Desnos EC (1972). The history of urology up to the latter half of the nineteenth century. En: *The history of urology.* Murphy LJT, Springfield.
 - Devlin TM (1986). *Bioquímica*, pp 735-740. Reverté, Barcelona, España.
 - Dove PM, De Yoreo JJ & Weiner S (eds) (2003). *Biom mineralization. Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54.
 - Drach GW (1986). Urinary lithiasis. In: Walsh P.C., Gittes R.F., Plummer A.D., Stamey T.A. (eds). *Campbell's Urology*, ed. 5. Philadelphia, Saunders: 1094-1190.
 - Ekeruo WO, Yen Hong Tan, Young MD, Dahm P, Maloney ME, Mathias BJ, Albala DM & Preminger GM (2004). Metabolic risk factors and the impact of medical therapy on the management of nephrolithiasis in obese patients. *The Journal Of Urology* 172: 159-163.
 - Elliot JS (1973). Structure and composition of urinary calculi. *J Urol* 109: 82-83.
 - Elliott JC (2002). Biom minerals – overview. *Reviews in mineralogy and geochemistry* 48: 427-453.
 - Fan J, Chandhoke PS & Graampas SA (1999). Role of sex hormones in experimental calcium oxalate nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol.* 10: 376-380.
 - Ferrie BG & Scott R (1984). Occupation and urinary tract stone disease. *Urology* 24: 443-445.
 - Finlayson B (1978a). Physicochemical aspects of urolithiasis. *Kidney Int* 13: 344-360.
 - Finlayson B & Reid F (1978b). The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. *Invest Urol* 15: 442-448.
 - Fleisch H & Bisaz S. (1964). The inhibitory effect of pyrophosphate on calcium oxalate precipitation and its relation to urolithiasis. *Experientia* 20: 276-280.

- Friberg L, Kjellstrom T, Nordberg GF & Piscator M (1975). Cadmium in the environment. III. A toxicological and epidemiological appraisal, US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Washington, D.C.: pp. 217.
- Galán JA, Conte A, Llobera A, Costa-Bauzá A & Grases F (1996). A comparative study between etioloical factors of calcium oxalate monohydrate and calcium oxalate dihydrate urolithiasis. *Urol Int* 56: 79-85.
- Gault MH, Chafe LL, Morgan JM, Parfrey PS, Harnett JD, Walsh EA, Prabhakaran VM, Dow D & Colpitts A (1991). Comparison of patients with idiopathic calcium phosphate and calcium oxalate stones. *Medicine (Baltimore)* 70, 345-359.
- Gill WB, Jones KW & Ruggiero KJ (1982). Protective effects of heparin and other sulfated glycosaminoglycans on crystal adhesion to injured urothelium. *J Urol* 127, 152-154.
- Goldfarb DS, Fischer ME, Keich Y & Goldberg J (2005). A twin study of genetic and dietary influences of nephrolithiasis: a report from the Vietnam Era Twin (VET) Registry. *Kidney International* 67: 1053-1061.
- Grases F, Genestar C & Millán A (1989a). The influence of some metallic ions and their complexes on the kinetics of crystal growth of calcium oxalate. *J Cryst Growth* 94, 507-594.
- Grases F & March P (1989b). A study about some phosphate derivatives as inhibitors of calcium oxalate crystal growth. *J Cryst Growth* 96: 993-995.
- Grases F, Millán A & Conte A (1990). Production of calcium oxalate monohydrate, dehydrate or trihydrate. A comparative study. *Urol Res*; 18: 17-20.
- Grases F & Conte A (1992a). Urolithiasis, inhibitors and promoters. *Urol Res* 20:86-88.
- Grases F, Masárová L, Söhnle O & Costa-Bauzá A (1992b). Agglomeration of calcium oxalate monohydrate in synthetic urine. *Br J Urol* 70:240-246.
- Grases F, Millán A & Söhnle O.(1992c). Role of agglomeration in calcium oxalate monohydrate urolith development. *Nephron* 61:145-150.
- Grases F, Costa-Bauzá, A & Conte A (1993a). Studies on structure of calcium oxalate monohydrate renal papillary calculi. Mechanism of formation. *Scanning Microsc* 7: 1067-1074.
- Grases F, March JG, Conte A & Costa-Bauzá A (1993b). New aspects on the composition structure and origin of the calcium oxalate monohydrate calculi. *Eur Urol* 24, 381-386.
- Grases F, Kroupa M & Costa-Bauzá A (1994a). Studies on calcium oxalate

- monohydrate crystallization: influence of inhibitors. *Urol Res* 22: 39-43.
- Grases F, Costa-Bauzá A, March JG & Söhnel O (1994b). Artificial simulation of renal stone formation. Study of the early stages. *Br J Urol* 74: 298-301.
 - Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A & March JG (1996a). Study of the effects of different substances on the early stages of papillary stone formation. *Nephron* 73: 561-568.
 - Grases F, García-Ferragut L & Costa-Bauzá A (1996b). Study of the early stages of renal formation: experimental model using urothelium of pig urinary bladder. *Urol Res* 24: 305-311.
 - Grases F & Llobera A (1996c). Determination of phytic acid in urine by ICP Atomic Emission Spectrometry. *Anal Letts* 29: 1193-1199.
 - Grases F, Costa-Bauzá A & García-Ferragut L (1998a). Biopathological crystallization: a general view about the mechanisms of stone formation. *Adv Colloid Interface Sci* 74: 169-194.
 - Grases F & Llobera A (1998b). Experimental model to study sedimentary kidney stones. *Micron* 29: 105-111.
 - Grases F, Söhnel O & Costa-Bauzá A (1999). Renal stone formation and development. *Int Urol Nephrol* 31, 591-600.
 - Grases F, Villacampa AI, Costa-Bauzá A & Söhnel O (2000a). Uric acid calculi: types, etiology and mechanisms of formation. *Clin Chim Acta* 302: 89-104.
 - Grases F, Ramis M & Costa-Bauzá A (2000b). Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Comparison with the action of other polyphosphates. *Urol Res* 28: 136-140.
 - Grases F, Costa-Bauzá A, Ramis M, Montesinos V & Conte A (2002). Simple classification of renal calculi closely related to their micromorphology and etiology. *Clin Chim Acta* 322: 29-36.
 - Gross KA & Berndt CC (2002). Biomedical application of apatite, in: Kohn, M.J., Rakovan, J., Hughes, J.M. (eds). *Phosphates: Geochemical, geobiological and material importance, Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, vol. 48. Mineralogical Society of America, Washington, DC: pp. 631-672.
 - Heilberg IP & Schor N (2006). Renal stone disease: causes, evaluation and medical treatment. *Arq Bras Endocrinol Metab* 50, 823-831.
 - Hess B (2003). Pathophysiology, diagnosis and conservative therapy in calcium kidney calculi. *Ther Umsch* 60: 79-87.
 - Hesse A, Schneider HJ, Berg W & Hienzsch E (1975). Uric acid dihydrate as urinary calculus component. *Invest Urol* 12:405-409.
 - Hesse A, Berg W & Bothor C (1979). Scanning electron microscopic investigations on the morphology and phase conversions of uroliths. *Int*

Urol Nephrol 11: 11-20.

- Hesse A, Siener R, Heynek H & Jahn A (1993). The influence of dietary factors on the risk of urinary stone formation. *Scanning Microsc.* 7: 1119-1128.
- Hesse A, Brandle E, Wilbert D, Kohrmann KU & Alken P (2003). Study on the prevalence and incidence of urolithiasis in Germany comparing the years 1979 vs. 2000. *European urology* 44(6): 709-713.
- Iwata H, Nishio S, Wakatsuki A, Ochi K & Takeuchi M (1985). Architecture of calcium oxalate monohydrate urinary calculi. *J Urol* 133: 334-338.
- Johnson CM, Wilson DM, O'Fallon WM, Malek RS & Kurland LT (1979). Renal stone epidemiology: a 25-year study in Rochester, Minnesota. *Kidney Int.* 16: 624-631.
- Jones AG (1989). Agglomeration during crystallization and precipitation from solution. En: 5th Int Symp Agglomeration (Cross M, Oliver R, eds.), p 131. Inst Chem Eng, Rugby.
- Kemenade MJJM van & Bruyn PL (1987). A kinetic study of precipitation from supersaturated calcium phosphate solutions. *J Colloid Interface Sci* 118: 564-585.
- Khan SR (1997). Interactions between stone-forming calcific crystals and macromolecules. *Urol. Int.* 59: 59-71.
- Kim MK (1982). The stones. *Scanning Electron Microsc* 4: 1634-1660.
- Komatina MM (2004). *Medical Geology: Effects of geological environments on human health.* Elsevier: pp. 488.
- Låg J (1990). General Survey of Geomedicine. In: Låg J (ed). *Geomedicine,* CRC Press, Boca Raton: pp. 1-24.
- Lee YH, Huang WC, Tsai JY, Lu CM, Chen WC, Lee MH, Hsu HS, Huang JK & Chang LS (2002). Epidemiological studies on the prevalence of upper urinary calculi in Taiwan. *Urologia internationalis* 68(3): 172-177.
- LeGeros RZ (1991). Calcium phosphates in oral biology and medicine, in: Myers, H.M. (ed.), *Monographs in oral science,* Karger publishing, New York, NY.
- LeGeros RZ (1999). Calcium Phosphates in Demineralization/Remineralization Processes. *J. Clin. Dent.* 10: 65-73.
- LeGeros RZ, LeGeros JP, Kim Y, Kijkowska R, Zheng R, Bautista C & Wong JL (1995). Calcium phosphates in plasma-sprayed HA coatings. *Ceramic Trans.* 48: 173-189.
- Leonetti F, Dussol B, Bethézène P, Thirion X & Berland Y (1998). Dietary and urinary risk factors for stones in idiopathic calcium stone formers compared

- with healthy subjects. *Nephrology dialysis transplantation* 13(3): 617-622.
- Leusmann DB (1991). A classification of urinary calculi with respect to their composition and micromorphology. *Scand J Urol* 25: 141-150.
 - Li MK, Blacklock NJ & Garside J (1985). Effects of magnesium on calcium oxalate crystallization. *J Urol* 133: 123-125.
 - Lieske JC, Norris R, Swift H & Toback FG (1997). Adhesion, internalization and metabolism of calcium oxalate monohydrate crystals by renal epithelial cells. *Kidney Int* 52, 1291-1301.
 - Ljunghall S, Danielson BG, Fellstrom B, Holmgren K, Johansson G & Wikstrom B (1985). Family history of renal stones in recurrent stone patients. *Br J Urol* 57:370-374.
 - Lowenstam HA & Weiner S (1989). *On biomineralization*. Oxford University Press, New York, 324 pp.
 - Lowenstam HA & Margulis L (1980). Calcium regulation and the appearance of calcareous skeletons in the fossil record. In: *The mechanisms of biomineralization in animals and plants*. Omori, M., Watabe, N. (eds). Tokai University Press, Tokyo: 289-300.
 - Mann S (2001). *Biomineralization, principles and concepts in bioinorganic material chemistry*. Oxford University Press, Oxford.
 - Manolagas SC & Olefski JM (1988). Metabolic bone and mineral disorders. En: *Contemporary Issues in Endocrinology and metabolism*, pp 13–33. Churchill Livingstone, New York, USA.
 - Marangella M, Vitale C, Petrarulo M, Rovera L & Dutto F (1996). Effects of mineral composition of drinking water on risk for stone formation and bone metabolism in idiopathic calcium nephrolithiasis. *Clin Sci*. 91: 313-318.
 - Menni Turbanti I (2002). I biominerali: fasi, ambienti e processi. *PLINIUS* 27: 160-171.
 - Messa P, Marangella M & Paganin L (1997). Different dietary calcium intake and relative supersaturation of calcium oxalate in the urine of patients forming renal stones. *Clin Sci*. 93: 257-263.
 - Meyer JL (1985). Relative importance of calcium phosphate urinary inhibitors. En: *Urolithiasis and related clinical research* (Schiwille PO, Smith LH, Robertson WG, Vahlensieck W, eds.), p 811. Plenum Press, New York.
 - Millán A, Grases F, Söhnle O & Krivánková I (1992). Semi-batch precipitation of calcium oxalate monohydrate. *Cryst Res Technol* 27: 31-39.
 - Miyahara T, Yamada H, Takeuchi M, Kozuka H, Kato T & Sudo H (1988). Inhibitory effects of cadmium on in vitro calcification of a clonal osteogenic cell, Mc3T3-E1. *Toxicol Appl Pharmacol*, 96: 52-59.

- Modlin M (1967). The aetiology of renal stone: a new concept arising from studies on a stone-free population. *Ann R Coll Surg WEngl.* 40: 155-178.
- Murata I, Hirono T, Saeki Y & Nakagawa S (1970). Cadmium enteropathy, renal osteomalacia (« Itai-itai » disease in Japan). *Bull Soc Int Chir*, 2: 34-42.
- Murphy BT & Pyrah LN (1962). The composition, structure, and mechanism of the formation of urinary calculi. *Br J Urol* 34: 129-159.
- Muskat DA (1951). The problem of nephrolithiasis with special reference to the Bantu. *S Afr J Clin Sci.* 2: 18-38.
- Nakai H, Yanagawa M, Kameda K, Ogura Y & Kawamura J (1996). *Proc VIII Int Symp Urol. Dallas.*
- Nancollas GH & Koutsoukos PG (1980). Calcium phosphate nucleation and growth in solution. *Prog Cryst Growth Charact* 3: 77-102.
- Nancollas GH, Smesso SA, Campbell AA, Coyle-Rees M, Ebrahimpour A, Binette M & Binette JP (1989). Mineralization inhibitors and promoters. In: Walker VR, Sutton RAL, Cameron ECB, Pak CYC, Robertson WG (eds) *Urolithiasis.* Plenum Press. New York London, pp. 83.
- Nriagu JO (1983). Tales told in Lead. *Science* 281: 1622-1623.
- Pak CYC (1987). Citrate and renal calculi. *Miner Electrolyte Metab* 13: 257-266.
- Parks JH & Coe FL (1986). A urinary calcium-citrate index for the evaluation of nephrolithiasis. *Kidney Int.* 30: 85-90.
- Parks JH, Worcester EM, Coe FL, Evan AP & Lingeman JE (2004). Clinical implications of abundant calcium phosphate in routinely analyzed kidney stones. *Kidney Int* 66, 777-785.
- Peacock M (2002). Primary hyperparathyroidism and the kidney: biochemical and clinical spectrum. *J Bone Miner Res* 17, 87-94.
- Pieras E, Costa-Bauzá A, Ramis M & Grases F (2006). Papillary and Nonpapillary calcium oxalate monohydrate renal calculi: comparative study of etiologic factors. *TSW Urology* 1, 116-124.
- Pierratos AE, Khalaff H, Cheng PT, Psihramis K & Jewett MA (1994). Clinical and biochemical differences in patients with pure calcium oxalate monohydrate and calcium oxalate dihydrate kidney stones. *J Urol* 151: 571-574.
- Posner AS (1985). The mineral of bone. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 200: 87-99.
- Prien EL & Frondel C (1947). Studies in urolithiasis. I. The composition of urinary calculi. *J Urol* 57:949-994.
- Ramello A, Vitale C & Marangella M (2000). Epidemiology of nephrolithiasis. *Journal of nephology* 13: S45-S50.

- Robertson WG, Gallagher JC, Marshall DH, Peacock M & Nordin BEC (1974). Seasonal variations in urinary excretion of calcium. *British Medical J.* IV: 436-437.
- Robertson WG, Peacock M, Marshall RW, Speed R & Nordin BEC (1975). Seasonal variations in the composition of urine in relation to calcium stone-formation. *Clinical Science and Molecular Medicine* 49: 597-602.
- Robertson WG, Peacock M & Heyburn PJ (1981). The risk of calcium stone formation in relation to affluence and dietary animal protein. *Urinary Calculus.* Littleton, Massachusetts: 3-12.
- Robertson WG, Peacock M & Baker M (1983). Studies on the prevalence and epidemiology of urinary stone disease in men in Leeds. *Br J Urol* 55: 595-598.
- Rodgers AL (1991). Urinary calculi: (I) Epidemiology. *Update* 6: 18-31.
- Rodgers AL (1997). Effect of mineral water containing calcium and magnesium on calcium oxalate urolithiasis risk factors. *Urol Int.* 58: 92-99.
- Rodgers A (1999). Effect of cola consumption on urinary biochemical and physicochemical risk factors associated with calcium oxalate urolithiasis. *Urol Res.* 27: 77-81.
- Ryall RL (1997). Urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and their potential role in stone formation. *World J Urol* 15: 155-164.
- Ryall RL, Harnett RM & Marshall V R (1981). The effect of urine, pyrophosphate, citrate, magnesium and glycosaminoglycans on the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. *Clin Chim Acta* 112: 349-156.
- Schneider HJ (1985). Urolithiasis: etiology. Diagnosis. En: *Handbook of urology* pp 137-145 Springer-Verlag, Berlin.
- Schulz E, Börner R, Brundig P & Mäurer F (1989a). Influence of different factors on the formation of calcium oxalate stones. I. Discriminant analytical computations of morphological parameters of the pelvic-calycela systems of calcium oxalate stone formers and controls. *Eur Urol* 16:212-217.
- Schulz E, Börner R, Brundig P & Mäurer F (1989b). Influence of different factors on the formation of calcium oxalate stones. II. Discriminant analytical computations of morphological parameters of pelvic-calyceal systems and clinicochemical urine parameters of control and calcium oxalate stone formers. *Eur Urol* 16: 218-222.
- Schuille PO & Herrmann U (1992). Environmental factors in the pathophysiology of recurrent idiopathic calcium urolithiasis (RCU), with emphasis on nutrition. *Urol Res.* 20: 72-83.

- Scott R (1985). Epidemiology of stone disease. *Br J Urol* 57: 491-497.
- Scott R, Frelund R & Mowat W (1977). The prevalence of calcified upper urinary tract stone disease in random population – Cumberland health survey. *Br J Urol* 49: 589-595.
- Scurr DS & Robertson WG (1986) Modifiers of calcium oxalate crystallization found in urine: III. Studies on the role of Tamm Horsfall mucoprotein and of ionic strength. *J Urol* 136:505.
- See WA & Williams RD (1992). Urothelial injury and clotting cascade activation: common denominators in particulate adherence to urothelial surfaces. *J Urol* 147: 541-548.
- Seltzer MA, Low RK, McDonal M, Shami GS & Stoller ML (1996). Dietary manipulation with lemonade to treat hypocitraturia calcium nephrolithiasis. *J Urol.* 156: 907-909.
- Serio A & Fraioli A (1999). Epidemiology of nephrolithiasis. *Nephron.* 81(suppl 1): 26-30.
- Simkiss K & Wilbur K (1989). Biomineralization. Cell biology and mineral depositino. Academic Press, Inc., San Diego.
- Skinner WCH (1987). Bone: mineral and mineralization. In: Albright J.A., & Brand R. (eds) – *The scientific basis of orthopaedics*. 2nd ed. Norwalk (Conn): Appleton & Lange: 199-211.
- Skinner WCH (2000). Minerals and human health. *EMU Notes in Mineralogy* 2, cap. 11: 383-412.
- Skrtic D, Fürdi-Nilhofer H & Markovic M (1987). Precipitation of calcium oxalates from high ionic strength solutions. V. The influence of precipitation conditions and some additives on the nucleating phase. *J Cryst Growth* 80: 113-120.
- Söhnel O, Grases F & March JG. (1993). Experimental technique simulating oxalocalcic renal stone generation. *Urol Res* 21:95-99.
- Söhnel O & Grases F (1995). Calcium oxalate monohydrate renal calculi. Formation and development mechanism. *Adv Colloid Interface Sci* 59, 1-17.
- Sojka JE & Weaver CM (1995). Magnesium supplementation and osteoporosis. *Nutrition Reviews*, 53: 71-74.
- Staessen JA, Roels HA, Emalianov D, Kuznetsova T, Thijs L, Vangronsveld J & Fagard R (1999). Environmental exposure to cadmium, forearm density, and risk of fractures: prospective population study. *Lancet*, 353: 1140-1144.
- Thompson JB, Kindt JH, Drake B, Hansma HG, Morse DE & Hansma PK (2001). Bone indentation recovery time correlates with bond reforming time. *Nature* 414: 773-776.

- Trueman CN & Tuross N (2002). Trace elements in recent and fossil bone apatite. In: Kohn M.J., Rakovan J., & Hughes J.M. (eds) – Phosphates: geochemical, geobiological and material importance. *Reviews in mineralogy and geochemistry* 48: 455-488.
- Tsuchiya K (1978). Cadmium studies in Japan: a review. Amsterdam, North Holland.
- Uribarri J, Oh M & Carroll HJ (1989). The first kidney stone. *Ann Int Med* 111: 1006-1009.
- Vaananen HK (1991). Pathogenesis of osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 49: S11-S14.
- Vahlensieck W (1986). Review: the importance of diet in urinary stones. *Urol Res.* 14: 283-288.
- Veis A (2003). Mineralization in organic matrix frameworks. *Rev. Mineral Geochem.* 54: 249-289.
- Wasserstein AG, Stolley PD, Soper KA, Goldfarb S, Maislin G & Agus Z (1987). Case-control study of risk factors for idiopathic calcium nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab* 13: 85-95.
- Wopenka B & Pasteris JD (2005). A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials science & engineering c-biomimetic and supramolecular systems* 25 (2): 131-143.
- World Health Organization (WHO) (2006). Guidelines for drinking water quality [electronic resource]: incorporating first addendum. Vol. 1, Recommendations. – 3rd ed. World Health Organization, Geneva.
- Zheng W, Beiko DT, Segura JW, Preminger GM, Albala DM & Denstedt JD (2002). Urinary calculi in aviation pilots: what is the best therapeutic approach? *J Urol.* 168: 1341-1343.