

Estudio cristalográfico y anatomopatológico del ateroma calcificado

HECTOR ENRIQUE MOSSO. Lic. MARIA RODRIGUEZ de BENYACAR, MARIA F. ROBERTI, GABRIEL GROSMAN

Hospital de Clínicas, UBA, Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires

Trabajo recibido para su publicación: 4/88. Aceptado: 7/90

Dirección para separatas: Ayacucho 1510, P. 2º, Buenos Aires

El objetivo de este trabajo fue la identificación de las fases minerales presentes en aortas ateromatosas calcificadas. Se usaron las siguientes técnicas: 1) Microscopía óptica para ubicar las masas cristalinas. 2) Microscopía electrónica de barrido. 3) Difracción de rayos X para identificar las fases minerales presentes. 4) Análisis dispersivo de rayos X (EDAX) para confirmar la composición química y para determinar la relación Ca/P: A) La relación Ca/P demuestra la presencia de iones carbonato, reemplazando a iones fosfato, en la estructura de los fosfatos de calcio. Los resultados de la difracción de rayos X indican que el mineral presente en las calcificaciones estudiadas pertenece a la familia de las calcio-hidroxiapatitas, de fórmula general $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. B) Como hecho llamativo se destaca que el análisis por EDAX señaló la presencia de iones cloro y calcio como componentes principales, con baja concentración de fósforo, azufre, silicio, aluminio y sodio en las esferulitas descritas debajo de la íntima. Estos resultados muestran que, además de las calcificaciones en forma de carbonato-hidroxiapatita, pueden aparecer otros tipos de calcificaciones en las que los componentes principales son cloro y calcio con muy baja concentración de fósforo. El análisis dispersivo en rayos X resulta un método irremplazable para este tipo de información en muestras muy pequeñas. Por otra parte, se destaca la utilidad e importancia del uso de técnicas cristalográficas de alta tecnología en el estudio del ateroma calcificado de la aorta, al mostrar la variedad que puede encontrarse en las apatitas en los tejidos, como es la entrada de los iones carbonato en la estructura de las hidroxiapatitas, o la presencia de cloro.

La calcificación de la aorta y sus ramas ocurre regularmente; puede iniciarse desde los primeros meses de vida, aumenta con la edad y luego de la menopausia en las mujeres, y suele estar asociada con la acumulación de lípidos en la pared arterial.

Hasta hace poco tiempo los depósitos de calcio eran considerados como un fenómeno secundario¹ que complicaba la enfermedad aterosclerótica.²

Actualmente cobra importancia la acción

que la sobrecarga de calcio puede desempeñar en la célula muscular lisa de la pared arterial, ya sea durante el envejecimiento, en que se observa un contenido progresivo de calcio paralelamente a la osteoporosis que sufren los huesos, ya sea como daño vascular arterioesclerótico por la sobrecarga de calcio citoplasmático y mitocondrial.

La espectrometría atómica de absorción, microscopía electrónica y cristalografía revelan una continuada sobrecarga de calcio y aumento

de la relación calcio-magnesio a medida que pasan los años.¹

Aportes experimentales demuestran que la sobrecarga de calcio produce un importante grado de calcinosis en la túnica media de las arterias, similar a lo que ocurre en la arterioesclerosis tipo Mönckeberg. En animales tratados con vitamina D₃ se ha visto la presencia de cristales de apatita y gránulos densos en la capa media de las arterias, en el interior de las células musculares lisas, vacuolas en el citoplasma y cambios estructurales en las mitocondrias, señalando el daño celular.

Se supone que el exceso de calcio arterial es un factor de riesgo que predispone a la degeneración arterioesclerótica, pues al contribuir a la destrucción celular tendría especial significación patogénica en ese proceso, de no menor importancia que la acumulación de colesterol.¹

Basados en estas ideas, Kramasch y Chan³ sostienen que ciertas drogas que previenen la excesiva deposición de calcio en las arterias del conejo juegan un importante papel antiaterogénico, y Fleckenstein⁴ señala que las sustancias antagonistas del calcio previenen en ratas viejas la sobrecarga progresiva de calcio, que de otra manera produciría un grave daño arterioesclerótico.

El proceso de calcificación arterial entra dentro del grupo de enfermedades calcificantes: arterioesclerosis, esclerosis valvular, calcificación de prótesis cardiovasculares, entre otras.⁵

La calcificación anormal de tejidos comprende dos tipos:

- a) calcificación metastásica, que ocurre en tejidos sanos cuando el nivel calcio y fosfato es elevado;
- b) calcificación distrófica, que sucede en tejidos lesionados, bañados por fluidos extracelulares que contienen cantidades normales de calcio y fosfatos.⁵

La mineralización puede ser iniciada por las mitocondrias de células dañadas en las cuales la membrana plasmática se ha vuelto más permeable al calcio, ya sea por isquemia o por otro proceso lesional.

En ambos tipos de calcificación, la mineralización ocurre en asociación con fragmentos de membrana extracelular no mitocondriales, formando vesículas matrices. Con el microscopio electrónico se observa que la mineralización se produce en el perímetro de las fibras elásticas de pequeñas y medianas arterias. En las células musculares lisas envejecidas aparecen vesículas exocíticas que sirven de punto de partida para la deposición de apatita.⁶ El mismo cuadro de

calcificación vesicular se ve en la placa aterosclerótica.² Las vesículas matrices promueven la calcificación a través de la ligadura calcio-fosfolípidos y de la actividad fosfatásica. La proliferación de cristales minerales depende de factores reguladores que son el calcio extracelular, los fosfatos y otros elementos promotores e inhibidores de la mineralización.⁵ El proceso de calcificación termina en la deposición de calcio insoluble bajo la forma de cristales de hidroxapatita.

En la pared arterial, el tejido conectivo contiene macromoléculas de hidratos de carbono y de proteínas que son los proteoglicanos.

Los glicosaminoglicanos, entre otras funciones, regulan el proceso de calcificación.⁷

Numerosos estudios morfológicos y bioquímicos han sido comunicados por diversos autores a propósito de la calcificación arterial⁸⁻¹¹ y autores argentinos estudiaron el intercambio de calcio y su distribución en la pared arterial.^{12, 13}

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue el estudio anatomopatológico y cristalográfico del ateroma calcificado de la aorta mediante el análisis y la identificación de los compuestos minerales que se encuentran en los depósitos patológicos de aortas humanas.

MATERIAL Y METODO

Anatomía patológica

Se estudiaron trece autopsias de pacientes de ambos sexos (5 mujeres y 8 varones) de edades comprendidas entre los 45 y 92 años.

a) Se determinó la topografía de las lesiones ateromatosas clasificándolas por grados (I a IV). Luego se seleccionaron trozos de aorta calcificados sin complicaciones ulcerativas, dividiéndolos en dos fragmentos: uno en solución fisiológica para estudio cristalográfico y otro para el examen histológico.

b) Para el estudio microscópico el material fue fijado en formol-calcio e incluido en parafina. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson, PAS y según técnica de Von Kossa para calcio.

Estudio cristalográfico de las calcificaciones arteriales

El estudio cristalográfico permitió el análisis y la identificación de los componentes minerales observados en los depósitos ateromatosos de aortas pertenecientes a sujetos arterioescleróticos. Las técnicas de investigación fueron las

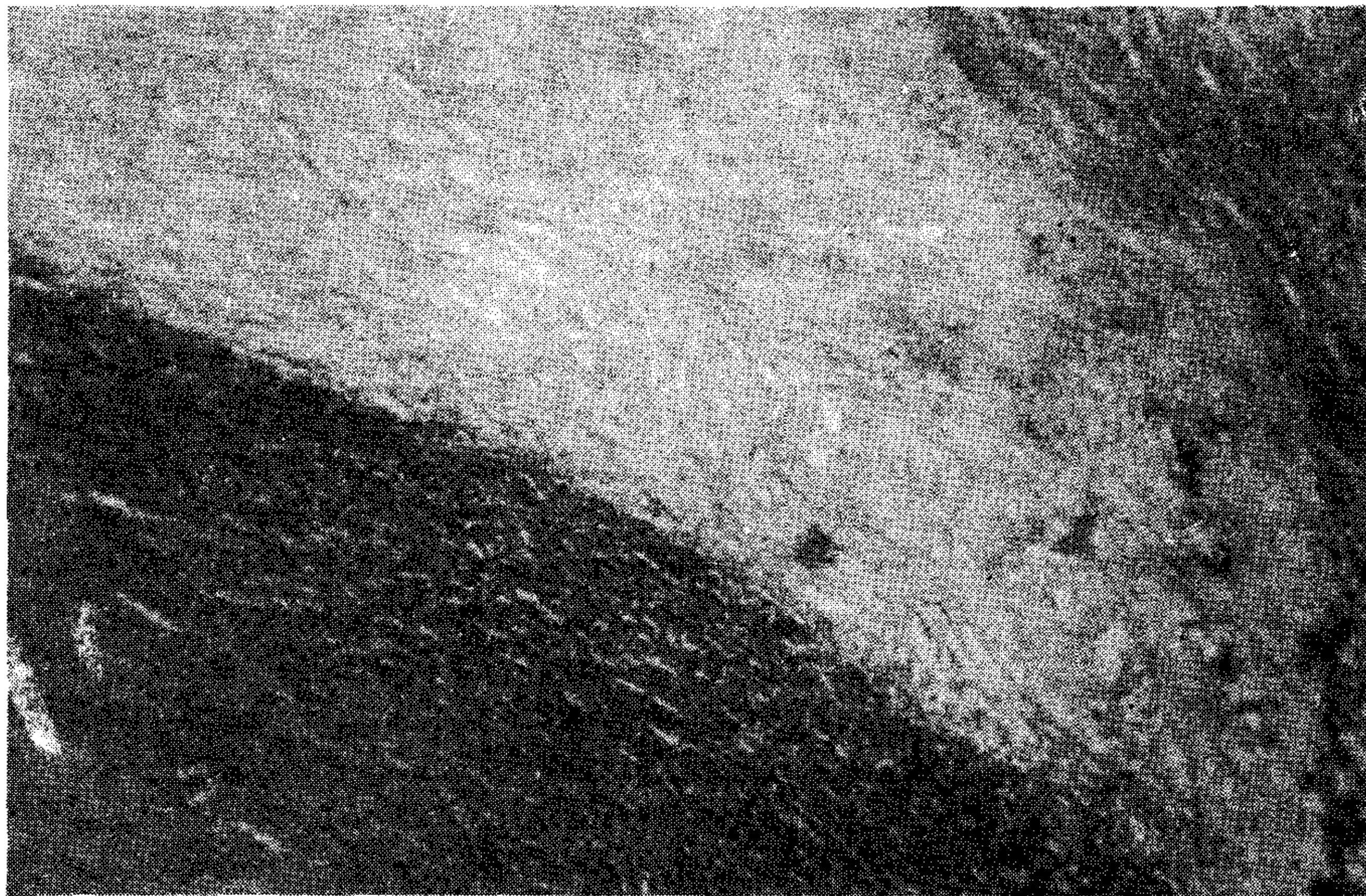


Foto 1. Microscopía panorámica de pared aórtica con el ateroma. Se observa la masa amorfa, pálida, de la pulpa ateromatosa. Por encima de él, la íntima con degeneración hialina y la media fibrosa (H-E 10x).



Foto 2. Detalle del ateroma. Se observan imágenes aciculares de los cristales de colesterol (Tricrómico de Masson, 40x).

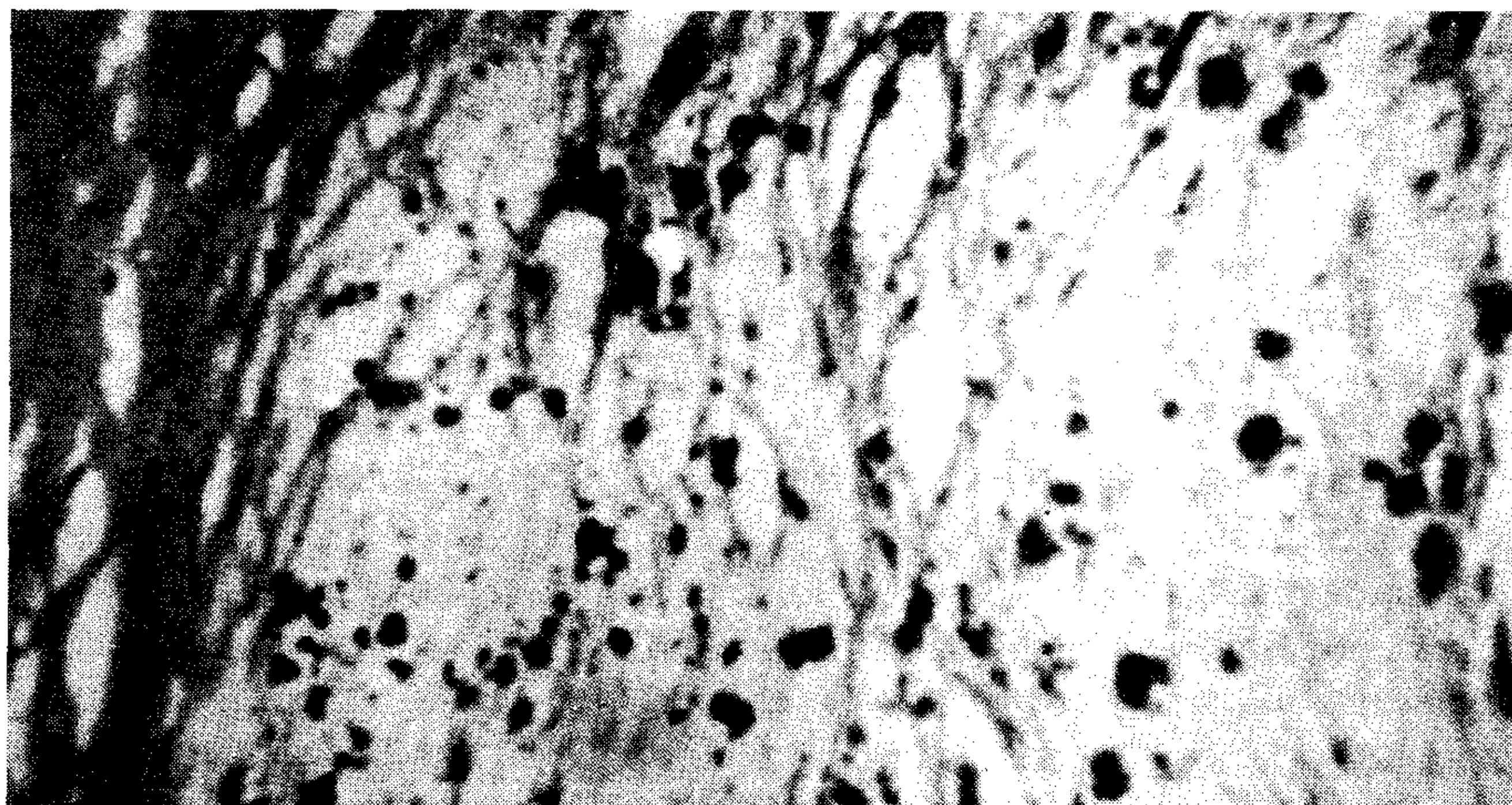


Foto 3. Sector de ateroma con depósitos granulosos de calcio (Hematoxilina-eosina, 40x).

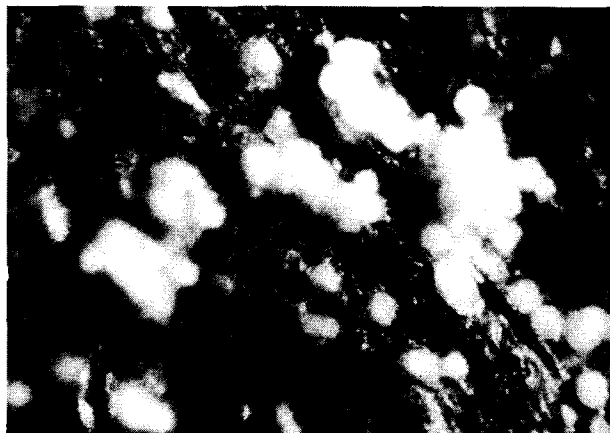


Foto 4. Esferulitas observadas debajo de la íntima, con Ca. Luz reflejada 720 X.

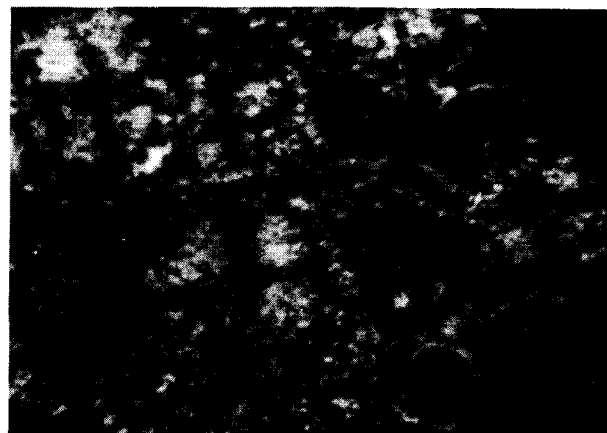


Foto 5. Esferulitas observadas debajo de la íntima, con Ca. Luz transmitida, polarizadores cruzados, lámina de yeso 720 X.

siguientes:

1) *Microscopía óptica* en luz reflejada y en luz transmitida polarizada y *microscopía electrónica*, observándose la relación macroscópica entre los tejidos y los depósitos, la forma y el tamaño de estos últimos, haciendo una primera determinación de su carácter cristalino (isótropo o anisótropo).

2) *Difracción de rayos X*: Las muestras secadas fueron separadas del tejido, molidas y analizadas utilizando un difractómetro de polvo, con anticátodo de cobre y filtro de níquel, trabajando a 36 Kv y 19 mA. El rango angular cubierto fue de 10° a 55° de 2.

3) *Análisis con rayos X dispersivo en energía (EDAX)*: Este análisis permitió el conocimiento de la mayoría de los elementos químicos constituyentes de las muestras.

4) *Espectrometría de infrarrojo*: De ella se obtuvo la información sobre los grupos funcionales presentes en el material analizado, por ejemplo $PO_4 \cong$, $CO_3 =$, OH^- , etc. Esta técnica permitió demostrar la existencia, en algunas estructuras, de grupos diferentes de los que normalmente se encuentran en el material puro.

Alrededor de 1 mg de la muestra molida fue mezclado con 100 mg de bromuro de potasio y se hizo una pastilla al vacío, que fue analizada utilizando un espectrómetro Beckman I R 33, en el intervalo de 700 cm^{-1} a 4.000 cm^{-1} .

Los trozos de aorta fueron mantenidos en solución fisiológica y en la heladera hasta su estudio; una vez separados del líquido fueron secados a 35-40°C.

RESULTADOS

Anatomía patológica

Microscópicamente las placas (Foto 1) aparecen formadas por una masa central de material necrótico con cristales de colesterol (Foto 2), tapizada por una íntima gruesa, fibrosa, con degeneración hialina y apoyada sobre una capa media con fragmentación de la elástica interna. En algunos de los casos más avanzados la media era fibrosa y se observó el crecimiento de finos vasos sanguíneos desde los vasa vasorum hacia la base de la placa. En todos los casos el calcio se halló como finos granos de polvo o pequeños glóbulos sueltos en racimo (Foto 3).

Estudio cristalográfico

Los depósitos patológicos se presentan bajo aspectos diferentes: a) masas blandas y esponjosas sobre la pared interna de la aorta; b) nódulos compactos incluidos entre los tejidos que forman la pared de la aorta; c) zonas extendidas de contornos indefinidos incluidas en el tejido; d) pequeñas esferulitas muy próximas a la pared interna de la aorta, pero cubiertas por una delgada capa de tejido.

Los depósitos de *tipo a* son de color amarillento, funden a temperaturas inferiores a 100°C, se carbonizan a 300°C y se calcinan, dejando muy escaso residuo, si se llevan a 800-900°C. Son materias grasas, cristalinas, que dan un diagrama característico de difracción de rayos X, con pocas líneas anchas y de baja intensidad, en la zona entre 18° y 26° de 2.

Se trata de materiales orgánicos no muy bien cristalizados.

Para comprobar que estas masas de material

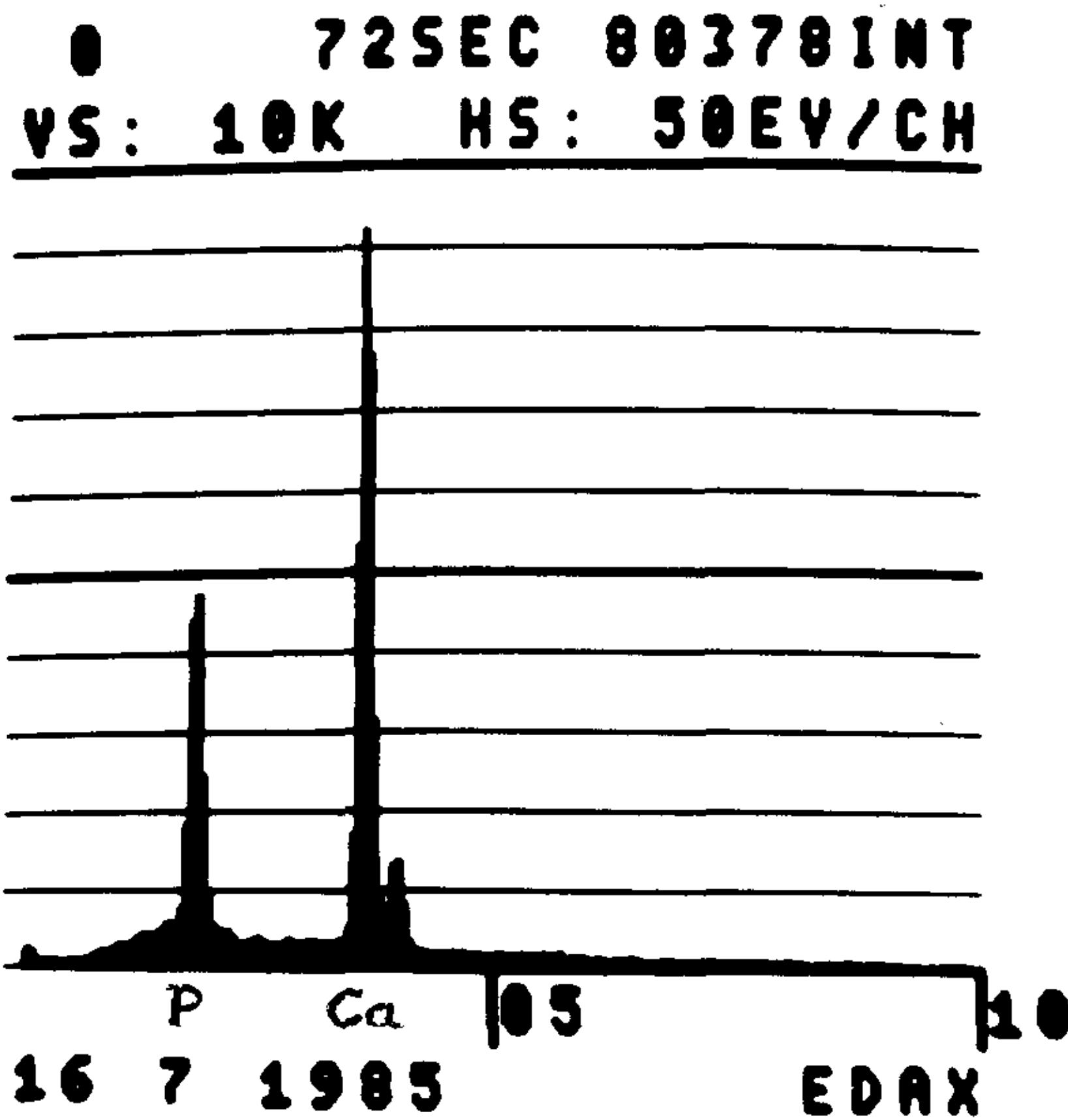


Fig. 1. Composición química de los nódulos calcificados. Método EDAX. Compuestos principales, Ca y P.

orgánico no contenían material de tipo apatita en forma microcristalina, envuelto por la materia orgánica, la misma muestra fue calcinada 4 horas a 820°C. En estas condiciones las apatitas recristalizan, dando diagramas de difracción de rayos X característicos y bien definidos. En este caso la calcinación no dejó residuo cristalino observable.

Los depósitos de *tipo b* son nódulos blancos, frágiles, de contornos bien definidos, que suelen tener, en su mayoría, alrededor de 5 mm de diámetro y de 2 a 3 mm de espesor. En este material compacto no se distinguen cristales de formas definidas; es un material anisótropo, de grano muy pequeño, que da un diagrama

de difracción de rayos X con dos o tres líneas más o menos anchas y de baja intensidad, muy semejante a las carbonato-hidroxi-apatitas de calcio observadas en la dentina o en el hueso¹⁴ y peor cristalizadas que las carbonato-hidroxi-apatitas observadas en el esmalte dentario¹⁵ o en calcificaciones de cartílago.¹⁶

Los datos obtenidos por calcinación en aortas y difracción de rayos X mostraron la semejanza del material con la hidroxiapatita de calcio y la ausencia de líneas correspondientes a otros compuestos.

Para comprobar que se trataba de carbonato-hidroxiapatitas de calcio de bajo grado de cristalinidad, las muestras molidas fueron calcinadas manteniéndolas durante dos a cuatro horas a 820°C.

En estas condiciones las muestras recristalizan dando un diagrama de difracción de rayos X correspondiente a una hidroxiapatita de calcio bien cristalizada.

Esta identificación se completó con un análisis por EDAX en el microscopio electrónico de barrido.

Los elementos encontrados fueron, en todos los casos, Ca y P con una relación Ca/P mayor que 2 (Fig. 1).

La espectrometría de infrarrojo mostró las bandas de 864, 1.430 y 1.455 cm^{-1} , características de iones carbonato reemplazando a iones fosfato en la estructura de la hidroxiapatita de calcio (Fig. 2).

Depósitos de *tipo c*: Estos depósitos parecen corresponder a material calcificado, del mismo tipo que el anterior.

Depósitos de *tipo d*: Esferulitas blancas, deleznales, aisladas o formando grupos, muchas veces alineadas a lo largo de fibras elás-

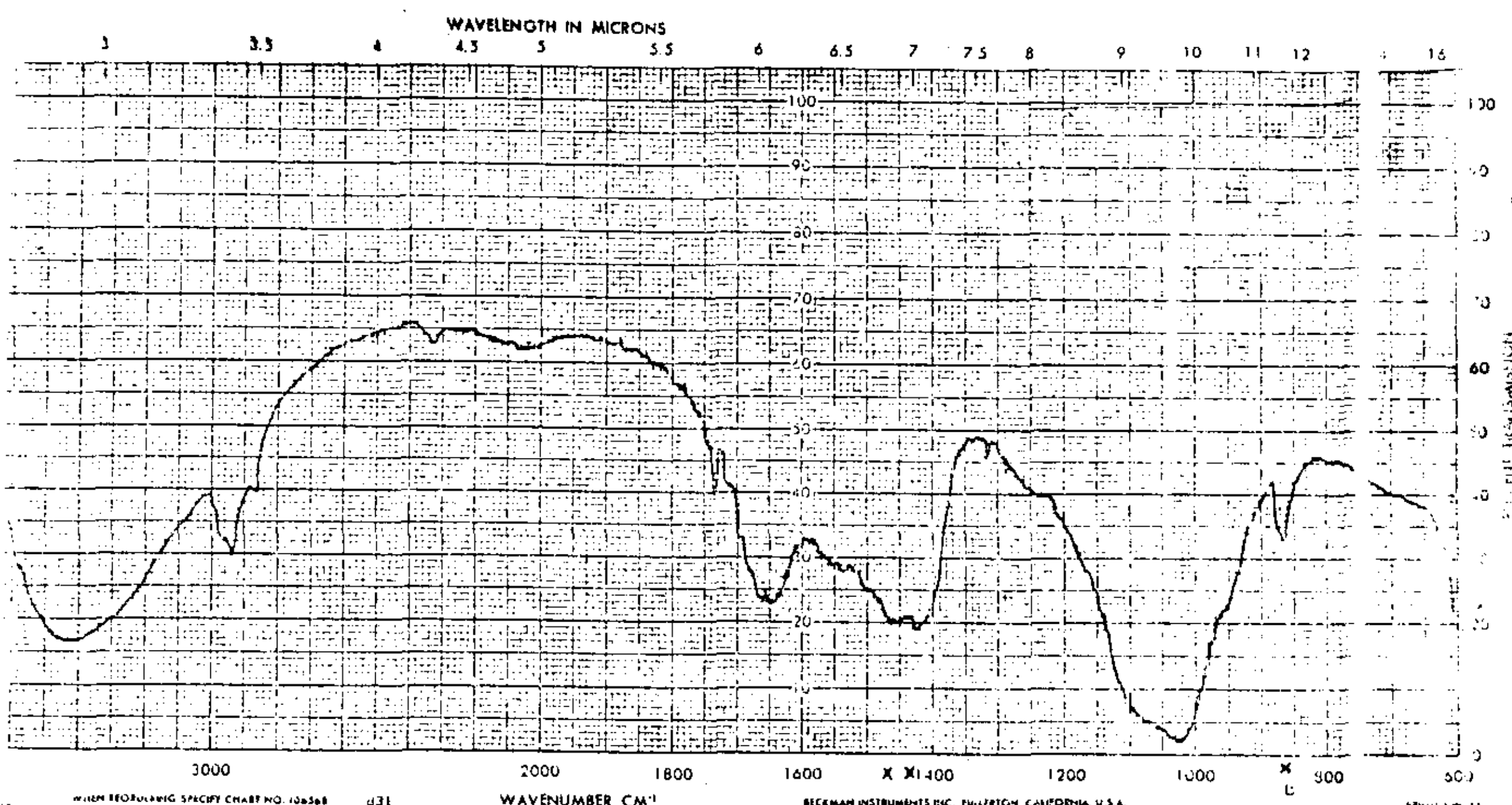


Fig. 2. Espectro de infrarrojo de nódulos calcificados mostrando la presencia de iones carbonato en 864, 1.430 y 1.455 cm^{-1} .

04-MAR-88 09:34:44
 RATE: CPS TIME 160LSEC
 00-20KEV: 10EV/CH PRST: 160LSEC
 A: AORTA/1 B:
 FS= 2046 MEM: A FS= 200

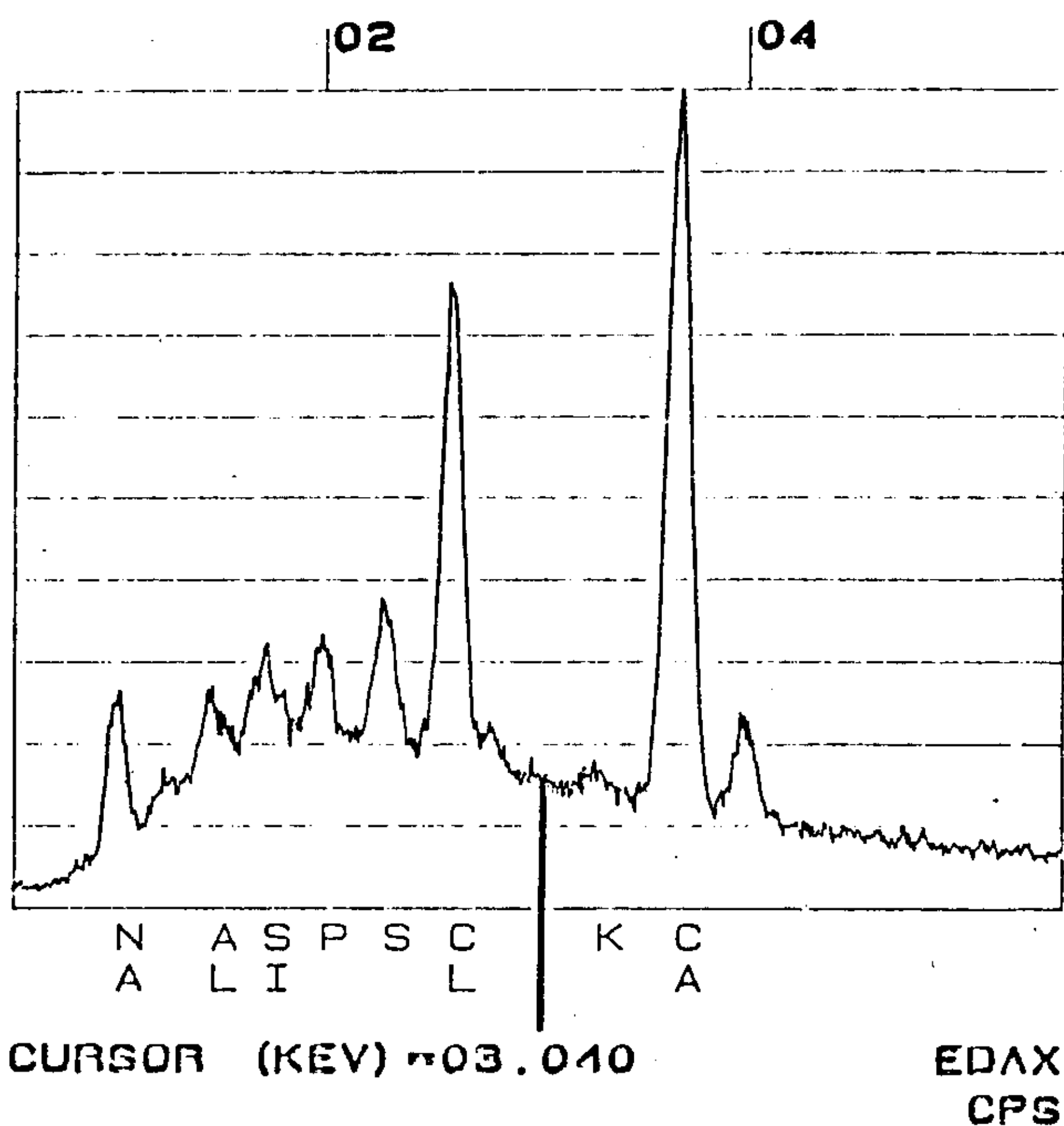


Fig. 3. Composición química de las esferulitas. Método EDAX. Componentes principales, Cl y Ca. Componentes menores, Na, Al, Si, P, S.

ticas, de diámetro bastante uniforme y no superior a 0,05 mm (Fotos 4 y 5).

El material es cristalino, característico de esferulitas, del cual no se pudo obtener diagrama de difracción de rayos X en muestras de polvo. Una pequeña cantidad, en una cámara de Gandolfi, señaló la presencia de un halo difuso, probablemente debido a la materia orgánica que las acompaña.

Para el análisis por EDAX las muestras, dado su carácter aislador, fueron preparadas evaporando una delgada capa de oro en la superficie, para evitar problemas de carga. El análisis señaló la presencia de iones cloro y calcio como componentes principales y la ausencia de fósforo.

Dado lo inusitado de la composición observada se hizo un nuevo análisis de varias esferulitas en el microscopio electrónico de barrido (Fig. 3), variando ligeramente la preparación de las muestras. Por la circunstancia de que una línea característica del oro está muy próxima a la línea del fósforo que se usa para identificar este elemento, las nuevas muestras se prepararon evaporando una capa de carbón como capa conductora, en lugar del oro.

Los resultados de este nuevo análisis confirmaron como componentes principales al calcio y al cloro; el fósforo se encuentra en muy pequeña proporción, acompañando a otros elementos menores: sodio, aluminio, silicio y azufre, algunos de los cuales son probablemente debidos al manipuleo de la muestra.

No descartamos la presencia de iones carbonato, de difícil determinación por EDAX, por ser un elemento muy liviano y dado que no es posible obtener muestras puras para hacer un análisis por infrarrojo.

COMENTARIOS

Los resultados obtenidos en el estudio anatomopatológico concuerdan con los conocimientos aceptados por todos los autores y muestran la existencia de extensas lesiones ateromatosas calcificadas en las aortas estudiadas, en las cuales el depósito de calcio se visualiza tanto macroscópica como histológicamente, empleando técnicas adecuadas.

Se pueden destacar los siguientes hechos:

- La lesión ateromatosa y el depósito de calcio se reparten por igual en ambos sexos.
- Las lesiones son más intensas en las personas de edad avanzada, pero llama la atención el hallazgo de ateromatosis de grados III y IV en aortas y de grados II y III en coronarias de mujeres en la edad media de la vida. Estos hallazgos complementan lo observado por Mosso y colaboradores.¹⁷

Con relación al estudio cristalográfico, el material calcificado depositado entre las tunicas de la aorta corresponde a un compuesto de la familia de las apatitas de calcio, cuya fórmula general es $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$.

De los espectros de infrarrojo se concluye que se trata de una carbonato-hidroxiapatita de tipo B, en la que parte de los grupos $PO_4 \cong$ está reemplazada por grupos carbonato. Esta sustitución explica la alta relación Ca/P y la baja cristalinidad del material.¹⁸⁻²¹

Las carbonato-hidroxiapatitas de calcio estudiadas tienen una cristalinidad comparable a la de las carbonato-hidroxiapatitas de calcio descritas en hueso y dentina¹⁴ y peor cristalinizadas que las descritas en esmalte dentario y en cartílago.^{15, 16}

Probablemente la mayoría de los materiales calcificados descritos en la literatura como hidroxiapatitas de calcio contienen iones carbonato reemplazando parcialmente a los iones oxhidrilo o a los iones fosfato o a ambos.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gatter y Mc Carthy.²² Aunque no es posible decidir si en todos los casos las hidroxiapatitas se presentan bajo la forma de carbonatos hidroxiapatitas, el diagrama de difracción de rayos X incluido en el trabajo mencionado hace sospechar un menor contenido de carbonato, por ser aparentemente mayor su cristalinidad.

El modo de calcificación de la túnica media de la aorta humana es similar al de la valva aórtica, y las vesículas matrices aparentemente derivadas de las células musculares lisas son los lugares de iniciación de la calcificación, en el estroma rico en glicosaminoglicanos.²³

En este proceso de calcificación tiene importancia no solamente la presencia de lípidos sino también de fibras elásticas.

Es de destacar, por otra parte, la relación existente entre la calcificación de la túnica media de la aorta, la arterioesclerosis de la íntima y la edad, tal como lo pusieron de manifiesto Blumenthal y colaboradores.²⁴

Un aspecto interesante a discutir es la presencia de iones cloro y calcio y la ausencia de iones fosfato, sin que se pueda destacar la presencia de iones carbonato, para lo cual se deben obtener muestras puras en cantidad suficiente como para hacer difracción de rayos X, o análisis químico o por infrarrojo.

Aunque el silicio ha sido encontrado ocasionalmente en tejidos humanos, su presencia ha sido detectada en muy escasa proporción en las muestras de aorta aquí estudiadas. En la última década ha aparecido una serie de trabajos sobre este tema. Bonel, Trombe y colaboradores²⁵ y Guyader, Lang y colaboradores²⁶ refieren las modificaciones biológicas que pueden ocurrir con las apatitas en la intimidad de los tejidos.

Los citados autores^{25,26} refieren la sustitución de los iones PO_4^{3-} . Tal como ocurre con los iones OH^- , los iones PO_4^{3-} pueden ser reemplazados por otros iones de la misma carga o de carga diferente. Recientemente, dos tipos de sustitución han sido descriptos por los investigadores franceses: de una parte la sustitución de grupos PO_4^{3-} por grupos SiO_4^{4-} , asociado al reemplazo por átomos de nitrógeno de parte de los átomos de oxígeno del tetraedro SiO_4^{4-} ; por otra parte, la sustitución del tetraedro PO_4^{3-} por grupos piramidales ReO_5 .

Desde el punto de mira biológico, Montel y colaboradores²⁵ consideran que en las apatitas acopiadas en los tejidos donde constituyen una reserva de fósforo, calcio, carbonato, magnesio y oligoelementos, los iones PO_4^{3-} pueden ser

reemplazados por el tetraedro SiO_4^{4-} o por pirámides ReO_5 ; su reemplazo por grupos HPO_4^{2-} doblemente cargados tiene gran significación biológica.

La presencia de silicio en la pared arterial ha sido publicada en varias oportunidades.²⁷⁻²⁹

Los resultados sugieren que el incremento del silicio en la íntima se relaciona con el desarrollo y progresión de la aterosclerosis.

En oposición a estos hallazgos, Loeper, Emerit y colaboradores³⁰ establecieron que los compuestos orgánicos de silicio agregados a la dieta aterogénica tienen una acción protectora contra la ateromatosis. Loeper³¹ sostiene que el silicio es un constituyente del tejido conectivo y elástico. En una publicación posterior³² también se refiere al silicio como factor protector de la pared arterial contra la aterosclerosis. Finalmente, Yung³³ sostiene que el silicio puede inhibir la formación de ateromas en la aorta.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo referentes a las hidroxiapatitas son coincidentes con el resultado del estudio cristalográfico de las calcificaciones cutáneas observadas en las enfermedades del tejido conectivo realizado por Toubes, Benyacar y Hubscher³⁴ y con las investigaciones de Marcos, Benyacar, García Morteo y colaboradores¹⁵ en un caso de condrocalcinosis familiar idiopática.

Estos hallazgos dan idea de la identidad y de la generalización que el proceso de calcificación tiene en el organismo humano, aceptando también las características particulares que dicho proceso presenta en la pared arterial arterioesclerótica.

SUMMARY

The objective of this study was to identify the mineral phases present in calcified atheromatous aortas. The following techniques were used:

1) Optic microscopy in order to find the crystalline masses. 2) Scanning electron microscopy. 3) X-ray diffraction in order to identify the mineral phases present. 4) X-ray dispersion analysis to confirm the chemical composition and to determine the relationship Ca/P: A) The relationship Ca/P indicates the presence of carbonate ions, replacing phosphate ions, in the calcium phosphate structure. The results of the X-ray diffraction indicate that the mineral present in the studied calcifications belong to the calcium-hydroxiapatites family, its general formula being $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. B) It is worth mentioning that EDAX analysis of the small spherulites showed the presence of chlorine and

calcium ions and only a low concentration of phosphate ions. The results show that, apart from the calcifications that appear in the form of carbonate-hydroxiapatite, other type of calcifications may be present whose main components are chlorine and calcium with a very low phosphorus concentration, S, Si, Al and Na. The X-ray energy dispersive analysis is an unreplaceable method for this type of information with very small samples. On the other hand, it pointed out the usefulness and importance of high technology cristallographic techniques in the study of aortic calcified atheroma showing the variety that can be found in the apatites present in biological tissues, as shown by the presence of Cl^- or $CO_3^{=}$ in the hydroxiapatite structure.

BIBLIOGRAFIA

1. Fleckenstein A, Frey M, Leder O: Prevention by calcium antagonists of arterial calcinosis. *In*: Fleckenstein, Hashimoto, Herrmann, Schwarts, Sepel (eds): Drug development and evaluation. New calcium antagonists. Recent developments and prospects. Diltiazem workshop. Freiburg, Germany, May 1982; Stuttgart, Gustav Fisher Verlag, 1983, pp 15-31.
2. Tanimura A, Mc Gregor DH, Clarke-Anderson H: Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. *Proc Soc Exp Biol Med* 172: 173-177, 1983.
3. Kramsch DM, Chan CT: The effect of agents interfering with soft tissue calcification and cell proliferation on calcific fibrous-fatty plaques in rabbits. *Circ Res* 42: 562-571, 1978.
4. Fleckenstein A: New experimental data on antihypertensive, anticalcinotic and arterioesclerotic effects of longterm administration of calcium antagonists. Physiological Institute, Univ of Freiburg, FRG (Abstracts). Berlin, Oct 1985.
5. Clarke-Anderson H: Calcific disease. *Arch Pathol Lab Med* 107: 341-348, 1983.
6. Kim KM: Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. *Fed Proc* 35: 156-162, 1976.
7. Bihary-Varga M: Glycosaminoglycans and atherosclerosis. *Gjorn Arteriosclerosis* 1: 25-33, 1984.
8. Gardner MB, Blankenhorn DH: Aortic media calcification. An ultrastructural study. *Arch Pathol* 85: 397-403, 1968.
9. Dmitrovsky E, Boskey AL, Minick CR: Lipids associated with aortic calcification. *Calcific Tissue Int* 33: 314-322, 1981.
10. Morgan AJ: Mineralized deposits in the thoracic aorta of aged rats: ultrastructural and electron probe X ray microanalysis study. *Exper Gerontol* 15: 563-573, 1980.
11. Meyer WW, Lind J, Yao AC, Kauffman SL: Lesiones arteriales precoces de la lactancia y la infancia y medios de prevenirlas. *Rassegna* 5 (2): 31-38, 1984.
12. Villamil MF, Rettori V, Yeyati N: Calcium exchange and distribution in the arterial wall. *Am J of Physiol* 224: 1314-1319, 1973.
13. Villamil MF, Martoff J: Changes in vascular ionic content and distribution across aortic coarctation in the dog. *Am J of Physiol* 228: 1087-1093, 1975.
14. Le Geros RZ: Apatites from aqueous and non aqueous systems: relation to biological apatites. 1st International Congress on phosphorus compounds. Rabat IMPROS, Oct 1977, pp 347-361.
15. Marcos JC, Benyacar MR de, García Morteo O et al: Idiopathic familial chondrocalcinosis due to apatite crystal deposition. *Am J Med* 71: 557-564, 1981.
16. Saenz-Clavere L, Le Geros RZ, Arlet J, Bonel G: Etude cristallographique de deux calcifications sous-deltoidiennes. *Rev Rhum* 47: 383-392, 1980.
17. Mosso HE, Baré G, Ibarra R, Bibiloni A: Arterioesclerosis coronaria y aórtica juvenil. Correlación anatomoclínica con un grupo de mayor edad. *Tribuna Médica* 8: 44-48, 1970.
18. Le Geros RZ, Trautz OR, Le Geros J, Klein E: Apatite cristallites: Effects of carbonate on morphology. *Science* 155: 1409-1411, 1967.
19. Jonas K, Vassanyi I, Ungvari I: The study of synthetic carbonate-hydroxiapatites and dental enamels by infra-red and derivatographic methods. *Physics and Chemistry of Minerals* 6: 55-60, 1980.
20. Bonel G: Contribution a l'étude de la carbonation des apatites. II: Synthèse et étude des propriétés physico-chimiques des apatites carbonatées de type B. *Ann Chim* 7: 127-140, 1972.
21. Bonel G: Contribution a l'étude de la carbonation des apatites. III: Synthèse et étude des propriétés physico-chimiques des apatites carbonatées dans deux types de site. Evolution des spectres infra-rouge en fonction de la composition des apatites. *Ann Chim* 7: 140-144, 1972.
22. Gatter RA, Mc Carty DJ: Pathological tissue calcifications in man. *Arch Pathol* 81: 346-353, 1967.
23. Kim KM, Trump BF: Calcification of human aortic media. An electron microscopic study. *Circulation* 46 (Suppl 11): 176, 1972.
24. Blumenthal HT, Lansing AI, Wheeler PA: Calcification of the media of the human aorta and its relation to intimal arterioesclerosis, aging and disease. *Am J Pathol* 20: 665-687, 1944.
25. Montel G, Bonel G, Trombe JC, Henghebaert JC, Rey C: Progrès dans le domaine de la chimie des composés phosphores solides à structure d'apatite. Application à la biologie et au traitement des minéraux. *Pure et Appl Chem* 52: 973-987, 1980.
26. Guyader J, Marchand R, Gaudé J, Lang J: Sur quelques silico-apatites. *C R Acad Sci Paris* 281: 307-308, 1975.
27. Arabidze GG, Burkitbaev SM, Bykovskii IuA, Kutsenko AI, Laptev ID: Elemental analysis of sclerotic plaques of large blood vessels by laser mass spectrometry. *Biofizika* 30 (4): 655-660, 1985.
28. Arabidze GG, Burkitbaev SM, Bykovskii IuA, Kutsenko AL, Laptev ID: Elemental analysis of atherosclerotic plaque using laser mass-spectrometry. *Biull Vsesoiusnogo Kardiol Nauchn Tsentra* 6 (2): 41-46, 1983.
29. Nakashima Y, Kuroiwa A, Nakamura M: Silicon contents in normal, fatty streaks and atheroma of human aortic intima: its relationships with glycosaminoglycans. *Brit J Exp Pathol* 66 (1): 123-127, 1985.
30. Loeper J, Emerit J, Goy J, Rozensztajn L, Fragny M: Etude des acides gras et de la peroxydation lipidique dans l'atherome experimental du lapin. Rôle joué para le silicium. *Pthol Biol* 32 (6): 693-697, 1984.
31. Loeper J, Goy-Loeper J, Rozensztajn L, Fragny M: The antiatheromatous action of silicon. *Atherosclerosis* 33 (4): 397-408, 1979.
32. Loeper J, Goy-Loeper J: Etude des certains éléments de protection de la paroi arterielle contre l'atherosclerose: à propos du silicium. *Bull Acad Natl Med* 165 (4): 485-491, 1981.
33. Yung CY: A synopsis on metals in medicine and psychiatry. *Pharmacol Biochem Behav* 21 (Suppl 1): 41-47, 1984.
34. Toubes R, Benyacar MR de, Hübscher O: Estudio cristalográfico de calcificaciones heterotópicas en pacientes con enfermedades del tejido conectivo. XXVI Congr Arg Reumat y II Simp Intern de Enfermedades del Tejido Conectivo. Mendoza, Argentina, Nov 1983.