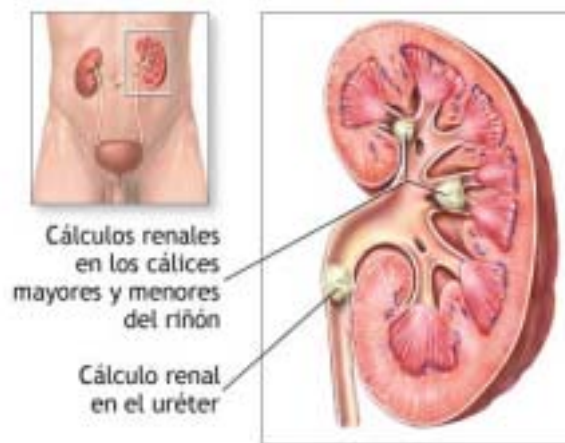




**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
Departament de Química  
Unitat de Química Analítica

## **LITIASIS RENAL OXALOCÁLCICA**

Avances en la comprensión de su etiología y mejoras en la metodología analítica para su estudio



**José Antonio Muñoz Martínez**  
**2004**



**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
Departament de Química  
Unitat de Química Analítica

## **LITIASIS RENAL OXALOCÁLCICA**

Avances en la comprensión de su etiología y  
mejoras en la metodología analítica para su estudio

Centre Grup de Tècniques de Separació en Química

Memoria presentada por **José Antonio Muñoz Martínez** para aspirar al grado de Doctor en Química

Octubre de 2004

Manuel Valiente Malmagro, Catedrático de Química Analítica del Departamento de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA: Que los estudios descritos en la presente memoria bajo el título "Litiasis renal oxalocálcica. Avances en la comprensión de su etiología y mejoras en la metodología analítica para su estudio", que presenta el Licenciado en Química José Antonio Muñoz Martínez para optar al Grado de Doctor en Química, han sido realizados bajo mi dirección.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Bellaterra, a 1 de Octubre de 2004

Manuel Valiente Malmagro



## UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Los estudios que recoge la presente memoria significan el inicio de una nueva línea de investigación en el campo biomédico (litiasis urinaria), dentro de las líneas de investigación en desarrollo en el Centre Grup de Tècniques de Separació en Química.

Querría agradecer:

- Al Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya por la concesión de una Beca predoctoral per a la formació d'investigadors. (Ref. 2001FI00240), así como también de una bolsa de viaje para realizar una estancia de dos meses en la Universitat de les Illes Balears (UIB).
- Al Laboratori d'Investigació en Litiasi Renal de la UIB (dirigido por el Dr. F. Grases) por su contribución a nuestra introducción en el campo de estudio de la litiasis renal, que ha hecho posible el desarrollo de los estudios de esta memoria, colaboración que continúa en el presente.
- A la Unidad de Urología del Institut Universitari Dexeus por su colaboración en la realización de los ensayos clínicos con pacientes afectos de litiasis oxalocálcica.
- A la Unidad de Urología y al Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital de Bellvitge por su colaboración en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de marcadores litógenos.
- Al Ministerio de Educación y Ciencia por el soporte económico para la realización de los estudios recogidos en esta tesis (PPQ2002-04267-C03-01).

**ÍNDICE**

<b>SUMMARY</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Entorno de formación del cálculo renal: anatomía y fisiología del aparato urinario</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Descripción de la urolitiasis</b>	<b>16</b>
1.2.1 Manifestación clínica de la litiasis renal	16
1.2.2 Repercusión económica y social de la urolitiasis	19
<b>1.3 Litogénesis urinaria</b>	<b>20</b>
1.3.1 Saturación urinaria	20
1.3.2 Promotores de la cristalización	23
1.3.3 Inhibidores de la litiasis urinaria	24
1.3.3.1 Inhibición de la nucleación	26
1.3.3.2 Inhibición del crecimiento cristalino	27
1.3.3.3 Inhibición de la agregación cristalina	28
1.3.4 Morfoanatomía renal	29
<b>1.4 Clasificación de los cálculos renales</b>	<b>31</b>
1.4.1 Cálculos de oxalato cálcico	32
1.4.1.1 Cálculos de oxalato cálcico monohidrato (COM)	32
1.4.1.1.1 Cálculos papilares de COM	32
1.4.1.1.2 Cálculos no papilares de COM	34
1.4.1.2 Cálculos de oxalato cálcico dihidrato (COD)	35
1.4.1.2.1 Cálculos papilares de COD	35
1.4.1.2.2 Cálculos no papilares de COD	35
1.4.2 Cálculos de fosfatos	36
1.4.2.1 Cálculos de estruvita o cálculos infecciosos	37
1.4.2.2 Cálculos de fosfatos cálcicos	37
1.4.2.2.1 Cálculos de hidroxapatita	38
1.4.2.2.2 Cálculos de brushita	38
1.4.3 Cálculos de ácido úrico	39
1.4.3.1 Cálculos compactos de ácido úrico	40
1.4.3.2 Cálculos porosos de ácido úrico	40
1.4.4 Otros cálculos menos frecuentes	41
<b>1.5 Metodologías para el diagnóstico de la etiología litiásica</b>	<b>41</b>
1.5.1 Estudio metabólico-mineral (análisis de orina)	42
1.5.2 Análisis de cálculo renal	45
1.5.3 Tratamiento profiláctico de la litiasis	47
<b>1.6 Estado actual de la enfermedad litiásica</b>	<b>48</b>
<b>1.7 Objetivos</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y EXPERIMENTAL</b>	<b>53</b>
<b>2.1 Técnicas analíticas</b>	<b>55</b>
2.1.1 Potenciometría	56
2.1.2 Espectrofotometría UV-Visible	56
2.1.3 Espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado por inducción	56
2.1.4 Electroforesis capilar de zona	58
2.1.5 Espectrometría de masas por plasma acoplado por inducción	61
2.1.6 Ensayo de riesgo litógeno urinario	64
2.1.7 Microscopia electrónica de barrido	65
2.1.8 Herramientas de análisis estadístico multivariable	66
2.1.8.1 Análisis en componentes principales	67
2.1.8.2 Análisis de conglomerados jerarquizados	70
<b>2.2 Evaluación del riesgo temporal de formación de cálculos renales</b>	<b>71</b>
2.2.1 Evaluación del riesgo circadiano de formación de cálculos renales	71
2.2.2 Evaluación del riesgo estacional de formación de cálculos renales	73

<b>2.3 Estudios in vitro sobre la inhibición de la cristalización de oxalato cálcico</b>	<b>73</b>
2.3.1 Composición de orina artificial	74
2.3.2 Efecto de diferentes inhibidores sobre la cristalización de oxalato cálcico	74
2.3.3 Efecto de diferentes inhibidores sobre orinas naturales litógenas	75
2.3.4 Efecto de mezclas de inhibidores sobre la cristalización de oxalato cálcico	76
<b>2.4 Estudio preliminar de la orina nocturna como espécimen para el diagnóstico de alteraciones en la litiasis oxalocálcica</b>	<b>77</b>
<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>79</b>
<b>3.1 Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de marcadores de la litogénesis</b>	<b>82</b>
3.1.1 Método de determinación de oxalato por CG-MS	83
3.1.2 Método de determinación de oxalato, citrato, ácido úrico y creatinina en orina mediante electroforesis capilar	83
3.1.3 Método de determinación de fitato en orina mediante ICP-MS	86
3.1.4 Método de determinación de pirofosfato en orina mediante ICP-MS	89
<b>3.2 Evaluación del riesgo temporal de formación de cálculos renales</b>	<b>91</b>
3.2.1 Evaluación del riesgo circadiano de formación de cálculos renales	91
3.2.1.1 Riesgo de cristalización de oxalato cálcico	92
3.2.1.2 Riesgo de cristalización de otras sales	94
3.2.1.3 Relevancia de los resultados obtenidos	94
3.2.2 Evaluación del riesgo estacional de formación de oxalato cálcico	97
3.2.2.1 Relevancia de los resultados obtenidos	99
<b>3.3 Estudios in vitro sobre la inhibición de la cristalización de oxalato cálcico</b>	<b>99</b>
3.3.1 Caracterización del sistema de cristalización	99
3.3.2 Inhibición de la cristalización de oxalato cálcico por varias sustancias	102
3.3.2.1 Aspectos cinéticos de la inhibición	106
3.3.2.2 Efecto de diferentes inhibidores sobre orinas litógenas naturales	107
3.3.3 Inhibición de la cristalización de oxalato cálcico por mezclas de inhibidores	108
<b>3.4 Estudio preliminar de la orina nocturna como espécimen para el diagnóstico de alteraciones en la litiasis oxalocálcica</b>	<b>112</b>
3.4.1 Análisis multivariable del riesgo litógeno	115
3.4.1.1 Litiasis de COM	117
3.4.1.2 Litiasis de COD	119
3.4.2 Relevancia de los resultados y necesidades futuras	121
<b>CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES</b>	<b>123</b>
<b>CAPÍTULO 5. ANEXOS</b>	<b>129</b>

#### **Anexo 1**

March JG, Simonet BM, Grases F, Muñoz JA, Valiente M. *Determination of Trace Amounts of Oxalate in Renal Calculi and Related Samples by Gas Chromatography – Mass Spectrometry*. *Chromatographia* 57, 2003, 811-817

#### **Anexo 2**

Muñoz JA, Valiente M. *One Set Determination of Urine Metabolites (Oxalate, Citrate, Uric Acid and Creatinine) by Capillary Zone Electrophoresis*. To be submitted.

#### **Anexo 3**

Muñoz JA, Valiente M. *Determination of Phytic Acid in Urine by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. *Anal. Chem.* 75, 2003, 6374-6378

#### **Anexo 4**

Muñoz JA, Valiente M. *A method for speciation of urinary phosphorous inhibitors of urolithiasis (pyrophosphate and phytic acid) with minimum handling by inductively coupled plasma mass spectrometry*. Submitted to Analytical Chemistry.

**Anexo 5**

Muñoz JA, Valiente M. *Circadian variations in urine composition. Evaluation of nocturnal urine as most appropriate urinary specimen for characterization of urolithiasis.* To be submitted.

**Anexo 6**

Muñoz JA, Valiente M. *Inhibitors of oxalocalcic lithiasis. Effects of their interactions on calcium oxalate crystallization.* Submitted to British Journal of Urology International.

**Anexo 7**

Muñoz JA, Valiente M. *Effects of trace metals on the inhibition of calcium oxalate crystallization.* Submitted to Urological Research.

**Anexo 8**

*Imágenes de los principales tipos de cálculos renales.* Imágenes extraídas de:  
[http://www.uib.es/secc6/laboratori\\_litiasi/3inform/albTipo/index.htm](http://www.uib.es/secc6/laboratori_litiasi/3inform/albTipo/index.htm)



**SUMMARY**

Urolithiasis is a common disease, which will affect 12% of the European Union population along their life, characterized by high prevalence and incidence, high morbidity and high rates of recurrence. Nowadays, multifactorial origin is accepted for the lithogenic process: the main phenomena is the supersaturation of several compounds in urine that might crystallise forming solid concretions, influenced by the scarcity of crystallization inhibitors, the presence of crystallization promoters and morphoanatomic factors of the urinary tract. The recurrence rate during five years lies between 44-75%, independently that the lithiasic episode is being solved spontaneously or by urologic intervention. This fact is due to the persistence of the urinary alteration which causes the renal stone formation. Such alterations are susceptible to be diagnosed by calculi and urine characterization and treated by dietetic modifications, pharmacological treatment or both, decreasing the aggressiveness of the disease and, consequently, the number of recurrences.

At the moment, main efforts in the urolithiasis field should be addressed to reduce incidence and recurrence rates, especially if we consider the lower costs associated to prophylactic treatments and prevention of this disease against to those of calculi extraction. In this sense, better understanding of lithiasic etiology and better efficacy in the diagnosis of lithogenic alterations are required to increase efficacy in the prevention of urolithiasis. Under this context, the main objectives of the present thesis include the development of efficient analytical methodologies for urolithiasis markers, the characterization of diary and stational fluctuations in urinary composition regarding lithogenic risk and the effect of various chemical substances (and its mixtures) on calcium oxalate crystallization.

### *Development of simple analytical methodologies for urolithiasis markers*

Accurate evaluation of urinary abnormalities in lithiasic patients is known to have vital importance in the reliable diagnosis and treatment of urolithiasis. Thus, the development of more efficient analytical methodologies for urolithiasis markers is crucial for the accurate characterization of urolithiasis, especially if we consider the well-known drawbacks of some existing analytical methods. Moreover, some urinary parameters (i.e. phytic acid and pyrophosphate) are not routinely analysed probably because of the scarcity of efficient methodologies for their determination, despite its knowledge is most valuable for diagnostic and treatment purposes. In this sense, a need for efficient analytical methodologies offering relevant information for urolithiasis management was identified.

Research in this field has been focused on 6 urolithiasis markers: oxalate, citrate, uric acid, creatinine, phytic acid and pyrophosphate. Main drawbacks associated to existing

methodologies for these analytes include individual determination, large and tedious sample treatment (often requiring dilution, filtration, centrifugation, pH adjusting, incubation, purification, hydrolysis, derivatization...) with consequent large times of analysis, lack of specificity or the need of especial component (enzymes) which could be rather expensive in some cases (oxalate). The development of more efficient, multicomponent and, thus, faster analytical methodologies involved a method for analysis of urinary metabolites (oxalate, citrate, creatinine and uric acid) by capillary zone electrophoresis and a method for the determination of phytic acid and pyrophosphate in urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. Validation parameters were evaluated in both cases, indicating appropriate lineal ranges and limits of detection, lack of interferences and good accuracy and precision, thus, demonstrating their applicability. Main advantages of these methods (ease of sample treatment, low requirements of reagents and sample amounts, multicomponent analysis capabilities, short times of analysis and high sample throughput, adequate accuracy and precision...) make feasible its implementation in clinical laboratories for a better diagnosis of urolithiasis illness, being the main associated drawback the limited (but increasing) availability of the required instrumentation.

### *Characterization of diary and stational fluctuations in lithogenic risk*

In the second part of this thesis, the study of the diary and stational fluctuations of urinary composition revealed important temporal variations producing relevant peaks of increased risk for the pathologic crystallization of calcium oxalate. In this sense, the identification of periods with increased risk of lithogenesis is of interest in the therapeutic treatment design, by trying to reduce the supersaturation of urine or to increase the inhibitory capacity of given urine by dietary changes or pharmacological treatment at a stage when they could be more effective.

With respect to circadian course, relevant fluctuations in the supersaturation / promotion / inhibition system for crystallization in urine, related with some of the urolithiasis-related measured urinary parameters (volume/h, calcium, oxalate, magnesium, phytic acid) were found, leading to a variation on the lithogenic risk during 24 hours. An increased risk period for calcium oxalate crystallization was identified at the nocturnal rest period, thus indicating that 24-hour urines do not reflect properly the crystallization properties of urine. Moreover, application of multivariate statistical analysis (PCA and HCA) to fractionated 24-h urines revealed that nocturnal urines can be differentiated from the diurnal ones by their lithogenicity, also indicating some homogeneity in urinary composition of such samples. Both facts, lithogenicity naturally increased at night and homogeneity in urinary

composition, suggested that analysis of nocturnal urines can represent an objective for more appropriate evaluation of calcium oxalate lithogenic risk.

With respect to stational fluctuation in urinary composition, remarkable variations were found indicating an increased risk of calcium oxalate crystallization in the summer period, provoked by both a decrease in diuresis with an associated increased supersaturation and a non-increased inhibitory capacity. These results indicate the need for both maintaining adequate hidration levels during the summer and increasing the inhibitory activity of urine by dietary changes or pharmacological treatment in those patients with higher risks of recurrence.

### *Effect of various substances (and its mixtures) on calcium oxalate crystallization*

In the third part of this thesis, the effect of several substances (and its mixtures) on calcium oxalate crystallization were studied. A test of urinary lithogenic risk was used to follow the crystallization of calcium oxalate from artificial urine in presence of several substances (phytate, pyrophosphate, citrate, chondroitin sulphate and some trace metals including  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Sn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ), which were assayed in physiological concentrations.

Several substances such as phytate, pyrophosphate, citrate and, chondroitin sulphate were proved to significantly decrease the calcium oxalate crystallization, both in artificial and natural lithogenic urines. However, the existence of relevant interactions between these substances and their effect on modulating the inhibition capacity of calcium oxalate crystallization were also examined, indicating interactions between different urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and incipient crystals in urine can result either in synergic, additive or negative effects on the overall inhibition of insoluble urinary salts. Synergistic effects occur when substances with high affinity for calcium (i.e. phytate + pyrophosphate mixtures) are selectively adsorbed on actives sites of calcium oxalate crystallization, disturbing the crystal surface more effectively than the mere additive effect of the individual inhibitors. Negative effects take place when a substance with high affinity for calcium (i.e. phytate) is in presence of high amounts of another substance with lower affinity (i.e. citrate), resulting in a effective displacement of the former from actives sites of calcium oxalate crystallization, thus decreasing the overall inhibition below the expected additive effect. Finally, merely additive effects seem to occur when the substances involved in the inhibition have similar affinities for actives sites of calcium oxalate crystallization and/or they are present in urine in concentrations that do not exceed considerably from each other.

As a consequence of the related effects, it can be concluded that the crystallization inhibitory capacity of urine could not be assigned to the inhibitory capacity of each individual substance but also to the possible interactions between these substances in the complex media of urine containing incipient crystals. In this sense, the abundant likely interactions of this compound with other components of urine (complex formation, precipitation, chemisorption on crystal surface, displacement from crystal surface...) can determine the inability of a given substance to disturb the development of a specific insoluble salt. For example, the interactions of physiological concentrations of citrate with urinary phytate, can limit the high inhibitory potential of phytate, with the consequent disadvantage in prevention of calcium oxalate crystallization.

On the other hand, physiological concentrations of trace metals in urine do not have a significant influence on calcium oxalate crystallization. In this sense,  $\text{Fe}^{3+}$ , which is the unique trace metal that exhibit an intrinsic high inhibitory capacity of calcium oxalate crystallization at physiological concentrations, even increased by concomitant presence of phytate and pyrophosphate, is probably unable to act as a powerful inhibitor in presence of physiological concentrations of citrate, as a consequence of the negative effect produced for citrate and  $\text{Fe}^{3+}$  mixtures, due to the formation of highly stable complexes in solution without inhibitory activity.

Because of the scarce knowledge of such interactions, further investigation in this concern will contribute to best assessment on designing prophylactic treatments with inhibitors.

### *Evaluation of nocturnal urine as most appropriate urinary specimen for study of urolithiasis*

Finally, efficacy in the diagnosis of lithogenic alterations by the use of nocturnal urines as reference urinary specimen for study of urolithiasis was preliminary evaluated. In this sense, the main objective was to obtain a simplified scheme for a first simple and accurate diagnostic of urinary lithogenic alterations, also overcoming the known limitations of current schemes based on 24-hours urines. Nocturnal urines were able to effectively discriminate the main lithogenic factors of oxalocalcic lithiasis, mainly related to deficient inhibitory capacity (phytic acid, pyrophosphate and citrate concentrations) for calcium oxalate monohydrate and high urinary pH and high calciuria for calcium oxalate dihydrate. Thus, nocturnal urines can represent an objective for more appropriate evaluation of calcium oxalate lithogenic risk, that can be useful and suitable in diagnosing and monitoring of preventive therapy. This analysis, against the 24-hours urinalysis, can also simplify the necessary metabolic investigations in patients, being easy its implementation in clinical practice, with relevant advantages related to greater representativity with respect to lithogenic risk and easy of sample collection by the patient. In this sense,

further study (now under development) is required before implementation of nocturnal urines for urolithiasis evaluation in order to establish new reference values for lithogenic risk assessment based on nocturnal urines, to extend the study to the other main kinds of lithiasis (phosphate and uric acid) and to compare the diagnostic power of nocturnal urines with respect to 24-hours specimens.

The different contributions of this thesis could deserve for a better understanding of lithiasic etiology and better efficacy in the diagnosis of lithogenic alterations, both required to increase efficacy in the evaluation and monitorization of urolithiasis and to decrease incidence and recurrence rates by adoption of preventive measures.

## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL**

**Índice del Capítulo 1: Introducción General**

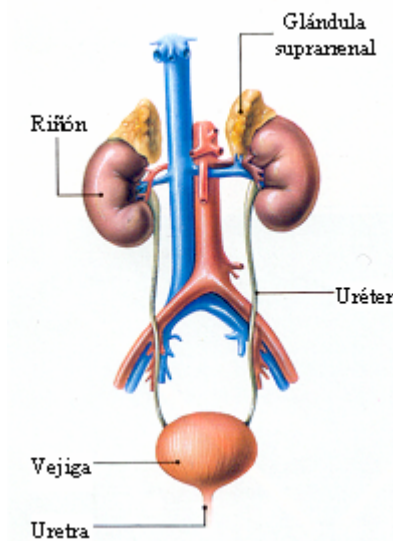
<b>1.1 Entorno de formación del cálculo renal: anatomía y fisiología del aparato urinario</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Descripción de la urolitiasis</b>	<b>16</b>
1.2.1 Manifestación clínica de la litiasis renal	16
1.2.2 Repercusión económica y social de la urolitiasis	19
<b>1.3 Litogénesis urinaria</b>	<b>20</b>
1.3.1 Saturación urinaria	20
1.3.2 Promotores de la cristalización	23
1.3.3 Inhibidores de la litiasis urinaria	24
1.3.3.1 Inhibición de la nucleación	26
1.3.3.2 Inhibición del crecimiento cristalino	27
1.3.3.3 Inhibición de la agregación cristalina	28
1.3.4 Morfoanatomía renal	29
<b>1.4 Clasificación de los cálculos renales</b>	<b>31</b>
1.4.1 Cálculos de oxalato cálcico	32
1.4.1.1 Cálculos de oxalato cálcico monohidrato (COM)	32
1.4.1.1.1 Cálculos papilares de COM	32
1.4.1.1.2 Cálculos no papilares de COM	34
1.4.1.2 Cálculos de oxalato cálcico dihidrato (COD)	35
1.4.1.2.1 Cálculos papilares de COD	35
1.4.1.2.2 Cálculos no papilares de COD	35
1.4.2 Cálculos de fosfatos	36
1.4.2.1 Cálculos de estruvita o cálculos infecciosos	37
1.4.2.2 Cálculos de fosfatos cálcicos	37
1.4.2.2.1 Cálculos de hidroxapatita	38
1.4.2.2.2 Cálculos de brushita	38
1.4.3 Cálculos de ácido úrico	39
1.4.3.1 Cálculos compactos de ácido úrico	40
1.4.3.2 Cálculos porosos de ácido úrico	40
1.4.4 Otros cálculos menos frecuentes	41
<b>1.5 Metodologías para el diagnóstico de la etiología litiásica</b>	<b>41</b>
1.5.1 Estudio metabólico-mineral (análisis de orina)	42
1.5.2 Análisis de cálculo renal	45
1.5.3 Tratamiento profiláctico de la litiasis	47
<b>1.6 Estado actual de la enfermedad litiásica</b>	<b>48</b>
<b>1.7 Objetivos</b>	<b>51</b>

Los estudios que se presentan en esta memoria se refieren a diferentes aspectos de los procesos de formación de cálculos renales o litiasis renal. Es por ello que inicialmente introduciremos algunos detalles básicos referentes al contexto anatómico y fisiológico en que se produce la formación de cálculos (el aparato urinario), para posteriormente proceder a una descripción general de la litiasis renal, considerando los mecanismos de formación de cálculos renales, su clasificación, así como los mecanismos de acción de los inhibidores de la litiasis renal. Además, describiremos las técnicas de análisis de cálculos renales y análisis metabólico-mineral (análisis de orina) encaminadas al diagnóstico de las causas de formación del cálculo renal, así como algunos aspectos sobre el tratamiento de la litiasis renal.



## 1.1 ENTORNO DE FORMACIÓN DEL CÁLCULO RENAL: ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL APARATO URINARIO

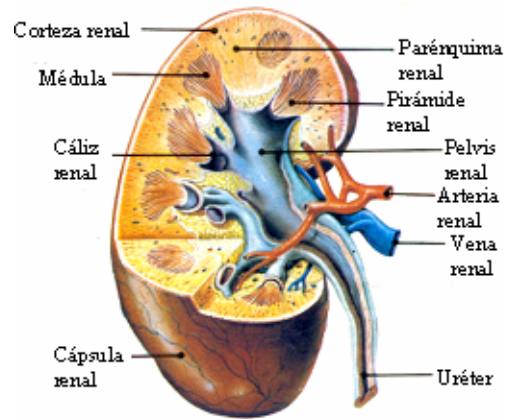
El aparato urinario<sup>1</sup> está constituido por dos vías excretoras convergentes (Figura 1.1) que se inician en los riñones, órganos encargados de la producción de orina, de color pardo-rojizo, con forma de habichuela, de dimensiones aproximadas de 12cm longitud x 6cm anchura x 3cm de espesor (dentro de la variedad individual) y de un peso también aproximado de 150g.



**Figura 1.1** Aparato urinario.

El corte del riñón (Figura 1.2) muestra macroscópicamente dos zonas bien diferenciadas: la corteza y la médula, separadas por una franja sinuosa que constituye el límite corticomedular. En el centro del órgano se aprecia una oquedad (seno renal), donde se van constituyendo las vías excretoras y acceden los vasos y nervios, acolchado todo ello por tejido adiposo. La médula está formada por 10-20 unidades morfológicas denominadas pirámides de Malpighio, con vértice en la papila y base en la zona límite corticomedular, separadas por materia cortical. Entre ellas se aprecian las columnas renales de Bertin por las que discurren los vasos interlobulares. Las papilas renales están revestidas por unas estructuras membranosas que a manera de copa recogen el producto liberado por las áreas cribosas. Son los llamados cálices menores, que en un número variable (alrededor de 10) se van reuniendo para acabar dando de 2 a 3 cálices mayores: superior, medio e inferior; que desembocan en un receptáculo común y amplio, que ocupa buena parte del seno del órgano, denominado pelvis renal.

<sup>1</sup> Sarrat R. Anatomía del aparato urogenital. En: Jiménez JF, Rioja LA. Tratado de Urología. Tomo I. J.R. Prous Editores, Barcelona (España), 1993, Capítulo 2, pp. 17-40



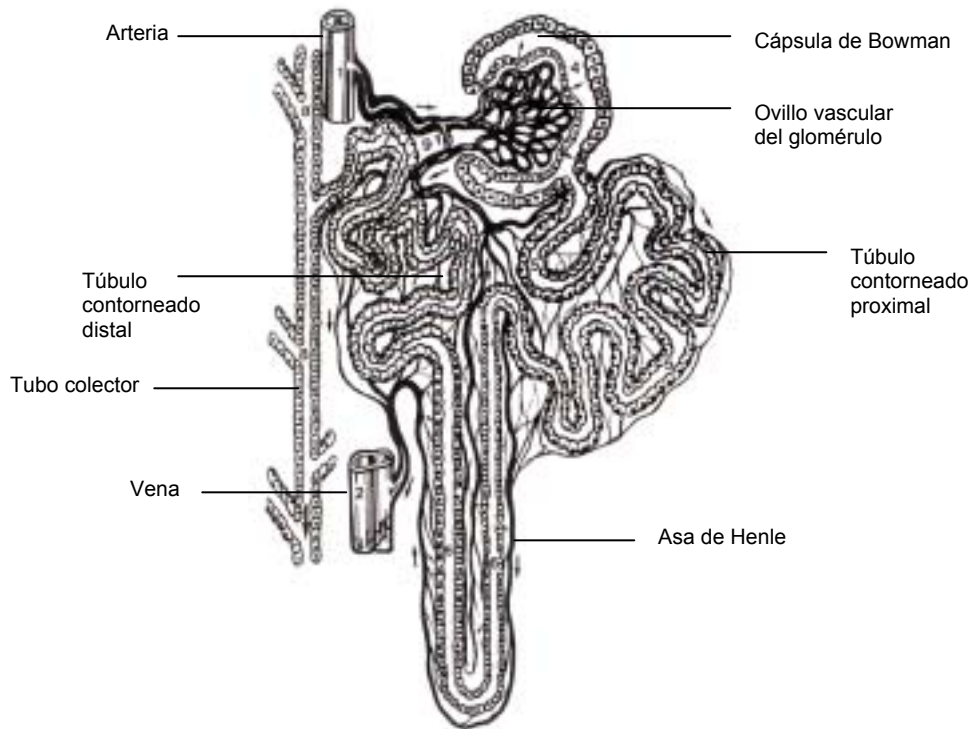
**Figura 1.2** Visión interna del riñón.

El aparato urinario se continúa con los uréteres, conductos de gruesa pared muscular, de 25 a 30 cm de longitud, encargados de transportar la orina desde la pelvis renal hasta la vejiga, reservorio elasticomuscular que permite que la continua producción de orina sea expulsada intermitentemente y a voluntad, con las ventajas que ello comporta. La vejiga puede almacenar cantidades variables de orina, desde los 300 a 350 cc que motivan el deseo de orinar, pasando por los 750 a 1000 cc que pueden ser retenidos a voluntad con esfuerzo y molestia, hasta llegar a varios litros en distensiones máximas por obstrucción, que pueden incluso acarrear su ruptura. Finalmente, la orina almacenada en la vejiga es expulsada al exterior a través de la uretra, conducto que comunica la vejiga con el exterior y que tiene un evidente y conocido dimorfismo sexual.

En cuanto a la fisiología del aparato urinario<sup>2</sup>, los riñones están íntimamente relacionados con el mantenimiento constante de la composición del organismo (homeostasis del equilibrio ácido-base y balance hidrosalino), extrayendo de la sangre los desechos del metabolismo celular y eliminándolos hacia el exterior del cuerpo.

A nivel microscópico pueden contemplarse en un riñón más de un millón de nefronas, la unidad básica funcional del riñón. La nefrona (Figura 1.3) está constituida por el glomérulo (auténtico complejo filtrante) y los túbulos (con fundamental misión reabsorbente de los elementos útiles al organismo, como agua y electrolitos, aunque a su nivel multitud de sustancias trasiegan en uno y otro sentido, equilibrando en un dinamismo frenético las constantes plasmáticas). Del glomérulo debemos destacar el pelotón de asas capilares en que se resuelve la arteriola aferente, incluido en el receptáculo de la cápsula de Bowman, de la que parte el túbulo contorneado proximal. La arteriola eferente emerge del glomérulo formando un ángulo, en el que se aloja el recodo del tubo contorneado distal, para acabar irrigando el dispositivo tubular.

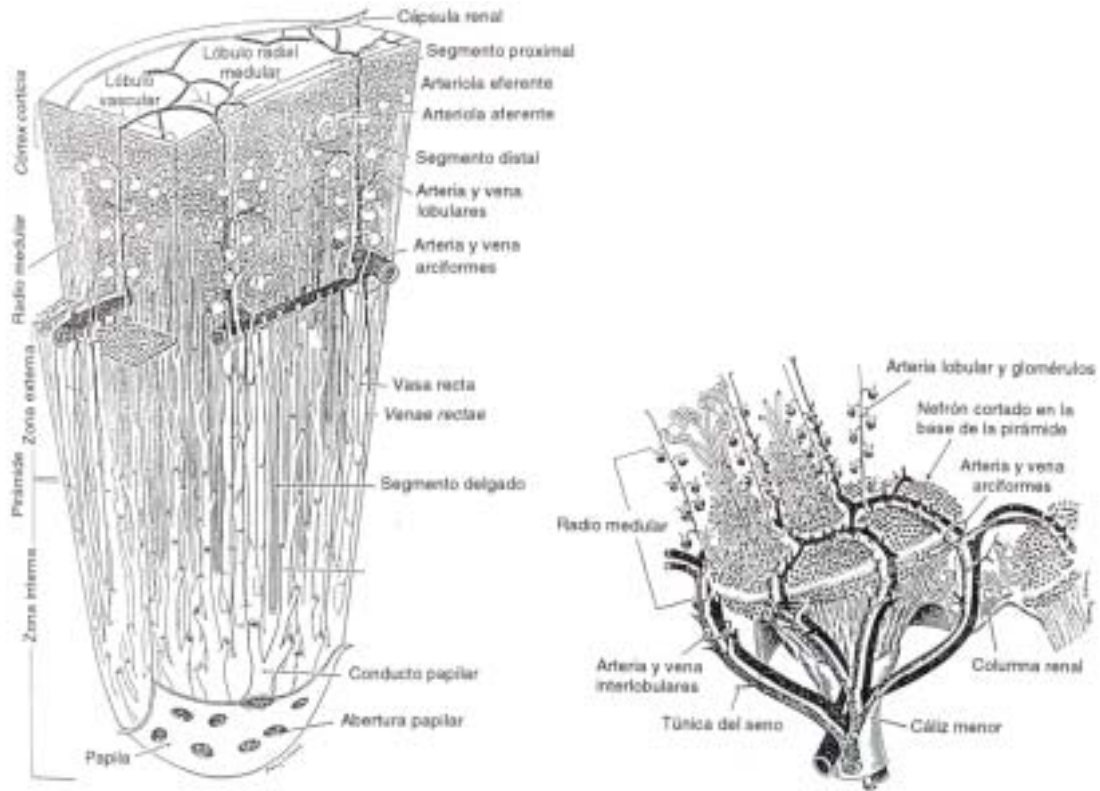
<sup>2</sup> Gutiérrez JA. Fisiología renal. En: Jiménez JF, Rioja LA. Tratado de Urología. Tomo I. J.R. Prous Editores, Barcelona (España), 1993, Capítulo 3, pp. 41-53



**Figura 1.3** Unidad funcional del riñón: nefrona.

La nutrición del riñón corre a cargo de la arteria renal, procedente de la aorta a la altura de la primera vértebra lumbar. Al entrar en el hilio, la arteria se divide sucesivamente hasta dar lugar a los vasos interlobulares que discurren por las columnas renales de Bertin, entre las pirámides medulares de Malpighio. Estos vasos alcanzan el límite corticomedular, ramificándose en arterias arciformes, de las que parten las arterias interlobulillares, que darán lugar a las arterias aferentes y eferentes al glomérulo, partiendo de estas últimas los vasos rectos, que profundizan en la pirámide renal entre los túbulos, hasta alcanzar la papila muy cerca del área cribosa (Figura 1.4).

En la red capilar que constituye el ovillo glomerular, se filtra aproximadamente el 20% del flujo plasmático renal para constituir la orina primitiva. A través del endotelio de la red de capilares sanguíneos que forman el glomérulo se produce una filtración glomerular selectiva en función del tamaño de los poros del endotelio, la carga electrostática sobre la barrera de filtración y el tamaño, forma y carga de la molécula en cuestión, permitiendo el paso de pequeñas moléculas (peso inferior a 5000 Da), de forma que se encuentran en el filtrado glomerular en concentraciones muy parecidas a las del plasma; sin embargo, el paso de moléculas mayores depende de su peso molecular y de su carga, siendo muy baja a partir de pesos moleculares superiores a 5000 Da y prácticamente despreciable para pesos superiores a 70000 Da.



**Figura 1.4** Esquema que muestra la organización vascular y tubular renal.

Una segunda red capilar nace de las arterias eferentes glomerulares y rodea los túbulos suministrando el sustrato necesario para su función y hacer que sean arrastrados el agua y los solutos reabsorbidos en este tramo de la nefrona. El ultrafiltrado que aparece en la cápsula de Bowman progresa a través de los túbulos en donde se producen complejos fenómenos de reabsorción (por transporte activo en contra de gradientes de concentración, ligadas a la absorción de sodio y agua o de forma pasiva a favor de gradiente de concentración) y/o secreción de múltiples sustancias, que acaban de conformar la composición final de la orina. Dichos fenómenos se producen de forma diferenciada a lo largo de la nefrona, difiriendo en gran medida en el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal y el tubo colector.

Esta breve descripción de la fisiología renal pretende ilustrar la elevada complejidad del proceso de formación de orina, proceso en que intervienen diversos mecanismos, más o menos complejos, de filtración, reabsorción y secreción diferenciados para las diversas sustancias que acaban por conformar la composición de la orina.

## 1.2 DESCRIPCIÓN DE LA UROLITIASIS

La urolitiasis consiste en la generación de cálculos en el tracto urinario. Un cálculo urinario<sup>3</sup> es una estructura sólida que se origina como consecuencia de alteraciones en el balance físico-químico y/o urodinámico del aparato urinario, desde los túbulos colectores hasta la uretra. Estas estructuras tienen un tamaño mínimo de 1000 micras, y están formadas básicamente por elementos cristalinos (sales urinarias) y, en menor medida, por elementos amorfos orgánicos y/o inorgánicos, que pueden ser mixtos con sustancias no cristalinas de alto peso molecular (matriz del cálculo).

En la actualidad se reconocen una serie de factores epidemiológicos favorecedores de la formación de cálculos (Tabla 1.1), unos dependientes del propio individuo (herencia, raza, edad, sexo, etc...) y otros en relación con factores medio-ambientales (hábitos dietéticos y de ingesta de líquidos, factores climáticos y estacionales, distribución geográfica, profesión y nivel socioeconómico, etc...)<sup>4</sup>. La influencia de ambos factores epidemiológicos debe tenerse en cuenta en cada caso de formación de cálculos.

### 1.2.1 Manifestación clínica de la litiasis renal

La existencia de un cálculo en el aparato urinario puede determinar múltiples manifestaciones clínicas<sup>5</sup>:

- *Litiasis asintomática*. La presencia de un cálculo calicilar, piélico, incluso ureteral, puede cursar de manera totalmente silenciosa, sin síntomas clínicos o biológicos.
- *Litiasis oligosintomática*. La existencia de un cálculo localizado en un cáliz, pelvis renal o divertículo calicilar suele ponerse en evidencia por síntomas de escasa intensidad: dolor sordo, molestia, incomodidad o pinchazos. Son dolores preferentemente lumbares, de tipo crónico, que se alivian o desaparecen con el reposo y que son desencadenados por la actividad, la marcha y la bipedestación.
- *Cólico nefrítico*. La manifestación más frecuente de la litiasis es el dolor que en su fase aguda constituye el cólico nefrítico. El dolor varía según los casos, en función de la localización, el tamaño, la superficie y la movilidad del cálculo, de la zona de impactación del mismo y de las alteraciones mecánicas o dinámicas del flujo urinario que éste ocasiona, determinando hiperpresión y disfunción de la vía urinaria. La impactación del cálculo aumenta la intensidad del cólico, dependiendo la localización y la irradiación del dolor del lugar donde quede enclavado.

---

<sup>3</sup> Schneider HJ, Berg W. Morphology of Urinary Tract Concretions. En: Schneider HJ. Urolithiasis: Etiology, Diagnosis (Handbook of Urology, Vol 17/1). Springer-Verlag, New York, 1985, pp. 1-136

<sup>4</sup> García M, Arrabal M, Campoy P. Litiasis: epidemiología, litogénesis y clasificación. En: Jiménez JF, Rioja LA. Tratado de Urología. Tomo I. J.R. Prous Editores, Barcelona (España), 1993, Capítulo 46, pp. 723-740

<sup>5</sup> Ibarz JM, Lázaro J, Rioja LA. Litiasis: sintomatología. En: Jiménez JF, Rioja LA. Tratado de Urología. Tomo I. J.R. Prous Editores, Barcelona (España), 1993, Capítulo 47, pp. 741-781

**Tabla 1.1** Marcadores y factores de riesgo de la urolitiasis.

<b>Marcadores de riesgo</b>	
<i>Edad</i>	Prevalencia máxima de la enfermedad entre la tercera y quinta década de la vida
<i>Sexo</i>	A nivel mundial, la litiasis afecta predominantemente al sexo masculino (relación 2-3/1). En la mujer predominan las litiasis de origen infeccioso o las relacionadas con defectos metabólicos, como la cistinuria o el hiperparatiroidismo, mientras que en el varón es más frecuente la litiasis oxalocálcica, así como la litiasis úrica.
<i>Raza</i>	Los asiáticos, sirios e indios parecen tener una mayor predisposición a padecer la enfermedad en contraposición con la raza negra, con una menor propensión, quizá por el aumento de los inhibidores de la cristalización en orina o por hipovitaminosis D.
<i>Herencia</i>	Papel importante en las litiasis úricas, xantínicas, cistinúricas y en algunos casos de litiasis cálcica secundaria a acidosis tubular renal o hipercalciuria familiar hereditaria.
<b>Factores de riesgo</b>	
<i>Dieta</i>	Puede favorecer la eliminación por la orina tanto de sustancias litógenas, como inhibidores de la cristalización. Son muy frecuentes los hábitos y excesos dietéticos peculiares, individuales y familiares que favorecen la litiasis en alguna de sus formas.
<i>Ingesta de líquidos</i>	El aporte oral de líquidos provoca una dilución osmótica extracelular, que produce una dilución urinaria y disminuye la precipitación cristalina en las personas predispuestas a formar cálculos. Por el contrario, la baja diuresis se considera como uno de los factores de riesgo más importantes en la litogénesis. El contenido mineral del agua podría contribuir a la formación de cálculos en enfermos predispuestos.
<i>Factores climáticos y estacionales</i>	El aumento de la temperatura atmosférica determina el de las pérdidas hídricas, la disminución de la diuresis y la elevación de la concentración urinaria de solutos, favoreciendo la enfermedad litiásica. Las manifestaciones clínicas de ésta aparecen con mayor frecuencia en la época estival.
<i>Distribución geográfica</i>	Parece claro que los efectos de la geografía sobre la litiasis urinaria se superponen a factores ambientales, alimentarios y socioeconómicos. La litiasis urinaria es frecuente en Estados Unidos, Europa central, países mediterráneos, Pakistán, India y China, a diferencia de Centroamérica, Sudamérica y la mayor parte de África.
<i>Nivel socioeconómico y profesión</i>	Un nivel socioeconómico alto conlleva una mayor frecuencia de dietas ricas en proteínas animales, azúcares, cosa que conduce a una mayor presencia urinaria de oxalato, urato y calcio, lo que aumenta el riesgo litógeno. Las profesiones que comportan una vida sedentaria o se relacionan con ambientes calurosos tienen una mayor frecuencia de litiasis. El estrés se considera como un factor de riesgo en la litiasis oxalocálcica. Los sectores más marginados, así como los países subdesarrollados, presentan un predominio de la litiasis infecciosa.

- *Cólico renal séptico*. Cuando un cólico renal producido por un cálculo obstructivo de la vía urinaria se complica con la colonización de gérmenes en la orina retenida en el tracto urinario suprayacente al elemento obstructivo, se conoce como cólico renal séptico. A la clínica propia del cólico renal se añaden fiebre y alteraciones hemodinámicas, hematológicas y metabólicas, principalmente. La infección de la orina retenida por encima de un cálculo obstructivo constituye una de las complicaciones más graves de la litiasis, por las repercusiones que determina sobre el funcionalismo renal y la agresión destructora del parénquima renal.
- La litiasis urinaria, sea o no obstructiva, favorece la aparición de la *infección urinaria*, así como el desarrollo de otras patologías, ya sea por la recurrencia de la infección urinaria o por el efecto del mismo cálculo sobre el urotelio.

Frecuentemente, la existencia de una litiasis urinaria se anuncia a través de un cólico renoureteral: cuando un cálculo transcurre desde la pelvis renal al uréter determina una obstrucción total o parcial, acompañándose de los síntomas que ya se han descrito. El objetivo principal del tratamiento del cólico es la eliminación del cálculo y los efectos que éste determina sobre el riñón y la vía urinaria, fundamentalmente la obstrucción. Hay que consignar que, cuando la forma y el tamaño (inferior a 3mm de diámetro) son favorables, el tratamiento conservador y sintomático de un cálculo que está emigrando puede lograr su expulsión, que según estadística varía del 60 al 90% de los casos<sup>6</sup>. Este tratamiento terapéutico buscará calmar el dolor y facilitar la expulsión del cálculo, mediante el uso de analgésicos (meperidina, morfina, metamizol, ketoroloco...), antiespasmódicos, antiinflamatorios (diclorenaco sódico, indoprofeno, ...), medidas complementarias como el tratamiento con antiedematosos (aescina sódica o estreptocinasa) e hiperdiuresis para favorecer la progresión del cálculo mediante hidratación forzada y fármacos diuréticos, así como otras medidas generales como reposo en cama, aplicación de calor... En otros casos, se requerirá actuación urológica para la eliminación del cálculo mediante la utilización de litofragmentación extracorpórea por ondas de choque, nefrolitotomía percutánea, ureteroscopía o cirugía convencional. Ante complicaciones, como un cuadro de cólico renal séptico, será necesario realizar con carácter de urgencia una derivación urinaria (cateterismo ureteral, técnica quirúrgica o nefrostomía percutánea), para drenar el foco séptico, posibilitar el flujo urinario, preservar el riñón y la vía urinaria de los efectos de la obstrucción y la infección, y conseguir un adecuado aporte de antibióticos.

---

<sup>6</sup> Drach GW. Transurethral ureteral stone manipulation. Urol Clin North Am 10, 1983, 708

### 1.2.2 Repercusión económica y social de la urolitiasis

La alta frecuencia de litiasis urinaria, el hecho de manifestarse habitualmente en forma de crisis de cólico renal y su repercusión sobre la función renal, convierten a esta enfermedad en una de las más importantes dentro de la urología, con una gran repercusión económica y social.

La litiasis urinaria tiene una prevalencia poblacional en España del 4,16% y una incidencia anual estimada del 0,27%, afectando al varón en un 4,5% y a la mujer en un 3,8%<sup>7</sup>. Se estima que el 12% de la población de la Unión Europea sufrirá a lo largo de su vida, al menos un proceso relacionado con la litiasis<sup>8</sup>, de manera que el riesgo de formar un cálculo en una persona de edad media se estima en un 20% para los varones y en un 5-10% para las mujeres<sup>9</sup>.

En cuanto a la resolución de la litiasis, ésta se da de manera espontánea con la expulsión del cálculo (y su correspondiente cólico renal) en un 70-75% de los casos, mientras que el 25-30% restante requiere actuación urológica<sup>10</sup>. Independientemente de su forma de resolución, la recidiva de un nuevo cálculo se observa en porcentajes tan elevados como un 50% a los 5 años, un 60% a los 8 años y de hasta un 70% en plazos mayores de tiempo<sup>11,12</sup>. Este hecho es debido a que, en la mayoría de casos, pese a la expulsión/extracción del cálculo, persiste la alteración urinaria causante de su formación.

En el plano económico, podemos afirmar que la litiasis urinaria genera unos costes elevados al precisar el paciente cuidados médicos repetidos<sup>13</sup>: 1) elevado número de asistencias e ingresos hospitalarios por cólico nefrítico, uropatía obstructiva, infección urinaria, etc..., 2) tratamientos conservadores del cálculo renal, 3) tratamientos intervencionistas del cálculo renal mediante litotricia extracorpórea, nefrolitotomía percutánea, uretereoscopia o cirugía convencional, 4) diagnóstico de los factores etiológicos responsables de la formación del cálculo, tratamiento farmacológico de las alteraciones metabólicas urinarias y seguimiento de la idoneidad del tratamiento para la corrección de dichas alteraciones.

---

<sup>7</sup> Rousand A, Pedrajas A. Estudio epidemiológico de la urolitiasis en España. Grupo de Urolitiasis. Asociación Española de Urología. Ed. Centro de Estudios Wellcome, Madrid, 1986

<sup>8</sup> Schneider HJ. Urolithiasis: Etiology, Diagnosis (Handbook of Urology, Vol 17/1). Springer-Verlag, New York, 1985, pp. 137-145

<sup>9</sup> Preminger GM. Renal calculi: Pathogenesis, diagnosis and medical therapy. Semin Nephrol 12, 1992, 200

<sup>10</sup> Alcover J, Rousand A, Ruiz-Marcellán FJ, Serrallach N, Serrate R. Efectos adversos de las ondas de choque. LVII Congreso Nacional de Urología. ENE Ediciones S.A., Madrid, 1992, pp. 23-37

<sup>11</sup> Ljunghall S. Incidence of upper urinary tract stones. Miner Electrolyte Metab 13, 1987, 220

<sup>12</sup> Ljunghall S, Danielson BG, A prospective study of renal stone recurrences, Br J Urol 1984, 56, 122

<sup>13</sup> Arrabal M, Lancina A, Ozonas M, Rousand A, Conte A. Aspectos económicos del tratamiento de la litiasis renal. Mesa Redonda VII Reunión Urolitiasis y Endoscopia Urinaria. Actas Urológicas Españolas 19, 1995, 486



### 1.3 LITOGÉNESIS URINARIA

La formación de un cristal y su crecimiento en la orina es un complejo proceso dinámico influido por numerosos factores, tal y como se recoge en las diferentes teorías litogénicas existentes<sup>4</sup>: teoría de la sobresaturación, teoría de la nucleación matricial, teoría de la ausencia de inhibidores, teoría de la epitaxia e inductores...

Si evaluamos globalmente el proceso litogénico tenemos que aceptar una teoría combinada en la que el fenómeno central corresponde al fenómeno de sobresaturación de diversas sustancias en la orina que pueden cristalizar formando concreciones sólidas, influido por la ausencia de inhibidores de la cristalización, por la presencia de sustancias promotoras de ésta y por factores relacionados con la morfoanatomía renal. En definitiva, para que se forme un cálculo urinario, la función renal debe permitir la excreción de una cantidad excesiva de especies químicas en condiciones físicas de saturación y pH adecuado que permitan su cristalización, favorecida por la presencia de determinados promotores de la cristalización y por ausencia absoluta o relativa de numerosos inhibidores de la precipitación y agregación cristalina. Evidentemente, la masa cristalina formada debe permanecer en el aparato urinario un periodo de tiempo suficiente hasta alcanzar un tamaño que impida su expulsión espontánea asintomática.

Normalmente existe un balance entre los factores dependientes de la composición de la orina (sobresaturación, promotores e inhibidores) y los factores morfoanatómicos mencionados, de modo que no se forman cálculos renales. Sin embargo, si el equilibrio se altera, probablemente acabe manifestándose como un episodio litiásico. Ello puede ocurrir, por ejemplo, en aquellos casos en los que se manifiesta una concentración anormalmente alta de compuestos litógenos en orina (hipercalciuria, hiperoxaluria, hiperuricosuria...) o ésta muestra un déficit importante de inhibidores (hipomagnesiuria, hipocitraturia, hipofiticuria...). Aunque en algunos casos, la presencia de una alteración importante de alguno de los factores anteriormente comentados puede explicar la formación de un cálculo, habitualmente es necesaria la coexistencia de alteraciones en los factores inherentes a la composición de la orina y los factores morfoanatómicos para el desarrollo de un cálculo, de tal forma que, en la mayoría de los casos, la eliminación de alguno de ellos es suficiente para evitar el desarrollo de un nuevo cálculo.

#### 1.3.1 Saturación urinaria

La saturación,  $S$ , de una sustancia ionizable se define como el cociente de su producto de actividad iónico en solución y su producto de solubilidad termodinámico. El producto de solubilidad termodinámico determina que, en unas determinadas condiciones de fuerza iónica y temperatura, las concentraciones termodinámicas límite de los iones

formadores de la sustancia ionizable en solución sean aquellas correspondientes al estado de equilibrio entre dicha solución (solución saturada) y la fase insoluble. Así, una disolución saturada ( $S=1$ ) es estable por un tiempo indefinido, es decir, el soluto no tiene tendencia a cristalizar y las partículas sólidas de soluto en contacto con la disolución saturada no tienen tendencia a disolverse. En cambio, una disolución sobresaturada contiene un exceso de soluto por encima de la solubilidad termodinámica ( $S>1$ ) y, por tanto, tenderá a precipitar hasta alcanzar un nuevo estado de equilibrio ( $S=1$ ).

Ahora bien, aunque la sobresaturación indica si el proceso de cristalización es posible, no tiene relación directa con la velocidad del proceso. De hecho, son conocidas las soluciones sobresaturadas que no dan lugar a la formación apreciable de cristales debido a limitaciones en la cristalización de origen cinético. Para explicar el mecanismo de la formación de un cristal debemos recurrir a la cinética química más que a los aspectos termodinámicos<sup>14</sup>. La primera demuestra que el choque simultáneo de tres especies en una disolución es altamente improbable, de manera que un cristal, constituido por miles de unidades, es poco probable que se forme mediante un choque simultáneo de tales especies. Así, la teoría actual sobre la formación de cristales admite que éstos se forman a través de tres etapas claramente diferenciadas: la nucleación (apartado 1.3.3.1), el crecimiento cristalino (apartado 1.3.3.2) y la agregación cristalina (apartado 1.3.3.3).

Teniendo en cuenta esta visión cinética de la cristalización, la orina, respecto a la concentración de sustancias que se eliminan por ella, se puede clasificar en tres tipos: infrasaturada, metaestable e hipersaturada (Figura 1.5), dependiendo de la solubilidad de dicha sustancia, pH, temperatura, presencia de complejantes y fuerza iónica del medio<sup>15</sup>.

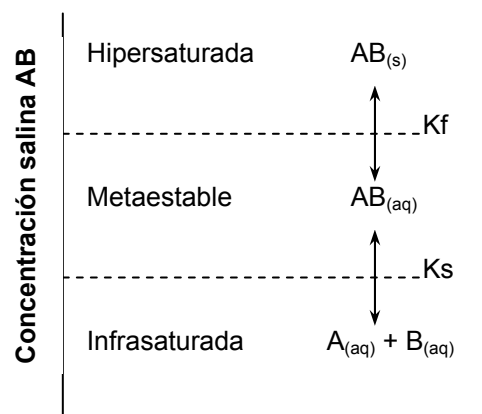


Figura 1.5 Esquema de los posibles estados de saturación urinaria.

<sup>14</sup> Grases F, Costa-Bauzá A, Söhnle O. Cristalización en disolución. Conceptos básicos. Editorial Reverté, S.A., Barcelona, 2000

<sup>15</sup> Robert M, Averous M. Notions fondamentales de la lithogénèse oxalo-calcique urinaire. Journal d'Urologie 100, 1994, 40

Cuando la concentración de un compuesto insoluble AB se halla por encima de su producto de formación ( $K_f$ , entendido como un producto de solubilidad condicionado a la formación espontánea del sólido) se dice que la solución está hipersaturada. En esta situación, la solución se torna inestable y tiene lugar la nucleación espontánea de la sal insoluble, así como su crecimiento cristalino y agregación. Por el contrario, si la concentración de AB es inferior a su producto de solubilidad termodinámico ( $K_s$ ), la solución está infraturada, y permanece estable. En aquella situación en que la concentración de AB se halla entre  $K_f$  y  $K_s$ , la solución se denomina metaestable. En esta solución no tiene lugar la formación espontánea de cristales AB, aunque, dado el estado de sobresaturación, sí pueden darse procesos de nucleación heterogénea (formación de cristales sobre otros componentes presentes en orina) y crecimiento cristalino, en función de la presencia de especies promotoras e inhibidoras de la cristalización en solución capaces de modular el estado de metaestabilidad.

La sobresaturación urinaria es, sin duda, un factor necesario para la nucleación, crecimiento y agregación del cristal, ya que constituye la fuerza conductora fundamental del proceso de cristalización. Aún así, por sí misma, no es una condición suficiente ya que incluso los sujetos sanos presentan orinas normalmente sobresaturadas<sup>16</sup>. A esto hay que añadir que no parece existir una relación directa entre nivel de sobresaturación y predisposición a la formación de cálculos renales (excepto para los casos de sobresaturaciones extremas provocadas, por ejemplo, por hipercalciuria o hiperoxaluria en determinados individuos), lo que indica la existencia de otra serie de componentes que tienden a acelerar (promotores) o ralentizar (inhibidores) el proceso litogénico<sup>17</sup>.

De este modo, la orina litogénica se halla sobresaturada en algunos momentos, y a veces continuamente, respecto al oxalato cálcico, el ácido úrico, los fosfatos cálcicos, entre otras sustancias. Habitualmente, las concentraciones de especies litógenas en orina hacen que únicamente se sobrepase el producto de formación de estas sales (Tabla 1.2) de forma intermitente, manteniéndose por debajo el resto del tiempo<sup>18</sup>, de manera que se requiere una presión o activación de los promotores o una desactivación o descenso de los inhibidores para la formación de los cristales correspondientes.

---

<sup>16</sup> Robertson WG, Peacock M, Nordin BEC. Activity products in stone-forming and non-stone forming urine. Clin Sci 34, 1968, 579

<sup>17</sup> Fleisch H. Inhibitors and promoters of stone formation. Kidney Int 13, 1978, 361

<sup>18</sup> Marshall RW, Cochran M. The relation between the concentration of calcium salts in the urine and renal stones composition in patients with calcium containing stones. Clin Sci 43, 1972, 433

**Tabla 1.2** Productos de solubilidad y de formación de diversas sales calculogénicas.

	- log Ks	- log Kf
<b>Oxalato cálcico</b> <sup>19</sup>	8.70	7.55
<b>Hidroxiapatita</b> <sup>20</sup>	55.96	-
<b>Brushita</b> <sup>20</sup>	6.70	5.70
<b>Ácido úrico dihidrato</b> <sup>21</sup>	8.64	-

### 1.3.2 Promotores de la cristalización

Los promotores de la cristalización son sustancias de diferentes características químicas (materia orgánica en forma de detritus celulares, agregados proteicos, macromoléculas, medicamentos o materiales cristalinos) que tienen la capacidad de combinarse con los componentes urinarios de determinadas fases cristalinas insolubles, catalizando la capacidad precipitante de éstas, a través de la formación de un complejo estable poco soluble (con un tamaño que sobrepasa el tamaño crítico) que hace precipitar dicha fase insoluble sin necesidad de que se verifiquen en orina sobresaturaciones demasiado elevadas.

Normalmente, estos promotores actúan como nucleantes heterogéneos y conforman el dispositivo estructural sobre el que se depositan las sustancias cristalinas insolubles que conforman la mayor parte del cálculo renal. Los activadores de la nucleación se hallan constituidos por las mucoproteínas litogénicas urinarias<sup>22</sup>, los focos de necrosis local en forma de placa<sup>23</sup> (placa de Randall) y los fenómenos de epitaxia<sup>24</sup>.

El mecanismo de actuación de las mucoproteínas litogénicas urinarias se caracteriza por su interacción con el fosfato y/o el calcio<sup>25,26</sup>, lo que da lugar a la polimerización de estas mucoproteínas, de manera que aumenta su peso molecular y disminuye su solubilidad. Las partículas de mucoproteína polimerizada se pueden considerar como esferulitas de fosfato cálcico. Éstas promueven entonces la interacción con más fosfato o oxalato, hasta que finalmente se forma el núcleo calculígeno.

<sup>19</sup> Ahlstrand C, Larsson L, Tiselius H. Variations in urine composition during the day in patients with calcium oxalate stone disease. J Urol 131, 1984, 77

<sup>20</sup> Ogawa Y. Impact of sodium-potassium citrate on the diurnal variations in urinary calcium oxalate and calcium phosphate saturation levels in normal individuals. Brit J Urol 73, 1994, 133

<sup>21</sup> Grases F, Villacampa AI, Costa-Bauzá A, Söhnel O. Uric acid calculi: types, etiology and mechanisms of formation. Clin Chim Acta 302, 2000, 89

<sup>22</sup> Boyce WH, Garvey FK. The amount and nature of the organic matrix in urinary calculi: A review. J Urol 76, 1956, 213

<sup>23</sup> Randall A. Papillary pathology as a precursor of primary renal calculus. J Urol 44, 1940, 580

<sup>24</sup> Mandel NS, Mandel GS. Epitaxis between stone-forming crystals at the atomic level. En: Smith LH, Robertson WG, Finlayson B. Urolithiasis. Plenum Press, New York, 1981, p. 469

<sup>25</sup> Boyce WH, Garvey FK. Ion-binding properties of electrophoretically homogenous mucoproteins of urine in normal subjects and in patients with renal calculus disease. J Urol 72, 1954, 1019

<sup>26</sup> Lian JB, Prien EL. The presence of protein bound  $\gamma$ -carboxyglutamate in calcium containing renal stones. J Clin Invest 59, 1977, 1151

Por su parte, la calcificación de componentes orgánicos o microlesiones situadas habitualmente a nivel de la papila renal dan lugar a la formación de focos de necrosis local en forma de placa, responsables de la constitución del núcleo litógeno anclado de los llamados cálculos papilares<sup>27</sup>.

En el caso de los fenómenos de epitaxia, éstos se producen por interacción de dos o más sustancias con redes cristalinas de características distintas, pero que coinciden en parte de la red. Los lugares de coincidencia de las redes constituyen el sitio de interacción, dependiendo la intensidad de ésta de la similitud de las redes. Los fenómenos de epitaxia o crecimiento de cristales sobre otras redes cristalinas similares se dan de manera abundante entre oxalato cálcico monohidrato y dihidrato, fosfatos cálcicos y oxalato cálcico monohidrato, y ácido úrico y oxalato cálcico monohidrato, dependiendo su intensidad tanto del grado de sobresaturación, como de la abundancia de lugares de coincidencia de ambas redes cristalinas.

A su vez, existen también los activadores de la agregación. Cabe destacar que la presencia de materia orgánica en la orina (procedente de restos bacterianos y/o inflamatorios) favorece la agregación de partículas cristalinas existentes en la orina. Los fenómenos de epitaxia pueden también jugar un papel similar al de la materia orgánica sobre la agregación. Además, el efecto del pH urinario favorece la agregación del ácido úrico cuando es bajo e incrementa la agregación de la hidroxapatita cuando es elevado.

Finalmente, otros agentes promotores a destacar son la presencia de cuerpos extraños en la vía urinaria (catéteres o suturas no reabsorbibles), la estasis urinaria (acumulo y estancamiento de orina), la infección por gérmenes ureolíticos (sólo responsable de la formación de cálculos infecciosos), así como la presencia de restos medicamentosos en la orina.

### 1.3.3 Inhibidores de la litiasis urinaria

Los inhibidores de la urolitiasis<sup>28,29</sup> son una serie de sustancias orgánicas e inorgánicas estabilizadoras de la orina, que permiten altas concentraciones urinarias de especies químicas susceptibles de cristalizar en solución, actuando bien sobre la superficie del cristal (interfiriendo en los sitios activos de crecimiento del cristal) o bien formando complejos más solubles al unirse a las sustancias cristalizables.

---

<sup>27</sup> Cifuentes L. Composición y estructura de los cálculos renales, Salvat Editores, Barcelona, 1984

<sup>28</sup> Robertson WG, Peacock M. Pathogenesis of urolithiasis. In: Scheneider HJ, Peacock M, Robertson WG, Vahlensieck W (eds). Urolithiasis: Etiology. Diagnosis. Springer-Verlag, New York, 1985; 185-334

<sup>29</sup> Grases F, Costa-Bauzá A, Conte A. Litiasis cálcica: inhibidores de la cristalización. En: Lancina JA.

Litogénesis urinaria de origen metabólico. J&C Ediciones médicas S.L., Barcelona, 2002. Capítulo 6, pp. 59-84

Así pues, los inhibidores de la cristalización pueden definirse como todas aquellas sustancias que impiden o dificultan la formación de un determinado material cristalino al intervenir en una o varias de las etapas fundamentales implicadas en su formación<sup>29</sup>: nucleación, crecimiento cristalino y/o agregación.

Cabe considerar que la efectividad de un inhibidor de la cristalización depende no sólo de la concentración en la que se encuentre presente en el medio, sino también de la fuerza impulsora de la cristalización, esto es, de la sobresaturación de la especie insoluble. Así, cuanto mayor sea la sobresaturación, mayor será la concentración de inhibidor requerida para su actividad. Por tanto, si bien la presencia de los inhibidores de la cristalización tiene relevancia en cualquier tipo de litiasis renal, éstos son realmente decisivos en aquellos casos en los que no se alcanzan sobresaturaciones demasiado elevadas (por ejemplo, en la litiasis oxalocálcica no hipercalcémica).

Entre los inhibidores de la urolitiasis<sup>15,17,28,29,30,31</sup> destacan diversas especies químicas de bajo peso molecular, como el citrato, el magnesio, el pirofosfato o el fitato, aunque también se han identificado varios compuestos macromoleculares, en su mayoría proteínas sintetizadas en el riñón, que parecen jugar un papel en el proceso de inhibición de la litogénesis, aunque no tienen un rol bien definido como para aconsejar su determinación: glicosaminoglicanos, nefrocalcina, proteína de Tamm-Horsfall, uropontina, fragmento 1 de la protrombina, litostatina renal y RNA. En la Tabla 1.3 se recogen algunos de los inhibidores de la litogénesis oxalocálcica y fosfocálcica, indicando las etapas de la cristalización que resultan afectadas por su actividad.

**Tabla 1.3** Inhibidores de la litogénesis.

	<b>Nucleación</b>	<b>Crecimiento cristalino</b>	<b>Agregación</b>
<b>Oxalato cálcico</b>	Citrato	Citrato	
	Macromoléculas	Nefrocalcina	Pirofosfato
	Magnesio	Glicosaminoglicanos	Citrato
	Glicosaminoglicanos	Magnesio	Glicosaminoglicanos
	Fitato	Pirofosfato	Proteína de Tamm Horsfall
	Fitato	Fitato	
<b>Fosfato cálcico</b>	Pirofosfato	Pirofosfato	
	Citrato	Citrato	Pirofosfato
	Fluoruro	Fluoruro	Citrato
	Magnesio	Magnesio	Glicosaminoglicanos
	Fitato		

<sup>30</sup> Grases F, Genestar C, Conte A. Inhibidores de la litiasis renal: evolución histórica, situación actual y perspectivas futuras. Med Clin 90, 1988, 83

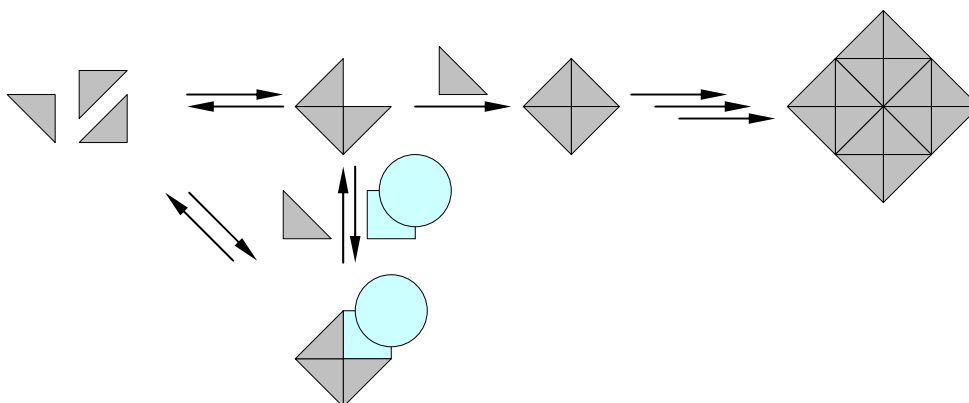
<sup>31</sup> Grases F, Conte A. Urolithiasis, inhibitors and promoters. Urol Res 20, 1992, 86

### 1.3.3.1 Inhibición de la nucleación

La nucleación es la primera etapa en la formación de una masa cristalina y consiste en la formación de amontonamientos de iones (núcleos cristalinos) constituyentes de la nueva fase en pequeñas zonas separadas en el interior de la antigua fase (solución). Algunos de los núcleos formados crecen y aumentan su volumen, mientras que otros se desmoronan. Cuando un núcleo alcanza una determinada dimensión crítica, entonces, inevitablemente aumenta su volumen en el sistema sobresaturado, se hace insoluble, y con el tiempo alcanza una dimensión macroscópica a través de la combinación de las etapas posteriores de crecimiento cristalino y agregación cristalina.

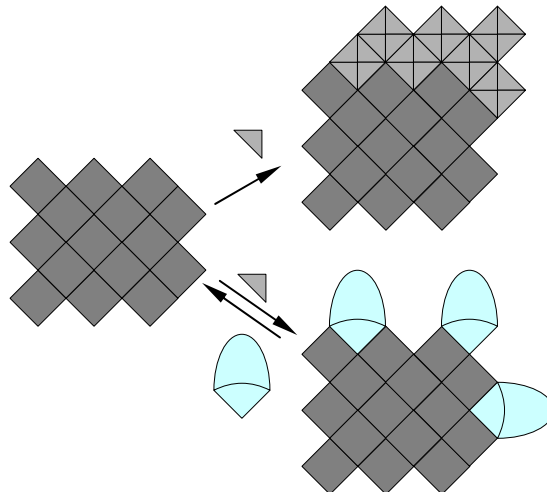
Por experiencia, sabemos que en muchos sistemas el cambio de fase no empieza en el momento en que es termodinámicamente posible (cuando el sistema está sobresaturado), sino en condiciones que frecuentemente sobrepasan el equilibrio. Esta estabilidad aparente del sistema en condiciones alejadas del equilibrio se debe a que el comienzo del cambio de fase viene condicionado por la formación de los gérmenes de la nueva fase en el sistema. Si por cualquier razón la nucleación no tiene lugar, aunque ello sea posible desde el punto de vista termodinámico, el sistema se comporta como “estable” (estado de metaestabilidad).

Es necesario destacar que la nucleación puede ser básicamente de dos tipos: homogénea o heterogénea. En la nucleación homogénea, el núcleo está formado por la unión de las especies que van a constituir los futuros cristales y, por tanto, la composición de núcleo y cristal es idéntica (Figura 1.6). Al exigir choques simultáneos y sucesivos de diversas especies en disolución, la nucleación homogénea es un proceso poco probable, de importancia sólo en presencia de elevados grados de sobresaturación. Los inhibidores de la nucleación homogénea serán, por tanto, especies capaces de unirse a los núcleos cristalinos en formación, impidiendo que alcancen el tamaño crítico e inicien la formación de un nuevo cristal.



**Figura 1.6** Esquema de la nucleación homogénea. Mecanismo de inhibición.

La nucleación para sobresaturaciones bajas, inferiores al valor crítico para la nucleación homogénea, se produce por otro mecanismo diferente: la formación de la nueva fase está condicionada por la presencia en el sistema en nucleación de una fase sólida extraña (nucleante heterogéneo) capaz de atraer y retener en su superficie a las especies que van a constituir el futuro cristal (Figura 1.7). Éste actúa como catalizador de la nucleación y facilita la génesis de los núcleos de la fase en nucleación, incluso a bajos niveles de sobresaturación. La nucleación heterogénea se produce más fácilmente cuanto menor es la incongruencia entre los parámetros reticulares de ambas fases (nucleante heterogéneo y cristal en formación), es decir, cuanto más parecidas sean las dos redes. Así, cuanto menos se diferencien las estructuras de las dos fases, más fácil será la nucleación heterogénea, y mejor “catalizador” de la nucleación será el sustrato. Los inhibidores de la nucleación heterogénea actúan impidiendo la formación de los núcleos heterogéneos o bien dificultando la unión de éstos con las especies que constituirán el futuro cristal.



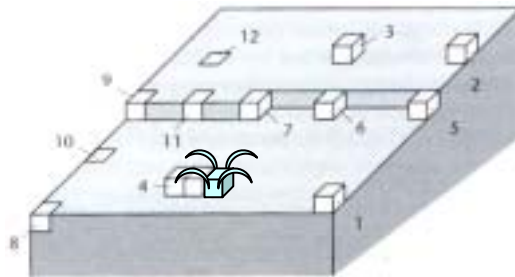
**Figura 1.7** Esquema de la nucleación heterogénea. Mecanismo de inhibición.

### 1.3.3.2 Inhibición del crecimiento cristalino

En disoluciones sobresaturadas, los núcleos con dimensiones críticas, originados por nucleación, crecen fácilmente por la incorporación gradual de las unidades constructivas que formarán el futuro cristal. Este proceso de crecimiento cristalino puede dividirse en varios procesos consecutivos: 1) llegada de la unidad constructiva a la capa de adsorción en la superficie del cristal desde la disolución, acompañada por su deshidratación parcial; 2) desplazamiento de la unidad constructiva por la capa de adsorción sobre la superficie del cristal, hasta alcanzar un lugar donde incorporarse al cristal, o hasta dejar la capa de adsorción y volver de nuevo a la disolución; 3) adsorción en el punto de incorporación acompañada de desolvatación completa; 4) formación de enlaces fuertes, con los que se alcanza la incorporación de la unidad constructiva a la red cristalina.



Las unidades constructivas se incorporan al cristal siguiendo un orden de energía de enlace decreciente (Figura 1.8): primero se ocupan los defectos de la superficie (8,10,12) y los defectos de posibles escalones (9,11). Después se ocupan las fracturas de escalón (7) hasta completar la fila. Mediante la unión de unidades constructivas en el resto de posiciones, se va completando el proceso, hasta formar otro plano cristalino completo. Los inhibidores del crecimiento cristalino serán, por tanto, sustancias capaces de adsorberse sobre la superficie del cristal formado, de manera que dificultan la incorporación de nuevas unidades constructivas al mismo, impidiendo el proceso de crecimiento.



**Figura 1.8** Esquema del crecimiento cristalino. Mecanismo de inhibición.

### 1.3.3.3 Inhibición de la agregación cristalina

La agregación primaria consiste en el crecimiento de cristales (cristales hijos) sobre las caras de un cristal ya existente (cristal padre) que favorece su desarrollo. Este tipo de agregación depende de la naturaleza de los cristales, siendo, por ejemplo, muy favorable para el oxalato cálcico<sup>32</sup>. Dado que la agregación primaria es fundamentalmente un tipo particular de crecimiento cristalino, presumiblemente los inhibidores del crecimiento cristalino también actuarán como inhibidores de la agregación primaria.

Por otro lado, la agregación secundaria consiste en la unión de una serie de cristales ya formados como consecuencia de enlaces débiles que se establecen entre ellos por puentes cristalinos o, en ocasiones por la presencia de sustancias orgánicas (por ejemplo, uromucoides) que actúan como puente de unión entre cristales<sup>33</sup>. Estos procesos son importantes cuando en el medio hay una importante cantidad de cristales, como es el caso de la litiasis infecciosa o de fosfatos cálcicos, donde suele darse una elevada cristaluria (orinas turbias). Los inhibidores de la agregación secundaria son sustancias que se adsorben sobre las superficies de los cristales, dotándolas de carga eléctrica de idéntico signo, lo que genera repulsiones entre ellos, impidiendo su posterior acercamiento para formar el agregado secundario.

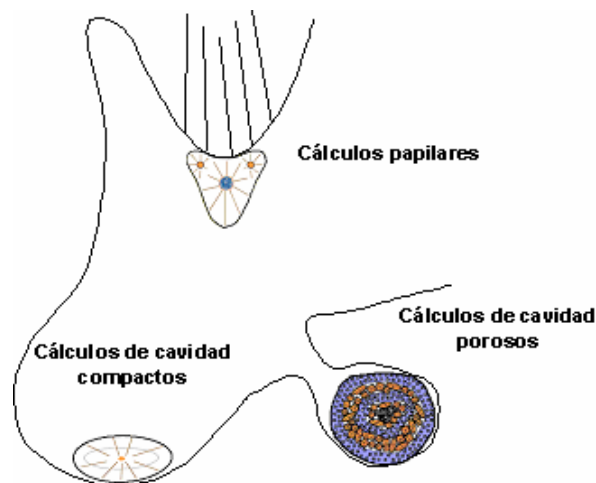
<sup>32</sup> Grases F, Masárová L, Söhnel O, Costa-Bauzá A. Agglomeration of calcium oxalate monohydrate in synthetic urine. *Brit J Urol* 70, 1992, 240

<sup>33</sup> Arrabal M, Lancina JA, García M. Criterios Clínicos y Tratamiento Actual de la Litiasis Urinaria. ENE Ediciones S.A., Madrid, 1990

### 1.3.4 Morfoanatomía renal

La formación de un cálculo clínicamente sintomático requiere, además de los requisitos ya comentados, que los cristales que lo conforman puedan crecer hasta alcanzar un tamaño que impida su expulsión espontánea asintomática del aparato urinario, para lo cual deben quedar retenidos en el tracto urinario superior<sup>4</sup>. Cabe tener en cuenta que la presencia de cristales en orina (cristaluria) y la urolitiasis no están siempre correlacionadas<sup>34</sup>, de manera que la cristaluria se considera un proceso útil para manejar un episodio de sobresaturación urinaria mediante la formación de un gran número de cristales pequeños que pueden ser rápidamente lavados del tracto urinario superior.

Los mecanismos de retención de cristales se encuentran relacionados con la morfoanatomía del aparato urinario<sup>35</sup>. Así, las cavidades con baja eficacia urodinámica y/o la presencia de un urotelio papilar dañado son los principales factores que favorecen la retención de cristales hasta conformar la entidad de cálculo renal (Figura 1.9).



**Figura 1.9** Mecanismos generales de retención cristalina y formación de cálculos.

La presencia de alteraciones del epitelio que recubre la papila renal (reducción o lesión de la capa protectora antiadherente del epitelio o necrosis papilar causada por analgésicos o cristaluria) favorece su actuación como nucleante heterogéneo. Como resultado, dependiendo del tiempo y nivel de los inhibidores de la cristalización, tiene lugar el desarrollo inicial de partículas ancladas de sales insolubles como oxalato cálcico, fosfato cálcico o ácido úrico, dependiendo del valor del pH urinario. Sobre tales nidos anclados en el urotelio, se desarrollará el resto del cálculo en función de las características urinarias particulares que concurren en dicho individuo.

<sup>34</sup> Baumann JM. Stone prevention: why so little progress? Urol Res 26, 1998, 77-81

<sup>35</sup> Grases F, Costa-Bauzá A, Ramis M, Montesinos V, Conte A. Simple classification of renal calculi closely related to their micromorphology and etiology. Clin Chim Acta 322, 2002, 29

El papel de algunas macromoléculas<sup>36</sup> (glicosaminoglicanos y glicoproteínas como la nefrocalcina o la proteína de Tamm-Horsfall) en la urolitiasis ha sido ampliamente debatido, con opiniones contradictorias, atribuyéndoseles tanto propiedades inhibitoras como promotoras de la cristalización de oxalato y fosfatos cálcicos. En cambio, si parece claro su papel como lubricantes en la protección del urotelio. Los glicosaminoglicanos, bien excretados por las propias células que tapizan los epitelios renales internos o bien metabolizados de proteoglicanos tisulares, se unen a las glicoproteínas de las membranas celulares, constituyendo una capa protectora antiadherente y continuamente renovada, que recubre las paredes renales internas. Esta capa protectora previene eficientemente la nucleación de cristales<sup>37</sup>, evitando la formación y desarrollo de depósitos sólidos sobre el epitelio renal, de tal manera que los cristales anclados sólo podrán formarse en puntos en los que la capa protectora ha sido destruida, dañada o tal vez ligeramente reducida. Igualmente, las glicoproteínas excretadas por el riñón parecen desempeñar un importante papel como protectoras del desarrollo de incrustaciones.

Las cavidades con baja eficacia urodinámica, como consecuencia de un flujo urinario disminuido, retienen la orina durante largos periodos de tiempo en el tracto urinario superior, favoreciendo la formación de cálculos renales. Se pueden distinguir dos tipos generales de cálculos de cavidad en función de las características de la zona en que se han formado:

- Los cálculos de cavidad compactos se forman como consecuencia de la retención de una partícula libre en una cavidad abierta durante un tiempo suficiente para que se desarrolle sobre ella una capa de cristales de oxalato cálcico, ácido úrico o fosfato cálcico, debido a sobresaturaciones urinarias elevadas y/o déficit de capacidad inhibitora de la cristalización. El constante balanceo del cálculo en formación debido al movimiento del cuerpo, que permite el acceso de orina sobresaturada a toda su superficie, asegura el desarrollo de una forma esférica y compacta con un corazón situado aproximadamente en su centro.
- Los cálculos de cavidad porosos se forman en cavidades cerradas, en que la orina queda estancada, como consecuencia de la sedimentación de algunas partículas (principalmente materia orgánica), que favorecen el desarrollo desordenado de grandes cristales de sustancias respecto a las que la orina está sobresaturada (oxalato cálcico, ácido úrico, fosfatos cálcicos,...), lo que resulta en una estructura porosa del cálculo.

---

<sup>36</sup> Grases F, Costa-Bauzá A, Llobera A. Glicoproteínas, glucosaminoglicanos y urolitiasis. Med Clin 105, 1995, 31

<sup>37</sup> Gill WB, Jones KW, Ruggiero KJ. Protective effects of heparin and other sulfated glycosaminoglycans on crystal adhesion to injured urothelium. J Urol 127, 1982, 152

Tal y como ha quedado demostrado estudios recientes, la capacidad de un inhibidor de la cristalización para impedir el desarrollo de cálculos se ve enormemente reducida en las zonas de escasa eficacia urodinámica<sup>38</sup>, ya que el poder inhibidor disminuye al aumentar el tiempo de exposición, con lo cual en zonas donde la orina puede quedar estancada disminuye la capacidad de los inhibidores de la cristalización.

### 1.4 CLASIFICACIÓN DE LOS CÁLCULOS RENALES

En general, los pacientes afectados de litiasis renal se pueden clasificar, de acuerdo con el componente químico mayoritario del cálculo<sup>39,40</sup>, en 6 grandes grupos generales:

- litiasis de oxalato cálcico (70-80% de los casos)
- litiasis de fosfatos cálcicos (5-10% de los casos)
- litiasis de ácido úrico (5-10% de los casos)
- litiasis de estruvita o infecciosa (5% de los casos)
- litiasis de cistina (1% de los casos)
- litiasis medicamentosa (1% de los casos)

El estudio minucioso de la composición y microestructura de los cálculos renales ha permitido obtener información crucial sobre los mecanismos físico-químicos de su formación. Esto ha posibilitado el desarrollo reciente de clasificaciones que relacionan la composición y estructura de los cálculos renales con sus mecanismos de formación y, por extensión, con los posibles factores urinarios responsables de su formación (etiología litiásica). Estas clasificaciones<sup>41,42,43</sup> son de gran importancia en la práctica clínica ya que permiten, a través de un análisis correcto de la morfología, estructura y composición del cálculo renal, conocer las posibles alteraciones urinarias susceptibles de haber desencadenado el episodio litiásico, proporcionando, de esta manera, información decisiva para el tratamiento de la enfermedad litiásica encaminado a evitar recidivas.

A continuación se describirán los distintos tipos de cálculos renales más frecuentes (en el Anexo 8 encontramos fotografías de los más comunes), según una de las clasificaciones antes mencionada<sup>43</sup>, en función de su composición y microestructura. De este modo, se indicarán brevemente los mecanismos de formación de los diferentes tipos de cálculos así como los principales factores etiológicos susceptibles de explicar su formación.

---

<sup>38</sup> Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A, March JG. Study of the effects of different substances on the early stages of papillary stone formation. *Nephron* 73, 1996, 561

<sup>39</sup> Prien EL, Frondel C. Studies in urolithiasis: I. The composition of urinary calculi. *J Urol* 57, 1947, 949

<sup>40</sup> Herring LC. Observations on the analysis of ten thousand urinary calculi. *J Urol* 88, 1962, 545

<sup>41</sup> Leusmann DB. A classification of urinary calculi with respect to their composition and micromorphology. *Scand. J. Urol.* 25, 1991, 141

<sup>42</sup> Daudon M, Bader CA, Jungers P. Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology. *Scanning Microsc* 7, 1993, 1081

<sup>43</sup> Grases F, Costa-Bauzá A, García-Ferragut L. Biopathological crystallization: a general view about the mechanisms of renal stone formation. *Adv Coll Interf Sci* 74, 1998, 169

### 1.4.1 Cálculos de oxalato cálcico

El oxalato cálcico constituye el componente mayoritario en más del 70% de los cálculos urinarios generados en los países industrializados, presentándose, en los cálculos humanos, en dos formas hidratadas diferentes, el oxalato cálcico monohidrato (COM) y el oxalato cálcico dihidrato (COD). Es importante considerar que la forma dihidratada del oxalato cálcico es la fase termodinámicamente inestable del oxalato cálcico, y que en contacto con la fase líquida se transforma gradualmente en la forma monohidratada que es la estable<sup>44</sup>. De hecho, la formación de cristales de COD sólo se puede explicar considerando factores cinéticos. Así, se ha demostrado que para valores elevados de la relación Ca/oxalato, fuerza iónica elevada, presencia de citrato en cantidades importantes y presencia de fosfato de calcio coloidal ( $\text{pH} \geq 6$ ), la producción de la forma dihidratada es cinéticamente más favorable que la formación de la forma monohidratada<sup>45</sup>.

Por tanto, no es de extrañar que los principales factores etiológicos relacionados con la formación de estos dos compuestos sean diferentes, de manera que la formación de COM se da frecuentemente en condiciones de normocalciuria (excreciones urinarias normales de calcio) asociadas con un déficit de capacidad inhibidora de la cristalización, mientras que las condiciones de hipercalciuria (niveles elevados de excreción urinaria de calcio) con excreción normal de citrato y  $\text{pH}$  urinario  $\geq 6$  favorecen la formación de COD<sup>46</sup>.

#### 1.4.1.1 Cálculos de oxalato cálcico monohidrato (COM)

##### 1.4.1.1.1 Cálculos papilares de COM

Los cálculos papilares de COM crecen anclados a la papila renal, de manera que en su superficie se puede distinguir un punto de anclaje papilar. Este tipo de cálculos dispone de un corazón (de composición variable) a partir del cuál crece una capa de COM estriada radialmente, formada por la yuxtaposición columnar de cristales laminares que crecen perpendicularmente a la superficie del corazón<sup>47</sup>. Estos cristales columnares quedan interrumpidos parcialmente debido a acumulaciones de materia orgánica aproximadamente cada  $100\mu\text{m}$ <sup>48</sup>, formando un patrón macroscópico regular de capas concéntricas alrededor del corazón, que son típicas para los cálculos de COM.

---

<sup>44</sup> Skrtic D, Furedi-Milhofer H, Markovic M. Precipitation of calcium oxalates from high ionic strength solutions. V. The influence of precipitation conditions and some additives on the nucleating phase. *J Crystal Growth* 80, 1987, 113

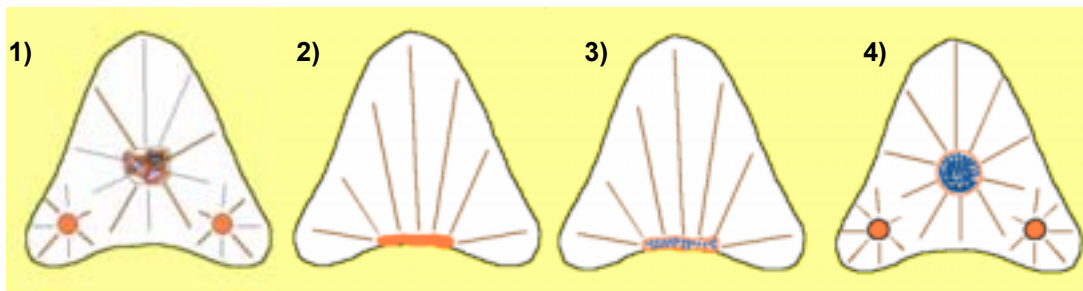
<sup>45</sup> Grases F, Millan A, Conte A. Production of calcium oxalate monohydrate, dihydrate or trihydrate. A comparative study. *Urol Res* 18, 1990, 17

<sup>46</sup> Pierratos AE, Khalaff H, Cheng PT, Psihramis K, Jewett MAS. Clinical and biochemical differences in patients with pure calcium oxalate monohydrate and calcium oxalate dihydrate kidney stones. *J Urol* 151, 1994, 571

<sup>47</sup> Iwata H, Nishio S, Wakatsuki A, Ochi K, Takeuchi M. Architecture of calcium oxalate monohydrate urinary calculi. *J Urol* 133, 1985, 334

<sup>48</sup> Iwata H, Iio S, Nishio S, Takeuchi M. Architecture of mixed calcium oxalate dihydrate and monohydrate stones. *Scanning Microsc* 6, 1992, 321

La retención de partículas cristalinas en el riñón se considera un requisito indispensable para la formación de los cálculos papilares<sup>49</sup>. La formación del núcleo representa la primera, y posiblemente la etapa más importante, en el desarrollo de un cálculo papilar de COM. Dicho núcleo, que se encuentra siempre situado cerca de la región de unión del cálculo a la papila (en particular, a una zona dañada de ésta), puede presentar básicamente cuatro estructuras diferentes (Figura 1.10).



**Figura 1.10** Disposición interna de los cálculos papilares de COM.

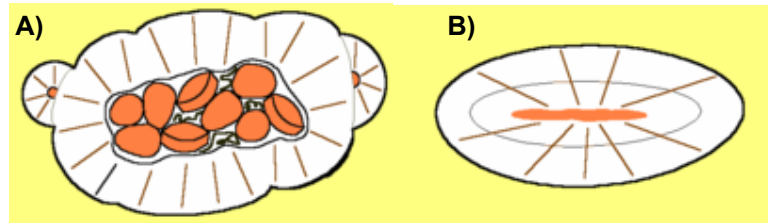
- 1) Corazón constituido básicamente por cristales de COM dispuestos aleatoriamente, que crecen sobre zonas dañadas del epitelio, presentando un patrón complejo constituido por zonas comunes de crecimiento y cristales gemelos.
- 2) Corazón constituido básicamente por materia orgánica (básicamente una amalgama de proteínas y detritus orgánicos procedentes de diferentes procesos patológicos como glomerulonefritis, enfermedades inflamatorias, hipertensión, neoplasia...) adherida a la superficie papilar dañada.
- 3) Corazón constituido por una capa densa, plana y fina de materia orgánica calcificada por hidroxapatita (HAP), adherida a la superficie mineralizada de un epitelio papilar dañado.
- 4) Corazón constituido por esferulitos de HAP (con fragmentos de materia orgánica en menor proporción) que crecen sobre un epitelio dañado en combinación con unas condiciones urinarias adecuadas para su cristalización (pH urinario > 6, baja excreción de Mg...).

Una vez formado el núcleo, éste en contacto con orina sobresaturada respecto a COM (y con un posible déficit de capacidad inhibidora de su cristalización) actúa de nido para el desarrollo posterior de la concreción macroscópica, induciendo el crecimiento de los cristales columnares de COM que constituirán la capa estriada del cálculo.

<sup>49</sup> Khan SR. Pathogenesis of oxalate urolithiasis: Lessons from experimental studies with rats. Am J Kidney Dis 17, 1991, 398

#### 1.4.1.1.2 Cálculos no papilares de COM

Los cálculos no papilares de COM, aquellos sin un punto detectable de anclaje a la papila renal, se forman en cavidades renales<sup>50</sup> y se pueden clasificar en dos grupos principales (Figura 1.11), en función de su estructura porosa (A) o compacta (B).



**Figura 1.11** Disposición interna de los cálculos no papilares de COM.

Los cálculos porosos no tienen un núcleo que sirva como nido para la organización y desarrollo del cálculo, sino que muestran una estructura interna de disposición aleatoria, conteniendo oquedades, completamente vacías o englobando pequeñas esferas de HAP, distribuidas irregularmente en el cálculo. La morfología externa del cálculo se encuentra determinada por la presencia de glóbulos de COM, de forma semiesférica y estructura autónoma. Éstos contienen un corazón, consistente en grandes cristales individuales de COM (generalmente superior a 50  $\mu\text{m}$ ), situados en la base del glóbulo, a partir de los cuáles se desarrollan los cristales columnares de COM hacia la superficie formando la capa radial del glóbulo. Este tipo de cálculos se forma en cavidades con aberturas estrechas, y por tanto, con una urodinámica deficiente. La sedimentación de partículas sólidas (principalmente materia orgánica) en estas cavidades podría representar la primera etapa de formación de estos cálculos, y la última etapa la constituiría el crecimiento regular de nuevos cristales en la superficie del sólido ya formado.

Los cálculos compactos contienen un núcleo que actúa claramente de nido para la organización y el desarrollo del cálculo, que crece en forma de cristales columnares de COM que emergen desde el corazón. El corazón, de forma delgada plana o esférica, está compuesto principalmente por materia orgánica sola o mezclada con HAP. Los cristales columnares de COM están orientados perpendicularmente a este corazón. Este tipo de cálculos se forma en cavidades abiertas con una urodinámica deficiente. El depósito de materia orgánica y ocasionalmente su calcificación por HAP representarían la primera etapa de su formación. Si la partícula incipiente no se elimina como cristaluria y la capacidad inhibidora de la cristalización de COM no es la suficiente durante el tiempo de retención de dichas partículas, se forman los cristales columnares de COM que emergen desde el corazón, hasta constituir la entidad de cálculo renal.

<sup>50</sup> Chandhoke PS, May DJ. Proc VIII Int Symp Urol, Dallas, 1996, pp. 50-51

A pesar de las diferencias morfológicas entre los cálculos porosos y compactos, los factores etiológicos son bastante similares: la retención de materia orgánica y, en algunos casos, la formación de HAP desencadenan el desarrollo de cristales columnares de COM. La diferente morfología de estos cálculos se atribuye a la distinta morfología de las cavidades en las que se forman estos cálculos (apartado 1.3.4).

#### 1.4.1.2 Cálculos de oxalato cálcico dihidrato (COD)

##### 1.4.1.2.1 Cálculos papilares de COD

Los cálculos papilares de COD consisten en un pequeño cálculo papilar de COM sobre el que crecen grandes cristales bipiramidales de COD, formando el cuerpo principal del cálculo como un gran agregado primario de cristales de COD generado mediante mecanismos de intercrecimiento y/o desarrollo de cristales gemelos (Figura 1.12).



Figura 1.12 Cálculos papilares de COD.

Estos cálculos se forman sobre un urotelio papilar dañado que primero induce la formación de COM y, posteriormente, con unas condiciones urinarias favorables (valores elevados de calcio urinario, valores normales de citrato, pH urinario > 6...) induce el desarrollo de COD sobre el núcleo papilar de COM.

##### 1.4.1.2.2 Cálculos no papilares de COD

Los cálculos no papilares de COD se deben clasificar en dos grupos claramente diferenciados por su morfología externa (Figura 1.13).

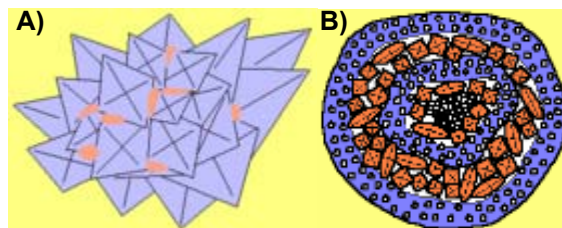


Figura 1.13 Cálculos no papilares de COD.



- A. Cálculos formados por cristales de COD bipiramidales y cantidades variables de COM resultado de la transformación del COD mediada por la presencia de líquido (orina). Estos cálculos también pueden contener pequeñas cantidades de HAP distribuida irregularmente entre los cristales de COD. La sedimentación de algunas partículas sólidas (principalmente materia orgánica y ocasionalmente HAP) en cavidades abiertas con una urodinámica deficiente puede inducir el desarrollo de cristales de COD en unas condiciones urinarias favorables (valores elevados del calcio urinario, valores normales del citrato urinario, pH urinario > 6...). Los cristales de COD se replican entonces a través de mecanismos de intercrecimiento y formación de cristales gemelos (agregación primaria), dando lugar a la formación del cálculo. Finalmente, cabe destacar que la proporción de COM procedente de la transformación depende del tiempo de permanencia del cálculo en el organismo, en contacto con la orina.
- B. Cálculos formados por cristales de COD, cierta cantidad de COM resultante de la transformación de COD e importantes cantidades de HAP y materia orgánica que, frecuentemente (aunque no siempre), se disponen alternativamente formando capas bien diferenciadas. Este tipo de cálculos se formaría en presencia de cavidades con aberturas estrechas y baja eficiencia urodinámica. La sedimentación de materia orgánica, y su calcificación por HAP (valores de pH urinario > 6) inducen el desarrollo de cristales de COD cuando coexisten niveles elevados de calcio y niveles normales de citrato. La existencia de capas alternadas de HAP y COD puede ser atribuida a fenómenos estacionales debido a cambios en la composición de la orina, consecuencia de modificaciones dietarias<sup>27</sup>. Así, por ejemplo, la existencia de valores relativamente elevados de pH urinario debido a dietas vegetarianas u ocasionalmente a acidosis tubular renal, podría favorecer la formación de HAP frente a la de COD.

### 1.4.2 Cálculos de fosfatos

Se pueden distinguir dos tipos principales de cálculos que contienen fosfatos<sup>41,42</sup>: los cálculos de fosfato cálcico formados básicamente de hidroxapatita (HAP)  $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$  o brushita (BRU)  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , y los cálculos infecciosos de estruvita (STR)  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Aún así, cabe destacar que también se han encontrado otros fosfatos diferentes, como carbonato apatita  $\text{Ca}_{10}(\text{OH},\text{CO}_3,\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  o whitlockita  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , como componentes mayoritarios o minoritarios de cálculos renales<sup>39,51</sup>.

---

<sup>51</sup> Murphy BT, Pyrah LN. The composition, structure and mechanisms of the formation of urinary calculi. *Brit J Urol* 34, 1962, 129

### 1.4.2.1 Cálculos de estruvita o cálculos infecciosos

Los cálculos infecciosos están formados por estruvita (20-60%), HAP y materia orgánica. Estos cálculos no presentan ninguna estructura fina regular, de manera que los cristales de estruvita, bien desarrollados (tamaño superior a 100  $\mu\text{m}$ ), están diseminados por el interior del cálculo, donde también aparecen esferas individuales de HAP y una cantidad considerable de materia orgánica amorfa distribuidas por todo el cálculo.

Este tipo de cálculo está inducido por ureolisis bacteriológica. Debido a infección en la orina aparecen partículas de materia orgánica, detritus celulares y residuos bacterianos en gran cantidad. Cuando las partículas alcanzan un tamaño lo suficientemente grande (durante el tiempo de residencia en el tracto urinario superior), si no son eliminadas hacia la vejiga por el flujo urinario, sedimentan en el riñón. Debido a la composición particular de la orina ( $\text{pH} > 6.5$  y elevado contenido de amonio debido a bacterias ureolíticas), los cristales de estruvita nuclean y crecen retenidos por el sedimento orgánico dentro del espacio calicular<sup>52</sup>. Los cambios en la posición del riñón debido al movimiento del cuerpo, determinan que la sedimentación se produzca sucesivamente en varias direcciones, dando lugar a la disposición interna desordenada. Este tipo de crecimiento puede provocar, en algunas ocasiones, que el material calculoso ocupe todo el espacio renal (cálculos coraliformes), evitando la expulsión de la orina al exterior y cesando así la producción de la orina de las nefronas conectadas a las papilas afectadas, lo que puede producir una situación grave y requerir intervención clínica.

### 1.4.2.2 Cálculos de fosfatos cálcicos

Para valores de  $\text{pH} < 5$ , la fase termodinámicamente estable en contacto con el sistema acuoso  $\text{Ca-PO}_4\text{-Mg}$  es la brushita, mientras que HAP lo es para valores de  $\text{pH} > 5$ <sup>53,54</sup>. Por este motivo, cualquier otro fosfato cálcico que se haya formado se transformará, dependiendo de las condiciones existentes, en uno u otro compuesto, a través de procesos mediados por disolución en el medio. En este sentido, el magnesio parece jugar una papel decisivo sobre la fase insoluble formada, ya que éste inhibe la cristalización de HAP, pero no ejerce influencia sobre la brushita<sup>55,56,57</sup>.

---

<sup>52</sup> Lerner SP, Gleeson MS, Griffith DP. Infection stones. *J Urol* 141, 1989, 753

<sup>53</sup> Nancollas GH, Koutsoukos PG. Calcium phosphate nucleation and growth in solution. *Prog Crystal Growth Charact* 3, 1980, 77

<sup>54</sup> Van Kemenade MJJM, Bruyn PL. A kinetic study of precipitation from supersaturated calcium phosphate solutions. *J Coll Interf Sci* 118, 1987, 564

<sup>55</sup> Salimi MH, Heughebaert JC, Nancollas GH. Crystal growth of calcium phosphates in the presence of magnesium ions. *Langmuir* 1, 1985, 119

<sup>56</sup> Bigi A, Falini G, Foresti E, Gazzano M, Ripamonti A, Roveri N. Magnesium influence on hydroxyapatite crystallization. *J Inorg Biochem* 49, 1993, 69

<sup>57</sup> Grases F, Söhnel O, Vilacampa AI, March JG. Phosphates precipitating from artificial urine and fine structure of phosphate renal calculi. *Clin Chim Acta* 244, 1996, 250

### 1.4.2.2.1 Cálculos de hidroxapatita

Los cálculos de HAP contienen también una cantidad considerable de materia orgánica (tanto en su superficie como en su interior) y presentan, por regla general, un interior cavernoso, en que no se detectan estructuras regulares formadas por crecimiento cristalino. En las cavidades del cálculo se acumula gran cantidad de esferas de HAP (con un tamaño entre 5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro y compuestas de material amorfo con cristales diminutos en su superficie), bien como entidades individuales o como aglomerados de diámetro aproximado de 50  $\mu\text{m}$ . La estructura fina propia de estos cálculos está caracterizada por la aparición frecuente de capas de material amorfo, llamadas capas de HAP aspidínica<sup>27</sup>. Una inspección detallada de éstas revela que están compuestas por esferas pequeñas de HAP, de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  de diámetro, estrechamente unidas por material amorfo. Finalmente, de manera ocasional, la masa del cálculo puede presentar también grandes objetos esféricos de tamaño superior a 100  $\mu\text{m}$ , constituidos por capas aspidínicas concéntricas, que se forman independientemente al resto del cálculo y que quedan atrapados posteriormente en su interior.

Este tipo de cálculos se forma en espacios confinados con baja eficacia urodinámica, en que sedimentan pequeñas partículas de materia orgánica que se distribuyen en forma de capa sobre la pared de la cavidad o la superficie interna del cálculo en desarrollo. Esta capa es gradualmente calcificada por HAP en condiciones urinarias favorables (pH urinario > 7 y una baja concentración de magnesio), dando lugar al cálculo de HAP.

### 1.4.2.2.2 Cálculos de brushita

Los cálculos de brushita no son generalmente compactos; suelen contener numerosas cavidades parcialmente llenas con partículas esféricas de HAP (inferior al 10% en peso de la masa del cálculo) y pequeñas cantidades de materia orgánica. Los cristales de brushita tienen forma plana y alargada y están ordenados radialmente dando lugar a grandes formaciones en las que están separados por fisuras microscópicas laterales. Además, frecuentemente los cristales quedan interrumpidos formando láminas visibles macroscópicamente, compuestas por nuevos cristales que han nucleado en la parte superior de una capa cristalina compacta. La estructura interna no consiste, pues, en cristales columnares individuales que abarcan toda la longitud de la formación, sino que está normalmente constituida por una distribución ordenada de pequeños cristales planos de brushita. Aun así, se pueden observar también agregados de cristales bien desarrollados. La superficie de estos cálculos está formada principalmente por puntas de cristales de brushita con forma plana.

Este tipo de cálculos se forma en cavidades renales con baja eficacia urodinámica con grandes aberturas. En condiciones urinarias favorables (concentración normal de magnesio alrededor de 60 mg/l y pH < 7) la brushita precipita en forma de cristales planos individuales, originados por mecanismos de crecimiento cristalino, junto con pequeñas cantidades de HAP<sup>57</sup>.

### 1.4.3 Cálculos de ácido úrico

Dependiendo de las condiciones urinarias predominantes, el ácido úrico cristaliza en disoluciones acuosas, como ácido úrico anhidro (AUA), o ácido úrico dihidrato (AUD) o una mezcla de ambas fases<sup>58</sup>, de manera que el AUD se transforma rápidamente en AUA<sup>59</sup>.

Aunque el AUA es la fase estable desde el punto de vista termodinámico, la temperatura, el pH, las sustancias presentes en el medio líquido y la concentración de ácido úrico determinan la naturaleza de fase sólida que precipita en cada caso. Así, el AUD es la única fase sólida que se forma en una orina sobresaturada respecto a las dos fases, cosa que sucede en condiciones de hiperuricosuria (altas concentraciones de ácido úrico en orina) y pH urinario inferior a 5,5. No obstante, cuando la orina está sobresaturada únicamente respecto a AUA, el AUD no puede generarse y solamente se forma el compuesto anhidro, siendo el principal factor de riesgo la existencia de un pH urinario inferior a 5,5.

La transformación de AUD en AUA en condiciones fisiológicas es lo suficientemente rápida para permitir la desaparición de la mayor parte de AUD del cálculo. El AUD que se podría formar inicialmente en abundancia, se transforma in vivo en AUA durante el desarrollo del cálculo, o posteriormente in vitro durante su almacenamiento antes del análisis. Así, los cálculos de ácido úrico están compuestos principalmente por AUA, algunas veces mezclado con una pequeña cantidad de AUD. No obstante, la presencia de cristales con grandes grietas, observables mediante microscopía electrónica de barrido, es una señal típica de cristales de AUD que se han transformado directamente en AUA, y sugiere que en algunos cálculos se forma preferentemente el AUD durante determinadas etapas de la calculogénesis.

Cabe destacar, finalmente, que se detectan, con cierta asiduidad, cristales de COM en el corazón del cálculo o diseminados en la masa del mismo, como consecuencia de los fenómenos de epitaxia que se manifiestan entre estos dos materiales cristalinos.

---

<sup>58</sup> Babic-Ivancic V, Furedi-Milhofer H, Brown WE, Gregory TM. Precipitation diagrams and solubility of uric acid dihydrate. *J Crystal Growth* 83, 1987, 581

<sup>59</sup> Hesse A, Berg W, Bothor C. Scanning electron microscopic investigations on the morphology and phase conversions of uroliths. *Int Urol Nephrol* 11, 1979, 11

#### 1.4.3.1 Cálculos compactos de ácido úrico

Este tipo de cálculo se genera principalmente mediante crecimiento cristalino de AUA sobre núcleos pre-formados que quedan retenidos en cavidades renales abiertas, aunque pueden contener también pequeñas partículas sedimentadas desde la orina. Sobre el corazón, que está en contacto continuo con la orina sobresaturada respecto a AUA, pero infrasaturada respecto a AUD, se desarrollan capas cristalinas más o menos compactas formadas básicamente por AUA. De acuerdo con las características del corazón y el interior del cálculo, éstos pueden a su vez dividirse en dos subgrupos<sup>21</sup>:

- I) Cálculos con un corazón compacto, consistente en cristales bien desarrollados de AUA poco conectados o pequeñas concreciones de COM. El interior del cálculo está formado por cristales columnares de AUA que radian hacia la periferia del cálculo, formados por cristalización directa desde la orina y no como resultado de la transformación de AUD. Esto implica la existencia de un crecimiento cristalino lento durante la generación del cálculo, indicando la presencia de una sobresaturación urinaria relativamente baja.
- II) Cálculos con un corazón poroso, consistente en una gran cantidad de cristales de AUA, desconectados y sin orden aparente. El interior del cálculo está compuesto por pequeños cristales de AUA, y aparentemente está estructurado en capas no columnares, alternando entre unas más pobladas y otras menos densas, dando la impresión de laminaciones concéntricas. La aparición periódica de estas laminaciones implica la existencia de episodios transitorios de corta duración en los que aumenta la sobresaturación de la orina, dando lugar a la formación de abundantes cristales pequeños, muy desorganizados y poco conectados de AUA, que causan la rotura completa de la estructura columnar.

#### 1.4.3.2 Cálculos porosos de ácido úrico

Los cálculos porosos de ácido úrico presentan una gran complejidad estructural, resultado de la superposición de tres procesos independientes que tienen lugar sucesivamente y/o simultáneamente durante el proceso de calculogénesis: el crecimiento cristalino, la sedimentación y la transformación producida en disolución de AUD en AUA. Estos cálculos se inician mediante la sedimentación de partículas presentes en la orina, como cristales de ácido úrico, oxalato cálcico o residuos orgánicos, en el fondo de cavidades renales cerradas o mediante el desarrollo de depósitos cristalinos consistentes en AUD cubriendo toda la cavidad, originando así dos subgrupos, que se diferencian en función de la apariencia de la capa externa del cálculo<sup>21</sup>:

- I) Cálculos de superficie irregular formados por material de origen orgánico, grandes bloques de AUD, cristales de COM y/o AUA. Estas partículas permanecen en contacto con la orina durante un periodo de tiempo considerable, de manera que crecen hasta alcanzar un tamaño apreciable, y en el caso de AUD puede transformarse en voluminosos cristales hexagonales de AUA. No se puede distinguir, incluso en áreas limitadas, una estructura organizada, excepto en la parte externa del cálculo, constituida por una capa delgada y bastante compacta de material cristalino.
- II) Cálculos formados por una capa exterior densa y bien desarrollada, compuesta predominantemente por grandes bloques de AUD originalmente formado que más tarde se transforma directamente en AUA como indica la aparición de grietas en la masa cristalina. Esta capa crea una especie de concha, con el interior vacío o parcialmente lleno de partículas (cristales, residuos orgánicos...) depositados desde la orina durante la formación del cálculo.

### **1.4.4 Otros cálculos menos frecuentes**

Existen otros tipos de cálculos menos frecuentes, como los de cistina (debidos a una alteración genética en el metabolismo de este aminoácido), medicamentosos (producidos por la insolubilidad urinaria de algunos medicamentos como el diurético triamterene, o el indinavir usado en el tratamiento del SIDA), u otros con bajos porcentajes de incidencia, que no se discutirán en esta memoria.

### **1.5 METODOLOGÍAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LA ETIOLOGÍA LITIÁSICA**

La enfermedad litiásica frecuentemente no proporciona al paciente ningún síntoma de alarma que le impulse a buscar ayuda médica. Además, cuando la enfermedad progresa pueden aparecer síntomas suficientemente vagos como para ser atribuidos a cualquier circunstancia banal. De esta manera se llega, con frecuencia, a consultar por primera vez al urólogo en estadios muy avanzados de la enfermedad, que en ocasiones se diagnostica cuando están presentes complicaciones importantes.

Hemos visto anteriormente que el cálculo no es más que la expresión final de trastornos subyacentes: elevada sobresaturación urinaria de sustancias cristalizables, déficit de inhibidores de la cristalización, cambios en el pH urinario, infecciones urinarias por gérmenes ureolíticos, presencia de nucleantes heterogéneos, zonas con flujo urinario reducido, alteraciones en el urotelio... El desconocimiento y, por tanto, la no resolución de estos diferentes factores litogénicos conducen, en muchos casos, a una indeseable recidiva de la enfermedad litiásica.

Desde un punto de vista clínico-sanitario resulta siempre atractivo poder identificar los principales factores de riesgo litógenos, cuyo conocimiento puede facilitarnos el control sobre la aparición de nuevos casos o sus recurrencias mediante el establecimiento de una profilaxis médica individualizada<sup>60</sup>. Dicha profilaxis<sup>61,62</sup> es posible, eficaz y significativamente menos costosa que cualquier otra terapéutica de intervención sobre el cálculo y, desde luego, supone un beneficio real para el enfermo porque le evita el futuro sufrimiento de un cólico nefrítico o de un posible tratamiento activo del cálculo, rebajando así los costes socioeconómicos de esta enfermedad.

En la actualidad, existe la posibilidad de reconocer una serie de trastornos litogénicos por medio del estudio metabólico-mineral del paciente y el análisis del cálculo, descubriéndose los factores causales en un número elevado de casos<sup>63</sup>.

### 1.5.1 Estudio metabólico-mineral (análisis de orina)

El estudio metabólico-mineral del paciente litiásico, encaminado al diagnóstico de los parámetros urinarios alterados susceptibles de desencadenar la enfermedad litiásica, se debe realizar entre 4-6 semanas después de la resolución del episodio litiásico, una vez que se han restablecido tanto la función renal como los hábitos dietéticos y la actividad diaria normal en el individuo.

El protocolo de estudio metabólico-mineral de urolitiasis que se expone a continuación está basado en el preparado por el Grupo de Urolitiasis de la Asociación Española de Urología, utilizado por muchos grupos de trabajo de urolitiasis de nuestro país. Dicho estudio<sup>5</sup> se realiza en tres fases, que van desarrollándose según los hallazgos obtenidos.

Así, la *fase I* va precedida de 7 días de dieta hipocálcica (400 mg de calcio/día), suprimiendo de la alimentación la leche y sus derivados, sin restricción de proteínas. Al séptimo día se recoge la orina durante 24 horas (de 8h a 8h), la orina de 2 horas (de 8h a 10h), una muestra de sangre venosa y se realiza sobrecarga oral con 1 g de calcio, recogiendo la orina de las 4 horas siguientes (de 10h a 14h). Las determinaciones que se realizan se recogen en la Tabla 1.4. Con los datos obtenidos pueden evaluarse correctamente las alteraciones que afectan a un número elevado de los pacientes; el resto requerirán la realización de estudios complementarios, en las *fases II* y *III*, aplicados básicamente al estudio de las alteraciones del metabolismo del calcio, del oxalato, del ácido úrico y de la cistina, entre otras alteraciones.

---

<sup>60</sup> Resnick MI. Are metabolic studies of urolithiasis necessary? J Urol 137, 1987, 960

<sup>61</sup> Yendt ER, Cohanin M. Prevention of calcium stones with thiazides. Kidney Int 13, 1978, 297

<sup>62</sup> Pak CYC. Citrate and renal calculi. Min Electrolyte Metab 13, 1987, 257

<sup>63</sup> Preminger GM. The metabolic evaluation of patients with recurrent nephrolithiasis: A view of comprehensive and simplified approaches. J Urol 141, 1989, 760

**Tabla 1.4** Esquema de análisis metabólico-mineral.

Parámetros determinados	
Sangre	urea, glucosa, ácido úrico, creatinina, proteínas totales, calcio, fósforo, magnesio, cloruro, sodio, potasio, fosfatasa alcalina y equilibrio ácido-base
Orina 24h	diuresis, densidad, fósforo, proteínas, glucosa, volumen/minuto, sedimento, calcio, potasio, magnesio, ácido úrico, creatinina, sodio, cloruro, oxalato y citrato
Orina 2h	diuresis, pH, acidez titulable, amonio, bicarbonato, calcio y creatinina
Orina 4h	calcio, fósforo, creatinina, ácido oxálico y magnesio

Cabe destacar que hay numerosos grupos de trabajo que realizan un estudio metabólico-mineral con dieta alimenticia libre en sangre, orina de 24 horas y orina de 2 horas, previamente al descrito con anterioridad, para una primera evaluación del enfermo.

En la Tabla 1.5 se definen los límites normales de excreción urinaria de calcio, oxalato, ácido úrico, fósforo, citrato y magnesio, así como de diuresis y pH urinario que marcan la presencia o no de la alteración urinaria correspondiente como factor de riesgo litógeno, indicando algunas de las posibles causas que explican dicha alteración<sup>5,64</sup>.

**Tabla 1.5** Principales alteraciones urinarias. Valores de riesgo y factores causales de la alteración.

Parámetro urinario (alteración)	Valores de riesgo	Posibles Causas de la Alteración
pH	<5,5	Diarrea crónica e ingesta elevada de proteínas animales
pH	>6,5	Acidosis tubular renal
Diuresis	< 1500 mL	Baja ingesta de líquidos Gran pérdida de líquidos (sudoración, ejercicio físico, diarreas o enfermedades intestinales malabsortivas).
Calcio (Hipercalciuria)	> 250 mg/24h (mujer) > 300 mg/24h (varón)	Idiopática (absortiva, renal o resortiva) Hiperparatiroidismo Hipervitaminosis D Metastasis óseas de tumores malignos Osteoporosis
Oxalato (Hiperoxaluria)	> 40 mg/24h	Resección intestinal. Enfermedad de Crohn. Desordenes metabólicos genéticos Deficiencia de vitamina B6 Otros: sobrecarga de oxalato en dieta, dieta hipocálcica
Fósforo (Hiperfosfaturia)	> 1100 mg/24h	Dietas excesivamente ricas en fosfato o polifosfatos (leche y derivados, pescado, coca-cola, embutidos...)
Ácido úrico (Hiperuricosuria)	> 600 mg/24h (mujer) > 800 mg/24h (varón)	Gota Síndromes mieloproliferativos Procesos tumorales o psoriasis Otros: sobrecarga de purinas en la dieta
Magnesio (Hipomagnesiuria)	< 70 mg/24h	Tratamiento de hipercalciuria con tiazidas o fosfato de celulosa
Citrato (Hipocitraturia)	< 350 mg/24h	Acidosis tubular renal (pH > 6,0) Otros: dietas ricas en proteínas animales, estados diarreicos crónicos, déficit de potasio, ejercicio físico agotador, abuso de sal,...

<sup>64</sup> Bihi G, Meyers A. Recurrent renal stone disease-advances in pathogenesis and clinical management. The Lancet 358, 2001, 651



Como hemos visto anteriormente, los cálculos formados por oxalato cálcico, fosfato cálcico y ácido úrico, en sus diversas variedades, son los más frecuentes en la litiasis urinaria. En la Tabla 1.6 se muestran resumidas las principales alteraciones urinarias responsables de la formación de los cálculos descritos a lo largo de esta introducción (apartado 1.4), muchas de la cuáles son susceptibles de diagnóstico mediante el análisis metabólico-mineral del paciente litiásico.

**Tabla 1.6** Clasificación de los cálculos renales según su micromorfología y etiología litiásica<sup>35</sup>.

Tipo y componente principal	% casos	Principales alteraciones urinarias
Cálculos papilares de COM	~13	Déficit de inhibidores (citrato y otros) pH > 6.0 (en presencia de HAP) Urotelio papilar dañado
Cálculos de cavidad de COM	~16	Déficit de inhibidores (citrato y otros) pH > 6.0 (en presencia de HAP) pH < 5.5 (en presencia de ácido úrico) Cavidades renales con baja eficacia urodinámica
Cálculos de cavidad de COD	~34	Hiper calciuria Déficit de inhibidores pH > 6.0 (en presencia de HAP) Cavidades renales con baja eficacia urodinámica
Cálculos de cavidad mixtos de COD y HAP	~11	Hiper calciuria pH > 6.0 Hipocitraturia Cavidades renales con baja eficacia urodinámica
Cálculos de cavidad de HAP	~7	pH > 6.0 Hipocitraturia Hipomagnesiuria Cavidades renales con baja eficacia urodinámica
Calculos infecciosos	~4	Infección urinaria
Cálculos de cavidad de BRU	~1	pH > 6.0 Déficit de inhibidores Cavidades renales con baja eficacia urodinámica
Cálculos de cavidad de ácido úrico	~8	pH < 5.5 Hiperuricosuria Cavidades renales con baja eficacia urodinámica
Calculos mixtos de COM y ácido urico	~3	Déficit de inhibidores pH < 5.5 Hiperuricosuria Cavidades renales con baja eficacia urodinámica Urotelio papilar dañado
Cálculos de cavidad de cistina	~1	Hiper cistinuria pH < 5.5 Cavidades renales con baja eficacia urodinámica
Cálculos poco frecuentes	~2	Cálculos de MO Cálculos medicamentosos Residuos post-LEOC Cálculos de carbonato cálcico Artefactos

### 1.5.2 Análisis de cálculo renal

Cada tipo de cálculo, en función de su composición y estructura, representa una determinada forma clínica de la enfermedad litiásica, con una etiología, pronóstico, evolución y tratamiento diferentes. Desde el punto de vista clínico, el estudio del cálculo debería ser, pues, esencial para el diagnóstico y tratamiento del paciente aquejado de litiasis renal, ya que proporciona información fundamental relativa a la patogénesis de la enfermedad (anormalidades urinarias de origen metabólico y/o morfoanatómico, presencia de infección,...). Aunque las técnicas analíticas utilizadas para el estudio de los cálculos son diversas<sup>5</sup>, en el estudio de los cálculos con una finalidad asistencial, las técnicas consideradas esenciales son el estudio morfológico y estructural mediante microscopía estereoscópica, complementada con la microscopía electrónica de barrido que incorpora espectroscopia de rayos X por energía dispersiva (SEM-EDS) y la espectroscopia infrarroja (IR)<sup>65,66</sup>. Mediante el uso de la metodología de análisis de cálculos renales resumida en la Figura 1.14 es posible llegar a un diagnóstico exacto en la práctica totalidad de los casos, determinando sus componentes mayoritarios y minoritarios, y elucidando su estructura interna y externa, pudiendo obtener así información útil sobre la etiología de todos los tipos de cálculos renales.

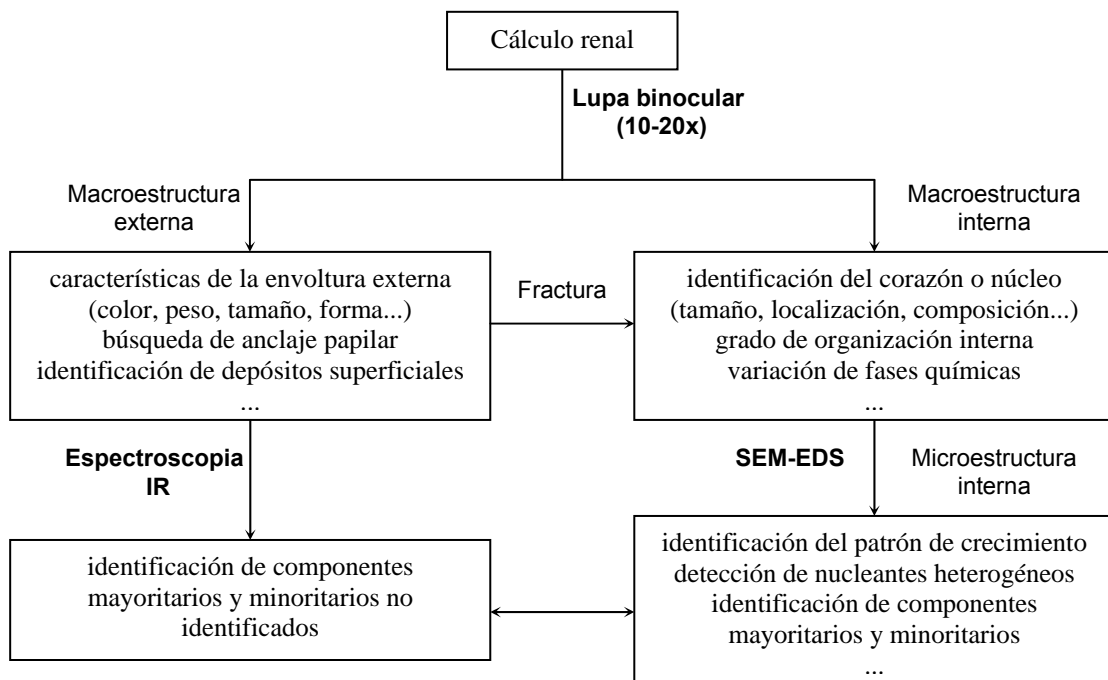


Figura 1.14 Metodología básica de estudio de cálculos renales.

<sup>65</sup> Conte A, Grases F. Manual para el estudio de los cálculos renales. Ed. CEGE Comunicación Gráfica S.L., Barcelona, 1996

<sup>66</sup> Grases F, García-Ferragut L., Costa-Bauzá A. Analytical study of renal calculi. A new insight. Recent Res Devel In Pure & Applied Anal Chem, 1, 1998, 187

El examen del cálculo bajo la lupa binocular (4-100X) permite una primera aproximación a la composición, morfología y estructura del cálculo urinario, así como una adecuada selección del plano de fractura óptimo (en el caso de cálculos completos) que nos permita obtener la máxima información sobre la disposición interna del cálculo, evitando la alteración o destrucción de la estructura de interés. El estudio sistemático de las características macroscópicas de los cálculos urinarios permite, en un gran número de casos, sacar conclusiones acertadas sobre la composición y disposición estructural del cálculo y clasificarlo en una de las formas clínicas descritas en el apartado 1.4, a partir de características como la forma, el color, el peso, el tamaño, la consistencia y el aspecto de la estructura externa e interna (existencia de un área adherida al epitelio, presencia de depósitos superficiales, variación de fase química o cristalina entre las diferentes zonas del cálculo, grado de organización interna, localización y tamaño del núcleo del cálculo, presencia de laminación o estructura radial del cálculo...). No obstante, para ello se precisa cierta experiencia y el apoyo confirmativo de técnicas analíticas complementarias, como SEM-EDS o la espectroscopia IR, que permiten un estudio más detallado de las zonas más interesantes (por ejemplo, la zona inicial del cálculo) o diferenciadas del resto del cálculo.

La técnica de SEM-EDS permite la observación microestructural de los cálculos (hasta 30000-60000X), así como el análisis elemental de microáreas del espécimen observado, enfatizando diversos aspectos de la estructura fina: composición del corazón y/o punto de anclaje papilar (si están presentes), identificación de microcomponentes (decisivos para establecer la etiología de la formación del cálculo en algunas ocasiones), composición de los compuestos cristalinos (permite detectar la presencia en los cálculos de elementos muy representativos de algunas sales insolubles como azufre en el caso de la cistina o magnesio en el caso de la estruvita), forma de los cristales, conversiones cristalinas, variación de fases cristalinas (que informan sobre cambios en la composición urinaria durante el desarrollo del cálculo), características de los agregados, relaciones íntimas entre cristales y material orgánico...

La espectroscopia IR es una técnica específica, simple y rápida para la identificación tanto de los componentes cristalinos (incluyendo los diferentes grados de hidratación), como de los componentes amorfos de los cálculos. Si la inspección superficial e interna del cálculo revela una apariencia homogénea, la identificación de la composición del cálculo se puede llevar a cabo pulverizando todo el cálculo y tomando una muestra promedio para el estudio. En cambio, si la estructura es heterogénea, será necesario recoger partes de los diferentes materiales con un escalpelo y llevar a cabo las diferentes identificaciones.

### 1.5.3 Tratamiento profiláctico de la litiasis

Tal y como hemos visto, la alteración responsable de la formación del cálculo es susceptible de diagnóstico y tratamiento mediante cambios dietéticos, fármacos o ambos, reduciendo con ello la agresividad de la enfermedad y, en consecuencia, el número de recidivas<sup>67</sup>. Los tratamientos profilácticos<sup>68,69</sup> encaminados a evitar recidivas se deben basar en su facilidad de manejo, ser baratos, eficaces, con mínimos efectos secundarios y con buena capacidad de implantación en la vida diaria de pacientes que, pasado un tiempo de su último episodio y al encontrarse bien, tienen tendencia al abandono de cualquier medida terapéutica que les suponga trastorno. Parece lógico asumir, dados los enunciados previos, que la profilaxis basada en la dieta sería el tratamiento ideal de estos pacientes siempre y cuando no fuera excesivamente restrictiva o inasumible por los gustos de la población. Ahora bien, el papel de la dieta en la profilaxis es limitado y de comportamiento variable según los factores fisiopatológicos a corregir (hipercalciuria, hiperuricosuria, hiperoxaluria, ...), de manera que normalmente se combinan diversas recomendaciones dietéticas con tratamientos farmacológicos específicos para la corrección de dichas alteraciones. En la Tabla 1.7 se recogen algunas de las recomendaciones dietéticas y tratamientos farmacológicos generalmente utilizados en el tratamiento de la litiasis cálcica, úrica e infecciosa.

**Tabla 1.7** Recomendaciones dietéticas y tratamiento farmacológico de la urolitiasis.

	<b>Recomendaciones dietéticas</b>	<b>Tratamiento farmacológico</b>
<b>Litiasis cálcica</b>	Restricciones de sodio	Citrato potásico
	Consumo de cítricos (evitar en litiasis fosfocálcica)	Suplementos de calcio
	Restricciones de calcio	Suplementos de magnesio
	Restricciones de oxalato	Suplementos de fitato
	Evitar dietas excesivamente vegetarianas	Fosfato de celulosa
	Consumo de frutos secos, legumbres y derivados integrales	Tiazidas
	...	Jarabe de fosfatos
<b>Litiasis úrica</b>	...	....
	Restricción de proteínas animales	Citrato potásico
	Ingesta de bebidas carbónicas, cítricos y verdura	Bicarbonato sódico
	Restricción de bebidas alcohólicas	Acetazolamida
<b>Litiasis infecciosa</b>	...	Alopurinol
	...	....
	Restricción de bebidas alcanizantes	Tratamiento antibiótico

<sup>67</sup> Barcelo P, Rousand. A. Temas actuales de urología y nefrología. Fundación Promedic, Barcelona, 1994

<sup>68</sup> García E. Tratamiento médico de la litiasis. En: Jiménez JF, Rioja LA. Tratado de Urología. Tomo I. J.R. Prous Editores, Barcelona, 1993. Capítulo 48, pp. 783-792

<sup>69</sup> Reina MC, Alonso JJ, García M. Rol de la dieta en la litogénesis. En: Lancina JA. Litogénesis urinaria de origen metabólico. J&C Ediciones médicas S.L., Barcelona, 2002. Capítulo 2, pp. 11-23

El tratamiento profiláctico más adecuado en cada paciente está encaminado a eliminar o minimizar las alteraciones urinarias que éste presenta. En este sentido, la compleja interrelación entre los diferentes parámetros urinarios puede provocar que un tratamiento farmacológico o dietario conduzca a la alteración de otro parámetro inicialmente no alterado, incurriendo en riesgo de generación de otras enfermedades u otro tipo de litiasis. Así, por ejemplo, una restricción excesiva de calcio en la dieta podría conducir a problemas derivados de su escasez como la osteoporosis. Además, en ausencia del contenido cálcico normal, la absorción de oxalato puede aumentar considerablemente (hiperoxaluria). Otro caso relativamente común, es el tratamiento con citrato potásico o bicarbonato de la litiasis úrica, en que se debe controlar estrictamente el pH urinario, ya que su aumento puede incrementar el riesgo de cristalización de fosfato cálcicos.

Finalmente, cabe comentar que en el tratamiento de la urolitiasis se dan con frecuencia una serie de recomendaciones generales orientadas a la obtención de una adecuada dilución de la orina. En este sentido, se ha relacionado una menor ingesta de líquidos con un mayor riesgo de aparición de nuevos incidentes litiásicos<sup>70</sup>. Así, se recomienda el consumo de 250 cc de agua en cada comida, cada 3-4 horas (incluso durante la noche), asegurando una diuresis urinaria mínima de 2 L/día. Evidentemente, esto puede requerir un cambio en el modo de vida, evitando las pérdidas por respiración y sudoración en ejercicios violentos, trabajos pesados o deportes que puedan conducir a una hiperconcentración de las sales litógenas. Además, en la época cálida se debe evitar la deshidratación, disminuir la exposición al sol y a la luz ultravioleta por favorecer la síntesis de vitamina D que aumenta la absorción intestinal de calcio y tener presente una adecuada reposición de las pérdidas de líquidos que pueden acentuar el riesgo litógeno.

### 1.6 ESTADO ACTUAL DE LA ENFERMEDAD LITIÁSICA

Actualmente, la litiasis renal, calificada como uno de los desordenes más dolorosos que afectan a los humanos, sigue afectando a un amplio sector de la población (entre el 4 y 15%), constituyendo una enfermedad con unos costes socioeconómicos muy elevados. Recientemente, se han estimado los costes totales anuales derivados de la urolitiasis en Estados Unidos sobre los 2.000 millones de dolares<sup>71</sup>. Además, cabe destacar el incremento en la frecuencia de la urolitiasis en las naciones desarrolladas, fuertemente correlacionado con la riqueza creciente y el gasto en comida per capita incrementado<sup>72</sup>.

---

<sup>70</sup> Curhan GC, Willet WC, Speizer FE. Beverage use and risk for kidney stone in women. *An Intern Med* 128, 1988, 534

<sup>71</sup> Clark JY, Thompson IM, Optenberg SA. Economic impact of urolithiasis in the United States. *J Urol* 154, 1995, 2020

<sup>72</sup> Robertson WC, Peacock M. The pattern of urinary stone disease in Leeds and in the United Kingdom in relation to animal protein intake during the period 1960-1980. *Urol Int* 37, 1982, 394

Los progresos conseguidos en los últimos veinte años en los métodos de extracción del cálculo (procedimientos endourológicos y litotricia extracorpórea por ondas de choque), han supuesto un cambio radical en el abordaje terapéutico de esta patología, consiguiendo una gran eficacia con una significativa menor morbilidad, mejor tolerancia y una reducción considerable de la convalecencia. Sin embargo, el impacto causado por estas nuevas modalidades terapéuticas ha supuesto también un abandono progresivo de la evaluación de los factores urinarios de riesgo implicados en la formación de los cálculos, que tienen como fin el establecer medidas profilácticas adecuadas para evitar la recidiva. Evidentemente, el problema no se limita a la eliminación del cálculo ya que si la alteración responsable de la formación del cálculo permanece, el riesgo de génesis de uno nuevo persiste, de manera que el 50-70% de los individuos litíasicos no tratados desarrollan nuevos cálculos en menos de 5 años.

Paralelamente, en los últimos años se han producido importantes progresos en el conocimiento de las alteraciones metabólicas y factores de riesgo específicos implicados en las diferentes variantes de la litogénesis<sup>64,73</sup>, en el perfeccionamiento de los métodos de estudio de los mecanismos de formación de cálculos renales, así como de la promoción e inhibición de la cristalización<sup>74,75</sup>, en el papel de la dieta en la litogénesis<sup>69</sup>, y en la aparición de terapias preventivas selectivas<sup>76</sup> para el control de la recidiva mediante actuación dietética o farmacológica. En este sentido, los progresos conseguidos en los últimos años han permitido controlar médicamente muchas de las alteraciones que conducen a la formación de cálculos en un sector amplio de pacientes, reduciendo la recurrencia hasta un nivel por debajo del 25% a largo plazo<sup>77</sup>.

A pesar de los avances anteriormente comentados, en la actualidad aún se desconocen todas las causas responsables de la formación de los diferentes tipos de cálculos y, en consecuencia, no se dispone de todas las soluciones para esta patología renal. A esto hay que unir el hecho que muchos urólogos hayan perdido el interés en la prevención de recidivas, centrando su atención de manera casi exclusiva en la eliminación del cálculo. Como consecuencia, la industria farmacéutica ha cancelado, en gran medida, el patrocinio y financiación de la investigación en litiasis renal<sup>34</sup>.

---

<sup>73</sup> Smith LH. The medical aspects of urolithiasis: An overview, *J Urol*, 141, 1989, 707

<sup>74</sup> Grases F, Prieto RM, Costa-Bauzá A. In vitro models for studying renal stone formation: a clear alternative. *ATLA* 26, 1998, 481

<sup>75</sup> Grases F, Costa-Bauzá A, March JG. Artificial simulation of the early stages of renal stone formation. *Br J Urol* 74, 1994, 298

<sup>76</sup> Tiselius HG, Ackermann D, Alken P, Buck C, Conort P, Gallucci M. Guidelines on urolithiasis, *Eur Urol* 40, 2001, 362

<sup>77</sup> Coe FL, Parks JH, Asplin R. The pathogenesis and treatment of kidney stones, *N Eng J Med* 327, 1992, 1141

La explicación de este insatisfactorio estado de la cuestión se puede encontrar en la propia naturaleza de la urolitiasis, que implica la conjunción entre fisiología renal y cristalización, incluyendo por supuesto, aspectos bioquímicos y analíticos.

En lo referente al carácter multifactorial de la enfermedad, debemos considerar que la urolitiasis es un proceso complejo, que implica la formación de estructuras sólidas en las que coexisten cristales y materia orgánica, desarrolladas en un medio líquido complejo como es la orina y en cavidades renales con paredes de tejido vivo. En este sentido, son muchos los disturbios (desordenes metabólicos, alteraciones del transporte de iones a lo largo del tracto intestinal y el riñón, factores relacionados con la dieta, factores genéticos, interacciones cristal-células epiteliales renales...) que pueden influenciar las relaciones fisicoquímicas en la orina favoreciendo el desarrollo de un cálculo. Obviamente, el elevado número de factores participantes en la formación del cálculo (sobresaturación, acción de promotores e inhibidores de la cristalización, fuerza iónica, complejantes, transformación de fases cristalinas, retención de cristales en el tracto urinario...) dificulta enormemente el estudio adecuado de la enfermedad. Además, cabe considerar que el peso específico de un determinado factor en un determinado tipo de litogénesis puede depender en gran medida de la naturaleza y magnitud de otros factores. En este sentido, cabe destacar que en la actualidad aún se desconocen, en gran parte, la importancia de las interacciones entre componentes urinarios sobre los procesos de promoción e inhibición de la cristalización. A esto hay que añadir el desconocimiento de posibles promotores o inhibidores de la cristalización presentes en orina, así como de la función real de muchas sustancias urinarias en los procesos de cristalización.

Desde el punto de vista analítico las limitaciones existentes también son evidentes. Como hemos visto anteriormente, el estudio adecuado de los cálculos renales es un paso esencial en el diagnóstico y tratamiento inicial del paciente litiásico. A pesar del gran progreso alcanzado en este campo, la mayoría de estos avances han sido utilizados básicamente para propósitos científicos y han trascendido poco al campo clínico. De hecho, la gran parte de los laboratorios clínicos sólo llevan a cabo un análisis cualitativo del cálculo mediante métodos de química húmeda o espectroscopia IR del cálculo pulverizado, métodos de más que dudosa utilidad, ya que omiten detalles que conciernen a componentes minoritarios o la microestructura interna, cruciales para determinar el mecanismo de formación del cálculo y de gran valor al establecer consejos terapéuticos que prevengan la recurrencia de formación de cálculos.

En cuanto al diagnóstico de las alteraciones litógenas cabe destacar algunas limitaciones de los protocolos de análisis metabólico-mineral. En primer lugar, el hecho que la orina sea un fluido corporal complejo cambiante en el tiempo (dentro de un mismo día y a lo largo del año), dificulta el control y el diagnóstico de las alteraciones urinarias responsables de la litogénesis. En este sentido, la representatividad de la orina de 24 horas, comúnmente utilizada en el diagnóstico de la etiología litiásica, puede resultar escasa en muchos casos, más si tenemos en cuenta que la muestra de orina de 24 horas está fuertemente condicionada por los hábitos del individuo (ejercicio, dieta, consumo de fluidos...). Existe, pues, la necesidad de desarrollar metodologías alternativas para un control más efectivo de las alteraciones litógenas, quizás mediante la utilización de otros especímenes urinarios (diferentes a la orina de 24 horas), que proporcionen mayor representatividad en el diagnóstico de la urolitiasis. Igualmente, sería necesario un mayor conocimiento de la variación diaria y estacional del riesgo litógeno, que pudiera permitir identificar los períodos de mayor riesgo, en que deberían acentuarse los controles sobre los individuos litiásicos, con el objetivo de reducir las tasas de recidiva.

En último lugar, debemos considerar también la elevada complejidad asociada con los protocolos de estudio metabólico-mineral, y las limitaciones existentes en algunos métodos analíticos para la determinación de los diferentes marcadores litógenos. Algunos de estos métodos, de gran relevancia, se caracterizan por su elevado coste (por ejemplo, el caso del oxalato), mientras que otros, a pesar de su escasa relevancia siguen utilizándose, originando grandes volúmenes de datos, difíciles de asimilar e interpretar correctamente por el urólogo. Además, a esto debe unirse el hecho que no se analizan determinados parámetros urinarios que podrían ser de interés para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad litiásica (como fitato y pirofosfato), posiblemente debido al coste y complejidad de los métodos analíticos asociados. En este sentido, se observa, por tanto, la necesidad de contar con métodos analíticos más eficaces, que den como resultado información realmente relevante para la evaluación de la urolitiasis.

### **1.7 OBJETIVOS**

En la actualidad, el objetivo de los estudios sobre litiasis debería estar encaminados a reducir las tasas de incidencia y recidiva, más aun si se tiene en cuenta el menor coste asociado al tratamiento y prevención de la enfermedad en comparación con los tratamientos de extracción del cálculo. Para ello se requieren una mejor comprensión de la etiología litiásica y una mayor eficacia en el diagnóstico de las alteraciones litógenas, que puedan ayudar a mejorar la prevención de nuevos casos de litiasis y la monitorización de los casos existentes para minimizar las recidivas.



Así pues, la finalidad del presente trabajo es la superación de algunas de las limitaciones anteriormente expuestas, básicamente en relación con la litiasis oxalocálcica. En este sentido, los objetivos particulares propuestos para el desarrollo de este trabajo son los siguientes:

- A nivel de metodología analítica de diagnóstico de la enfermedad litiásica se propone el desarrollo de métodos de análisis simples para la determinación de marcadores de riesgo de la litogénesis urinaria. En particular se pretende:
  - o Desarrollar un método de determinación de metabolitos presentes en orina con significación en la litiasis (oxalato, citrato, creatinina y ácido úrico), que permita superar los inconvenientes y mejorar las características que presentan los métodos de análisis ya existentes.
  - o Desarrollar métodos de determinación de marcadores litógenos no analizados normalmente en laboratorios clínicos (pirofosfato y fitato) que permitan su implementación en la práctica clínica.
- A nivel de conocimiento básico de la etiología litiásica:
  - o Estudiar las variaciones temporales (diarias y estacionales) de la composición urinaria para la identificación de los periodos más propicios para la cristalización patológica de oxalato cálcico en orina.
  - o Estudiar de manera sistemática el efecto *in vitro* de diversas sustancias con pretendidas propiedades inhibitoras sobre la cristalización de oxalato cálcico, haciendo especial énfasis en el efecto de sus interacciones sobre la inhibición.
- A nivel de metodología de estudio de las alteraciones litógenas se propone un estudio preliminar de la orina nocturna (orina de primera hora de la mañana) como espécimen para el diagnóstico de la litiasis oxalocálcica. Se pretende obtener un esquema simplificado de estudio metabólico-mineral de orina para una primera aproximación al diagnóstico simple, correcto y exacto de las alteraciones urinarias litógenas, con el objetivo de superar algunas de las limitaciones más importantes asociadas a los protocolos existentes basados en orinas de 24 horas.

## **CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y EXPERIMENTAL**

Índice del Capítulo 2: Metodología y Experimental

<b>2.1 Técnicas analíticas</b>	55
2.1.1 Potenciometría	56
2.1.2 Espectrofotometría UV-Visible	56
2.1.3 Espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado por inducción	56
2.1.4 Electroforesis capilar de zona	58
2.1.5 Espectrometría de masas por plasma acoplado por inducción	61
2.1.6 Ensayo de riesgo litógeno urinario	64
2.1.7 Microscopia electrónica de barrido	65
2.1.8 Herramientas de análisis estadístico multivariable	66
2.1.8.1 Análisis en componentes principales	67
2.1.8.2 Análisis de conglomerados jerarquizados	70
<b>2.2 Evaluación del riesgo temporal de formación de cálculos renales</b>	71
2.2.1 Evaluación del riesgo circadiano de formación de cálculos renales	71
2.2.2 Evaluación del riesgo estacional de formación de cálculos renales	73
<b>2.3 Estudios in vitro sobre la inhibición de la cristalización de oxalato cálcico</b>	73
2.3.1 Composición de orina artificial	74
2.3.2 Efecto de diferentes inhibidores sobre la cristalización de oxalato cálcico	74
2.3.3 Efecto de diferentes inhibidores sobre orinas naturales litógenas	75
2.3.4 Efecto de mezclas de inhibidores sobre la cristalización de oxalato cálcico	76
<b>2.4 Estudio preliminar de la orina nocturna como espécimen para el diagnóstico de alteraciones en la litiasis oxalocálcica</b>	77

A continuación, se describe en términos generales la metodología experimental utilizada en la presente memoria, con el objetivo de hacer más comprensibles los resultados obtenidos, que se recogen y discuten en el capítulo siguiente.

## 2.1 TÉCNICAS ANALÍTICAS

El primer paso en el desarrollo de cualquier estudio que requiera, en uno u otro modo, la determinación de la composición química de cualquier tipo de material consiste en el desarrollo o adecuación de un método de análisis, o simplemente la verificación de la idoneidad de una determinada metodología analítica para el seguimiento de los analitos objeto de estudio. Se describirán a continuación las diferentes técnicas analíticas aplicadas para la consecución de los objetivos propuestos en este trabajo.

### 2.1.1 Potenciometría<sup>78</sup>

El pH urinario se determinó en muestras de orina frescas, inmediatamente después de su recogida para evitar la alcalinización como consecuencia de la evaporación del dióxido de carbono o el crecimiento de gérmenes productores de ureasa, mediante un electrodo de vidrio combinado y un potenciómetro modelo 2001 de Crison (España). Los electrodos de vidrio responden a la concentración tanto del ión hidrógeno como de los iones de los metales alcalinos en disoluciones básicas (pH superiores a 9). Por tanto, su respuesta puede considerarse altamente selectiva para la medición de pH en muestras de orina, en que los pH fisiológicos se sitúan entre 4,5 y 8,0.

### 2.1.2 Espectrofotometría UV-Visible

La concentración de glicosaminoglicanos (GAGs) en orina se determinó mediante la técnica de espectrofotometría UV-visible, aplicando el método del azul de dimetilmetileno (DMB)<sup>79</sup>. Las determinaciones se llevaron a cabo con un fotómetro modelo Novaspec II de Pharmacia (Reino Unido) de haz sencillo con microcubetas de plástico, mediante interpolación directa sobre una recta de calibrado preparada con patrones de sulfato de condroitina. La reacción colorimétrica se lleva a cabo por mezcla de 2 mL de la solución de reactivo (solución acuosa de 10,7 mg/L de DMB y ácido fórmico 55 mM a pH 3,3), con 0,4 mL de muestra o patrón. La absorbancia del complejo formado se mide a 520 nm. El método resulta rápido, fácil de aplicar y libre del efecto de especies interferentes en orina.

### 2.1.3 Espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado por inducción

Las determinaciones de Ca, Mg, P, Na y K en orina<sup>80</sup> se llevaron a cabo mediante la técnica de espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-OES) en un instrumento Iris Intrepid II XLS de Thermo Electron (EEUU).

Esta técnica se basa en la atomización, ionización y excitación de la muestra mediante una fuente de ICP<sup>81</sup>. Ésta consiste en una antorcha formada por tres tubos concéntricos de cuarzo a través de los cuales fluye una corriente de argón, rodeada en su parte superior por una bobina de inducción refrigerada por agua y alimentada por un generador de radiofrecuencias capaz de producir una potencia de 2kW a unos 27MHz (Figura 2.1).

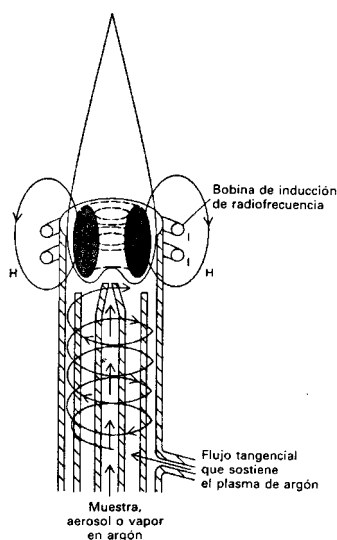
---

<sup>78</sup> Skoog, DA, Leary JJ. Métodos potenciométricos. En: Análisis Instrumental (4a edición), McGraw-Hill, Madrid, 1997, pp. 571-603

<sup>79</sup> Jong JGN, Wevers RA, Laarakers C, Poorthuis JHM. DMB-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. Clin Chem 35, 1989, 1472

<sup>80</sup> Krejčova A, Cernohorsky T, Curdova E. Determination of sodium, potassium, magnesium and calcium in urine by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. JAAS 16, 200, 1002

<sup>81</sup> Moore GL. Introduction to inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. Elsevier Science Publishers, Nueva York, 1989



**Figura 2.1** Esquema de una antorcha de plasma acoplado por inducción.

El argón que fluye por la antorcha se ioniza inicialmente por medio de una chispa. Los iones y electrones resultantes interactúan con el campo magnético oscilante generado por la bobina de inducción, provocando que éstos se muevan en trayectorias anulares cerradas y colisionen con más átomos de argón multiplicando así la ionización del gas y generando el calentamiento responsable del mantenimiento del plasma (6000-10000 K).

La introducción de muestras líquidas en el plasma se realiza en forma de aerosol de la muestra mediante un sistema de nebulización. Al alcanzar el plasma, la muestra nebulizada se desolvata, volatiliza, disocia, atomiza (ionizándose en algunos casos) y excita. A medida que las especies iónicas y/o atómicas pasan a través del plasma, se relajan hacia sus estados fundamentales emitiendo una radiación característica para cada elemento. Dicha radiación se enfoca hacia la apertura de un monocromador, que separa la radiación de las diferentes longitudes de onda. Esta radiación es captada por un detector de forma secuencial o simultánea (dependiendo del tipo de instrumento), pudiendo controlar la emisión de los diferentes elementos de la muestra mediante la selección de la longitud de onda más adecuada.

Algunas de las características más importantes de esta técnica son<sup>82</sup>: capacidad de análisis multielemental, amplio rango lineal (de cuatro a seis ordenes de magnitud) y bajos límites de detección (del orden de ppb para muchos elementos) que permiten el análisis tanto de componentes mayoritarios como de trazas y una buena exactitud y precisión. El principal inconveniente de la técnica es su coste, tanto de adquisición, como de funcionamiento y mantenimiento.

<sup>82</sup> Boumans PWJM. Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy – Part 1. Boumans PWJM (ed.); John Wiley & Sons, New York, 1987, p. 69

La Tabla 2.1 muestra las líneas de emisión utilizadas en los análisis de los elementos de interés, así como sus límites de detección e interferencias<sup>83</sup>. La selección de la longitud de onda analítica se realiza de manera que se evitan las interferencias espectrales de otros elementos presentes en la matriz de la muestra, a la vez que se consiguen rangos lineales y límites de detección adecuados a la concentración de los analitos en las muestras.

**Tabla 2.1** Especificaciones espectroscópicas de los iones determinados.

	Ca	Mg	Na	K	P
<b>Línea de emisión (nm)</b>	317,933	285,213	589,592	766,490	213,618
<b>Límite de detección (ppm)</b>	0,019	0,0016	0,069	0,060	0,076
<b>Interferencias</b>	Cr,Fe,V	Cr,Fe,V	Fe,Ti,V	Ti	Al,Cr,Cu,Fe,Ti

Las determinaciones se llevaron a cabo por interpolación sobre una recta de calibrado preparada con patrones de dichos analitos en el mismo medio (HCl 0.2M) con que se diluían las muestras (1:20). Dicha dilución tenía por objetivo reducir los efectos de matriz que puede ejercer la gran complejidad de la matriz urinaria sobre los fenómenos de introducción de muestra, nebulización, atomización, ionización y excitación que tienen lugar en el proceso analítico.

#### 2.1.4 Electroforesis capilar de zona

La técnica de electroforesis capilar de zona (CZE) fue utilizada para la determinación de diferentes especies (oxalato, citrato, ácido úrico y creatinina) en muestras de orina. Para ello se utilizó el modelo P/ACE MDQ de Beckman (EEUU), equipado con detector de espectrofotometría UV-visible.

En este apartado incluimos una breve introducción a los fundamentos de la técnica de electroforesis capilar, mientras el desarrollo, optimización y validación del método analítico se recogen en el apartado 3.1.2 de esta memoria.

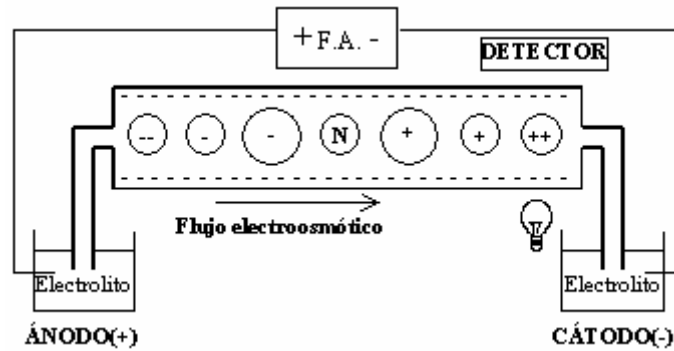
La electroforesis consiste en la migración de partículas eléctricamente cargadas en el seno de un medio conductor bajo la influencia de un campo eléctrico. En CZE<sup>84</sup>, el proceso de separación electroforético se lleva a cabo en un capilar (normalmente de sílice) de 25 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro interno. De esta manera, se incrementa la capacidad de disipar el calor generado por el campo eléctrico y se minimizan los procesos de

<sup>83</sup> Winge RK, Fassel VA, Peterson VJ, Floyd MA. Inductively coupled plasma-Atomic emission spectroscopy. An Atlas of Spectral Information, Elsevier, Amsterdam, 1985

<sup>84</sup> Baker DR. Capillary Electrophoresis, John Wiley & Sons, New York, 1995

convección y difusión que limitan la separación conseguida por la migración de las especies bajo la acción del campo eléctrico.

En CZE, tras la inyección de la muestra en el capilar, los extremos de éste se sumergen en una disolución de electrolito juntamente con dos electrodos conectados a una fuente de alimentación capaz de proporcionar potenciales de 100 a 500 V/cm (Figura 2.2).



**Figura 2.2** Esquema del proceso de separación mediante electroforesis capilar de zona. Se muestra el orden de migración de las especies en función de su tamaño y carga (+, - y N). Modo de polaridad directa o normal.

La aplicación de este campo eléctrico provoca la migración rápida de las especies a lo largo del capilar en base a dos tipos de movimiento diferenciados:

- Movimiento electroforético. Es el movimiento de migración de las partículas cargadas en el seno de un campo eléctrico. La movilidad electroforética es característica de cada especie en cada medio y se define como:

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{1}{6 \cdot \pi \cdot \eta} \cdot \frac{q}{r}$$

donde  $v_{ep}$  es la velocidad de migración de la especie,  $E$  es el campo eléctrico,  $\eta$  es la viscosidad del electrolito,  $r$  es el radio de la especie y  $q$  es su carga. Por tanto, la migración de una especie viene determinada por su relación  $q/r$ .

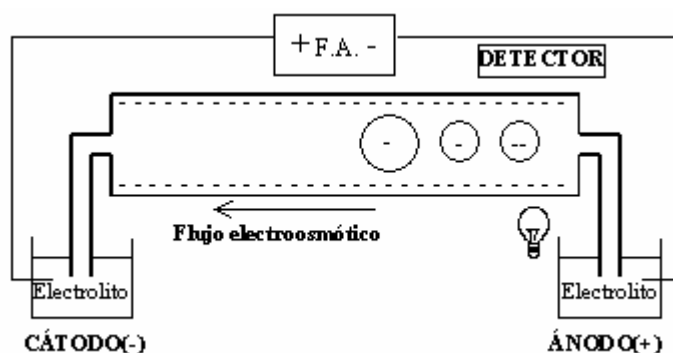
- Movimiento del flujo electrosmótico. La presencia de carga negativa en la superficie de la pared interna del capilar (originada por la ionización de los grupos silanol de la sílice en contacto con la disolución de electrolito) queda compensada por una doble capa difusa de cationes de la disolución. Éstos son arrastrados hacia el cátodo con su capa de solvatación, generando un movimiento de toda la disolución hacia dicho electrodo, denominado flujo electrosmótico. La movilidad del flujo electrosmótico se define como:

$$\mu_{eof} = \frac{v_{eof}}{E} = \frac{\epsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta}$$

donde  $v_{eof}$  es la velocidad del flujo electrosmótico,  $E$  es el campo eléctrico,  $\eta$  es la viscosidad,  $\varepsilon$  es la constante dieléctrica del medio y  $\zeta$  es el potencial zeta (potencial generado por la distribución de cargas en la pared del capilar y que es directamente proporcional al grosor de la doble capa difusa). La movilidad electrosmótica depende de varios factores: pH (determina el grado de ionización de la pared del capilar), fuerza iónica de la disolución (determina el grosor de la doble capa difusa), temperatura, presencia de modificadores...

Como resultado de lo anteriormente expuesto, los cationes serán acelerados en su migración hacia el cátodo, las moléculas neutras viajarán hacia éste empujadas únicamente por el flujo electrosmótico y los aniones llegarán o no al cátodo en función de la magnitud relativa de las movilidades electroforética y electrosmótica. El modo de detección más habitual es el de espectrofotometría UV-visible, por lo cual cerca del final del capilar y antes del electrodo se sitúa una ventana transparente que permite el paso de luz a través de la muestra desde la fuente hasta el detector. El registro de la absorbancia en función del tiempo (electroferograma) muestra los picos de absorción correspondientes a las especies separadas a lo largo del proceso electroforético. El área de estos picos constituye la señal analítica utilizada para la cuantificación de los analitos de interés.

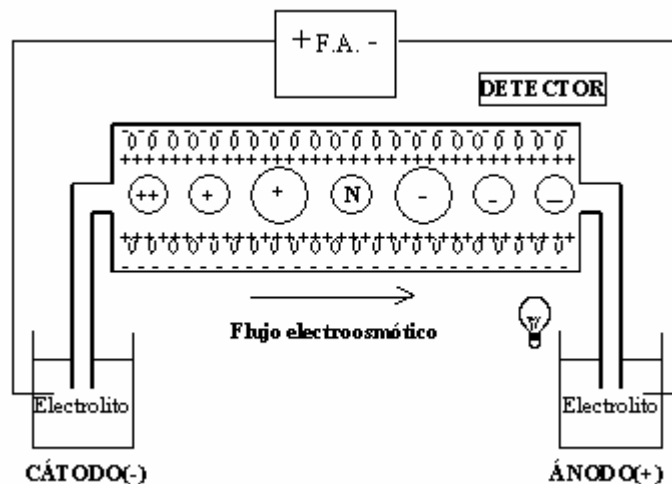
Para el análisis de aniones, se suele realizar un cambio en la polaridad de los electrodos de manera que las especies migren hacia el ánodo en lugar de hacia el cátodo (Figura 2.3). De esta manera se evita que los cationes y especies neutras lleguen a la ventana del detector, de manera que los aniones son las primeras especies en alcanzarlo, reduciendo así el tiempo de análisis.



**Figura 2.3** Esquema del proceso de separación mediante electroforesis capilar de zona. Se muestra el orden de migración de las especies en función de su tamaño y carga (+, - y N). Modo de polaridad inversa.



Existen otras posibilidades en el análisis con la CZE. Una de ellas consiste en invertir la dirección del flujo electrosmótico mediante la adición al electrolito de aditivos de carácter surfactante (por ejemplo, sales de amonio cuaternario con largas cadenas alifáticas). Estos aditivos forman una doble capa en la superficie negativamente cargada del capilar, dotándola de carga positiva, de manera que se invierte la dirección del flujo electrosmótico. De esta manera, utilizando polaridad inversa, se pueden analizar en el mismo proceso aniones, moléculas neutras y cationes por este orden (Figura 2.4).



**Figura 2.4** Esquema del proceso de separación mediante electroforesis capilar de zona. Se muestra el orden de migración de las especies en función de su tamaño y carga (+, - y N). Modo de polaridad inversa con inversión del flujo electrosmótico.

Las principales ventajas de la CZE son una gran eficiencia y rapidez en la separación, requerimientos de pequeñas cantidades de muestra, bajo consumo de reactivos y bajos costes de análisis.

### 2.1.5 Espectrometría de masas por plasma acoplado por inducción

La técnica de espectrometría de masas por plasma acoplado por inducción (ICP-MS) fue utilizada para la determinación de diferentes especies (fitato y pirofosfato) en orina. Para ello se utilizó el modelo PQ-ExCell de Thermo Elemental (Reino Unido).

En este apartado incluimos una breve introducción a los fundamentos de la técnica de ICP-MS, mientras el desarrollo, optimización y validación de los métodos analíticos asociados se recogen en los apartados 3.1.3 y 3.1.4 de esta memoria.

La técnica de ICP-MS<sup>85,86</sup> es una técnica multielemental que utiliza una fuente de plasma para disociar la muestra en los átomos que la constituyen. El mismo plasma ioniza estos átomos y los iones generados son extraídos del plasma y separados en función de su relación masa/carga ( $m/q$ ) mediante un analizador de iones (en nuestro caso un cuadrupolo).

Los procesos de introducción de muestra, así como de atomización e ionización de la misma sigue los mismos principios que en la técnica de ICP-OES (apartado 2.1.3), con la diferencia que en ICP-MS el gas plasmógeno generado por la fuente de ICP se acopla posteriormente con un detector (espectrómetro) de masas (Figura 2.5).

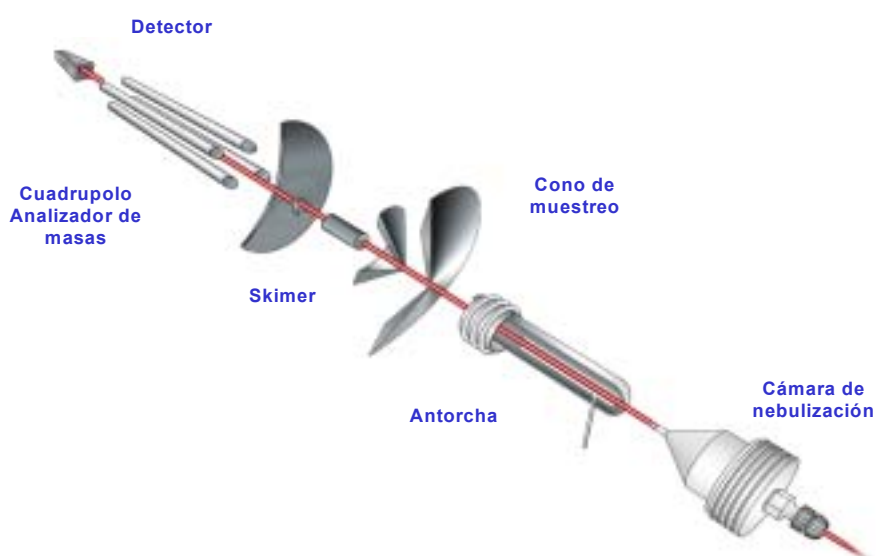


Figura 2.5 Esquema de funcionamiento de un ICP-MS.

La muestra ionizada en el plasma atraviesa una interfase que separa la zona de presión atmosférica (fuente de ICP) de la zona de alto vacío (espectrómetro de masas). En primer lugar los iones son muestreados del plasma a través del orificio del cono de muestreo hasta una zona de menor presión (1.7 mbar), para después atravesar un segundo elemento muestreador (skimmer) y alcanzar un sistema de lentes. El objetivo de éste es enfocar el haz de iones hacia el analizador (normalmente un cuadrupolo) gracias al campo electrostático que generan. El cuadrupolo se encarga de filtrar los iones que entran en él, de tal manera, que en cada instante de tiempo, la aplicación de un voltaje determinado provoca que únicamente los iones con una determinada relación  $m/q$  puedan mantener una trayectoria estable dentro del analizador que los permita llegar al detector de masa, compuesto por un multiplicador de electrones en modo dual.

<sup>85</sup> Montaser A. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Wiley-VCH, 1998

<sup>86</sup> Tanner SD. Plasma source mass spectrometry. New developments and applications, RSC, 1999

Algunas de las características más importantes de esta técnica son: capacidad de análisis multielemental, amplio rango lineal, bajos límites de detección (del orden de la ppt para muchos elementos) y buena exactitud y precisión. El principal inconveniente de la técnica es su coste, tanto de adquisición, como de funcionamiento y mantenimiento. Además, cabe considerar como principal limitación de la técnica la existencia de interferencias<sup>87</sup> que dificultan la aplicabilidad de la técnica para determinados analitos y determinados tipos de muestras:

- Las interferencias no espectroscópicas pueden provocar un aumento o reducción de la señal analítica como consecuencia de las diferentes características de la matriz de las muestras, que pueden modificar las características de transporte, ionización, extracción o enfoque de los iones. Uno de los efectos más conocidos es la deposición de sales en los orificios de los conos muestreadores que causan variaciones de señal con el tiempo y que suponen una limitación en la cantidad total de sólidos disueltos que puede contener la muestra a analizar.
- Las interferencias espectroscópicas están provocadas por iones de átomos o moléculas, que al tener la misma relación m/q que el analito, generan una señal que se solapa con la del analito de interés. Esta fuente de error puede estar provocada por el solapamiento de isótopos con la misma relación m/q pero correspondientes a diferentes elementos ( $^{40}\text{Ar}^+$  interfiere con  $^{40}\text{Ca}^+$ ) o a iones poliatómicos generados en el plasma por precursores de los gases atmosféricos, la matriz de la muestra o los iones del propio plasma ( $^{38}\text{Ar}^1\text{H}^+$  interfiere con  $^{39}\text{K}^+$ ,  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$  interfiere con  $^{56}\text{Fe}^+$ ...).

Aun así, cabe tener en cuenta que se han estudiado métodos muy diversos para evitar las interferencias espectroscópicas y no espectroscópicas<sup>87</sup>. En general, estos métodos se centran en la manipulación de la muestra (digestión, dilución, procesos de separación, uso de patrones internos o de adición estándar...), en el tratamiento de los datos generados (uso de ecuaciones de corrección o tratamiento quimiométrico de los datos...) o en la modificación de las características instrumentales del ICP-MS (uso de técnicas de plasma frío o celda de colisión para reducir la formación de iones poliatómicos....).

En la Tabla 2.2 se recogen los parámetros habituales de funcionamiento del instrumento de ICP-MS utilizado. Por otro lado, en la Tabla 2.3 se muestran los isótopos utilizados en las determinaciones llevadas a cabo en este trabajo, así como su abundancia, límites de detección e interferencias espectroscópicas principales.

---

<sup>87</sup> Evans EH, Giglio JJ. Interferences in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. JAAS 8, 1993, 1

**Tabla 2.2** Condiciones de operación instrumental del sistema de ICP-MS utilizado.

<b>Sistema ICP</b>	
Potencia del generador	1350 W
Frecuencia	27.12 MHz
Gas Auxiliar	0.92 L min <sup>-1</sup>
Gas de Refrigeración	13.30 L min <sup>-1</sup>
Gas de Nebulización	0.89 L min <sup>-1</sup>
Nebulizador	Pneumático Concentrico (Meinhard)
Cámara de Nebulización	Bola de impacto
Cono de Muestra	Níquel con orificio de 1,0 mm
Cono Skimmer	Níquel con orificio de 0,7 mm
<b>Sistema de introducción de muestra</b>	
Velocidad de la bomba peristáltica	2 mL min <sup>-1</sup>
Tiempo de estabilización	100 s
Tiempo de lavado	40 s (HNO <sub>3</sub> 1%)
<b>Parámetros de adquisición de datos</b>	
Analizador	Cuadripolo
Número de barridos (scans)	100
Número de replicados	3
Tiempo de lectura	10 ms

**Tabla 2.3** Isótopos utilizados en las determinaciones por ICP-MS<sup>88</sup>.

Isótopo	Abundancia	Límite de Detección	Interferencias espectroscópicas
<sup>31</sup> P	100	~ 1ppb	<sup>14</sup> N <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>15</sup> N <sup>15</sup> N <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>15</sup> N <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>14</sup> N <sup>17</sup> O <sup>+</sup>

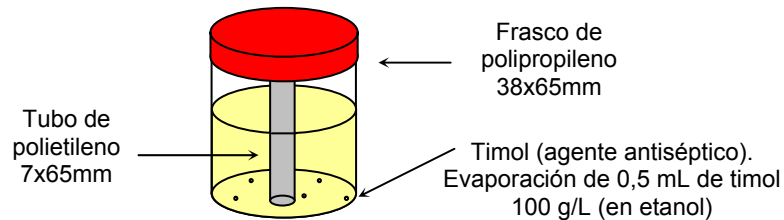
### 2.1.6 Ensayo de riesgo litógeno urinario

El ensayo de riesgo litógeno urinario (ensayo RLU)<sup>89</sup> permite evaluar de forma muy simple y precisa la capacidad que posee una determinada orina para cristalizar sales cálcicas. Las características y dimensiones de la unidad de reacción se muestran en la Figura 2.6. Cuando la superficie no protegida de polietileno entra en contacto con la orina, más tarde o más temprano, acaban cristalizando sobre ella las sustancias urinarias sobresaturadas. Así, se colocan 45 mL de orina recién emitida en el frasco de polipropileno y se tapa, de manera que el tubo de polietileno (superficie activa) queda en contacto con la orina, durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo,

<sup>88</sup> May TW, Wiedmeyer RH. A Table of polyatomic interferences in ICP-MS. At Spectr 19, 1998, 150

<sup>89</sup> Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A, Conte A, García-Raja A. Simple test to evaluate the risk of urinary calcium stone formation. Clin Chim Acta 263, 1997, 43

se vacía el contenido del recipiente y se lava el tubo de polietileno con agua bidestilada. A continuación se redisuelven los cristales formados, introduciendo el tubo de polietileno en un tubo de ensayo con 1 mL de ácido clorhídrico 1M, y se evalúa la cantidad de calcio precipitado, añadiendo al tubo de ensayo 150 mg de acetato sódico y 50  $\mu$ L de arsenazo III (1g/L), y midiendo la absorbancia del complejo correspondiente a 650 nm.



**Figura 2.6** Unidad de reacción de ensayo RLU utilizado.

La aplicación del ensayo RLU muestra una excelente discriminación entre el grupo de individuos sanos y el grupo de pacientes con importante actividad litiasica, lo que demuestra su aptitud para evaluar la litogenicidad o capacidad litógena global de una orina, considerando simultáneamente los factores que favorecen la cristalización (sobresaturación y promotores) y se oponen a ella (inhibidores). De esta manera, la orina de un individuo sano no da lugar fácilmente al crecimiento de cristales de sales cálcicas, y el ensayo RLU muestra valores de absorbancia cercanos a 170 mUA (correspondiente a la coloración rosa del indicador). Por el contrario, una orina litógena (muy sobresaturada y/o con importante déficit de inhibidores) cristaliza fácilmente dando lugar al crecimiento de cristales de sales cálcicas sobre la superficie, y el ensayo RLU muestra valores de absorbancia superiores a 200 mUA (con un color más azulado a medida que aumenta la concentración de calcio), siendo típicos los valores de absorbancia superiores a 300 mUA para pacientes oxalocálcicos<sup>89</sup>.

### 2.1.7 Microscopia electrónica de barrido

La técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM) fue utilizada para la obtención de imágenes superficiales tanto de cálculos renales como de cristales formados en los ensayos in vitro realizados a lo largo de este trabajo. Asimismo, con el empleo de la técnica de espectroscopia de rayos X por energía dispersiva (EDS) se estudió la composición elemental de alguna de las características superficiales de las muestras analizadas. La combinación de ambas técnicas permite la caracterización de la microestructura de superficies sólidas, junto con la identificación cualitativa de los diferentes elementos y su distribución en éstas. El instrumento utilizado fue un

microscopio electrónico de barrido modelo JSM-6300 de JEOL Ltd (Japón) dotado de un espectrómetro de energía dispersiva de rayos X modelo Link ISIS-200 de Oxford Instruments (Reino Unido).

Para el análisis con SEM-EDS, aquellas muestras no conductoras o poco conductoras deben ser recubiertas con una fina capa de carbón u oro, para que su respuesta al haz de electrones sea suficientemente intensa y se eviten fenómenos de polarización de la muestra. En SEM<sup>90</sup>, un haz de electrones barre la superficie de la muestra a analizar, obteniéndose a causa de ello varias señales procedentes de ella. Las tres señales que proporcionan más información en SEM son los electrones secundarios, los electrones dispersados y la radiación X emitida por la muestra.

Los electrones secundarios son emitidos por átomos que se encuentran en la superficie de la muestra, de manera que el contraste de la imagen que generan viene dado por la morfología y topografía de la muestra analizada.

Los electrones dispersados son electrones primarios que han sido reflejados por átomos del sólido. En este caso, el contraste de la imagen que generan viene dado por la diferencia de número atómico de los elementos de la muestra. La imagen capta en consecuencia la distribución de diferentes fases químicas en la muestra.

La interacción del haz primario de electrones con átomos de la muestra provoca transiciones electrónicas con el resultado de emisión de rayos-X característicos del átomo de origen. La detección y medida de esta radiación permite el análisis elemental de la superficie de la muestra, mediante EDS. Ésta ofrece de manera rápida información cualitativa de la composición elemental de la muestra, con la limitación de no poder analizar los elementos de bajo número atómico, siendo fiables los resultados del análisis semicuantitativo a partir del aluminio.

### **2.1.8 Herramientas de análisis estadístico multivariable**

En el campo clínico es, cada vez, más habitual determinar múltiples analitos en muestras de sangre u orina, obteniendo datos multivariados. La primera comparación entre muestras se acostumbra a realizar a través de los parámetros individuales. Sin embargo, la consideración simultánea de todos los parámetros considerados mediante métodos multivariados de análisis supone una ventaja considerable ya que proporciona una caracterización del efecto conjunto de las distintas variables y especialmente de las posibles relaciones entre éstas.

---

<sup>90</sup> Goldstein JI. Scanning Electron Microscopy and X-ray microanalysis (2nd ed), Plenum Press, New York, 1992

A continuación se describen brevemente los aspectos fundamentales de las dos técnicas estadísticas de análisis multivariantes utilizadas en esta memoria, sin entrar en los fundamentos matemáticos de fondo en que están sustentadas.

### 2.1.8.1 Análisis en componentes principales

Un problema habitual en el análisis multivariante es que el gran volumen de datos dificulta el reconocimiento de pautas y relaciones entre los diferentes parámetros (variables) que se miden para las diferentes muestras (objetos de la matriz de los datos). En este contexto, el objetivo del análisis en componentes principales (PCA)<sup>91</sup> es la reducción de la dimensionalidad de esta matriz de datos, con lo cual se pueden poner de manifiesto estructuras o agrupaciones en los objetos que no eran evidentes en los datos originales. El PCA consiste en un procedimiento matemático que transforma un número de variables (posiblemente) correlacionadas en un (menor) número de variables no correlacionadas llamados componentes principales (PC), sin pérdida significativa de información.

Aunque existen diversos algoritmos de cálculo, aquí se sigue el enfoque utilizado en el algoritmo NIPALS (Nonlinear Iterative Partial Least Squares). En la Figura 2.7, vemos su funcionamiento con dos variables ( $x_1$  y  $x_2$ ), aunque es análogo para  $k$  variables. En primer lugar, se busca la dirección del espacio en que la variabilidad de los objetos es más importante: se hace rotar un vector  $P$  de dimensión  $k$  a través del origen y se busca la dirección en que las proyecciones de los objetos sobre él tenga la mayor variabilidad posible. En esta posición, el vector  $P$  es el primer componente principal (un vector que describe de la mejor manera posible la dirección principal de variabilidad de los objetos). Los cosenos directores de este vector respecto a las variables originales  $x_i$  se denominan *loadings* y nos indican qué posición ocupa el PC1 en el espacio de  $k$  variables. Proyectando los objetos en el espacio de  $k$  dimensiones de las variables originales sobre este vector, se encuentra una nueva coordenada de los puntos respecto al vector del PC1 ( $t_i$ ). Estas nuevas coordenadas reciben el nombre de *scores*.

En un segundo paso, se puede encontrar un segundo PC. Para conseguir que este segundo vector de *loadings* no esté correlacionado con el primero, se hace rotar un segundo vector de *loadings*, ortogonal al primero, alrededor del origen hasta encontrar la dirección de máxima variabilidad de los objetos. Procediendo de esta manera se pueden encontrar un número de PCs igual al número de variables originales ( $k$ ).

---

<sup>91</sup> Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal Component Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2, 1987, 37

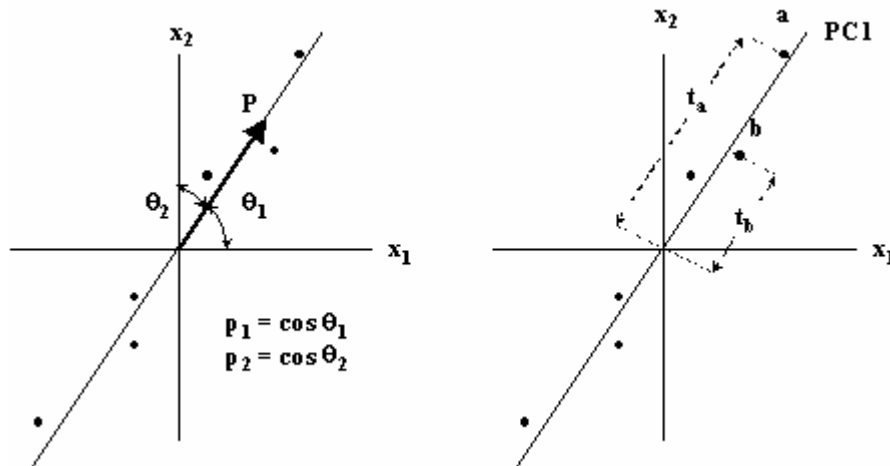


Figura 2.7 Descripción de PCA, mostrando loadings ( $p_i$ ) y scores ( $t_i$ ).

De esta manera, se puede construir una matriz de scores  $T$  y una matriz de loadings  $P^T$ , de manera que  $X = T \cdot P^T$ , donde  $X$  representa la matriz de datos originales.

Ahora bien, es posible representar la matriz original con un número de componentes principales inferior al número de variables ( $k$ ), dado que la información más importante (variación sistemática de los datos) está contenida en los primeros componentes principales, mientras que los últimos sólo describen variaciones debidas a ruido o error aleatorio contenido en los datos ( $E$ ). Así, a menudo, la matriz de datos se descompone en  $X = T \cdot P^T + E$ , de manera que se pueden visualizar los datos tratados en dos o tres dimensiones (2 o 3 PCs), con una buena conservación de la información contenida en los datos originales. De esta manera, los objetos que estaban originalmente representados en un espacio de  $k$  dimensiones ( $X$ ), se pueden representar tras el PCA en un espacio dimensional más reducido, en que las nuevas variables se denominan componentes principales. Los cosenos directores de los nuevos ejes (componentes principales) respecto a los antiguos (variables originales) vienen dados por los valores de los loadings ( $P^T$ ), que determinan el peso de las variables originales en cada PC. Las coordenadas de los objetos en este nuevo espacio descrito por los componentes principales vienen dadas por los scores ( $T$ ). Además, se consigue que el conjunto de datos  $X$ , que estaba descrito por variables correlacionadas esté, tras este proceso, descrito por los componentes principales que son variables no correlacionadas, en que se ha eliminado el ruido o variación aleatoria.



Quizás la utilización más común del PCA es la conversión de la matriz de datos en sencillos gráficos informativos, que muestran los dos o tres primeros PCs (Figura 2.8):

- El gráfico de scores ofrece información sobre las relaciones entre objetos, sugiriendo posibles agrupaciones de los objetos.
- El gráfico de loadings indica como está correlacionadas las variables originales entre sí y con los PCs.:
  - Si el punto se halla a gran distancia del centro (p.e., A y B), esa variable cede casi toda su varianza al plano PC1-PC2. Además, los ángulos que forma dicha variable con PC1 y PC2 indican a cuál de los dos cede preferentemente su varianza, esto es, con cuál de los dos está más fuertemente correlacionada (p.e., D está fuertemente correlacionada con el PC1).
  - Si el punto se halla cerca del centroide (p.e.,C), no cede varianza al plano PC1-PC2, sino a otro PC o está repartida entre varios componentes.
  - Los ángulos pequeños (A y B) o próximos a 180° (A y E) entre las variables originales indican fuerte correlación positiva o negativa entre ellas. En cambio, un ángulo próximo a 90° (A y D) indica independencia entre variables originales.
- Finalmente los diagramas dobles (de scores y loadings) informan sobre las relaciones entre los objetos y los grupos formados por las variables originales. Si un grupo de objetos se encuentra alejado del origen en la dirección marcada por una o más variables originales es porque dichos objetos tienen valores altos para dichas variables (grupo 1-variable E). Por otro lado, si un grupo de objetos muestra una relación de ortogonalidad (ángulos cercanos a 90°) respecto a algunas variables (grupo 2-variables A, B y E), es porque dichas variables contienen aleatoriamente valores altos y bajos para esos objetos, esto es, los objetos no están asociados con ellas.

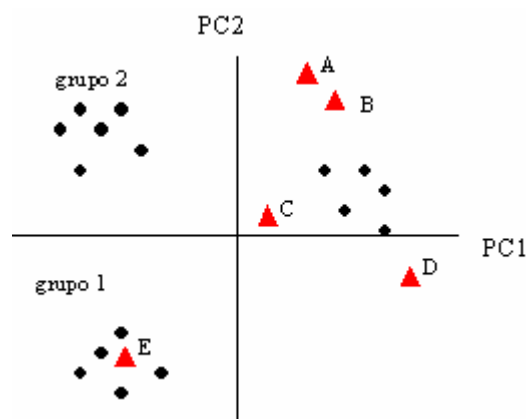


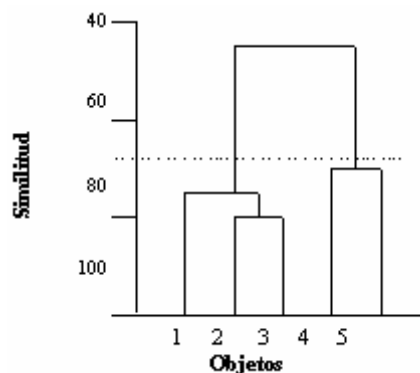
Figura 2.8. Diagrama de scores (●) y loadings (▲) para PC1-PC2.

Finalmente, cabe comentar, que antes de llevar a cabo la descomposición de la matriz de datos originales, éstos suelen tratarse mediante un autoescalado de los datos a varianza unidad. Esto permite que todas las variables tengan la misma influencia sobre el cálculo, que de otra manera estaría dominado por las variables de mayor varianza.

**2.1.8.2 Análisis de conglomerados jerarquizados**

El análisis de conglomerados jerarquizados<sup>92</sup> (HCA) consiste en una serie de técnicas de reconocimiento de pautas que buscan diferenciar una serie de objetos en diversos grupos en función de su similitud, de manera que los objetos pertenecientes a un grupo son más similares entre ellos que con los objetos pertenecientes a otro grupo. Estos métodos se pueden utilizar para identificar la existencia de una estructura grupal en una serie de datos, para verificar una hipótesis de agrupamiento de datos o para identificar miembros de un grupo entre los datos.

En este estudio, se ha utilizado como método de agrupación el método de Ward, que considera el cuadrado de la distancia euclidiana entre objetos como medida de similitud entre objetos. El HCA busca objetos que se encuentren próximos en el espacio de variables. Al principio del proceso de agrupación, cada objeto forma un cluster individual. En la primera etapa, los dos objetos que están más cercanos en el espacio de variables (es decir, los más similares) se agrupan para formar un conglomerado. Las distancias entre los conglomerados se comparan de nuevo y se combinan nuevamente los dos conglomerados que se encuentren más próximos. Este procedimiento se repite hasta que todos los objetos quedan unidos perteneciendo a uno solo conglomerado. Las sucesivas etapas de la agrupación se pueden mostrar sobre un grafico denominado dendograma (Figura 2.9). El eje vertical muestra la similitud entre objetos. La decisión del número de conglomerados significativos en la clasificación final queda al juicio de la persona que realiza el análisis, a través de la selección del valor de similitud que se considere más oportuno.



**Figura 2.9** Dendograma.

<sup>92</sup> Bratchell N. Cluster Analysis. Chemometrics and Intelligent laboratory systems 6, 1989, 105

## 2.2 EVALUACIÓN DEL RIESGO TEMPORAL DE FORMACIÓN DE CÁLCULOS RENALES

A continuación, expondremos la metodología empleada para determinar el riesgo temporal (diario y estacional) en la formación de cálculos renales a través del análisis de muestras de orina recogidas de forma apropiada durante el periodo de estudio correspondiente.

### 2.2.1 Evaluación del riesgo circadiano de formación de cálculos renales

Para el estudio del riesgo circadiano (a lo largo de un día) de formación de cálculos renales, se estudiaron las variaciones de 14 parámetros urinarios en cinco individuos sanos durante un período de 24 horas. Para cada individuo se recogieron un total de 6 muestras de orina, correspondientes a un período de tiempo total de 24 horas. Se recogió una muestra de orina acumulada durante el período de descanso nocturno (entre las 0h y las 9h, en ayunas). Después, durante el periodo de actividad diurna (entre las 9h y las 24h del mismo día), se recogieron de manera sucesiva otras cinco muestras de orina acumuladas durante 3 horas cada una de ellas. Los individuos participantes en el estudio estaban libres de restricciones dietéticas o de actividad física, pero se sincronizó su actividad nocturna entre las 0h y las 8h ( $\pm 1$  hora), y la diurna entre las 8h y las 24h ( $\pm 1$  hora). También las comidas se tomaron a horas fijas (9h, 14h y 21h;  $\pm 1$ h). Ninguno de los individuos tomaba medicación alguna que pudiera alterar la composición química de la orina, ni padecía de obstrucción urinaria o infección en el momento de la investigación.

Para cada una de las orinas recogidas, se registró el volumen y el pH, y se realizaron los análisis correspondientes para conocer el contenido de calcio, magnesio, fósforo, sodio, potasio, oxalato, citrato, ácido úrico, creatinina, GAGs y fitato de dichas orinas. Finalmente también se llevó a cabo el ensayo RLU en cada una de estas orinas. Con los datos obtenidos, se evaluaron de manera relativa tanto las sobresaturaciones urinarias mediante el cálculo del producto de actividad del oxalato cálcico<sup>93</sup>, la hidroxiapatita<sup>94</sup>, la brushita<sup>94</sup> y el ácido úrico<sup>21</sup>, como las relaciones urinarias Ca/Mg, Ca/Citrato, Ca/Fitato y Ca/GAGs.

Para cada una de las variables medidas se determinó la media y la desviación estándar correspondiente a cada periodo de muestreo. Teniendo en cuenta las concentraciones urinarias y la diuresis correspondiente a cada periodo, se calculó también la media y la desviación estándar correspondiente al periodo diurno acumulado (entre las 9h y las 24h)

<sup>93</sup> Tiselius HG. Aspects on estimation of the risk of calcium oxalate crystallization in urine. *Urol Int* 47, 1991, 255

<sup>94</sup> Tiselius HG. A simplified estimate of the ion-activity product of calcium phosphate in urine. *Eur Urol* 10, 1984, 191

y al periodo de 24 horas acumulado (entre las 0h y las 24h). Lógicamente, para los parámetros pH y ensayo RLU, no fue posible realizar estos cálculos correspondientes a los periodos acumulados.

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre las distintas fracciones urinarias recogidas, siguiendo la variación de cada parámetro individual, se utilizó el test de la t de Student para un nivel de significación del 5%<sup>95</sup>. Las comparaciones se llevaron a cabo entre cada periodo diurno individual y el período nocturno, y entre el periodo nocturno y los periodos acumulados diurnos y de 24 horas.

Para evaluar el riesgo asociado a cada parámetro urinario litógeno, calculamos el factor de riesgo, referenciando el valor particular de una orina a su valor límite de riesgo correspondiente, tal y como se recoge en la Tabla 2.4, de manera que valores del factor de riesgo mayores que 0 indican la presencia de alteración en ese parámetro, y por tanto, incremento en el riesgo de litogénesis.

**Tabla 2.4** Factores de riesgo asociados a los principales parámetros urinarios litógenos. Límites de riesgo litógeno<sup>89</sup> y cálculo del factor de riesgo.

	Límite de riesgo litógeno	Cálculo del factor de riesgo
<b>Volumen/h</b>	< 62.5 ml/h	$1 - \text{Valor parámetro} / \text{Valor límite}$
<b>pH a</b>	< 5.5	$1 - \text{Valor parámetro} / \text{Valor límite}$
<b>pH b</b>	> 6.5	$\text{Valor parámetro} / \text{Valor límite} - 1$
<b>Calcio</b>	> 170 mg/l	$\text{Valor parámetro} / \text{Valor límite} - 1$
<b>Fósforo</b>	> 1000 mg/l	$\text{Valor parámetro} / \text{Valor límite} - 1$
<b>Magnesio</b>	< 50 mg/l	$1 - \text{Valor parámetro} / \text{Valor límite}$
<b>Oxalato</b>	> 30 mg/l	$\text{Valor parámetro} / \text{Valor límite} - 1$
<b>Ácido Úrico</b>	> 600 mg/l	$\text{Valor parámetro} / \text{Valor límite} - 1$
<b>Citrato</b>	< 230 mg/l	$1 - \text{Valor parámetro} / \text{Valor límite}$
<b>Ca/Citrato</b>	> 0.33	$\text{Valor parámetro} / \text{Valor límite} - 1$
<b>Ca/Mg</b>	> 2.0	$\text{Valor parámetro} / \text{Valor límite} - 1$

Por último, también se utilizaron herramientas de análisis estadístico multivariable (Análisis en Componentes Principales y Análisis de Conglomerados Jerarquizados) para evaluar la clasificación de las orinas analizadas en función de su periodo de acumulación y recogida, mediante la utilización del software SPSS 11.5 para Windows.

<sup>95</sup> Miller JC, Miller JN. Pruebas de significación en Estadística para química analítica (2a ed), Addison-Wesley Iberoamericana, Wilmington, 1993, pp. 40-66

### 2.2.2 Evaluación del riesgo estacional de formación de cálculos renales

Para el estudio del riesgo estacional de formación de cálculos renales, se estudiaron las variaciones de 14 parámetros urinarios en diez individuos sanos durante un período de año. Para cada individuo se recogieron un total de 12 muestras de orina (una por mes), correspondientes a la orina acumulada durante el periodo de descanso nocturno (entre las 0h y las 9h). Los individuos participantes en el estudio estaban libres de restricciones dietéticas o de actividad física, no tomaban medicación alguna que pudiera alterar la composición química de la orina, ni padecían de obstrucción urinaria o infección en el momento de la investigación.

Tanto los parámetros urinarios medidos en cada muestra de orina, como las herramientas estadísticas para la evaluación de los datos son análogos a los del apartado 2.2.1. Para cada una de las variables se calculó la media y desviación estándar correspondiente a cada estación del año: verano (julio, agosto y septiembre), otoño (octubre, noviembre y diciembre), invierno (enero, febrero y marzo) y primavera (abril, mayo y junio). Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo entre el periodo estival y el resto de estaciones.

### 2.3 ESTUDIOS IN VITRO SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA CRISTALIZACIÓN DE OXALATO CÁLCICO

Para el estudio de la capacidad inhibidora de diferentes sustancias, así como de sus interacciones, sobre la cristalización de oxalato cálcico, se aplicó la metodología del ensayo RLU a muestras de una orina artificial con propiedades litógenas. En este apartado, el ensayo RLU (Figura 2.10) difirió del descrito en el apartado 2.1.6 en: 1) se introdujeron 30 mL de orina (artificial o natural) en el frasco de polipropileno (en lugar de 45 mL); 2) se redisolvieron los cristales formados sobre el tubo de polietileno con 4 mL de HCl 0.3 M (en lugar de en 1 mL de ácido clorhídrico 1M); 3) se midió el Ca precipitado mediante ICP-OES (en lugar de hacerlo con la reacción colorimétrica). Estas variaciones fueron introducidas para mejorar la reproducibilidad de las medidas de Ca precipitado en los ensayos de inhibición in vitro, mediante una técnica (ICP-OES) que permite un mayor rango de respuesta lineal.

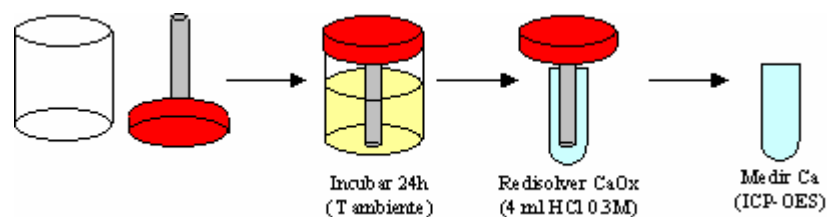


Figura 2.10 Descripción del ensayo RLU utilizado para los estudios de inhibición in vitro.

### 2.3.1 Composición de orina artificial

La orina artificial<sup>96</sup> utilizada en este estudio se preparó inmediatamente antes de su uso mezclando volúmenes iguales de las soluciones A y B. Ambas soluciones se prepararon por disolución de los correspondientes reactivos en agua milli-Q. La composición de ambas soluciones se detallan en la Tabla 2.5.

**Tabla 2.5** Composición de soluciones A y B utilizadas para conformar la orina artificial utilizada.

Solución A (g/L)		Solución B (g/L)	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.86	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.4
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.02	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.0
NH <sub>4</sub> Cl	4.65	NaCl	13.12
KCl	12.2	Na <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0.075
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	2.24		

El pH de la solución B fue ajustado previamente para que el pH de la solución después de la mezcla fuera el adecuado para el experimento. Como resultado de la mezcla de las soluciones A y B, la composición de la orina artificial utilizada es la que se detalla en la Tabla 2.6.

**Tabla 2.6** Composición de la orina artificial utilizada.

	Concentración (mM)	Concentración (ppm)
Na <sup>+</sup>	171.7	3949.4
K <sup>+</sup>	81.3	3169.8
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	43.5	782.2
Ca <sup>2+</sup>	4.7	189.7
Mg <sup>2+</sup>	2.1	50.3
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	16.1	499.7
Cl <sup>-</sup>	237.0	8413.0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	20.1	1933.4
oxalato	0.3	24.6

### 2.3.2 Efecto de diferentes inhibidores sobre la cristalización de oxalato cálcico

Para el ensayo de diferentes inhibidores en concentraciones crecientes (Figura 2.11), se modificó el contenido de cada frasco individual, conteniendo 30mL de orina artificial, por adición de volúmenes crecientes de un stock concentrado de la sustancia a ensayar como inhibidor, de tal manera que la composición de la orina, por la adición del pequeño volumen (10 a 300 µl), no ve alterada su composición de forma significativa.

<sup>96</sup> Grases F, Llobera A. Experimental model to study sedimentary kidney stones. Micron 29, 1998, 105

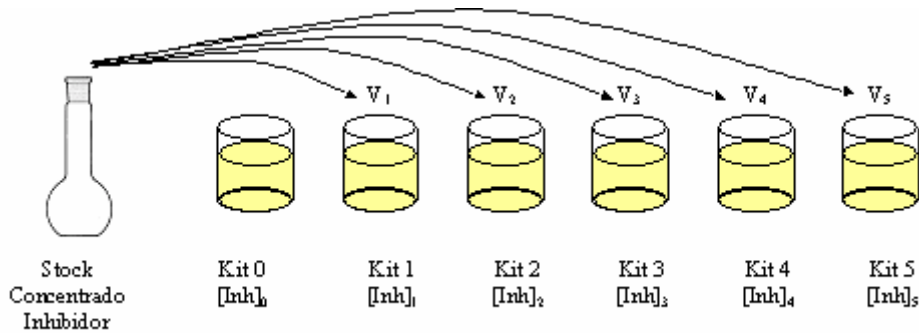


Figura 2.11 Esquema de ensayo de la capacidad inhibidora de una sustancia dada.

Cada una de las condiciones fue ensayada por triplicado. Tras medir la cantidad precipitada de Ca en cada uno de los casos, se calculó el porcentaje de inhibición, refiriéndolo a la precipitación de Ca en ausencia de inhibidores, según la expresión:

$$\% \text{ INHIBICIÓN KIT INH } i = 100 \left( 1 - \frac{\mu\text{g Ca (KIT INH } i)}{\mu\text{g Ca (KIT 0)}} \right)$$

Las sustancias ensayadas como posibles inhibidores de la cristalización de oxalato cálcico fueron: fitato, pirofosfato, sulfato de condroitina, citrato, algunos metales a nivel de trazas ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ), y dilución urinaria.

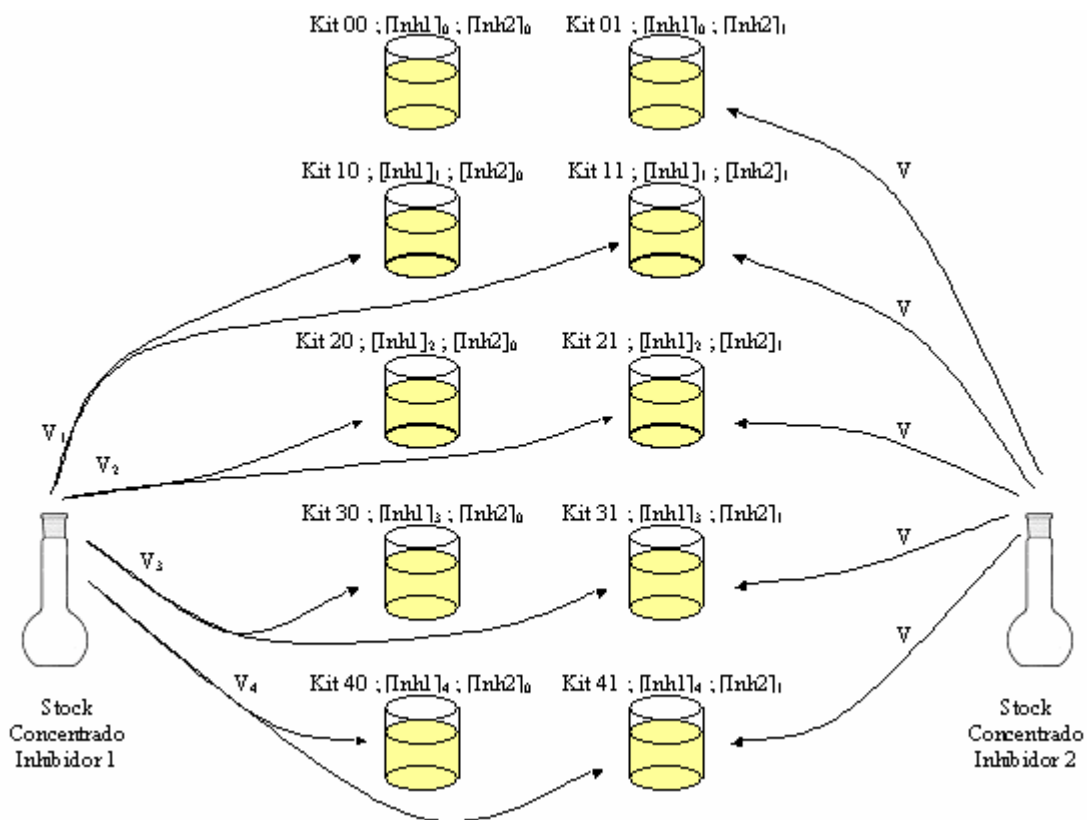
Cuando se estudió el efecto del citrato, se tuvo en cuenta la disminución de calcio libre en orina artificial debida a la formación de complejos solubles de calcio y citrato. Así, se añadió el correspondiente suplemento de calcio, controlando el calcio libre en solución mediante un electrodo selectivo a calcio, para alcanzar la misma sobresaturación de oxalato cálcico que se da en ausencia de citrato. Debemos considerar que una disminución en la sobresaturación podría producir una disminución en la velocidad de precipitación que no podría ser atribuida a efectos inhibidores. En el caso del resto de sustancias ensayadas, debido a sus bajos niveles de concentración, la disminución en los niveles de calcio libre son despreciables, de manera que no resultó necesaria la adición de suplementos de calcio.

### 2.3.3 Efecto de diferentes inhibidores sobre orinas naturales litógenas

La aplicación del ensayo RLU sobre muestras nocturnas de orina litogénica (que cristalizan formando oxalato cálcico) permitió evaluar la eficacia de inhibición real de algunos inhibidores, como fitato, citrato, sulfato de condroitina, pirofosfato y dilución urinaria, por adición de un stock concentrado de la sustancia a ensayar como inhibidor en cada frasco individual, conteniendo 30mL de orina real, de manera similar a la llevada a cabo en el apartado 2.3.2.

**2.3.4 Efecto de mezclas de inhibidores sobre la cristalización de oxalato cálcico**

Para el ensayo de diferentes mezclas binarias de inhibidores (Figura 2.12) se procedió de manera que la concentración de un inhibidor (inhibidor 2) se mantuvo constante, mientras que otro (inhibidor 1) se introdujo en concentraciones crecientes, modificando el contenido de cada frasco individual, conteniendo 30mL de orina artificial, por adición de pequeños volúmenes de stocks concentrados de las sustancias a ensayar. Los resultados de inhibición de esta serie se compararon entonces con los obtenidos en una serie en la que el inhibidor 2 estaba ausente y sólo se encontraba el inhibidor 1 en concentraciones crecientes.



**Figura 2.12** Esquema de ensayo de la capacidad inhibidora para mezclas de inhibidores.

De esta manera, se ensayaron las mezclas resultantes de las combinaciones binarias de fitato, pirofosfato, sulfato de condroitina, citrato y metales traza.



## **2.4 ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ORINA NOCTURNA COMO ESPÉCIMEN PARA EL DIAGNOSTICO DE ALTERACIONES EN LA LITIASIS OXALOCÁLCICA**

Para evaluar la utilización de la orina nocturna como el espécimen más adecuado para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad litiasica, se estudió la capacidad de múltiples parámetros de este espécimen urinario para discriminar entre pacientes afectados de litiasis oxalocálcica y controles sanos.

Para la selección de los pacientes litiasicos y su clasificación se llevó a cabo el análisis detallado de los cálculos renales correspondientes según el protocolo establecido en el apartado 1.5.2. Los individuos participantes en el estudio estaban libres de restricciones dietéticas o de actividad física, no tomaban medicación alguna que pudiera alterar la composición química de la orina, ni padecían de obstrucción urinaria o infección en el momento de la investigación.

La población de estudio seleccionada se divide en tres grupos claramente diferenciados:

- Pacientes de litiasis oxalocálcica monohidratada
- Pacientes de litiasis oxalocálcica dihidratada
- Controles sanos respecto a la enfermedad litiasica

Para cada individuo participante en el estudio se recogió una muestra de orina (en ayunas) correspondiente a la orina acumulada durante el periodo de descanso nocturno (orina de aproximadamente 8 horas). Tanto los parámetros urinarios medidos en cada muestra de orina, como las herramientas estadísticas aplicadas para la evaluación de los datos obtenidos son análogos a los aplicados en el apartado 2.2.1. En este caso, las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo entre el grupo de controles sanos y los grupos de pacientes de litiasis oxalocálcica monohidratada y dihidratada, respectivamente.

## **CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## Índice del Capítulo 3: Resultados y Discusión

<b>3.1 Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de marcadores de la litogénesis</b>	82
3.1.1 Método de determinación de oxalato por CG-MS	83
3.1.2 Método de determinación de oxalato, citrato, ácido úrico y creatinina en orina mediante electroforesis capilar	83
3.1.3 Método de determinación de fitato en orina mediante ICP-MS	86
3.1.4 Método de determinación de pirofosfato en orina mediante ICP-MS	89
<b>3.2 Evaluación del riesgo temporal de formación de cálculos renales</b>	91
3.2.1 Evaluación del riesgo circadiano de formación de cálculos renales	91
3.2.1.1 Riesgo de cristalización de oxalato cálcico	92
3.2.1.2 Riesgo de cristalización de otras sales	94
3.2.1.3 Relevancia de los resultados obtenidos	94
3.2.2 Evaluación del riesgo estacional de formación de oxalato cálcico	97
3.2.2.1 Relevancia de los resultados obtenidos	99
<b>3.3 Estudios <i>in vitro</i> sobre la inhibición de la cristalización de oxalato cálcico</b>	99
3.3.1 Caracterización del sistema de cristalización	99
3.3.2 Inhibición de la cristalización de oxalato cálcico por varias sustancias	102
3.3.2.1 Aspectos cinéticos de la inhibición	106
3.3.2.2 Efecto de diferentes inhibidores sobre orinas litógenas naturales	107
3.3.3 Inhibición de la cristalización de oxalato cálcico por mezclas de inhibidores	108
<b>3.4 Estudio preliminar de la orina nocturna como espécimen para el diagnóstico de alteraciones en la litiasis oxalocálcica</b>	112
3.4.1 Análisis multivariable del riesgo litógeno	115
3.4.1.1 Litiasis de COM	117
3.4.1.2 Litiasis de COD	119
3.4.2 Relevancia de los resultados y necesidades futuras	121

Este capítulo recoge aquellos aspectos más relevantes de los resultados de cada uno de los estudios presentados. Sin embargo, no se pretende repetir el contenido de los trabajos que se adjuntan en los anexos, sino que se intenta dar una visión de conjunto resaltando aquellos aspectos que suponen una nueva contribución en el contexto de la litiasis oxalocálcica. Por otro lado, aquellos estudios que no han sido recogidos en los anexos son expuestos y discutidos de manera más detallada.

### 3.1 DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE LA LITOGÉNESIS

El carácter multifactorial de la urolitiasis explica la diversidad de parámetros urinarios de interés cuando se aborda el estudio diagnóstico de la enfermedad para su tratamiento: pH, calcio, magnesio, fósforo, oxalato, citrato, ácido úrico y creatinina... A lo largo de esta memoria se han analizado también otros analitos, como glicosaminoglicanos, fitato o pirofosfato, que no son analizados de manera rutinaria en la práctica clínica, a pesar de la numerosa bibliografía que hace intuir su importancia en los procesos de litiasis renal.

Para la determinación de algunos de estos parámetros como pH, glicosaminoglicanos, Ca, Mg, P, Na y K se han aplicado métodos analíticos ya establecidos (apartado 2.1). Éstos tienen como características comunes el establecimiento de respuestas altamente selectivas, con precisión, exactitud, sensibilidad, límite de detección e intervalo de respuesta lineal adecuados para su determinación en orina. Ahora bien, no todos los analitos presentan las características físico-químicas idóneas para su determinación mediante respuestas altamente selectivas, especialmente en matrices complejas donde la presencia de interferentes puede modificar o enmascarar la respuesta del analito, de manera que requieren el uso de técnicas de separación para su determinación. Estas técnicas de separación pueden ser de dos tipos muy generales:

- Un primer tipo general de técnicas de separación son aquellas que implican la detección de las especies de manera continua tras ser separadas, integrando los sistemas de separación y de detección. A este tipo corresponden los métodos analíticos desarrollados en nuestro laboratorio para la determinación de oxalato, citrato, ácido úrico y creatinina mediante cromatografía o electroforesis capilar.
- Otras técnicas de separación no comportan en sí mismas la detección o determinación integrada con el proceso de separación; es decir, la medición de la señal analítica se efectúa de manera discontinua y posterior a dicho proceso de separación. A este género corresponden los métodos analíticos desarrollados en nuestro laboratorio para la determinación de fitato y pirofosfato en orina.

A continuación se describirán y discutirán los resultados de optimización y validación de los métodos analíticos desarrollados a lo largo de esta tesis.

### 3.1.1 Método de determinación de oxalato por CG-MS (Anexo 1)

El trabajo recogido en el Anexo 1 trata sobre la determinación de trazas de oxalato en cálculos renales y en muestras relacionadas (orina y algunos alimentos) mediante la técnica de cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-MS). Este trabajo fue desarrollado durante una estancia en el Laboratorio de Investigación en Litiasis Renal de la Universidad de las Islas Baleares, bajo la dirección del Profesor Félix Grases. En el Anexo 1 encontramos una descripción completa y discusión del método desarrollado. Cabe destacar que a pesar de mostrar buenas características de sensibilidad, rango lineal, límites de detección y cuantificación, selectividad, precisión y exactitud, el método requiere un pre-tratamiento de muestra bastante largo y tedioso previo a la determinación mediante CG-MS, incluyendo etapas de transformación de oxalato a ácido oxálico mediante resinas de intercambio catiónico, evaporación a sequedad y derivatización del ácido oxálico mediante la formación del derivado trimetilsilado. Este hecho unido a la no disponibilidad del instrumental necesario para la aplicación de este método en nuestros laboratorios, explica que no se utilizara el citado método en los estudios desarrollados con posterioridad, de manera que no se hará en esta memoria una discusión más detallada sobre él.

### 3.1.2 Método de determinación de oxalato, citrato, ácido úrico y creatinina en orina mediante electroforesis capilar (Anexo 2)

El conocimiento de estos parámetros urinarios en individuos litiásicos permite realizar un diagnóstico de la magnitud de sus alteraciones urinarias litógenas (hiperoxaluria, hipocitraturia o hiperuricosuria), así como evaluar su función renal (creatinina). Cabe destacar que la determinación de estos analitos por métodos existentes está sujeta a algunos inconvenientes prácticos. Así, algunos de los métodos enzimáticos utilizados para la determinación de oxalato<sup>97</sup>, citrato<sup>98</sup>, ácido úrico<sup>99</sup> y creatinina<sup>100</sup> se caracterizan por su carácter monocomponente y un tratamiento de muestra laborioso, requiriendo dilución, filtración, centrifugación, ajuste de pH, incubación..., con la necesidad de consecuentes largos tiempos de análisis. Otros factores limitantes pueden ser la falta de especificidad para el analito de interés, la existencia de reacciones cruzadas que condicionan los resultados o la necesidad de componentes especiales que, en algunos

---

<sup>97</sup> Hallson PC, Rose GA. Simplified and rapid enzymic method for determination of urinary oxalate. Clin Chim Acta 55, 1974, 29

<sup>98</sup> Petrarulo M, Facchini P, Cerelli E, Marangella M, Linari F. Citrate in urine determined with a new citrate lyase method. Clin Chem 41, 1995, 1518

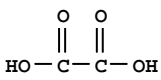
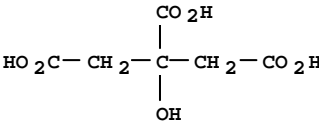
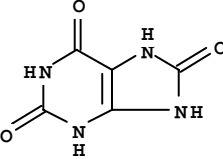
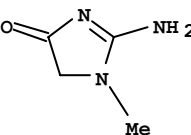
<sup>99</sup> Whelton A, Watson AJ, Rock RC. In: Burtis CA, Ashwood ER (Eds.). Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders, Philadelphia, 1996, pp. 569-592

<sup>100</sup> Fujita T, Takata S, Sunahara Y. Enzymic rate assay of creatinine in serum and urine. Clin Chem 39, 1993, 2130

casos, pueden resultar algo caros (p.e., para el análisis de oxalato). Por otro lado, los métodos cromatográficos utilizados para la determinación de oxalato<sup>101</sup>, citrato<sup>102</sup>, ácido úrico<sup>103</sup> y creatinina<sup>103</sup> se caracterizan por el consumo de grandes cantidades de reactivos y el requerimiento de diferentes tipos de columnas para su análisis. Finalmente, otros métodos, como la reacción de Jaffé<sup>104</sup>, usualmente utilizada para la determinación de creatinina, también muestra algunos inconvenientes como la falta de especificidad (interferido por algunas sustancias como proteínas, glucosa, cafeína, ácido ascórbico...) o el consumo de grandes cantidades de reactivos.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se consideró interesante desarrollar un método analítico alternativo que permitiese la determinación conjunta de estas especies, superando las limitaciones anteriores más notables. Dado que las moléculas de interés muestran una carga eléctrica dependiente del pH, pueden ser determinadas mediante la técnica de electroforesis capilar, en función de su diferente relación carga/radio, mediante detección espectrofotométrica UV (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1** Analitos analizados por CZE: estructura molecular, constantes de acidez y longitud de onda analítica.

Analito	Estructura molecular	Constantes de acidez	Longitud de onda analítica
Ácido Oxálico		pKa <sub>1</sub> 1,23 pKa <sub>2</sub> 4,19	195 nm (poco sensible)
Ácido Cítrico		pKa <sub>1</sub> 3,14 pKa <sub>2</sub> 4,77 pKa <sub>3</sub> 6,39	195 nm (poco sensible)
Ácido Úrico		pKa <sub>1</sub> 5,4 pKa <sub>2</sub> 5,5	234 nm (muy sensible)
Creatinina		pKa <sub>1</sub> 4,4	234 nm (muy sensible)

<sup>101</sup> Pfeiffer K, Berg W, Bongartz D, Hesse A. The direct determination of urinary oxalate by non-suppressed ion chromatography. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 35, 1997, 305

<sup>102</sup> Ogawa Y, Morozumi M, Tanaka T, Yamaguchi K. Determination of urinary citrate by ion chromatography *J Urol* 135, 1986, 178

<sup>103</sup> Jen J, Hsiao S, Liu K. Simultaneous determination of uric acid and creatinine in urine by an eco-friendly solvent-free high performance liquid chromatography method. *Talanta* 58, 2002, 711

<sup>104</sup> Gatti R, Lazzarotto V, De Palo VD, Cappellin E, Spinella P, De Palo EF. A rapid urine creatinine assay by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 20, 1999, 2917

Las pruebas preliminares para la determinación simultánea de las cuatro especies mediante el modo de polaridad inversa con inversión del flujo electroosmótico resultaron en electroferogramas con picos de algunos de los analitos superpuestos con otros picos correspondientes a diferentes componentes de la matriz urinaria. Como electrolito se utilizaron tampones fosfato 25-100 mM con bromuro de cetiltrimetilamonio 0.05-1.0 mM como inversor del flujo electroosmótico a pH 5.5-7.5, utilizando potenciales de separación entre 10-30kV. Además, como consecuencia de la gran sensibilidad de detección para el ácido úrico y la creatinina se producía saturación de la señal fotométrica al analizar las muestras con una dilución 1:5. El uso de diluciones urinarias 1:10-1:20 implicó problemas de cuantificación para oxalato y citrato, resultado de la reducida sensibilidad para éstos.

La optimización del método de ensayo (Anexo 2) reveló que, como consecuencia de la complejidad de la matriz urinaria, el nivel de concentración y la sensibilidad de detección para los diferentes analitos, la mejor opción para llevar a cabo esta determinación es procesar dos alícuotas de la muestra de orina según las condiciones de ensayo de la Tabla 3.2. Se procesa una alícuota con dilución elevada (1:20) para la determinación de ácido úrico y creatinina mediante el modo de polaridad directa. Al pH de trabajo del electrolito (pH 6,5), estos analitos, con una carga negativa moderada (ácido úrico) o nula (creatinina), muestran una baja movilidad electroforética, migrando a través del capilar gracias al flujo electroosmótico (tiempos de migración < 8 min). La elevada carga negativa de oxalato y citrato les confiere una gran movilidad electroforética e impide que alcancen el detector, debido a la insuficiente magnitud del flujo electroosmótico. Para analizar oxalato y citrato se aplica el modo de polaridad inversa sobre una alícuota con dilución reducida (1:5), de manera que estas especies migran a través del capilar, gracias a su gran movilidad electroforética, alcanzando el detector en tiempos < 8 min. En este otro modo, la baja movilidad electroforética de ácido úrico y creatinina explica que no se observen picos para estas especies en el electroferograma, debido a la mayor magnitud del flujo electroosmótico que fluye en dirección contraria al detector.

**Tabla 3.2** Condiciones de ensayo del método de electroforesis capilar.

<b>Características del capilar</b>	Capilar de sílice fundida con recubrimiento externo de poliimida 50 cm de longitud (40 cm al detector); 75 µm de diámetro interno
<b>Electrolito</b>	50 mM fosfato; pH 6,5
<b>Temperatura</b>	25°C
<b>Inyección</b>	Hidrodinámica (aplicando 0,5 psi durante 5 seg.)
<b>Potencial aplicado</b>	30 kV, polaridad directa: ácido úrico y creatinina -30 kV, polaridad inversa: oxalato y citrato
<b>Tratamiento de muestra</b>	Dilución 1:20 + acidificación (pH 3-4): ácido úrico y creatinina Dilución 1:5 + acidificación (pH 3-4): oxalato y citrato

Los resultados recogidos en el Anexo 2 demuestran la aplicabilidad del método para la medida de oxalato, citrato, ácido úrico y creatinina en orina, en función de la idoneidad de los parámetros de validación del método, del proceso de congelación como método de conservación de las muestras y la buena comparabilidad de los resultados obtenidos con el presente método en relación con los métodos oficiales usualmente utilizados en análisis clínicos. Además, cabe citar algunas de las múltiples ventajas que presenta el uso de la electroforesis capilar de zona con respecto a otras técnicas analíticas utilizadas para la determinación de estos analitos: posibilidad de analizar diversos analitos en el mismo proceso, simplicidad derivada del mínimo tratamiento de muestra, rapidez de análisis, fácil automatización y alta capacidad de procesamiento de muestras, bajos costes de análisis, buena reproducibilidad y necesidad de pequeñas cantidades de muestra.

Las principales limitaciones del método se refieren al uso de la electroforesis capilar, técnica analítica mucho menos establecida que otras, como la cromatografía, de manera que, aunque con implementación creciente, el número de equipos y personal adecuado para este tipo de análisis puede ser hoy en día todavía escaso. Aun así, la simplicidad del método desarrollado haría fácil su implementación en laboratorios clínicos como herramienta de diagnóstico rutinaria de los correspondientes desórdenes metabólicos que afectan a la excreción urinaria de las especies consideradas.

### 3.1.3 Método de determinación de fitato en orina mediante ICP-MS (Anexo 3)

El interés creciente en la determinación de fitato o hexafosfato de inositol (IP6) en fluidos biológicos encuentra su explicación en la variedad de efectos positivos que esta sustancia, presente de forma natural en cereales, legumbres, tubérculos, frutas y vegetales<sup>105</sup>, tiene sobre la salud, incluyendo la prevención de carcinogénesis<sup>106</sup>, enfermedades coronarias<sup>107</sup>, propiedades antioxidantes<sup>108</sup>... En el campo de la urolitiasis, el fitato previene, a concentraciones muy bajas, el desarrollo de cálculos renales<sup>109,110</sup>. Consecuentemente, el incremento de fitato en orina, mediante medidas dietéticas o farmacológicas, ha sido propuesto como un tratamiento efectivo para disminuir el riesgo de recidiva en pacientes formadores de cálculos de oxalato y fosfatos cálcicos<sup>111</sup>.

---

<sup>105</sup> Reddy NR. Occurrence, Distribution, Content and Dietary Intake of Phytate. In: Reddy NR and Sathe SK (ed.). Foods Phytate. CRC Press, 2002. p. 36-63.

<sup>106</sup> Kennedy AR. The evidence for soybean products as cancer preventive agents. J Nutr 125, 1995, 733

<sup>107</sup> Thompson LU. Antioxidants and hormone-mediated health benefits of whole grains. Crit Rev Food Sci Nutr 34, 1994, 473

<sup>108</sup> Graf E, Eaton JW. Antioxidant functions of phytic acid. Free Radical Biol Med 8, 1990, 61

<sup>109</sup> Grases F, March JG, Prieto RM, Simonet BM, Costa-Bauzá A, García-Raja A, Conte A. Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people. Scand J Urol Nephrol 34, 2000, 162

<sup>110</sup> Curhan GC, Willett WC, Knight EL, Stampfer MJ. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in younger women: Nurses Health Study II. Arch Intern Med 164, 2004, 885

<sup>111</sup> Conte A, Pizá P, García-Raja A, Grases F. Urinary lithogen risk test: usefulness in the evaluation of renal lithiasis treatment using crystallization inhibitors (citrate and phytate). Arch Esp Urol 52, 1999, 305



Cabe destacar que la mayoría de metodologías desarrolladas para la determinación de fitato, no muestran la sensibilidad adecuada para permitir su aplicación a fluidos biológicos, debido a los bajos niveles de fitato que presentan estas muestras y su compleja matriz. Las aplicaciones desarrolladas hasta la fecha para fluidos biológicos<sup>112,113</sup> son escasas y están caracterizadas por largos y tediosos tratamientos de muestra (incluyendo procesos de purificación, hidrólisis, derivatización, liofilización...), cosa que dificulta su aplicabilidad en el análisis clínico rutinario.

Ante la necesidad de una metodología exacta, precisa y más simple para la determinación de fitato en orina y teniendo en cuenta las características de alta selectividad y alta sensibilidad que está debería poseer, nos planteamos la posibilidad de utilizar dos alternativas diferentes.

La primera de ellas, consistía en la utilización de un sistema integrado de alta sensibilidad y selectividad como es la técnica de cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas mediante una interfase de ionización de electrospray, que permite la determinación de especies moleculares. Los intentos de optimización de la determinación de fitato en orina con este sistema resultaron frustrados, debido a la facilidad y poca homogeneidad de la fragmentación del analito, así como a la variabilidad de la formación de aductos alcalinos de fitato en muestras de orina, que no permitieron obtener una respuesta analítica suficientemente robusta en el espectrómetro de masas, pese a la variedad de tampones ensayados:

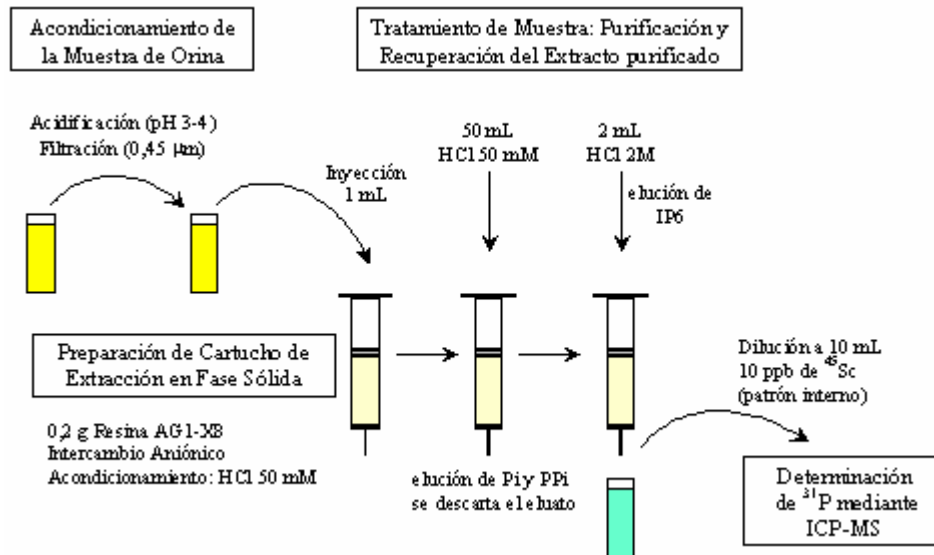
- MeOH/H<sub>2</sub>O 50% en ausencia y presencia de TEA 0,1%
- 0,5 M NaAcO/TEA 0,1%
- 0,05M NH<sub>4</sub>AcO/TEA 0,1%
- 0,2 % HCOOH en H<sub>2</sub>O

La segunda de las opciones consistía en la utilización de cartuchos de extracción en fase sólida para la purificación de fitato mediante un proceso altamente selectivo de intercambio aniónico que permitiera separarlo de cualquier otra fuente de fósforo presente en orina. Posteriormente se llevaría a cabo la determinación del contenido total de fósforo de los extractos purificados de fitato mediante un sistema altamente sensible como es la técnica de ICP-MS. En el Anexo 3 encontramos la descripción de los estudios de optimización del proceso de purificación del método propuesto. A modo de resumen se muestra un esquema del método analítico optimizado en la Figura 3.1.

---

<sup>112</sup> March JG, Simonet BM, Grases F. Determination of phytic acid by gas chromatography-mass spectroscopy: application to biological samples. *J Chromatogr B* 757, 2001, 247

<sup>113</sup> March JG, Simonet BM, Grases F, Salvador A. Indirect determination of phytic acid in urine. *Anal Chim Acta* 367, 1998, 63



**Figura 3.1.** Esquema del proceso de determinación de fitato por ICP-MS.  
Pi: fosfato; PPI: pirofosfato; IP6: fitato.

Los parámetros de validación del método indican un rango lineal y límites de detección adecuados para la determinación de las cantidades usuales de fitato en orina (0,2-6,0 ppm), así como la ausencia de interferencia de fosfato, pirofosfato y pH urinarios, observando una exactitud y precisión adecuadas.

Las principales características de este método son su simplicidad, requerimientos de pequeñas cantidades de muestra, alta capacidad de tratamiento de muestras (entre 6 y 10 minutos por muestra para tandas entre 100 y 50 muestras de orina, respectivamente), alta selectividad y elevada sensibilidad. Dadas estas características, el presente método representa la mejor alternativa para la determinación de fitato en fluidos biológicos, especialmente si consideramos la escasez de métodos desarrollados para este fin, y que, a su vez, éstos están caracterizados por largos y tediosos pre-tratamientos de muestra.

Finalmente, el método desarrollado en nuestro laboratorio puede contribuir a la elucidación de la acción del fitato en la urolitiasis, pudiendo ayudar a establecer los niveles normales y patológicos de fitato en orina en relación con la enfermedad litiásica. Resultados preliminares obtenidos en este estudio (Tabla 6 del Anexo 3) sugieren una relación clara entre la litiasis oxalocálcica y valores bajos de concentración de fitato en orina. Por tanto, el presente método utilizado como herramienta rutinaria podría permitir la predicción del riesgo de desarrollar cálculos cálcicos, así como un diagnóstico, tratamiento y seguimiento más racional de la enfermedad litiásica.

### 3.1.4 Método de determinación de pirofosfato en orina mediante ICP-MS (Anexo 4)

El pirofosfato (PPi), al igual que el fitato, es otro componente natural excretado en la orina con capacidad de inhibir, a bajas concentraciones, la formación de oxalato cálcico e hidroxiapatita, actuando así como inhibidor natural de la urolitiasis<sup>17,114,115</sup>. Pero a su vez, altas concentraciones de pirofosfato pueden provocar cristalizaciones patológicas en cartílagos, tendones y ligamentos<sup>116</sup>. De aquí el interés existente en la determinación de pirofosfato en fluidos biológicos, especialmente en orina, para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de estas alteraciones patológicas.

La mayoría de metodologías existentes para la determinación de pirofosfato en orina muestran algunas limitaciones importantes. Así, los métodos químicos<sup>117,118</sup> son bastantes laboriosos, mientras que los enzimáticos<sup>119,120,121</sup> requieren a menudo componentes especiales, que resultan caros o no disponibles comercialmente. Teniendo en cuenta estas limitaciones, nos planteamos la posibilidad de desarrollar un nuevo método para determinar pirofosfato en orina basado en los mismos principios que la metodología desarrollada en el apartado anterior para el fitato. Es decir, se utilizaron cartuchos de extracción en fase sólida para la purificación de pirofosfato mediante un proceso altamente selectivo de intercambio aniónico que permite separarlo de cualquier otra fuente de fósforo presente en orina, seguido de la determinación del contenido total de fósforo de los extractos purificados de pirofosfato mediante un sistema altamente sensible como es la técnica de ICP-MS. Además, se observó que, seleccionando de manera adecuada las condiciones de purificación, se puede recuperar posteriormente otro extracto purificado de fitato, permitiendo la extensión del método desarrollado para pirofosfato a este otro analito. En el Anexo 4 encontramos la descripción de los estudios de optimización de los procesos de purificación del método propuesto. A modo de resumen, en la Figura 3.2, se muestra un esquema del método analítico extendido (método para la determinación de pirofosfato y fitato en orina).

<sup>114</sup> Sharma S, Vaidyanathan S, Thind SK, Nath R. Urinary excretion of inorganic pyrophosphate by normal subjects and patients with renal calculi in north-western india and the effect of diclofenac sodium upon urinary excretion of pyrophosphate in stone formers. *Urol Int* 48, 1992, 404

<sup>115</sup> Breslau NA, Padalino P, Kok DJ, Kim YG, Pak CYC. Physicochemical effects of a new slow-release potassium phosphate preparation (UroPhos-K) in absorptive hypercalciuria. *J Bone Miner Res* 10, 1995, 394

<sup>116</sup> Ryan LM, McCarty DJ. In: Koopman W (ed). *Arthritis and Allied Conditions: A textbook of Rheumatology*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1997, pp. 2103-2126

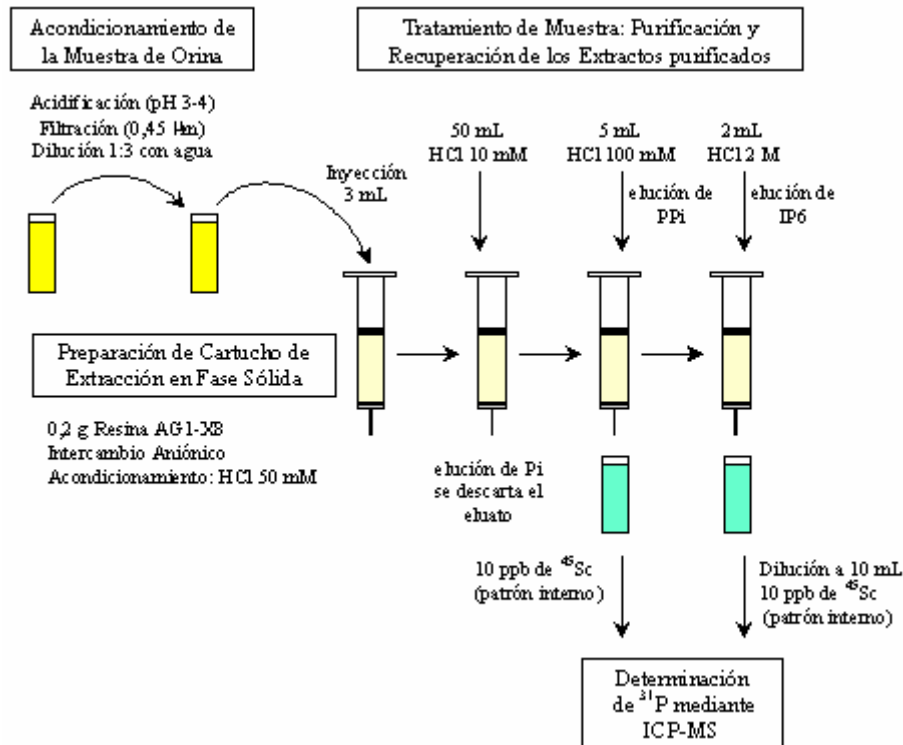
<sup>117</sup> Heinonen JK, Honkasalo SH, Kukko EI. A method for the concentration and for the colorimetric determination of nanomoles of inorganic pyrophosphate. *Anal Biochem* 117, 1981, 293

<sup>118</sup> Chang, G.; Denq, R. Determination of inorganic pyrophosphate concentration in urine. *Int. J. Biochem.* 1985, 17, 733-735

<sup>119</sup> O'Brien WE. A continuous spectrophotometric assay for argininosuccinate synthetase based on pyrophosphate formation. *Anal Biochem* 76, 1976, 423-430

<sup>120</sup> Cartier PH, Thuillier L. Measurement of inorganic pyrophosphate in biological fluids and bone tissues. *Anal Biochem* 61, 1974, 416

<sup>121</sup> Baykov AA, Avaeva SM. A sensitive method for measuring pyrophosphate in the presence of a 10,000-fold excess of orthophosphate using inorganic pyrophosphatase. *Anal Biochem* 119, 1982, 211



**Figura 3.2.** Esquema del proceso de determinación de pirofosfato y fitato por ICP-MS.  
Pi: fosfato; PPI: pirofosfato; IP6: fitato.

Los parámetros de validación del método indican un rango lineal y límites de detección adecuados para la determinación de las cantidades usuales de pirofosfato en orina (0,0-15,0 ppm), así como la ausencia de interferencia de fosfato, fitato y pH urinarios y una exactitud y precisión adecuadas.

Las principales características del método son análogas a las discutidas en el apartado anterior para la determinación de fitato, dada la similitud de los métodos analíticos desarrollados. Como principal limitación para ambos métodos cabe destacar la disponibilidad relativamente baja de equipamientos de ICP-MS en los laboratorios clínicos, debido a sus altos costes de adquisición, funcionamiento y mantenimiento.

Cabe destacar que, a pesar de la más que probable utilidad de conocer los niveles de pirofosfato y fitato en orina, su determinación no es habitual en laboratorios clínicos. Teniendo en cuenta que el presente método permite la determinación de ambas sustancias, con la ventaja que esto supone respecto a los métodos ya existentes para ambos analitos, así como la creciente implantación de la técnica de ICP-MS en laboratorios clínicos, el presente método representa una clara alternativa para la determinación rutinaria de ambos analitos en muestras biológicas y su aplicación al diagnóstico, tratamiento y seguimiento racional de la enfermedad litiasica, entre otras.

### 3.2 EVALUACIÓN DEL RIESGO TEMPORAL DE FORMACIÓN DE CÁLCULOS RENALES

En este apartado se describirán y discutirán aquellos resultados más relevantes sobre la evaluación del riesgo temporal (diario y estacional) de formación de cálculos renales, con especial atención al riesgo de cristalización de oxalato cálcico.

#### 3.2.1 Evaluación del riesgo circadiano de formación de cálculos renales (Anexo 5)

En la introducción hemos visto que se requieren evaluaciones correctas de las alteraciones urinarias y su magnitud con el objetivo de aplicar los tratamientos terapéuticos más efectivos y diagnosticar el riesgo de recurrencia en cada paciente. Esto se hace normalmente a través de análisis metabólico-mineral de orina de 24 horas<sup>122</sup>. En cualquier caso, las condiciones requeridas para la formación de cristales en el tracto urinario pueden darse únicamente de forma temporal, incluso a lo largo de un mismo día. Así, el estudio detallado de la variación de la composición de la orina durante 24 horas puede proporcionar una evaluación más adecuada del riesgo litógeno que el simple análisis de 24 horas, ya que el primero puede revelar los momentos más propicios para la iniciación de la urolitiasis durante un día.

Los trabajos publicados sobre la variación circadiana de la composición urinaria y su efecto sobre la litogenicidad<sup>123,124,125</sup> son sólo parciales, estudian únicamente algunos de los parámetros litógenos clave y no evalúan ningún parámetro que proporcione una idea de la tendencia global a la precipitación patológica o indique el riesgo de litogenicidad.

En contraposición, el principal objetivo en este trabajo era realizar una evaluación de la variación del riesgo litógeno, teniendo en cuenta las causas multifactoriales, mediante la inclusión de un mayor número de parámetros litogénicos en el estudio, la evaluación de las sobresaturaciones urinarias y la interpretación de los resultados de un parámetro que proporciona una idea global sobre el riesgo de litogénesis como es el ensayo RLU. Así, en este apartado se evaluó la variación a lo largo de 24 horas de diversas características urinarias directamente relacionadas con la urolitiasis, con el objetivo de identificar el comportamiento temporal del riesgo de cristalización patológica. En la Tabla 3.3 se muestran los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo.

<sup>122</sup> Robertson WG, Peacock M, Heyburn PJ, Marshall DH, Clark PB. Risk factors in calcium stone disease of the urinary tract. *Brit J Urol* 1978;50:449

<sup>123</sup> Robert M, Roux JO, Bourelly F, Boularn AM, Guiter J, Monnier L. Circadian variations in the risk of urinary calcium oxalate stone formation. *Brit J Urol* 74, 1994; 294

<sup>124</sup> Ahlstrand C, Larsson L, Tiselius HG. Variations in urine composition during the day in patients with calcium oxalate stone disease. *J Urol* 131, 1984, 77

<sup>125</sup> Vahlensieck EW, Bach D, Hesse A. Circadian rhythm of lithogenic substances in the urine. *Urol Res* 10, 1982, 195

**Tabla 3.3** Fluctuaciones diarias en varios parámetros urinarios. Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. † Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el periodo nocturno y los otros (periodos 1-5, diurno y 24 horas) mediante test de t de Student.

	Noche (0-9h)	Periodo1 (9-12h)	Periodo2 (12-15h)	Periodo3 (15-18h)	Periodo4 (18-21h)	Periodo5 (21-24h)	24 horas (0-24h)	Diurno (9-24h)
Diuresis (ml/h)	34 $\pm$ 12	63 $\pm$ 20†	67 $\pm$ 22†	48 $\pm$ 12	60 $\pm$ 16†	62 $\pm$ 18†	53 $\pm$ 20	64 $\pm$ 24†
pH	5.65 $\pm$ 0.20	5.83 $\pm$ 0.88	5.72 $\pm$ 0.92	6.33 $\pm$ 0.77	6.69 $\pm$ 0.73†	5.62 $\pm$ 0.46	-	-
RLU (mUA)	248 $\pm$ 64	127 $\pm$ 9†	128 $\pm$ 9†	145 $\pm$ 22†	160 $\pm$ 44†	126 $\pm$ 22†	-	-
Oxalato (mg/l)	33.1 $\pm$ 8.8	17.9 $\pm$ 9.3†	14.9 $\pm$ 7.3†	19.0 $\pm$ 6.6†	16.8 $\pm$ 6.3†	16.1 $\pm$ 9.7†	20.7 $\pm$ 7.1†	16.7 $\pm$ 7.7†
Calcio (mg/l)	206 $\pm$ 62	125 $\pm$ 83	87 $\pm$ 22†	126 $\pm$ 24†	91 $\pm$ 44†	86 $\pm$ 38†	126 $\pm$ 41†	97 $\pm$ 31†
Fósforo (mg/l)	1014 $\pm$ 444	371 $\pm$ 219†	254 $\pm$ 149†	695 $\pm$ 269	552 $\pm$ 332	768 $\pm$ 443	582 $\pm$ 323	507 $\pm$ 249
A. Úrico (mg/l)	601 $\pm$ 243	620 $\pm$ 336	444 $\pm$ 173	716 $\pm$ 279	532 $\pm$ 280	503 $\pm$ 275	549 $\pm$ 256	535 $\pm$ 262
Magnesio(mg/l)	135 $\pm$ 57	78 $\pm$ 42	55 $\pm$ 34†	86 $\pm$ 28	57 $\pm$ 24†	72 $\pm$ 41	83 $\pm$ 35	65 $\pm$ 25†
Citrato (mg/l)	492 $\pm$ 164	566 $\pm$ 260	362 $\pm$ 87	832 $\pm$ 43†	421 $\pm$ 184	409 $\pm$ 144	477 $\pm$ 123	478 $\pm$ 148
Fitato (mg/l)	0.83 $\pm$ 0.22	0.53 $\pm$ 0.15†	0.49 $\pm$ 0.22†	0.67 $\pm$ 0.23	0.47 $\pm$ 0.17†	0.69 $\pm$ 0.35	0.60 $\pm$ 0.18	0.53 $\pm$ 0.17†
GAGs (mg/l)	9.1 $\pm$ 3.3	9.1 $\pm$ 7.5	8.8 $\pm$ 7.4	9.4 $\pm$ 4.4	5.3 $\pm$ 4.5	9.3 $\pm$ 5.5	7.9 $\pm$ 4.5	7.5 $\pm$ 5.2
Creatinina (g/l)	1.6 $\pm$ 1.0	1.3 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 0.6	1.6 $\pm$ 0.9	1.0 $\pm$ 0.6	1.4 $\pm$ 1.1	1.3 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 0.7
Sodio (g/l)	3.2 $\pm$ 1.0	3.0 $\pm$ 1.6	3.0 $\pm$ 1.4	3.7 $\pm$ 0.8	3.7 $\pm$ 1.8	3.0 $\pm$ 1.9	3.3 $\pm$ 1.3	3.3 $\pm$ 1.5
Potasio (g/l)	1.0 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 1.3	2.9 $\pm$ 1.4†	2.6 $\pm$ 0.8†	1.9 $\pm$ 1.1	2.2 $\pm$ 1.4	1.9 $\pm$ 1.0	2.3 $\pm$ 1.3
Ca/Citrato (g/g)	0.51 $\pm$ 0.21	0.24 $\pm$ 0.09†	0.27 $\pm$ 0.09†	0.16 $\pm$ 0.01†	0.21 $\pm$ 0.07†	0.20 $\pm$ 0.05†	0.28 $\pm$ 0.07†	0.21 $\pm$ 0.04†
Ca/Mg (g/g)	1.8 $\pm$ 0.9	1.6 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.5	1.3 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.5
Ca/GAGs (g/g)	27 $\pm$ 10	10 $\pm$ 7†	11 $\pm$ 6†	14 $\pm$ 8†	13 $\pm$ 4†	9 $\pm$ 3†	16 $\pm$ 8	14 $\pm$ 6†
Ca/Fitato (g/g)	274 $\pm$ 97	184 $\pm$ 82	185 $\pm$ 80	199 $\pm$ 54	187 $\pm$ 54	128 $\pm$ 17†	212 $\pm$ 40	186 $\pm$ 13
-log AP(CaOx)	7.71 $\pm$ 0.14	8.13 $\pm$ 0.32†	8.23 $\pm$ 0.23†	8.07 $\pm$ 0.23†	8.07 $\pm$ 0.29†	8.24 $\pm$ 0.28†	-	-
-log AP(HAP)	52.99 $\pm$ 0.96	57.84 $\pm$ 0.75†	60.15 $\pm$ 0.87†	49.87 $\pm$ 0.85	49.93 $\pm$ 0.46	56.05 $\pm$ 0.58†	-	-
-log AP(BRU)	6.22 $\pm$ 0.20	6.71 $\pm$ 0.34†	7.12 $\pm$ 0.16†	6.19 $\pm$ 0.20	6.17 $\pm$ 0.20	6.62 $\pm$ 0.33†	-	-
-log AP(UAD)	8.43 $\pm$ 0.25	8.38 $\pm$ 0.43	8.41 $\pm$ 0.26	9.05 $\pm$ 0.38†	9.13 $\pm$ 0.51†	8.48 $\pm$ 0.22	-	-

### 3.2.1.1 Riesgo de cristalización de oxalato cálcico

En lo referente al riesgo de cristalización de oxalato cálcico debemos destacar las variaciones circadianas encontradas en relación a la diuresis, la sobresaturación urinaria y la presencia de inhibidores urinarios de la cristalización de oxalato cálcico:

- Diuresis. Observamos una diuresis significativamente disminuida en el periodo nocturno respecto a la diuresis diurna, debida posiblemente a un mayor consumo de fluidos durante el periodo de actividad diurna.
- Sobresaturación urinaria. La cantidad de calcio precipitada en el ensayo RLU se encuentra significativamente aumentada durante la noche, cosa que indica un riesgo más elevado de precipitación de sales cálcicas en este periodo. El producto de actividad de oxalato cálcico (y, por tanto, su sobresaturación urinaria) se encuentra significativamente incrementado durante la noche, como consecuencia de las concentraciones considerablemente aumentadas de calcio y oxalato en este periodo<sup>123,124</sup>, cosa que explica parcialmente este mayor riesgo nocturno de precipitación de oxalato cálcico.

- Inhibidores de la cristalización de oxalato cálcico:
  - Magnesio. Aparte de formar complejos solubles con oxalato que reducen la sobresaturación urinaria de oxalato cálcico, puede actuar como inhibidor de las diferentes fases de la constitución del cálculo<sup>17</sup>. De acuerdo con esto, se han reportado relaciones Ca/Mg significativamente aumentadas en pacientes litiásicos<sup>126</sup>. Así, la existencia de concentraciones de magnesio incrementadas, junto con la ausencia de relaciones Ca/Mg aumentadas durante la noche, indica una protección natural por parte del magnesio en el proceso de cristalización de oxalato cálcico durante el periodo nocturno.
  - Fitato. En el apartado 3.1.3 ya se describió el efecto beneficioso del fitato sobre la cristalización patológica de sales cálcicas. Los resultados de este estudio, con valores de fitato significativamente incrementado durante la noche y sin variaciones significativas para la relación Ca/fitato, señalan a esta sustancia como otra fuente extra de protección natural contra la precipitación de sales cálcicas durante el periodo nocturno.
  - Citrato. Actúa disminuyendo la sobresaturación urinaria de oxalato y fosfato cálcico<sup>17</sup> mediante la formación de complejos solubles con calcio, y ejerciendo cierta actividad inhibidora en el crecimiento cristalino y agregación de fosfato cálcico<sup>17</sup> y oxalato cálcico<sup>127</sup>. Según nuestros resultados, el citrato no supone una fuente extra de protección natural contra la precipitación de oxalato cálcico durante la noche, ya que la concentración de citrato no se encuentra incrementada en este periodo, sino, como ya fue reportado con anterioridad<sup>128</sup>, durante el período diurno a media tarde.
  - Glicosaminoglicanos. Aparte de los posibles efectos inhibidores sobre la nucleación heterogénea, el crecimiento cristalino y la agregación de oxalato cálcico, un bajo contenido de GAGs urinarios puede relacionarse con un epitelio patológico, que manifestaría una protección menor frente a la adhesión de micropartículas, que podrían actuar como nucleantes heterogéneos del oxalato cálcico y favorecer el desarrollo de cálculos<sup>129</sup>. Según los resultados obtenidos, de manera parecida al citrato, los GAGs tampoco suponen una fuente extra de protección natural durante el periodo nocturno.

---

<sup>126</sup> Robertson WG, Peacock M, Heyburn PJ, Marshall DH, Clark PB. Risk factors in calcium stone disease of the urinary tract. *Brit J Urol* 50, 1978, 449

<sup>127</sup> Kok DJ, Papapoulos SE, Bijvoet OLM. Low inhibition of crystal agglomeration and citrate excretion in recurrent calcium oxalate stone formers. *Contributions to nephrology* 58, 1987, 73

<sup>128</sup> Wangoo D, Thind SK, Gupta GS, Nath R. Chronobiology of urinary citrate excretion amongst stone-formers and healthy males from North Western India. *Urol Res* 19, 1991, 203

<sup>129</sup> Grases F, Llombart I, Conte A, Coll R, March JG. Glycosaminoglycans and oxalocalcic urolithiasis. *Nephron* 68, 1994, 449

Es importante observar que el ensayo RLU evalúa de forma global el riesgo de formación de sales cálcicas, de manera que en él se contemplan tanto la sobresaturación urinaria como la ausencia de inhibidores. Así, los resultados del ensayo RLU, indicando una mayor tendencia a la precipitación de oxalato cálcico durante la noche, se explican tanto por el aumento de la sobresaturación producida por los picos de concentración de oxalato y calcio durante la noche a lo largo del curso circadiano, como por la ausencia de picos de concentración para algunos inhibidores como los GAGs o el citrato. Sin embargo, la mayor excreción de fitato y magnesio que ocurre de manera natural durante la noche ayuda a contrarrestar parcialmente la mayor propensión a la cristalización que tiene lugar durante este periodo, cosa que explica que las cantidades de calcio precipitadas en el ensayo RLU no sean tan elevadas como las que presentan los pacientes oxalocálcicos.

### 3.2.1.2 Riesgo de cristalización de otras sales

A lo largo de este estudio no se ha podido evaluar de forma tan precisa la variación del riesgo de cristalización de ácido úrico o fosfatos cálcicos, debido, posiblemente, a que no se observaron variaciones circadianas notables que afectaran al resto de parámetros estudiados, como pH o las concentraciones urinarias de fósforo o ácido úrico. Aun así, observamos picos de sobresaturación de HAP y BRU en la orina nocturna y en la orina de la tarde, igual que en estudios precedentes<sup>130,131</sup>, posiblemente debidos a la elevada concentración de calcio durante la noche y al pH incrementado durante la tarde. En el caso del ácido úrico, la orina se encuentra ligeramente sobresaturada durante la mayoría del día, excepto durante la tarde, coincidiendo con el pH elevado de la orina.

### 3.2.1.3 Relevancia de los resultados obtenidos

Se ha podido demostrar que la composición urinaria sufre importantes variaciones a lo largo del día. Estas variaciones son de especial relevancia en parámetros relacionados con la litiasis oxalocálcica (diuresis, ensayo RLU y concentraciones urinarias de calcio, oxalato, citrato, magnesio, fitato) y contribuyen a aumentar el riesgo de cristalización de oxalato cálcico durante el periodo nocturno. Así pues, podemos inferir que cualquier anomalía en los parámetros críticos que condicionan la litiasis (sobresaturación, promotores, inhibidores o morfoanatomía renal) que pueda concurrir en un individuo, tendrá una incidencia más destacada durante dicho período. Además, este hecho debería ser tenido en cuenta a la hora de diseñar los tratamientos dietéticos o farmacológicos de

---

<sup>130</sup> Ogawa Y. Impact of sodium-potassium citrate on the diurnal variations in urinary calcium oxalate and calcium phosphate saturation levels in normal individuals. *Brit J Urol* 73, 1994, 133

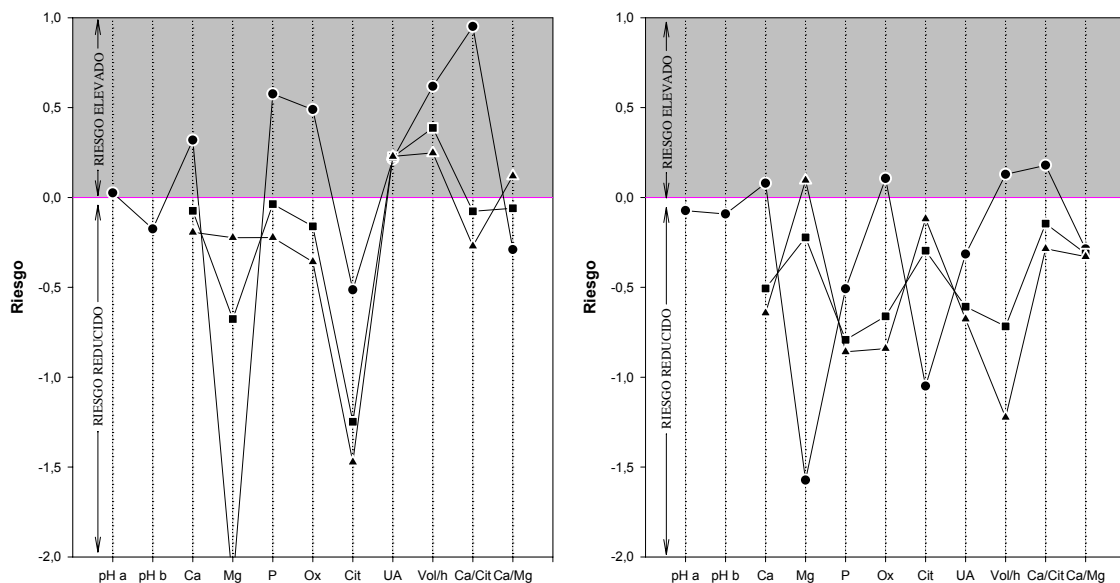
<sup>131</sup> Ogawa Y. Circadian rhythms of urinary saturation levels of calcium oxalate and calcium phosphate in normal male individuals. *Hinyokika Kyo. Acta Urologica Japonica* 39, 1993, 785



la enfermedad litiasica, buscando disminuir el riesgo litógeno durante la noche mediante la disminución de la sobresaturación urinaria y el aumento del poder inhibidor de la orina.

Por otro lado, se ha puesto de manifiesto que la orina de 24 horas no caracteriza de manera adecuada las propiedades de cristalización de la orina de un determinado individuo. Esto se observa con claridad en la Figura 3.3, que muestra los principales factores de riesgo de urolitiasis (calculados según la Tabla 2.4) para dos de los individuos del estudio. Podemos observar que los principales factores de riesgo de urolitiasis se encuentran, en general, más elevados en las orinas nocturnas que en las orina diurnas. Esto explica que estos factores de riesgo se puedan encontrar enmascarados en la orina de 24 horas, indicando un riesgo menor al que realmente concurre en dicho individuo, como resultado del efecto enmascarante que la orina diurna, de menor litogenicidad, produce sobre la nocturna cuando se recoge la orina acumulada de 24 horas.

Por tanto, el diagnóstico de alteraciones urinarias a través del análisis de 24 horas no parece ser el más adecuado, y puede explicar, en parte, el hecho que muchos individuos formen cálculos renales a pesar de una composición aparentemente normal en la orina de 24 horas (litiasis idiopática).



**Figura 3.3** Representación de factores de riesgo litógeno<sup>132</sup> en los periodos nocturno (●), diurno (▲) y 24 horas (■) para dos individuos del estudio. Ca: calcio; Mg: magnesio; P: fósforo; Ox: oxalato; Cit: citrato; UA: ácido úrico; Vol/h: diuresis/hora.

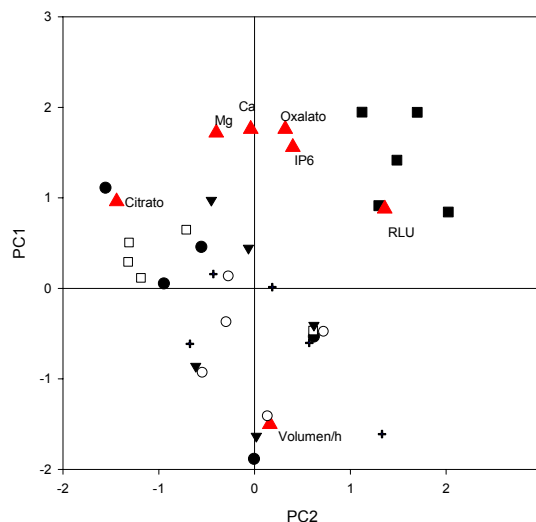
En contraposición, la composición de la orina nocturna parece expresar más adecuadamente las propiedades de cristalización de la orina, por tratarse del espécimen

<sup>132</sup> Pak CYC, Skurla C, Harvey J. Graphic display of urinary risk factors for renal stone formation. J Urol 134, 1985, 867

con mayor riesgo litógeno y representar el periodo en que podría darse con más facilidad el inicio del fenómeno litíásico.

Otro aspecto a destacar relacionado con este contexto es la diferente susceptibilidad de las orinas nocturnas y diurnas a la afectación de su composición por los hábitos diarios del individuo (consumo de fluidos, dieta, ejercicio...). En principio, esperaríamos una menor susceptibilidad para las orinas nocturnas, debido a la inactividad reinante durante el periodo de descanso nocturno. Para intentar aclarar este aspecto, se utilizaron dos herramientas de análisis multivariable (PCA y HCA) para evaluar como se agrupan las orinas correspondientes a los diferentes periodos de recogida (nocturno y periodos 1-5) y valorar la homogeneidad de éstas en función de su litogenicidad; es decir, en función de los parámetros con mayor influencia sobre el riesgo litógeno (como vimos anteriormente, volumen/h, ensayo RLU, calcio, magnesio, citrato, oxalato y fitato).

La aplicación de PCA a las 7 variables indicadas resultó en la extracción de 2 componentes principales, que explican alrededor del 71% de la varianza total. La visualización de los scores correspondientes a los 30 especímenes urinarios analizados (Figura 3.4) revela que las orinas diurnas (periodos 1 a 5) muestran mayor dispersión que las nocturnas, las cuales forman un grupo compacto perfectamente separado de las diurnas, cuando se considera su litogenicidad como principal factor para su clasificación. Por otro lado, la inspección visual de scores y loadings indica una relación evidente entre las orinas nocturnas y valores elevados para el ensayo RLU, oxalato y calcio, así como valores reducidos de volumen/h, como era de esperar dada su mayor litogenicidad.



**Figura 3.4** Gráfico de PC1-PC2. Scores de orina nocturna (■) y orinas diurnas: periodo 1 (●), periodo 2 (○), periodo 3 (□), periodo 4 (+) y periodo 5 (▼). Loadings multiplicados por 2 para evitar solapamientos (▲).

La aplicación de HCA a los datos resultantes del PCA (Figura 2 del Anexo 5) corrobora la agrupación de las orinas nocturnas, indicando su homogeneidad y su diferenciación de las orinas diurnas.

El hecho que las orinas diurnas no puedan ser distinguidas en función de su periodo de recogida es un buen indicador de la mayor variabilidad existente en los especímenes urinarios diurnos, posiblemente resultado de la mayor susceptibilidad a la afectación por los hábitos del individuo. En contraposición, la existencia de cierta homogeneidad en la composición de las orinas nocturnas es probablemente debida a una menor afectación por los hábitos del individuo que el que tiene lugar en las orinas diurnas.

Como resultado de su mayor litogenicidad y homogeneidad, parece evidente que la orina nocturna puede ser propuesto como espécimen urinario de referencia, como alternativa a la orina de 24 horas, para una evaluación más adecuada de la enfermedad litiasica, que podría ser útil tanto para el diagnóstico de las alteraciones urinarias responsables de la litogénesis como para el seguimiento de la terapia preventiva de la recidiva. Los resultados preliminares del trabajo desarrollado en este sentido se recogen en el apartado 3.4 de la presente memoria.

### **3.2.2 Evaluación del riesgo estacional de formación de oxalato cálcico**

La influencia de la climatología sobre la fisiología humana puede hacer variar el riesgo litógeno de forma considerable a lo largo del tiempo. En este apartado se evaluó la variación de la composición de la orina nocturna a lo largo de un periodo de tiempo de un año, con el objetivo de identificar el comportamiento estacional del riesgo de cristalización de oxalato cálcico.

De manera similar a la evaluación del riesgo circadiano (apartado 3.2.1), se estudió la variación de diversas características urinarias directamente relacionadas con la urolitiasis, incluyendo un parámetro que proporciona una idea global sobre el riesgo de litogénesis como es el ensayo RLU. En la Tabla 3.4 se muestran los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo.

Entre los resultados, debemos destacar, en primer lugar, una diuresis significativamente disminuida en el periodo estival, respecto al periodo invernal, como consecuencia del aumento de la temperatura atmosférica, que determina la importancia de las pérdidas hídricas por transpiración y sudoración. Aunque la menor diuresis estival conduce, en general, a una elevación de la concentración urinaria de solutos en este periodo, las diferencias para la mayoría de parámetros estudiados entre estaciones no son estadísticamente significativas, con la excepción de las concentraciones urinarias de calcio y magnesio, aumentadas durante el periodo estival.

**Tabla 3.4** Fluctuaciones anuales en varios parámetros urinarios. Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. † Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre periodo estival y los otros periodos (otoño, invierno y primavera) mediante test de t de Student.

	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
<b>Diuresis (mL)</b>	250 $\pm$ 55	293 $\pm$ 81†	308 $\pm$ 52†	270 $\pm$ 54
<b>pH</b>	5,68 $\pm$ 0,31	5,57 $\pm$ 0,20	5,66 $\pm$ 0,29	5,56 $\pm$ 0,26
<b>RLU (mUA)</b>	275 $\pm$ 63	227 $\pm$ 117	186 $\pm$ 84†	240 $\pm$ 107
<b>Oxalato (mg/l)</b>	32 $\pm$ 7	32 $\pm$ 12	34 $\pm$ 14	28 $\pm$ 11
<b>Calcio (mg/l)</b>	191 $\pm$ 61	157 $\pm$ 73	137 $\pm$ 53†	171 $\pm$ 55
<b>Fósforo (mg/l)</b>	1369 $\pm$ 235	1231 $\pm$ 369	1244 $\pm$ 265	1276 $\pm$ 359
<b>A. Úrico (mg/l)</b>	602 $\pm$ 142	637 $\pm$ 173	540 $\pm$ 158	641 $\pm$ 242
<b>Magnesio(mg/l)</b>	123 $\pm$ 20	115 $\pm$ 44	103 $\pm$ 31†	119 $\pm$ 35
<b>Citrato (mg/l)</b>	635 $\pm$ 257	589 $\pm$ 321	529 $\pm$ 251	543 $\pm$ 248
<b>Fitato (mg/l)</b>	1,05 $\pm$ 0,33	0,98 $\pm$ 0,27	0,90 $\pm$ 0,21	0,97 $\pm$ 0,33
<b>GAGs (mg/l)</b>	10,5 $\pm$ 1,0	10,3 $\pm$ 2,8	10,8 $\pm$ 1,4	10,2 $\pm$ 1,8
<b>Creatinina (g/l)</b>	1,8 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,6	1,8 $\pm$ 0,6
<b>Sodio (g/l)</b>	3,4 $\pm$ 1,2	3,0 $\pm$ 1,2	2,9 $\pm$ 0,9	2,9 $\pm$ 1,1
<b>Potasio (g/l)</b>	1,7 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,5	1,7 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,4

En estudios precedentes se hallaron picos estacionales de máxima producción de accidentes litiasicos que coinciden con el verano, junto con una elevación de los productos de actividad del fosfato y oxalato cálcico y una menor diuresis<sup>133,134</sup>. En nuestro caso, la cantidad de calcio precipitada en el ensayo RLU se encuentra significativamente aumentada durante el verano, cosa que indica un riesgo más elevado de precipitación de sales cálcicas durante este periodo en comparación con el periodo invernal. Por un lado, el aumento significativo de la concentración de calcio durante este periodo estival, probablemente debido a un incremento de los niveles de vitamina D<sup>135</sup> y a la menor diuresis, parece justificar este mayor riesgo por el consiguiente aumento de la sobresaturación urinaria. Por otro lado, la ausencia de concentraciones aumentadas de ciertos inhibidores como citrato, glicosaminoglicanos y fitato durante el verano, indica la existencia de un menor poder inhibidor relativo debido a la mayor sobresaturación urinaria a la que tienen que hacer frente, y, por tanto, un mayor riesgo litógeno. Cabe destacar, por último, la existencia de una protección natural de la cristalización patológica de oxalato cálcico por parte del magnesio durante la época estival, dada su concentración aumentada en este periodo. Aún así, la acción de este inhibidor no es suficiente para contrarrestar el mayor riesgo litógeno asociado a la época estival.

<sup>133</sup> Pinto B. Historia natural de la litiasis. En: Pinto B. Litiasis renal. 2ª ed. Barcelona: Masson-Salvat; 1993, pp. 69-76

<sup>134</sup> C Torres, A Zuluaga, JA Martínez. Influencias estacionales en edad, sexo y composición del agua de bebida sobre los cólicos nefríticos. Arch Esp Urol 1981, 34, 273

<sup>135</sup> Weitbrecht M, Hegemann M, Pfab R, Boettger I, Schuetz W. Seasonal levels of inhibitory substances in the urine of calcium oxalate stone formers. Fortschritte der Urologie und Nephrologie 23, 1985, 45

### 3.2.2.1 Relevancia de los resultados obtenidos

Los resultados de este estudio han permitido localizar la época del año con mayor riesgo litógeno en el periodo estival. El aumento de la cristaluria durante la época estival recogido en la bibliografía<sup>136</sup> parece estar motivado por la menor diuresis asociada a la orina estival y su consiguiente hiperconcentración. Por tanto, cabe alertar sobre la necesidad de mantener unos niveles de hidratación adecuados durante el verano, que permitan aumentar la diuresis y disminuir la concentración urinaria de sustancias litógenas. Por otro lado, también debería prestarse especial atención al mantenimiento y/o aumento del poder inhibitor de la orina durante este periodo, estableciendo medidas de carácter dietético o médico en aquellos pacientes con mayor riesgo de recidiva.

### 3.3 ESTUDIOS *IN VITRO* SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA CRISTALIZACIÓN DE OXALATO CÁLCICO

A lo largo de esta memoria hemos visto como los inhibidores de la cristalización son un parámetro crítico en la enfermedad litiásica. En este sentido, el objetivo de este apartado es el estudio sistemático de la inhibición *in vitro* de la cristalización de oxalato cálcico por varias sustancias con pretendidas propiedades inhibitoras (fitato, pirofosfato, citrato, un glicosaminoglicano como el sulfato de condroitina y algunos metales traza), con la finalidad de entender su repercusión real en los procesos de litiasis y evaluar su posible utilización como agentes profilácticos. Igualmente, se prestó especial atención a la repercusión que tienen sobre la cristalización la actuación de mezclas binarias de dichas sustancias en la búsqueda del conocimiento del efecto positivo, neutro o negativo que puedan tener las interacciones entre inhibidores sobre la cristalización del oxalato cálcico.

Dado que el ensayo RLU (descrito en el apartado 2.1.6) representa una manera simple de evaluar la capacidad de una orina para cristalizar sales cálcicas se ha utilizado dicho ensayo para el estudio de inhibición propuesto. Entre las ventajas de este método están su facilidad de aplicación, tanto sobre muestras de orina artificial como de orina real, su eficacia probada en la identificación de orinas litógenas, su rapidez y su bajo coste.

#### 3.3.1 Caracterización del sistema de cristalización

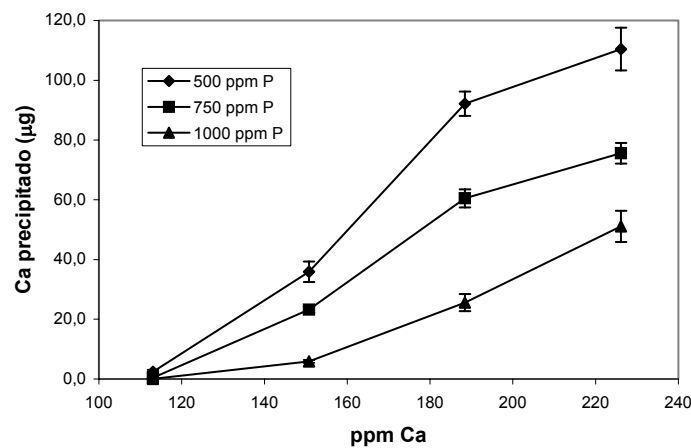
El objetivo de esta caracterización es evaluar el efecto de cada uno de los parámetros a priori más influyentes sobre la precipitación de oxalato cálcico (concentraciones en orina artificial de calcio, fosfato y oxalato, junto con el pH) y encontrar unas condiciones de orina artificial que nos permita trabajar con una precipitación de oxalato cálcico significativa y reproducible para el estudio posterior de la inhibición por varias sustancias.

---

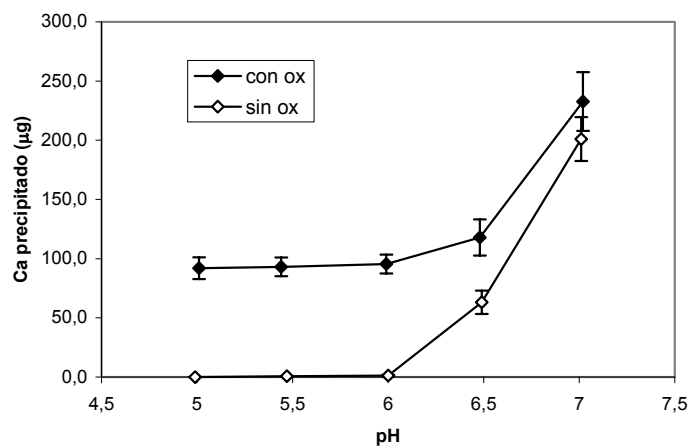
<sup>136</sup> Hallson PC, Rose GA. Seasonal variations in urinary crystals. Brit J Urol 49, 1977, 277

El efecto del calcio y fosfato urinario se recoge en la Figura 3.5. Al aumentar la concentración de Ca aumenta, lógicamente, la precipitación de CaOx en el ensayo RLU como consecuencia del aumento de la sobresaturación de CaOx en la orina artificial. Un aumento de la concentración de fosfato disminuye la precipitación de CaOx en el ensayo RLU como consecuencia de la disminución de la sobresaturación de CaOx debida a la formación de complejos solubles de fosfato y calcio.

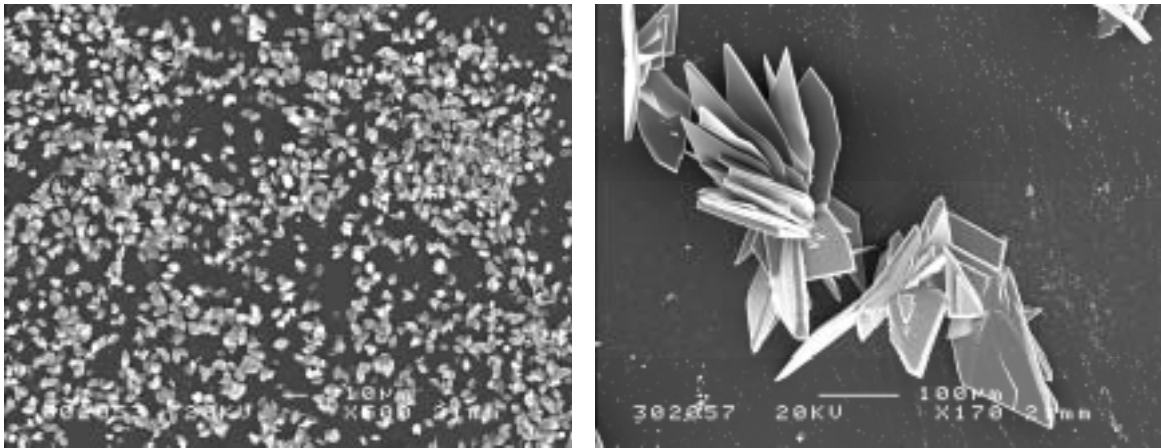
Por otro lado, en la Figura 3.6 encontramos el efecto del pH. Se observa que mientras a valores de pH entre 5,0 y 6,0 únicamente precipita oxalato cálcico (Figura 3.7a), a valores de pH superiores (pH 6,5-7,0) se produce la precipitación simultánea de brushita y oxalato cálcico (Figura 3.7b).



**Figura 3.5** Precipitación de oxalato cálcico en función de las concentraciones de calcio y fosfato. Concentraciones de orina artificial según composición indicada en la Tabla 2.6.

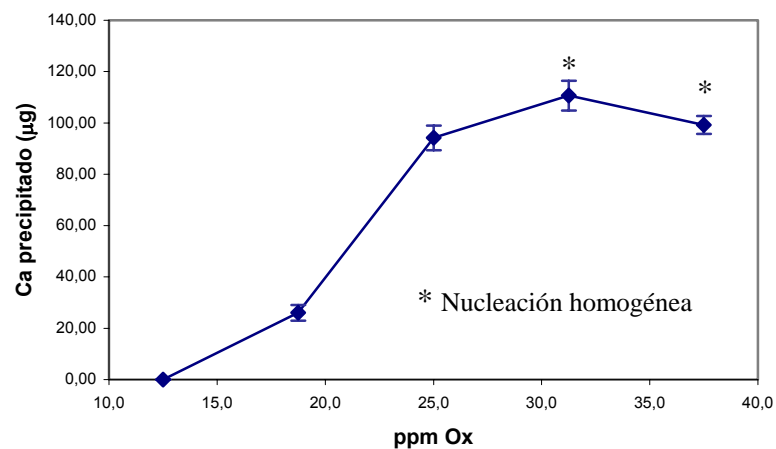


**Figura 3.6** Precipitación de calcio en función del pH en presencia y ausencia de oxalato. Concentraciones de orina artificial según composición indicada en la Tabla 2.6.



**Figura 3.7** a) Precipitación de oxalato cálcico a pH 5,5. b) Precipitación de oxalato cálcico y brushita a pH 7,0.

Finalmente, se evaluó también el efecto del oxalato (Figura 3.8). A concentraciones mayores de 25 ppm de oxalato, tuvo lugar nucleación homogénea de oxalato cálcico. Dado que la nucleación de los cristales de oxalato cálcico en orina humana, incluso en situaciones de hipercalciuria o hiperoxaluria, transcurre a través de procesos de nucleación heterogénea<sup>137</sup> se seleccionó una concentración de oxalato de 25 ppm, en que tiene lugar únicamente nucleación heterogénea en el sistema de ensayo RLU.



**Figura 3.8** Precipitación de oxalato cálcico en función de la concentración de oxalato. Concentraciones de orina artificial según composición indicada en la Tabla 2.6.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se escogió una orina artificial con la composición indicada en la Tabla 2.6 como orina de referencia para los ensayos de inhibición que siguen, debido a la existencia de una buena precipitación en cuanto a cantidad y a reproducibilidad (RSD < 5%), sin que tenga lugar la nucleación homogénea de oxalato cálcico (la transmitancia de la solución, a 500 nm, tras 72h fue del 100%).

<sup>137</sup> Finlayson B. Physicochemical aspects of urolithiasis. *Kidney Int* 13, 1978, 344

### 3.3.2 Inhibición de la cristalización de oxalato cálcico por varias sustancias

Antes de pasar a discutir los resultados de la aplicación del ensayo RLU para la identificación de la capacidad inhibidora de diferentes sustancias sobre la precipitación de oxalato cálcico (Figura 3.9), debemos tener en cuenta algunas consideraciones previas sobre los fenómenos de inhibición.

Algunas sustancias, como citrato o magnesio, actúan reduciendo la concentración de solutos litógenos por complejación de las especies activas en orina. En este sentido, la disminución en la precipitación que producen no es debida estrictamente a efectos de inhibición, sino al efecto que producen sobre la sobresaturación urinaria de oxalato cálcico. El mismo efecto supone el aumento de la dilución urinaria.

Por otro lado, la actuación de los inhibidores de la cristalización requiere de una interacción efectiva entre el inhibidor y la superficie del cristal en formación. Dicha interacción induce importantes alteraciones en la cinética y el desarrollo de la fase cristalina<sup>138</sup>. En este sentido, la inhibición más efectiva tiene lugar cuanto mayor es la fuerza de adsorción en los sitios activos de crecimiento del cristal, mayor es la distorsión de la red cristalina y más se dificulta la incorporación de unidades constructivas al cristal en formación por bloqueo de los sitios activos de crecimiento.

Otro aspecto remarcable es que la máxima inhibición en este tipo de experimentos se situó siempre alrededor del 80% (Figura 3.9). La explicación a este fenómeno se basa en la existencia de coprecipitación de pequeñas cantidades de COD junto al COM. Ya vimos en la introducción que el COD es la fase favorecida desde el punto de vista cinético en presencia de altas concentraciones de calcio, de manera que su formación no se inhibe tan fácilmente como la del COM. Este efecto se observa en la Figura 3.10, en que se visualizan imágenes de microscopia electrónica de la superficie del tubo de polietileno del ensayo RLU en ausencia y presencia de fitato. Podemos observar que, para concentraciones relativamente elevadas de fitato, en que la inhibición de COM es total, todavía persisten cristales de COD, con su típica forma de bipiramide triangular (cristales en punta de lanza).

---

<sup>138</sup> Nancollas GH, Zawacki SJ. In: Jancic SJ, De Jong EJ (ed). Inhibitors of crystallization and dissolution. Industrial crystallization, vol 84. Elsevier, Amsterdam, 1984. p. 51



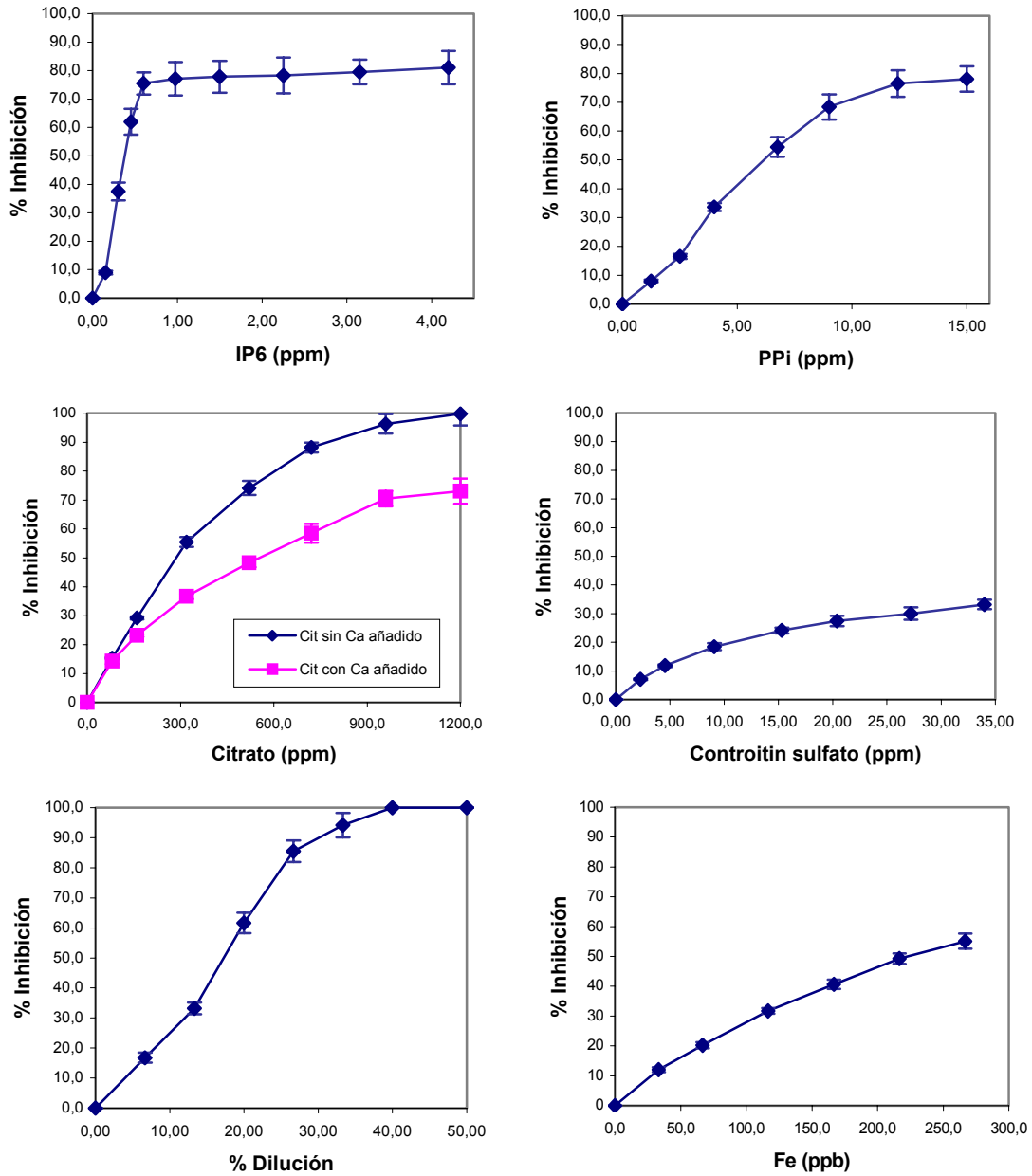


Figura 3.9 Inhibición de la cristalización de oxalato cálcico en presencia de diversas sustancias.

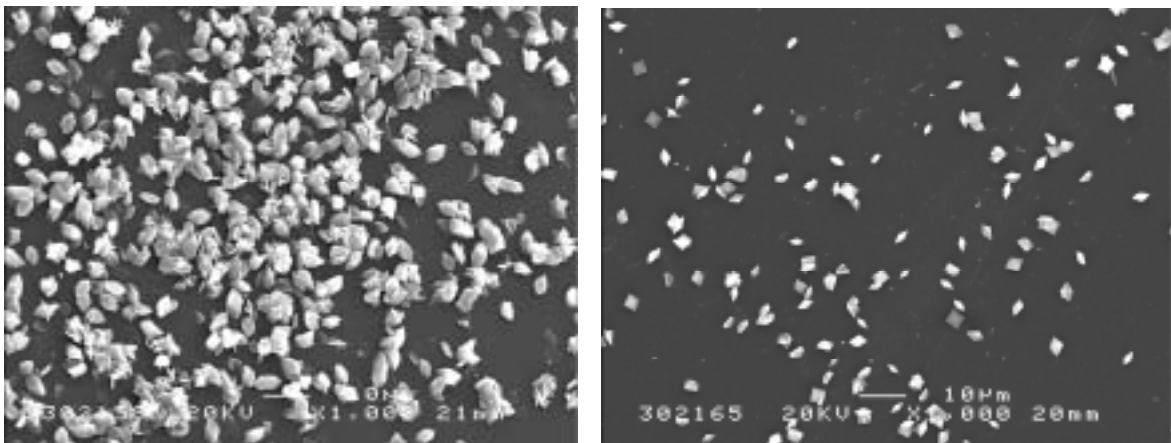


Figura 3.10 Oxalato cálcico precipitado sobre los tubos de polietileno en el ensayo RLU. Izquierda: Ausencia de inhibidores; Derecha: Presencia de fitato 1,0 ppm.

El fitato manifiesta efectos inhibidores a concentraciones muy bajas, alcanzando la inhibición máxima a partir de 0.60 ppm ( $> 0.90 \mu\text{M}$ ). Este efecto acusado se explica por la existencia de fuertes interacciones de adsorción química entre fitato y el cristal de oxalato cálcico. Existen en la bibliografía indicios de esta gran afinidad. Tanto, la presencia de fitato en los cálculos cálcicos<sup>139</sup> como la existencia de complejos estables de ligando mixto del tipo Fosfato–Ca–Carboxilato<sup>140,141</sup> (análogos a fitato–Ca–oxalato) refuerzan la idea de la existencia de fenómenos de adsorción química superficial de fitato sobre oxalato cálcico. En este sentido, también la presencia de pirofosfato en los cálculos cálcicos<sup>142</sup> y la analogía de grupos funcionales de fitato y pirofosfato, hacen prever una gran afinidad química del pirofosfato por el oxalato cálcico, de manera que no es de extrañar que el efecto inhibitor de éste se manifieste también a concentraciones relativamente bajas, alcanzando la inhibición máxima a partir de 12 ppm (69  $\mu\text{M}$ ).

Para el citrato podemos ver el doble efecto que éste tiene sobre la cristalización de oxalato cálcico. Cuando no añadimos a la orina artificial ningún suplemento de calcio, la disminución de la precipitación se debe tanto a la inhibición del crecimiento de cristales de oxalato cálcico por interferencia en la red cristalina como al secuestro de Ca por parte del citrato mediante complejación, lo que provoca una disminución de la sobresaturación de oxalato cálcico. Al añadir un suplemento apropiado de Ca que permita mantener en cada caso la misma actividad de este catión en solución, podemos observar únicamente los efectos del citrato sobre la inhibición del crecimiento de cristales de oxalato cálcico por interferencia con su red cristalina. La interacción entre citrato y la superficies cristalinas de COM, reconocida en la bibliografía<sup>143</sup>, junto con la existencia de complejos estables de ligando mixto tartrato–Ca–citrato<sup>144</sup> (análogos a oxalato–Ca–citrato), ayuda a explicar este efecto inhibitor. Aún así, cabe destacar que el efecto de inhibición es menor que el observado para los anteriores inhibidores, requiriéndose concentraciones superiores a 1200 ppm ( $> 6,35 \text{ mM}$ ) para conseguir alcanzar la inhibición máxima. En este sentido, el efecto del sulfato de condroitina (el GAG mas abundante en orina) sobre la precipitación de oxalato cálcico es incluso menos acusado que el del citrato, sin

---

<sup>139</sup> March JG, Simonet BM, Grases F. Determination of phytic acid by gas chromatography-mass spectrometry: application to biological samples. *J Chromatogr B* 757, 2001, 247

<sup>140</sup> Manning PG, Ramamoorthy S. Formation and stabilities of mixed ligand (NTA and phosphate) complexes of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ , *Inorganic and nuclear chemistry letters* 8, 1972; 653

<sup>141</sup> Dobrynina NA, Svetlova IE, Smirnova NS, Martynenko LI, Evseeva AM. Calcium and magnesium mixed-ligands complexes with adenosinetriphosphate and nitroacetate in comparison with analogous rare earth(III) complexes. *Zhurnal Neorganicheskoi Khimii* 1990, 35, 1216

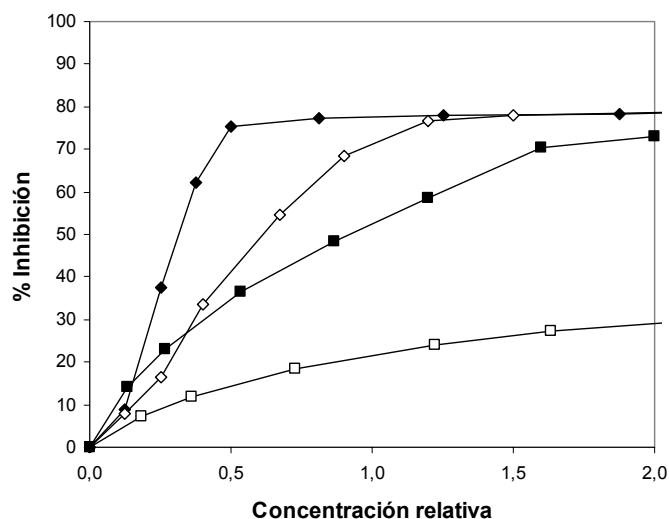
<sup>142</sup> March JG, Simonet BM, Grases F. Determination of pyrophosphate in renal calculi and urine by means of an enzymatic method. *Clin Chim Acta* 314, 2001, 187

<sup>143</sup> Antinozzi PA, Brown CM, Purich DL. Calcium oxalate monohydrate crystallization: citrate inhibition of nucleation and growth steps. *J Cryst Growth* 125, 1992, 215

<sup>144</sup> Banerjee AK, Rao TVRK, Roy SK. Alkaline earth metal complexes. Reactions of calcium ions with common plant acids. *Journal of the Indian Chemistry society* 63, 1986, 960

alcanzar la inhibición máxima en el sistema aún con concentraciones superiores a 35 ppm. En este caso, una menor afinidad del sulfato de condroitina con los cristales de oxalato cálcico, podría explicar este hecho, a la vez que parece indicar una reducida relevancia con respecto a la inhibición de la calcilogénesis oxalocálcica<sup>145</sup>. Así, el principal papel de los GAGs se relacionaría más con su acción en el urotelio como constituyente de una capa protectora antiadherente que recubre las paredes renales, previniendo la nucleación de cristales.

Dado que las sustancias ensayadas se encuentran en orina a niveles de concentración muy diferentes, se hace difícil una comparación directa de su poder inhibitorio. Así, la representación del porcentaje de inhibición en función de la concentración de cada inhibidor referida a la concentración media de dichas sustancias en la orina nocturna de una población sana (Figura 3.11) puede clarificar la situación. En relación a la concentración habitual de los 4 inhibidores considerados en orina, el orden teórico de capacidad inhibitoria de la cristalización de oxalato cálcico es fitato > pirofosfato > citrato > sulfato de condroitina. El hecho que el fitato muestre la mayor capacidad teórica de inhibición en orina, pese a encontrarse a niveles de concentración en orina mucho menor que el resto de inhibidores, nos da idea de su elevada afinidad por los cristales de oxalato cálcico. En este sentido y respecto al citrato, cabe destacar que a pesar de que su efecto sobre la cristalización de oxalato cálcico no sea muy acusado, su acción puede llegar a ser considerable debido a que suele presentarse en concentraciones elevadas en orina.



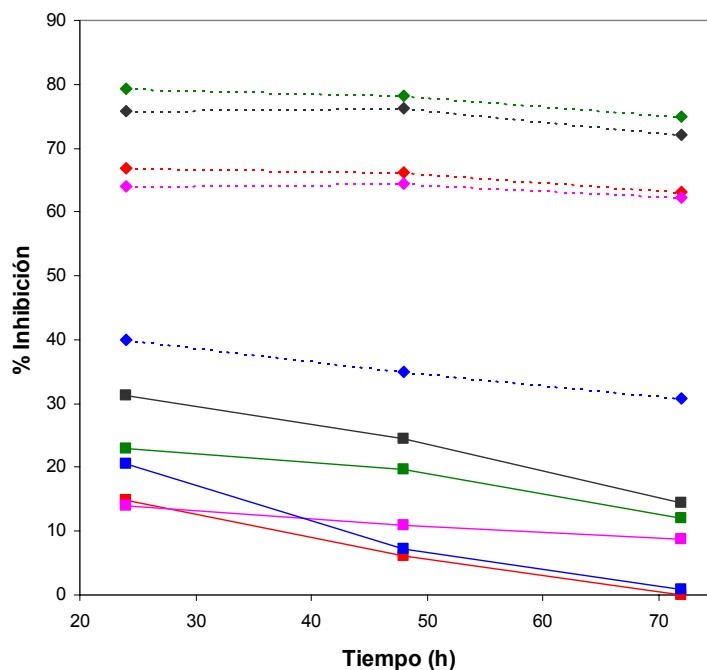
**Figura 3.11** Porcentaje de inhibición en función de la concentración ensayada de cada inhibidor referenciada a la concentración normal correspondiente a la orina nocturna de una población sana (entre paréntesis). ● Fitato (1.2 ppm); ○ Pirofosfato (10 ppm); ■ Citrato (600 ppm); □ Sulfato de condroitina (12.5 ppm)

<sup>145</sup> Grases F, Gil JJ, Conte A. Glycosaminoglycans: Inhibition of calcium oxalate crystalline growth and promotion of crystal aggregation. *Colloid Surfaces* 36, 1989, 29

A parte de los inhibidores hasta ahora comentados, también fue objeto de estudio la capacidad inhibidora de algunos metales traza ( $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Sn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ). Los resultados sobre estos efectos se recogen en el Anexo 7 de la presente memoria. Únicamente destacaremos aquí que el único de ellos que mostró efecto inhibidor sobre la cristalización de oxalato cálcico a niveles fisiológicos de concentración urinaria fue el  $Fe^{3+}$ . La habilidad del catión  $Fe^{3+}$  para establecer interacciones químicas con el anión oxalato en la superficie de los cristales de oxalato cálcico justificaría los efectos inhibidores observados por parte de este metal. En este sentido, cabe destacar, que los cationes  $Fe^{3+}$  son, de todos los ensayados, aquellos que forman los complejos con oxalato más estables en solución<sup>146</sup>.

### 3.3.2.1 Aspectos cinéticos de la inhibición

Es interesante observar como la efectividad de la inhibición tiende a disminuir con el tiempo (Figura 3.12), siendo el efecto más acusado a concentraciones bajas de inhibidor. Este fenómeno tiene su explicación en el hecho que una especie adsorbida en la superficie de un cristal puede detener su crecimiento de manera completa sólo por un periodo limitado de tiempo (cuanto más alta sea su concentración, mayor es este periodo), después del cual el crecimiento de cristales es inevitable<sup>147</sup>.



**Figura 3.12** Cinética de inhibición. ■ IP6 0,2 ppm ● IP6 1,0 ppm ■ PPI 1,25 ppm ● PPI 6,75 ppm ■ Sulfato de condroitina 4,5 ppm ● Sulfato de condroitina 25 ppm ■ Citrato 80 ppm ● Citrato 520 ppm ■  $Fe^{3+}$  33 ppb ●  $Fe^{3+}$  200 ppb

<sup>146</sup> Marthel AE, Smith RM. Critical stability constants. Plenum Press, New York, 1974

<sup>147</sup> Liu S, Nancollas GH. Kinetics of crystal growth of calcium sulfate dihydrate. J Cryst Growth 6, 1970, 281

Este hecho indica la potencialidad de riesgo que implica la presencia de zonas de baja eficacia urodinámica en el riñón, donde la orina puede quedar estancada, como consecuencia de la reducción con el tiempo de la acción de los inhibidores de la litogénesis.

### 3.3.2.2 Efecto de diferentes inhibidores sobre orinas litógenas naturales

La aplicación del ensayo RLU sobre muestras nocturnas de orina litogénica nos permite evaluar si los efectos inhibidores antes discutidos se verifican también en muestras de orina naturales, de mayor complejidad en lo referente a la composición de su matriz y número de interacciones que se pueden verificar en ella. En este sentido, los resultados mostrados en la Tabla 3.5 indican el efecto inhibidor resultante de modificar las orinas litógenas de este estudio con diferentes inhibidores: 1) diuresis mediante una dilución del 33% con agua, 2) Fitato 0,75 ppm, 3) Pirofosfato 5,0 ppm, 4) Citrato 400 ppm (sin suplemento de Ca), 5) Sulfato de condroitina 15 ppm.

**Tabla 3.5** Inhibición debida a la adición de varios inhibidores en orinas litógenas.

Orina	Diuresis (ml)	Ca (ppm)	% Inhibición Diuresis	% Inhibición IP6	% Inhibición PPI	% Inhibición Citrato	% Inhibición GAGs
1	310	247	46,5	9,1	9,0	10,2	2,2
2	410	167	91,5	38,9	12,7	28,7	5,9
3	380	166	98,0	42,3	40,7	68,9	27,4
4	200	276	73,8	17,0	27,2	14,1	3,4
5	310	186	94,7	21,9	22,9	53,1	15,0
6	300	291	38,7	8,0	20,3	13,4	7,5
7	310	131	99,6	58,8	13,7	68,6	0,2
8	310	221	99,1	26,1	11,9	56,5	5,6
9	340	194	93,6	28,9	22,6	41,9	10,9
10	300	198	97,3	24,4	33,1	33,1	2,6
<b>Media</b>			83,3±22,8	27,6±15,6	21,4±10,2	38,8±22,4	8,1±8,1

En general, se observa que los efectos inhibidores más destacados se producen en las orinas que presentan una menor calciuria, como consecuencia de la menor capacidad de los inhibidores para actuar en presencia de sobresaturaciones elevadas.

Aparte del elevado efecto de la dilución sobre la cristalización (causado por la disminución de la sobresaturación urinaria de oxalato cálcico), vemos que los efectos para los inhibidores ensayados son significativos, con la excepción del sulfato de condroitina. Aunque el efecto de fitato y pirofosfato es globalmente inferior al logrado por el citrato, debemos tener en cuenta el doble efecto del citrato sobre la cristalización (inhibición de la cristalización y disminución de la sobresaturación de oxalato cálcico).

Por otro lado, cabe destacar que, a tenor de los resultados de la Figura 3.9 y las concentraciones de inhibidores ensayadas, se esperaban mayores porcentajes de inhibición por parte del fitato o el pirofosfato. Una posible explicación a este hecho es que la actuación de estos inhibidores en orina real, con una matriz de mucha más complejidad que la orina artificial, se vea alterada por la presencia de otros componentes urinarios.

Finalmente, debemos considerar que el efecto inhibitor de una sustancia dada sobre la cristalización de oxalato cálcico depende de las características de cada orina particular (pH, fuerza iónica, presencia de otras sustancias activas...)<sup>148</sup>. Una sustancia con marcado carácter inhibitor en la orina de un paciente puede no producir los mismos efectos en otro paciente. Por tanto, este tipo de estudios de cristalización en orinas de pacientes litíasicos parecen permitir el estudio del riesgo litógeno en cada caso particular, a la vez que permiten evaluar la eficacia de los posibles tratamientos correctores del riesgo litógeno con inhibidores, antes de aplicarlos en clínica y como criterio de selección del tratamiento óptimo para cada paciente.

### **3.3.3 Inhibición de la cristalización de oxalato cálcico por mezclas de inhibidores (Anexos 6 y 7)**

En el apartado anterior se ha sugerido la posibilidad que la actuación de determinados inhibidores en orinas naturales, con una matriz de elevada complejidad, se vea alterada por la presencia de otros componentes urinarios. En este sentido y a pesar de que hay publicados múltiples estudios sobre la actividad inhibitora de una gran variedad de componentes urinarios, resulta sorprendente que las interacciones entre ellos hayan recibido tan poca atención. Estas interacciones son susceptibles de modificar de manera considerable el comportamiento que muestran determinadas sustancias sobre la inhibición de la cristalización de oxalato cálcico, pudiendo producir tanto efectos positivos (sinérgicos) como efectos negativos en la prevención de la cristalización.

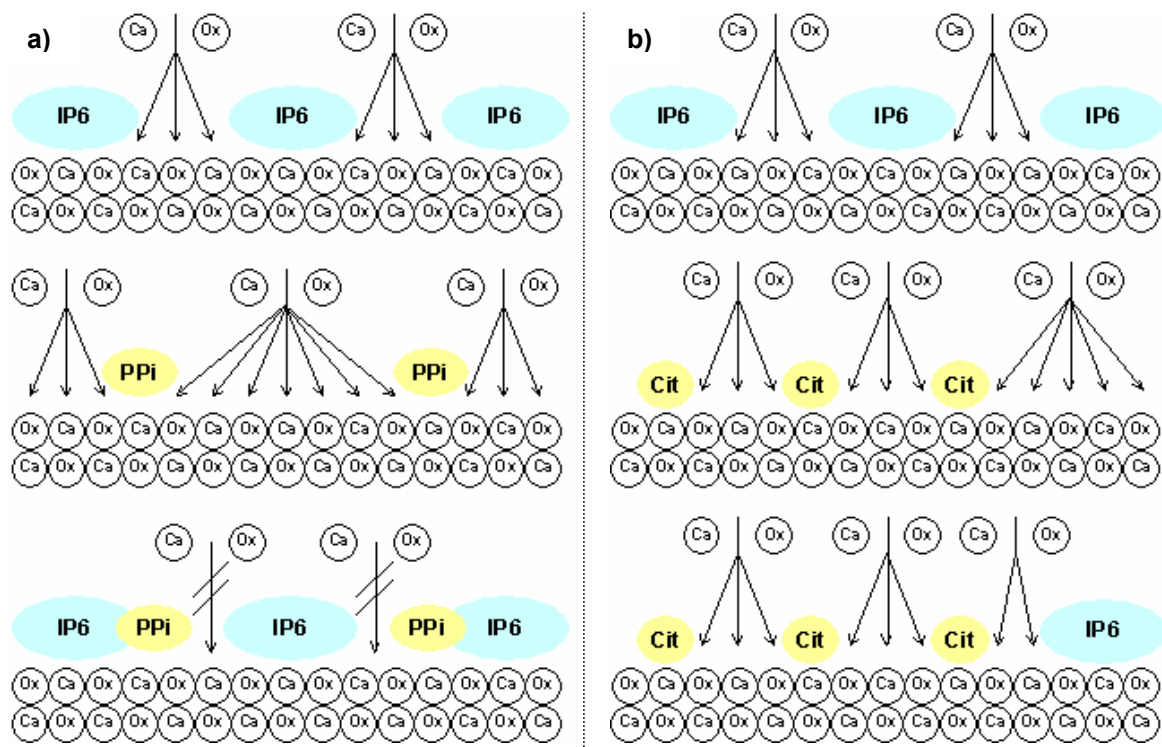
A lo largo de este trabajo se han estudiado tanto las interacciones que se verifican en mezclas binarias de fitato, pirofosfato, citrato y sulfato de condroitina (Anexo 6), como en mezclas binarias de metales traza con estos cuatro inhibidores (Anexo 7). No repetiremos aquí el contenido de los anexos, pero haremos mención de los aspectos más destacados.

---

<sup>148</sup> Grases F, Genestar C, March P, Conte A. Variations in the activity of urinary inhibitors in calcium oxalate urolithiasis. *Brit J Urol* 62, 1988, 515

En lo referente al primero de los trabajos (Anexo 6), cabe destacar el hallazgo de:

- o efectos sinérgicos significativos sobre la inhibición de oxalato cálcico para las mezclas de fitato y pirofosfato (Figura 2 del Anexo 6). La afinidad por la superficie de oxalato cálcico y las concentraciones relativas de fitato y pirofosfato permiten que ambas especies se adsorban selectivamente sobre sitios activos de crecimiento, provocando un bloqueo de posiciones activas de la superficie del cristal más efectivo que el esperado para su efecto aditivo (Figura 3.13a).
- o efectos negativos en el caso de las mezclas de fitato y citrato (Figura 3 del Anexo 6). La afinidad y concentraciones relativas de fitato y citrato en las mezclas ensayadas provoca que el citrato (pese a su menor afinidad) desplace de manera efectiva al fitato de los sitios activos de crecimiento, debido a su mayor concentración (relaciones molares citrato:fitato entre 1850 y 300). El resultado final es una inhibición menor a la meramente aditiva por parte de los dos inhibidores, debido a la menor capacidad de inhibición del citrato (Figura 3.13b).



**Figura 3.13** Inhibición de la cristalización de oxalato cálcico por mezclas de inhibidores. Las flechas indican los sitios activos de crecimiento libres en cada una de las situaciones expuestas. a) Arriba: Efecto de IP6. Centro: Efecto de PPI. Abajo: Efecto sinérgico en mezclas IP6 + PPI; b) Arriba: Efecto de IP6. Centro: Efecto de Citrato. Abajo: Efecto negativo en mezclas IP6 + Citrato.

- efectos aditivos de la inhibición para el resto de mezclas binarias ensayadas. Para las mezclas pirofosfato y citrato (Figura 4 del Anexo 6), el efecto negativo esperado en base al anterior mecanismo, no tienen lugar debido a que el desplazamiento de pirofosfato (con mayor afinidad por el cristal) por el citrato no está favorecido, como consecuencia de la mayor similitud de sus concentraciones (relaciones molares citrato:pirofosfato entre 60 y 6). Para las mezclas con sulfato de condroitina (Figuras 5-7 del Anexo 6), la ausencia de efectos diferentes de los aditivos en la inhibición se explican teniendo en cuenta sus pobres efectos inhibidores y su reducida concentración en orina.

Quizás la interacción de mayor relevancia sobre la inhibición de la cristalización de oxalato cálcico en orina natural puesta de manifiesto en este estudio es aquella fruto de la coexistencia de fitato y citrato. Dicha interacción puede provocar que concentraciones fisiológicas de citrato impidan al fitato desarrollar toda su acción inhibidora potencial, con la consecuente desventaja que esto supone para la prevención de la cristalización de oxalato cálcico mediante un posible tratamiento dietético con fitato de pacientes oxalocálcicos. Aun así, cabe destacar que el fitato muestra un efecto significativo sobre la cristalización de oxalato cálcico en muestras de orina natural litógena, en que coexiste con concentraciones fisiológicas de citrato, tal y como observamos en el apartado 3.3.2.2, si bien el efecto no es tan pronunciado como sería de esperar en función de la potencialidad del fitato para inhibir el crecimiento de oxalato cálcico.

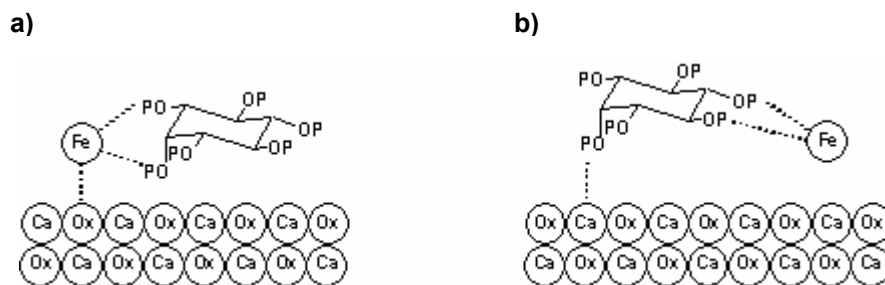
En el segundo trabajo sobre estos aspectos (Anexo 7), que trata sobre el efecto que tienen sobre la inhibición de oxalato cálcico diferentes mezclas binarias de diferentes metales traza con los inhibidores fitato, pirofosfato, citrato y sulfato de condroitina, sólo se encontraron efectos destacables en algunas mezclas que contenían el catión  $\text{Fe}^{3+}$ :

- efectos sinérgicos para las mezclas de  $\text{Fe}^{3+}$  con fitato y pirofosfato (Figuras 2 y 3 del Anexo 7). Estos efectos sinérgicos pueden ocurrir por un mecanismo similar al de la Figura 3.13a por adsorción selectiva de  $\text{Fe}^{3+}$  y fitato (o pirofosfato para las mezclas con esta sustancia) sobre el oxalato cálcico, provocando un bloqueo de posiciones activas de crecimiento de la superficie del cristal más efectivo que el esperado para su efecto aditivo. Además, existen otros 2 posibles mecanismos de actuación que generarían una mayor distorsión del cristal que los meros efectos aditivos de los dos inhibidores considerados. El primero se basaría en la formación de complejos de ligando mixto de  $\text{Fe}^{3+}$ , unidos por un lado al fitato (o pirofosfato) y anclados al cristal a través del oxalato (Figura 3.14a). La existencia de complejos estables análogos a los propuestos, formados por la interacción de  $\text{Fe}^{3+}$  con grupos fosfato y



carboxilato<sup>149</sup>, refuerzan la viabilidad de este mecanismo. El segundo mecanismo posible se basaría en la formación de complejos binucleares de fitato (o pirofosfato), unidos por un lado al  $\text{Fe}^{3+}$  y anclados a la superficie del cristal a través del calcio (Figura 3.14b). En este sentido, se encuentra publicado un mecanismo similar de actuación para explicar la potenciación de la actividad inhibidora de bisfosfonatos por parte del estaño<sup>150</sup>.

- o efectos negativos en el caso de las mezclas de  $\text{Fe}^{3+}$  y citrato (Figura 4 del Anexo 7). En este caso, la formación de complejos solubles estables entre  $\text{Fe}^{3+}$  y citrato, sin actividad inhibidora<sup>151</sup>, permite explicar este efecto. La elevada relación molar citrato: $\text{Fe}^{3+}$  provoca que la formación de complejos impida la interacción de los iones  $\text{Fe}^{3+}$  con la superficie de oxalato cálcico, contrarrestando su efecto inhibidor.



**Figura 3.14** Posibles mecanismos de interacción entre  $\text{Fe}^{3+}$  y fitato. **a)** Formación de complejos anclados de ligando mixto. **b)** Formación de complejos anclados binucleares.

Nuevamente, la interacción más relevante tiene lugar con el citrato. En este sentido, el catión  $\text{Fe}^{3+}$ , el único de los ensayados que muestra una alta capacidad intrínseca de inhibir el crecimiento de oxalato cálcico en concentraciones fisiológicas, es muy probablemente incapaz de actuar como tal en orinas naturales litógenas, en que la presencia de concentraciones urinarias fisiológicas de citrato provoca la formación de complejos solubles sin capacidad inhibidora, lo que impediría la interacción efectiva de los iones  $\text{Fe}^{3+}$  con los cristales incipientes de oxalato cálcico.

Como consecuencia de los diferentes efectos observados, podemos concluir que la capacidad inhibidora de la cristalización no puede ser asignada simplemente a la capacidad inhibidora de cada sustancia individual. Se deberían tener en cuenta también

<sup>149</sup> Isao Y. A spectrophotometric study on the mixed-ligands complexes of Iron(III)-N-(o-hydroxybenzyl) iminodiacetate with several anions. *Kenkyu Hokoku - Kumamoto Kogyo Daigaku* 19, 1994, 147

<sup>150</sup> Wolf JS, Stoller ML. Inhibition of calculi fragment growth by metal-bisphosphonate complexes demonstrated with a new assay measuring the surface activity of urolithiasis inhibitors. *J Urol* 152, 1994, 1609

<sup>151</sup> Meyer JL, Thomas WC. Trace metal-citric acid complexes as inhibitors of calcification and crystal growth. II. Effects of Fe(III), Cr(III) and Al(III) complexes on calcium oxalate crystal growth. *J Urol* 128, 1982, 1376

las interacciones existentes entre estas sustancias, junto con otras presentes en la compleja matriz urinaria, debido a que estas interacciones pueden modificar de manera considerable el comportamiento de una determinada sustancia sobre la inhibición de la cristalización de oxalato cálcico. Por un lado, los esfuerzos para incrementar un inhibidor dado en el marco de un tratamiento de la litiasis con inhibidores pueden resultar inútiles debido a la presencia de otros compuestos urinarios que provoquen un efecto negativo sobre la inhibición por esta sustancia. Por otro lado, pequeños incrementos en la concentración de un determinado inhibidor podría otorgar una gran capacidad inhibidora a la orina, en virtud de la existencia de efectos sinérgicos con otras sustancias presentes en ésta.

Dado el escaso conocimiento de estas interacciones, podemos afirmar que investigaciones futuras en este campo pueden contribuir a un mejor diseño de los tratamientos profilácticos de la urolitiasis basados en inhibidores.

### **3.4 ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ORINA NOCTURNA COMO ESPÉCIMEN PARA EL DIAGNOSTICO DE ALTERACIONES EN LA LITIASIS OXALOCÁLCICA**

Antes de pasar a discutir los resultados de este estudio, cabe recordar las limitaciones de la orina de 24 horas que justifican la búsqueda de un espécimen urinario alternativo para el estudio de la litiasis. En primer lugar, la recogida de la orina de 24 horas se encuentra asociada a problemas relacionados con la totalidad de la recogida, dado que a menudo los pacientes no prestan la debida atención a la extensión del periodo de 24 horas. Por otro lado, existen dudas importantes sobre la representatividad del flujo urinario, ya que los pacientes litiásicos que están recogiendo la orina tienden a consumir más fluidos de lo que hacen normalmente, conduciendo a una falta de representatividad evidente de los valores de concentración obtenidos en la orina de 24 horas<sup>152</sup>. Finalmente, vimos con anterioridad que las condiciones requeridas para la formación de cristales en orina no son homogéneas durante el día, si no que tienen lugar de manera temporal, con un mayor riesgo en el periodo de descanso nocturno, cosa que pone de manifiesto la incapacidad de la orina de 24 horas para reflejar adecuadamente las propiedades de cristalización en un determinado individuo.

En el apartado 3.2.1.3 de esta memoria se sugirió la posibilidad de utilizar la orina nocturna como espécimen urinario de referencia, como alternativa a la orina de 24 horas, para la evaluación de la enfermedad litiásica. En este contexto, el objetivo de este apartado es el estudio preliminar de la capacidad de la orina nocturna para discriminar los

---

<sup>152</sup> H.G. Tiselius. Standardized estimate of the ion activity product of calcium oxalate in urine from renal stone formers. Eur Urol 16, 1989, 48

factores de riesgo de la litogénesis oxalocálcica, por comparación de diferentes parámetros urinarios en grupos de pacientes aquejados de litiasis oxalocálcica (tanto monohidratada como dihidratada) y un grupo control de individuos sanos (Tabla 3.6). La capacidad para dicha discriminación sería indicadora de una buena capacidad de la orina nocturna para el diagnóstico y seguimiento de los desordenes metabólicos que afectan a los individuos afectados de litiasis renal oxalocálcica, susceptible de ser utilizada como primera aproximación para el diagnóstico simple de las alteraciones urinarias litógenas, superando algunas de las limitaciones anteriormente expuestas para los protocolos de análisis metabólico-mineral vigentes.

**Tabla 3.6** Parámetros urinarios medidos para los individuos de los grupos correspondientes a los pacientes con cálculos de oxalato cálcico monohidrato (COM), oxalato cálcico dihidrato (COD) y controles sanos (CS)

ID	TIPO	pH	Vol mL	GAGs ppm	IP6 ppm	PPi ppm	Ca ppm	Mg ppm	P ppm	Na ppm	K ppm	RLU mUA	Ox ppm	Cit ppm	Cr ppm	AU ppm
1	COM	5,97	280	16,2	0,71	6,0	104	55	894	4271	2759	229	46	558	1756	224
2	COM	5,11	280	10,0	0,43	4,1	157	149	627	4458	1279	416	50	272	1193	480
3	COM	5,33	230	11,3	0,76	8,2	216	185	1485	3478	1924	175	23	619	2217	440
4	COM	5,58	310	8,0	0,87	2,0	98	51	893	1780	1181	269	38	135	740	319
5	COM	5,69	170	14,5	1,11	6,8	163	84	1593	2226	1551	339	35	300	2382	612
6	COM	5,52	280	12,1	0,97	4,0	188	175	1415	4625	2024	387	35	466	1380	441
7	COM	5,57	270	11,1	0,79	5,6	138	77	836	3610	994	407	23	374	1166	430
8	COM	5,34	320	5,9	0,29	5,6	157	52	675	3975	778	316	23	61	680	460
9	COM	5,31	270	12,9	0,28	4,0	148	111	789	4095	2369	260	29	96	1300	353
10	COM	5,65	250	2,0	0,44	6,5	151	71	825	2638	972	263	35	411	816	324
11	COM	5,88	290	8,6	0,97	5,6	266	94	756	3380	564	473	37	469	1127	608
12	COM	5,45	230	10,6	0,69	6,8	186	87	1016	3649	2340	163	33	335	1801	599
13	COD	6,31	170	16,5	0,74	7,8	185	44	569	1278	1020	184	41	484	1217	244
14	COD	5,42	160	13,0	1,43	12,3	223	192	1820	3935	1905	370	37	661	3053	631
15	COD	6,50	240	3,2	0,99	6,8	170	42	446	2273	954	222	12	291	536	414
16	COD	5,50	240	12,9	1,54	7,8	306	154	1548	4144	1004	361	30	416	650	220
17	COD	5,96	350	9,7	1,04	6,8	192	77	849	4310	1941	394	36	302	1156	598
18	COD	5,42	280	10,1	0,91	9,0	215	141	1887	2644	1637	334	26	323	1320	450
19	COD	5,48	270	7,6	0,79	9,6	312	153	885	2663	859	459	32	327	1382	285
20	COD	5,97	320	8,4	1,24	10,4	196	111	1024	1145	1537	202	15	674	1632	389
21	COD	5,45	200	11,3	0,79	5,5	276	164	874	2017	852	327	45	608	1439	482
22	COD	6,22	310	10,8	0,69	10,2	236	108	968	2365	870	407	27	356	1503	542
23	COD	6,50	370	6,6	0,76	6,3	229	76	919	3687	1764	393	21	441	1133	428
24	COD	6,54	200	10,8	0,73	6,7	184	138	1194	4114	1462	338	39	572	2152	591
25	CS	5,67	280	9,9	0,93	13,6	149	155	1400	3289	2085	164	55	728	1555	592
26	CS	5,61	290	10,6	0,85	9,4	178	119	1149	3905	1312	185	25	288	1536	297
27	CS	5,76	330	14,6	1,08	9,9	164	120	1206	1822	840	179	25	575	1620	430
28	CS	5,58	280	14,8	0,74	5,3	168	86	943	4744	1527	171	31	479	1482	383
29	CS	4,98	260	11,0	0,98	12,6	144	108	1178	4006	1861	169	37	719	1348	759
30	CS	5,86	280	15,2	1,17	8,4	204	89	1273	4524	1815	242	33	813	2258	789
31	CS	6,15	320	9,7	1,10	7,8	128	79	599	2665	630	209	25	487	1085	521
32	CS	5,54	310	13,7	1,11	10,9	206	159	1501	1774	1055	169	25	418	1851	788
33	CS	5,70	250	14,3	1,36	10,5	172	123	1001	4404	3028	221	53	643	1795	740
34	CS	5,51	280	14,5	1,05	11,3	148	138	1447	1452	1091	189	48	460	1736	335
35	CS	5,29	290	15,8	1,42	11,0	268	123	1541	4840	2225	270	21	552	2023	269
36	CS	5,21	350	4,8	0,95	9,0	171	125	1199	2812	1313	179	31	287	890	577

La comparación de los valores recogidos para los tres grupos (Tabla 3.7) indica que los parámetros urinarios pH, Ca, fitato, pirofosfato, citrato y ensayo RLU son los que aparecen con mayor poder diagnóstico de la enfermedad litiasica oxalocálcica. Aún así, cabe recordar que la litiasis es una enfermedad multifactorial en la que pueden estar implicados muchos otros parámetros, como compuestos de fosfato, el magnesio o el ácido úrico... que pueden tener también una influencia decisiva en algunos casos particulares de litiasis oxalocálcica (por ejemplo, en el caso de cálculos de oxalato cálcico monohidrato que crecen sobre un corazón de hidroxapatita o ácido úrico).

**Tabla 3.7** Parámetros urinarios para pacientes aquejados de litiasis de COM, COD y controles sanos. Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. † Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre COM o COD y CS mediante test de t de Student.

TIPO	pH	Vol mL	GAGs ppm	IP6 ppm	PPi ppm	Ca ppm	Mg ppm	P ppm	Na ppm	K ppm	RLU mUA	Ox ppm	Cit ppm	Cr ppm	AU ppm
COM	5,53	265	10,3	0,69†	5,41†	164	99	984	3515	1561	308†	33,7	341†	1380	441
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0,25	41	3,8	0,28	1,67	46	47	328	891	710	99	8,7	178	555	124
COD	5,94†	259	10,1	0,97	8,25	227†	117	1082	2881	1317	333†	30,0	455	1431	440
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0,47	69	3,4	0,29	2,03	48	49	454	1128	432	87	10,4	143	663	138
CS	5,57	293	12,4	1,06	9,98	175	119	1203	3353	1565	195	34,1	537	1598	540
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0,31	29	3,2	0,20	2,23	37	25	267	1227	675	33	11,8	168	380	197

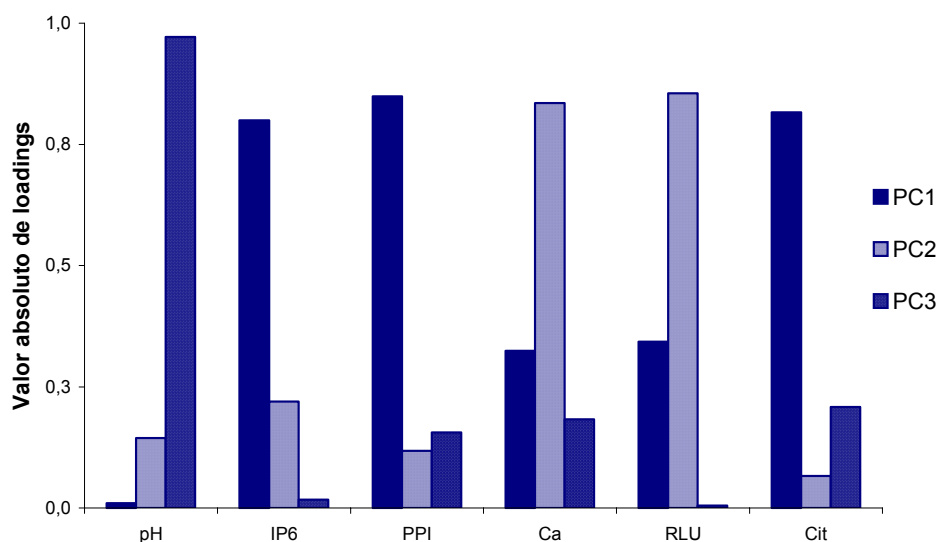
Dejando a un lado el ensayo RLU, que indica la tendencia global de una orina para cristalizar sales cálcicas, se observa una menor capacidad inhibidora de la orina (en función básicamente de los valores de fitato, pirofosfato y citrato) como factor decisivo que parece gobernar la litiasis oxalocálcica monohidratada, mientras que en el caso de la dihidratada, los principales factores de riesgo se encuentran relacionados con el aumento del pH y la calciuria. Estos resultados, acordes con los reportados en la bibliografía para orinas de 24 horas<sup>153</sup>, son un primer indicador de la capacidad de la orina nocturna para revelar los principales factores de riesgo de la litiasis oxalacálcica.

<sup>153</sup> Pierratos AE, Khalaff H, Cheng PT, Psihramis K, Jewett MAS. Clinical and biochemical differences in patients with pure calcium oxalate monohydrate and calcium oxalate dihydrate kidney stones. J Urol 151, 1994, 571

### 3.4.1 Análisis multivariable del riesgo litógeno

Con el objetivo de evaluar si la consideración simultánea de los diversos factores de riesgo litógeno oxalocálcico permite agrupar de manera eficiente los individuos del estudio en clases diferenciadas según su naturaleza (COM, COD y CS), se aplicaron herramientas de análisis multivariable (PCA y HCA) a los datos de la Tabla 3.6.

La aplicación de PCA sobre los parámetros significativos indicadores de riesgo litógeno oxalocálcico de la Tabla 3.6 (pH, Ca, fitato, pirofosfato, citrato y ensayo RLU) permite reducir la dimensionalidad de la matriz de datos, extrayéndose 3 PCs, que explican alrededor del 80% de la varianza. Un análisis detallado de los loadings (Figura 3.15) indica que el PC1 se correlaciona básicamente con las concentraciones de fitato, pirofosfato y citrato (representando, por tanto, la capacidad inhibidora de la orina), el PC2 con la concentración de Ca y el ensayo RLU (representando, por tanto, la tendencia de la orina a precipitar), mientras que el PC3 se refiere básicamente al pH urinario.



**Figura 3.15** Representación de loadings para PC1-PC2-PC3.

Aunque es difícil extraer conclusiones de la observación del gráfico tridimensional de scores y loadings (Figura 3.16), se intuye una cierta discriminación del grupo CS de los grupos COM y COD. Dicha discriminación se pone de manifiesto tras la aplicación de HCA a los datos resultantes del PCA (Figura 3.17), que permite distinguir la formación de dos grandes grupos: uno con las orinas menos litógenas (que contiene básicamente a los controles sanos y algunos pacientes de COM y COD) y otro indicando mayor litogenicidad (formado básicamente por pacientes de COM y COD).

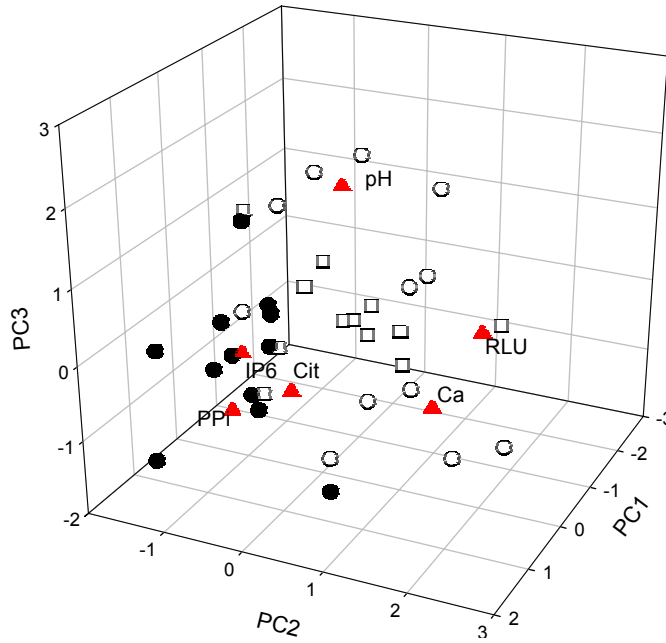


Figura 3.16 Gráfico de PC1-PC2-PC3. Scores para COM (□), COD (○) y CS (●). Loadings multiplicados por 2 para evitar solapamientos (▲).

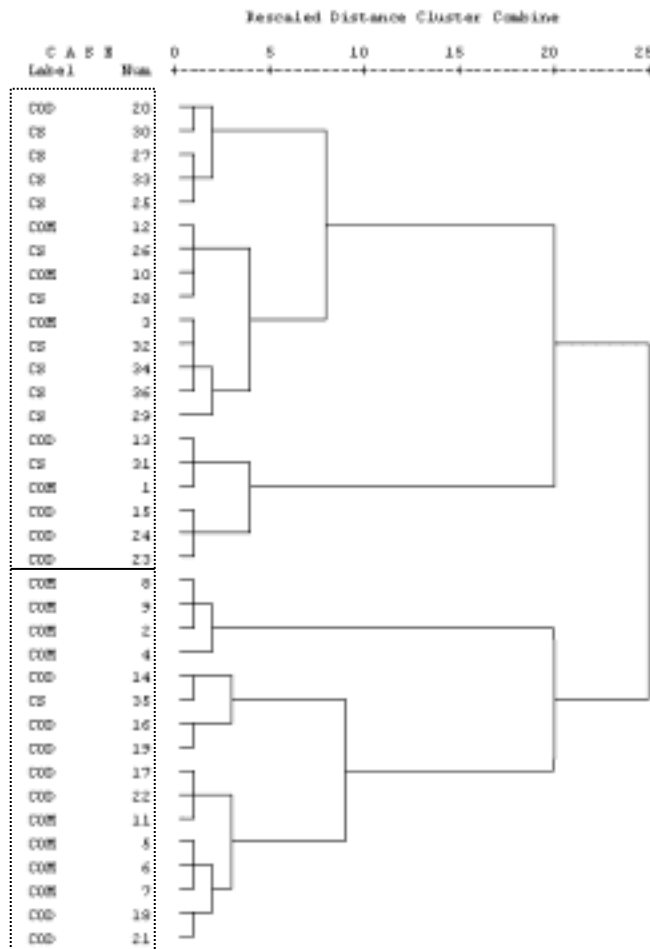


Figura 3.17 Dendrograma mostrando la agrupación de las orinas en función de los scores de PC1, PC2 y PC3. Grupo superior indica orinas menos litógenas que el grupo inferior.

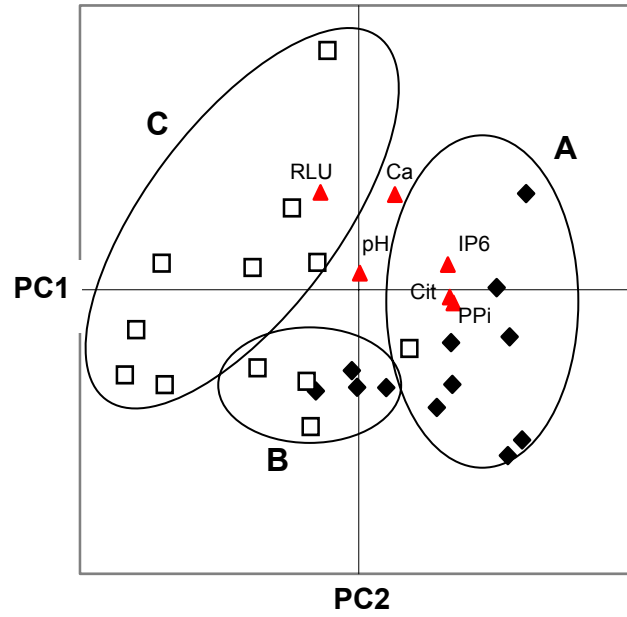
No debe sorprendernos que la discriminación entre individuos litiásicos y sanos no sea efectiva al 100%. En este sentido, cabe destacar la posible mayor relevancia de otros parámetros urinarios, diferentes a los considerados, en algunos casos particulares de pacientes litiásicos. Por otro lado, determinados pacientes pueden mostrar una orina no litógena en función de la corrección de sus alteraciones o de la modificación de sus hábitos. Y, finalmente, individuos sanos pueden mostrar orinas litógenas, sin incidencia de enfermedad como consecuencia de una buena eficacia urodinámica.

A la vista de la complejidad asociada a la existencia de 3 grupos de individuos diferenciados (COM, COD y CS) y para simplificar la discusión de los resultados, a continuación se consideran de manera separada la litiasis oxalocálcica monohidratada y la dihidratada.

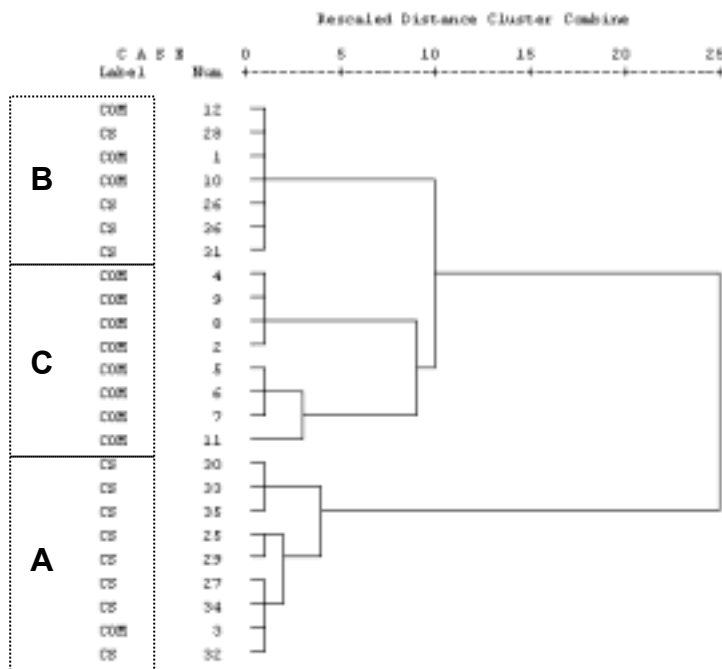
### 3.4.1.1 Litiasis de COM

Hemos visto anteriormente que los grupos CS y COM se diferencian básicamente en las concentraciones de fitato, pirofosfato y citrato; esto es, el principal factor de riesgo de la litiasis de COM es la deficiencia de inhibidores urinarios que se opongan a su cristalización. Teniendo en cuenta el PC1 y el PC2 (que representan el poder inhibitor y la tendencia a la cristalización, respectivamente) para los grupos CS y COM, obtenemos la representación de la Figura 3.18. En ella, se observa la existencia de 3 grupos diferenciados, puestos de manifiesto por la aplicación de HCA sobre PC1 y PC2 para los grupos CS y COM (Figura 3.19). En función del riesgo litógeno, asociado básicamente con su diferente capacidad inhibitoria, se distinguen:

- Grupo A: formado básicamente por individuos sanos, con riesgo litógeno reducido, caracterizado por una capacidad inhibitoria elevada (puntuación alta en PC1) y una tendencia a la precipitación reducida (puntuación negativa o baja en PC2).
- Grupo B: formado por individuos sanos y litiásicos, con riesgo litógeno intermedio, que pese a presentar tendencia a la precipitación reducida (puntuación negativa en PC2), no presentan una capacidad inhibitoria incrementada (puntuación negativa o baja en PC1).
- Grupo C: formado básicamente por individuos litiásicos, con riesgo litógeno elevado, que presentan una capacidad inhibitoria disminuida (puntuación negativa en PC1) y/o tendencia a la precipitación incrementada (puntuación alta en PC2).



**Figura 3.18** Gráfico de PC1-PC2. Scores para COM (□) y CS (●). Loadings multiplicados por 2 para evitar solapamientos (▲). Los círculos indican los grupos revelados por la aplicación de HCA a PC1 y PC2 para los grupos COM y CS (Figura 3.19).



**Figura 3.19.** Dendrograma indicando la agrupación de pacientes de COM y CS según PC1 y PC2.

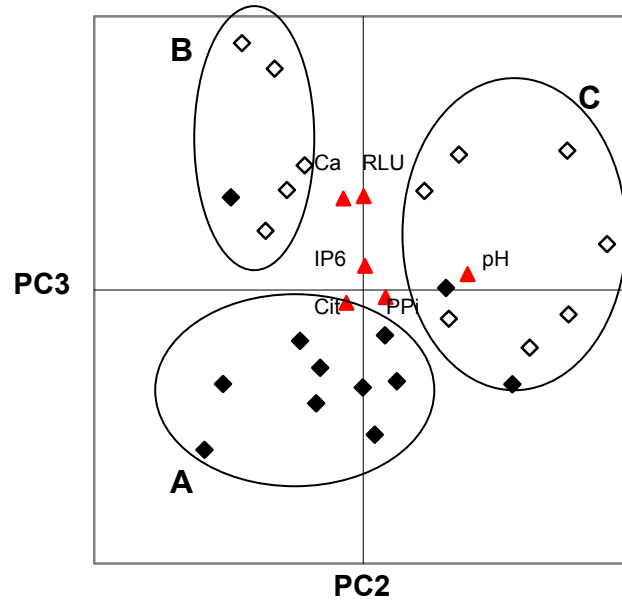


Concluimos, pues, que el poder inhibidor de la orina (representado por los valores de fitato, pirofosfato y citrato) permite, en función del riesgo litógeno asociado a él, una discriminación razonable entre individuos sanos e individuos afectados de litiasis de COM, revelándose nuevamente como el principal factor de riesgo que explica este tipo de litiasis. Por otro lado, estos resultados alertan sobre la necesidad de mantener unos buenos niveles de la capacidad inhibidora de la orina, no sólo en individuos litiásicos sino también en individuos sanos con factores de riesgo de litiasis de COM.

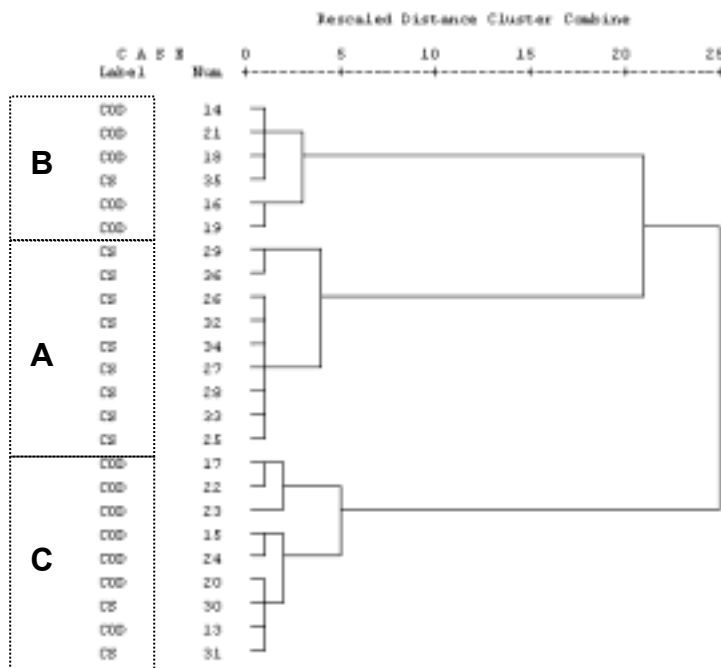
### 3.4.1.2 Litiasis de COD

Por otro lado, anteriormente vimos que los grupos CS y COD se diferencian básicamente en las concentraciones de Ca y en el pH urinario; esto es, el principal factor de riesgo de la litiasis de COD es la concurrencia de hipercalciuria y pH urinario cercano a 6. Si tenemos en cuenta el PC2 y el PC3 (que representan la tendencia a la cristalización y el pH urinario, respectivamente) para los grupos CS y COD, obtenemos la representación de la Figura 3.20. En ella, se observa la presencia de 3 grupos diferenciados, puestos de manifiesto por la aplicación de HCA sobre PC2 y PC3 para los grupos CS y COD (Figura 3.21). En función del riesgo litógeno, asociado básicamente al pH urinario y la calciuria, se distinguen:

- Grupo A: formado por individuos sanos, con riesgo litógeno reducido, caracterizado por un pH urinario cercano a 5,5 (puntuación baja en PC3) y una tendencia reducida a la precipitación debido a su baja calciuria (puntuación negativa en PC2).
- Grupo B: formado básicamente por individuos litiásicos, con riesgo litógeno elevado, que pese a presentar un pH urinario cercano a 5,5 (puntuación negativa en PC3), presentan una tendencia a la precipitación incrementada debido a su elevada calciuria (puntuación alta en PC2).
- Grupo C: formado básicamente por individuos litiásicos, con riesgo litógeno medio-alto, que presentan un pH urinario elevado como principal factor de riesgo (puntuación alta en PC3) y tendencia a la precipitación variable en función de su calciuria (puntuación variable en PC2).



**Figura 3.20** Gráfico de PC2-PC3. Scores para COD (○) y CS (●). Loadings multiplicados por 2 para evitar solapamientos (▲). Los círculos indican los grupos revelados por la aplicación de HCA a PC1 y PC2 para los grupos COM y CS (Figura 3.21)



**Figura 3.21** Dendrograma indicando la agrupación de pacientes de COD y CS según PC2 y PC3.

Hemos visto, pues, que el pH urinario y la calciuria permiten, en función del riesgo litógeno asociado a ellos, una discriminación razonable entre individuos sanos e individuos afectados de litiasis de COD, apareciendo nuevamente como los principales factores litógenos que explican la litiasis oxalocálcica dihidratada,. Por otro lado, estos resultados alertan sobre la necesidad de mantener unos niveles apropiados de pH urinario y calciuria, tanto en individuos litiásicos como en individuos sanos con factores de riesgo de litiasis de COD.

### **3.4.2 Relevancia de los resultados y necesidades futuras**

Una vez demostrada la capacidad de la orina nocturna para discriminar los principales factores de riesgo de la litogénesis oxalocálcica (tanto en su variante monohidratada como dihidratada), podemos concluir que el análisis de muestras urinarias nocturnas puede representar una alternativa adecuada a la orina de 24 horas para una evaluación más adecuada de la enfermedad litiásica, que podría ser útil tanto para el diagnóstico de las alteraciones urinarias responsables del cálculo renal como para el seguimiento de la terapia preventiva de la recidiva, siendo muy fácil su implementación en la práctica clínica. Dicha implementación, además, podría suponer algunas ventajas en relación al análisis de la orina de 24 horas:

- 1) mejor detección de las alteraciones urinarias responsables de la formación de un cálculo al ser medidas éstas en el periodo de mayor potencial de cristalización.
- 2) mayor representatividad de la orina nocturna en comparación con la orina de 24 horas en relación a la menor afectación de la primera con los hábitos del paciente (actividad física, consumo de fluidos, exposición solar...).
- 3) mayor facilidad de recogida de la muestra por parte del paciente, al tratarse de un período de recogida más corto, en que la actividad del individuo corresponde, en gran parte, al habitual descanso nocturno.
- 4) no es necesario recoger más de una muestra de orina, mientras que, en el caso de los esquemas de análisis metabólico de 24 horas se llegan a recoger hasta 3 especímenes diferentes (apartado 1.5.1).

El principal objetivo que persiguen estos estudios radica en mejorar las características de los protocolos de estudio de la litiasis, en cuanto a eficacia de diagnóstico de alteraciones litógenas, simplicidad de estudio y facilidad de recogida de la muestra de orina para dicho estudio. En este sentido, la implantación del análisis de orina nocturna como herramienta de estudio rutinario de la litiasis requiere todavía una serie de estudios complementarios. En primer lugar, sería necesario derivar nuevos valores límite de riesgo litógeno para los

parámetros considerados aplicables a la orina nocturna. En segundo lugar debería ampliarse el estudio a los diferentes tipos de litiasis más importantes (litiasis de fosfatos y úrica). Por último, ante el esfuerzo inicial que supondría a los servicios de análisis clínicos cambiar los esquemas de análisis de 24 horas por los de la orina nocturna, creemos necesaria la comparación del poder diagnóstico de la orina nocturna respecto a la orina de 24 horas, para comprobar que realmente el poder diagnóstico se incrementa con el uso de la primera. En este sentido, indicamos que dichos estudios se encuentran actualmente en desarrollo en nuestro laboratorio en colaboración con diferentes hospitales y clínicas de nuestro entorno.

## **CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES**

Los resultados descritos en la presente memoria constituyen una nueva contribución al conocimiento de la litiasis renal oxalocálcica, abundando en la comprensión de la etiología litiásica y en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para el diagnóstico de las alteraciones urinarias que conducen a esta enfermedad. A continuación se recogen las conclusiones más importantes que se pueden extraer de los resultados obtenidos para cada uno de los diferentes trabajos recogidos en la presente memoria.

En el ámbito de las metodologías analíticas para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad litiásica:

1. Se han desarrollado métodos analíticos eficaces, rápidos y con relevante capacidad multicomponente para la determinación de diversos marcadores de la litogénesis en orina. Destacan la puesta a punto de:
  - a. Método analítico para la determinación de oxalato, citrato, creatinina y ácido úrico en orina mediante la técnica de electroforesis capilar de zona.
  - b. Métodos analíticos para la determinación marcadores litógenos no analizados rutinariamente en la práctica clínica pese a su reconocida influencia sobre la cristalización de oxalato cálcico, como son fitato y pirofosfato, mediante la técnica de espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente.

Las ventajas de estos métodos respecto a otros existentes (facilidad de los esquemas de tratamiento o preparación de muestras, bajos requerimientos de reactivos y muestra, rápidos tiempos de análisis, exactitud y precisión) hacen factible su implementación en los laboratorios clínicos para el diagnóstico más eficiente de la enfermedad. En este sentido, el principal inconveniente de estos métodos es la limitada disponibilidad de la instrumentación requerida en laboratorios clínicos.

En el ámbito del análisis temporal (diario y estacional) del riesgo de formación de oxalato cálcico:

2. Las fluctuaciones circadianas de la composición urinaria, de especial relevancia en parámetros urinarios directamente relacionados con la litiasis oxalocálcica (diuresis, ensayo RLU y concentraciones urinarias de calcio, oxalato, citrato, magnesio, fitato), revelan un aumento natural del riesgo de cristalización de oxalato cálcico durante el periodo nocturno.
3. Se ha puesto de manifiesto que la orina de 24 horas no caracteriza de manera adecuada las propiedades de cristalización de la orina de un determinado individuo, al indicar un menor riesgo litógeno al que realmente concurre en dicho individuo, como

resultado del efecto enmascarante que ejerce sobre ella la orina diurna, de menor litogenicidad.

4. La aplicación de técnicas de análisis estadístico multivariable (PCA y HCA) sobre muestras de orina de 24-horas fraccionadas, revela que las orinas nocturnas se diferencian de las orinas diurnas en función de su litogenicidad, indicando además mayor homogeneidad en la composición urinaria para las muestras nocturnas, debido probablemente a su menor susceptibilidad a ser afectada por los hábitos (consumo de fluidos, dieta, ejercicio...) de cada individuo particular.
5. Como resultado de la mayor litogenicidad y homogeneidad asociada a las muestras de orina nocturna, éstas parecen expresar de manera más adecuada las propiedades de cristalización de la orina. De aquí, que sean propuestas en este trabajo como espécimen urinario de referencia y como una alternativa clara a la orina de 24 horas, para una evaluación más adecuada de la enfermedad litiásica.
6. Las fluctuaciones estacionales de la composición urinaria, de especial relevancia en parámetros urinarios directamente relacionados con la litiasis oxalocálcica (diuresis, ensayo RLU y concentraciones urinarias de calcio y magnesio), conducen a aumentar de forma natural el riesgo de cristalización de oxalato cálcico durante el periodo estival.

En el ámbito del conocimiento básico de la actuación de los inhibidores de la litogénesis oxalocálcica:

7. La actuación de sustancias como fitato, pirofosfato, citrato o sulfato de condroitina sobre la cristalización de oxalato cálcico en orina artificial corrobora los resultados obtenidos en estudios precedentes que indican su habilidad para actuar como inhibidores de la litogénesis oxalocálcica, observándose además que la efectividad de la inhibición disminuye a lo largo del tiempo. Esta habilidad ha sido también demostrada sobre muestras de orina real, observándose disminuciones significativas de la cristalización de oxalato cálcico en presencia de concentraciones fisiológicas de dichos inhibidores.
8. Se ha puesto de manifiesto que el abundante número de posibles interacciones de un compuesto dado con otros componentes de la compleja matriz urinaria (formación de complejos, precipitación, adsorción química sobre la superficie cristalina, desplazamiento de especies de la superficie del cristal...) puede modificar marcadamente su capacidad para inhibir el desarrollo de oxalato cálcico, pudiéndose producir tanto efectos negativos (mezclas de fitato y citrato) como sinérgicos (mezclas de fitato y pirofosfato) sobre la inhibición de su cristalización. En este sentido, la interacción de concentraciones fisiológicas de citrato con el fitato urinario, puede

impedir a este último desarrollar toda su acción inhibitoria potencial, con la consecuente desventaja que esto supone para la prevención de la cristalización de oxalato cálcico.

9. Concentraciones fisiológicas de metales traza ( $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Sn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ) en orina no tienen una influencia significativa en la cristalización de oxalato cálcico. En este sentido, el catión  $Fe^{3+}$ , que es el único de los ensayados que muestra una alta capacidad intrínseca de inhibir el crecimiento de oxalato cálcico en concentraciones fisiológicas, es probablemente incapaz de actuar como tal en presencia de concentraciones urinarias fisiológicas de citrato, dado el efecto negativo observado sobre la inhibición para mezclas de citrato y  $Fe^{3+}$ , debido a la formación de complejos solubles sin capacidad inhibitoria.

En el ámbito de las metodologías de estudio de alteraciones litógenas, el estudio preliminar de la orina nocturna como espécimen para el diagnóstico de alteraciones en la litiasis oxalocálcica reveló que:

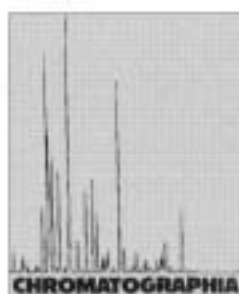
10. Los principales factores de riesgo asociados con la litogénesis oxalocálcica son la deficiencia de inhibidores de la cristalización para los cálculos de COM y un pH urinario y calciuria elevada para los cálculos de COD. Dichos factores, además, permiten una discriminación bastante eficiente entre individuos litíasicos de COM y COD respecto a controles sanos, en función del riesgo litógeno asociado a ellos.
11. El análisis de muestras urinarias nocturnas puede representar una alternativa adecuada a la orina de 24 horas para una evaluación más adecuada de la enfermedad litiasica, que podría ser útil tanto para una primera aproximación al diagnóstico de las alteraciones urinarias responsables del cálculo renal como para el seguimiento de la terapia preventiva de la recidiva. Dicho espécimen mostraría una fácil implementación en la práctica clínica, suponiendo además múltiples ventajas respecto a la tradicional recogida de la orina de 24 horas en relación con la mayor representatividad de la orina respecto al riesgo litógeno y a la mayor facilidad de recogida por parte del paciente.



## **CAPÍTULO 5. ANEXOS**

**ANEXO 1**

# Determination of Trace Amounts of Oxalate in Renal Calculi and Related Samples by Gas Chromatography – Mass Spectrometry



2003, 57, 811–817

J. G. March<sup>1</sup>\* / B. M. Simonet<sup>1</sup> / F. Grases<sup>1</sup> / J. A. Muñoz<sup>2</sup> / M. Valiente<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Universitat de les Illes Balears, 07071 Palma de Mallorca, Spain; E-Mail: joan.march@uib.es

<sup>2</sup> Department of Analytical Chemistry (IGTS), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

## Key Words

Gas chromatography – mass spectrometry  
Column liquid chromatography  
Cation-exchange chromatography  
Oxalate in renal calculi

## Summary

A GC-MS method has been developed for determination of trace amounts of oxalate in renal stones. The steps involved are: solubilisation of the oxalate in renal stones with HCl, elimination of cationic species by use of a cation-exchange resin, evaporation of water, reconstitution with ethyl acetate, and formation of trimethylsilyl esters of oxalic acid with chlorotrimethylsilane. Trichloroacetic acid was used as internal standard. With appropriate sample treatment the method has also been applied to urine and food. The main analytical features of the method were: linear range 0.2–5.0 mg oxalate L<sup>-1</sup>, limit of detection 0.06 mg oxalate L<sup>-1</sup> (concentrations in the solution chromatographed), coefficient of variation of the method 1.3%. Twenty-seven renal stones were analysed by the method. The average oxalic acid content of uric acid calculi was 0.11 mg g<sup>-1</sup> (SD = 0.08, n = 13). A larger amount of oxalate was found in struvite calculi (mean value 0.2 mg oxalic acid g<sup>-1</sup>, SD = 0.13, n = 8). Hydroxyapatite stones can be classified according to their oxalate content: samples with very low oxalate content (below the LOD of the method) and samples with large amounts of oxalate (0.431 and 0.801 mg oxalic acid g<sup>-1</sup>).

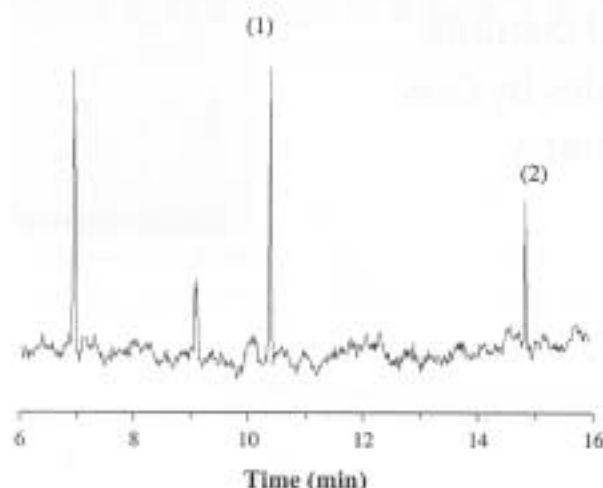
## Introduction

Urolithiasis is a serious health problem because, depending on geographical area, between 1 and 14% of the population suffers from the disease [1]. The causes of lithiasis are, nevertheless, because of its multifactorial origin [2], often unclear. Although there is some evidence suggesting that minor components could provide information on the conditions under which calculi are formed, very few trace

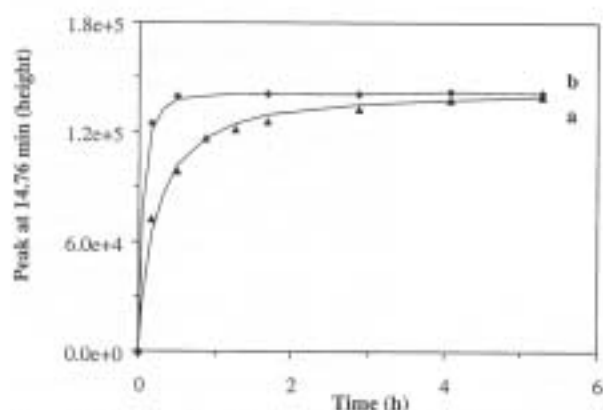
components of renal stones have yet been investigated [3, 4]. The determination of oxalate, as a trace component, in calculi remains unstudied. In this sense it is interesting to point out that approximately the 50% of all types of renal lithiasis are recurrent and that approximately 50% of recurrent stone formers produce different types of renal calculi. Preliminary studies on patients from Mallorca (Spain) [5] showed that approximately 27% of recurrent hydroxyapatite stone formers developed

calculi of calcium oxalate, and 21% developed mixed calculi of hydroxyapatite and calcium oxalate. Similar results were obtained with recurrent uric acid stone formers – 27% developed calcium oxalate calculi and 20% developed mixed uric acid/calcium oxalate calculi. The presence of oxalate as a minor component of a calculus is, therefore, likely to provide useful information about the composition of future calculi, and so preventive therapeutic measures could be taken accordingly. Obviously, confirmation of this clinical inference requires further extensive studies. For these reasons appropriate analytical methods are required for determination of oxalate at trace levels in renal calculi.

Calcium oxalate stones are the most frequent calculi in industrialised countries (approx. 65% of cases) [6]. The amount of oxalate excreted in urine is well-known to have an important role in calcium oxalate stone formation [7]. The oxalate present in the urine is the result of two contributions – oxalate synthesised in the body from different precursors (endogenous origin) and oxalate ingested (exogenous origin) [8]. Exogenous origin is especially important for patients with gastrointestinal hyperabsorption of oxalate, because the absorbed oxalate is not metabolised and is mainly excreted in the urine [9]. Thus, knowledge of urinary oxalate concentration and its relationship with diet are relevant for diagnosis and monitoring of hyperoxalurias. The concentration of oxalate in both urine and food is, therefore, related indirectly to renal stones, and for this reason both have also been included in this study.



**Figure 1.** Typical chromatogram obtained from a struvite stone containing  $0.198 \text{ mg oxalic acid g}^{-1}$  (equivalent to  $0.57 \text{ mg oxalic acid L}^{-1}$  in the solution injected): 1 = silylated trichloroacetic acid, 2 = silylated oxalic acid.



**Figure 2.** Evolution of analytical signal (peak height) with silylation reaction time for reaction at (a)  $20^\circ\text{C}$  and (b)  $60^\circ\text{C}$ . Oxalic acid concentration in the chromatographed solution  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . Non-reported conditions were as described in the recommended procedure.

**Table 1.** Effect of the solvent on the peak height of the trimethylsilyl ester of oxalic acid. Oxalic acid concentration  $5 \text{ mg L}^{-1}$  (in the solution chromatographed).

Solvent	Peak height	CV (%) <sup>a</sup>
Xylene	507184	6.3
Ethyl acetate	367212	2.7
Dichloromethane	329457	3.0
Heptane	342228	2.2
Tetrahydrofuran	323282	7.9

<sup>a</sup> Three measurements.

Chromatographic techniques including high-performance liquid chromatography [10], gas chromatography [11–13], ion chromatography [14], capillary electrophoresis [15, 16], and several enzymatic determinations involving either oxalate oxidase or oxalate decarboxylase [17, 18] have been reported for analysis of oxalate. Other methods of determination of oxalate based on its enhancing effect on the

oxidation of Mn(II) by periodate [19] or precipitation of calcium oxalate have been also described [20]. Because the sensitivity of gas chromatography is excellent, this technique was selected to perform this study. If oxalic acid is to be determined by gas chromatography its volatility and thermal stability must both be increased. Because the trimethylsilyl derivatives of aliphatic carboxylic acids are easy to ob-

tain and easy to analyse by gas chromatography [21], a silylation reaction was performed.

The aim of this work was development of a method for determination of trace amounts of oxalate in renal stones which could be used by clinical chemists to establish the possible diagnostic value of these data for urolithiasic patients. Because the oxalate content of urine and food samples is related to the risk of calculi formation, determination of oxalate in such samples was included as a second objective of this work.

## Experimental

### Reagents

All chemicals were of analytical-reagent grade. Granular activated carbon (100 mesh), sodium oxalate, and oxalic acid were purchased from Panreac. The strong cation-exchange resin SCX (500 mg, 2.8 mL) was from Alltech. Pyridine, ethyl acetate and trichloroacetic acid were from Sigma. The derivatization chemicals, 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane and chlorotrimethylsilane, and molecular sieves, 4 Å, 1.6-mm pellets, were from Aldrich.

### Apparatus

Gas chromatography was performed with a Shimadzu GC-17A gas chromatograph equipped with a Shimadzu QP-5000 mass spectrometer and fitted with a  $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d. SPB-20 fused-silica capillary column}$  (Supelco); helium was used as carrier gas. The column temperature was programmed from  $60^\circ\text{C}$  to  $106^\circ\text{C}$  at  $2.9^\circ \text{ min}^{-1}$  and from  $106^\circ\text{C}$  to  $200^\circ\text{C}$  at  $20^\circ \text{ min}^{-1}$ . To keep the carrier gas flow at  $0.8 \text{ mL min}^{-1}$  the column head pressure was simultaneously increased from 40.1 to 56.2 kPa at  $1 \text{ kPa min}^{-1}$  and then from 56.2 to 88.1 kPa at  $7.2 \text{ kPa min}^{-1}$ . The injector and the detector interface temperatures were  $200^\circ\text{C}$  and  $240^\circ\text{C}$ , respectively. A perfluorotributylamine standard was run every working session. Injections were performed automatically (Shimadzu AOC-17 autoinjector) in the splitless mode. The ions of fragments with  $m/z$  63, 93, 113, 147 amu were monitored. Data processing was performed by the Class-5000 software (Shimadzu). Peak heights were used for calculation purposes.

A Perkin-Elmer 2000 ICP-AES was used for calcium determinations.

## Procedures

### Determination of Oxalate (Transformation of Oxalate to Oxalic Acid, Derivatization, and Chromatographic Performance)

Oxalate in sample solutions was transformed to oxalic acid by use of a chromatographic column containing cation-exchange resin in the acid form. The purified sample (0.1 mL) was transferred to a vial and dried at 60 °C under vacuum (200 mm Hg). The residue obtained was reconstituted with 1 mL ethyl acetate containing 2 mg L<sup>-1</sup> of trichloroacetic acid (internal standard) and 0.1 mL pyridine. Hexamethyldisilazane (0.1 mL) and chlorotrimethylsilane (0.25 mL) were then added and the solution was maintained at 60 °C for 1 h. After reaction the solution was centrifuged and the supernatant (1 µL) was injected for chromatography. Peaks at 10.47 and 14.76 min, corresponding to the silylated esters of trichloroacetic acid and oxalic acid, were selected for analysis (Figure 1). Analytical concentrations were expressed as oxalic acid.

### Treatment of Urine Samples

Urine pH was measured and, when necessary, adjusted to 4.0–5.0 with HCl. Samples (10 mL) were purified by means of a 20-mm i.d. chromatographic column containing 0.5 g activated carbon. The solution obtained was used for determination of oxalate.

### Treatment of Renal Stones (Uric Acid, Hydroxyapatite, Struvite)

Samples (20–50 mg) were powdered, treated with HCl (2 mol L<sup>-1</sup>, 2 mL), and the mixtures were left at room temperature for 2 h. The solutions were then filtered through 0.45-µm Teflon filters and used for determination of oxalate.

### Treatment of Food Samples

Fresh vegetables were homogenised with HCl 2 mol L<sup>-1</sup> and the resulting mixtures were left at room temperature for 2 h. The solutions were filtered through a 0.45-µm Teflon filter and oxalate was determined in the filtrate.

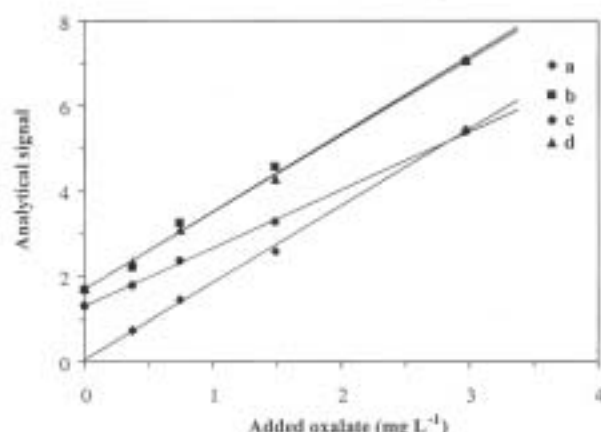


Figure 3. Calibration graphs obtained under different experimental conditions: (a) calibration graph obtained by use of the recommended procedure, (b) calibration graph obtained by use of the standard addition method after the recommended procedure, (c) calibration graph obtained by use of the standard addition method without clean up with activated carbon, (d) calibration graph obtained by use of the standard addition method without clean up with activated carbon and 12 h reaction time. Non-reported conditions were as described in the recommended procedure.

## Results and Discussion

Gas chromatography with mass spectrometry is an analytical tool with adequate sensitivity for determination of trace amounts of oxalate in calculi. Nevertheless, because of the low volatility and thermal instability of oxalic acid, derivatization is required before determination. Formation of the trimethylsilyl esters of oxalic acid was selected for this purpose. Because oxalate is present in the calculus as insoluble calcium salts which must, therefore, be dissolved with acid, and the derivatization reaction is performed in anhydrous organic solvent, a purification step is necessary. This purification was performed using a cation-exchange resin, to eliminate potential cationic interferences, followed by evaporation of water.

### Study of the Derivatization Reaction

Trimethylsilyl esters of oxalic acid are formed by reaction with chlorotrimethylsilane in pyridine [21]. To minimise the amounts of toxic reagents, development of this reaction in several organic solvents using smaller amounts of pyridine as base and hexamethyldisilazane as catalyst was studied. Experiments reported in this section were undertaken using oxalic acid standards in ethyl acetate. These standards were dried using a stream of nitrogen and the oxalic acid was reconstituted in the organic solvent under study. The re-

sults obtained showed that the reaction occurred in all the solvents studied but with different yields (Table I). A reproducible and sensitive analytical signal was obtained by use of ethyl acetate. Because of its relatively low toxicity, this solvent is recommended for oxalate determination. Use of xylene resulted in a higher yields but with poor reproducibility. Obviously, the reaction should always be performed under anhydrous conditions, because the trimethylsilyl esters of the analyte and internal standard are not stable in the presence of trace amounts of water.

Working with excess silylation reagents, the temperature and time of the reaction were the key variables in achieving maximum yield. Evolution of analyte peak size with time at two temperatures (Figure 2) shows that at higher temperatures the reaction is faster, and that the equilibrium signal does not depend on the temperature. Thus, 1 h at 60 °C was finally selected. If sampling time is not important, room temperature and a longer reaction time (4 h) can also be recommended.

### Study of the Transformation of Oxalate to Oxalic Acid

It was found that the silylation reaction occurred when the analyte (oxalate) was in the form of oxalic acid or ammonium oxalate. Other forms of oxalate, for example sodium, potassium, and calcium oxalates did not react, probably because of their very low solubility in ethyl acetate.

**Table II.** Effect of urinary pH on the determination of urinary oxalate.

Sample	pH	Amount of oxalic acid (mg L <sup>-1</sup> )		Recovery (%)
		Added	Found	
1	4.00	-	22.51	-
	4.50	2.00	24.51	99.80
		-	22.30	-
	5.00	2.00	24.30	100.10
		-	22.97	-
	5.50	2.00	24.95	99.90
-		22.42	-	
2	6.00	2.00	24.42	100.10
	6.50	-	21.54	-
		2.00	23.46	95.79
	4.00	-	16.75	-
		1.80	18.55	100.04
	4.50	-	16.80	-
1.80		18.60	99.98	
5.00	-	16.79	-	
	1.80	18.59	100.09	
5.50	-	16.17	-	
	1.80	18.97	99.99	
6.00	-	16.71	-	
	1.80	18.51	100.21	
6.50	-	16.62	-	
	1.80	18.40	98.69	
3	4.00	-	12.98	-
	4.50	1.80	14.78	99.96
		-	13.02	-
	5.00	1.80	14.82	100.06
		-	13.16	-
	5.50	1.80	14.82	99.96
-		13.04	-	
6.00	1.80	14.84	100.12	
	-	12.85	-	
6.50	1.80	14.85	100.04	
	1.80	14.85	99.57	

**Table III.** Effect of urinary calcium concentration on the determination of urinary oxalate.

Sample	Amount of calcium (mg L <sup>-1</sup> )		Amount of oxalic acid (mg L <sup>-1</sup> )		Recovery (%)
	Natural*	Added	Added	Found	
1	127	-	-	10.58	-
		-	1.9	12.49	100.11
		50	-	10.68	-
		50	1.9	12.58	99.99
		100	-	10.54	-
2	176	100	1.9	12.44	100.05
		-	-	12.60	-
		-	1.9	14.48	99.97
		50	-	12.64	-
		50	1.9	14.54	100.06
3	117	100	-	12.30	-
		100	1.9	14.39	99.70
		-	-	14.42	-
		-	1.9	16.32	99.99
		50	-	14.40	-
4	234	50	1.9	16.31	100.80
		100	-	14.36	-
		100	1.9	16.26	100.09
		-	-	21.23	-
		-	3.8	25.07	101.05
5	94	50	-	21.05	-
		50	3.8	24.85	100.04
		100	-	21.30	-
		100	3.8	25.07	98.60
		-	-	18.50	-
6	94	-	3.8	22.31	100.20
		50	-	18.43	-
		50	3.8	22.22	99.70
		100	-	18.61	-
		100	3.8	22.46	101.40

\* Determined by ICP-AES.

Transformation of oxalate to oxalic acid before derivatization was, therefore, essential if maximum sensitivity was to be achieved.

Two strategies for transforming oxalate to oxalic acid were investigated. The first consisted in liquid-liquid extraction with ethyl acetate from acid aqueous phases containing oxalate. The second was based on exchange of cations by protons on a cation-exchange resin. Much greater sensitivity was achieved by use of the cation-exchange resin, which is, therefore, recommended. The calibration graphs obtained for the analyte peak using sodium oxalate standards and using oxalic acid standards without cation-exchange treatment were statistically comparable at the 95% confidence level, revealing that transformation of oxalate to oxalic acid was quantitative.

### Analytical Features of the Method

Under the working conditions described above the calibration graph obtained was:

$$y = (-0.339 \pm 0.0532) + (3.042 \pm 0.0418)x; n = 8, R^2 = 0.9996$$

where  $y$  denotes the peak intensity ratio (oxalic acid/trichloroacetic acid), and  $x$  is the concentration of oxalic acid (mg L<sup>-1</sup>) in the solution chromatographed. The linear range was 0.2–5.0 mg oxalic acid L<sup>-1</sup>. The limit of detection, calculated as three times  $S_{y=0}/3.042$ , was 0.06 mg oxalic acid L<sup>-1</sup>, and the limit of quantification was 0.2 mg oxalic acid L<sup>-1</sup>. The coefficient of variation of the method, calculated as  $(100 \times S_{y=0})/(3.042 \times \text{average of concentration of standards})$  was 1.3%.

### Applications

#### Determination of Oxalate in Urine

Urine is a complex matrix containing potentially interfering species. The main interferences could arise from the presence of organic compounds which affect the silylation reaction and/or pH-dependent crystallisation of calcium salts during the cation-exchange process. For these reasons, clean up of the sample on activated carbon, and the effects of the calcium content and pH of the urine were studied.

### Study of Sample Clean-up

Figure 3 summarises results from a comparative study of the clean-up and the reaction time. It is apparent that when the proposed procedure for urine analysis was followed, the slope of the standard addition method is statistically comparable ( $p < 0.05$ ) with that of the calibration graph. A lower slope was obtained if clean-up was not performed. The slope of the calibration graph was also obtained without clean-up of the sample but with a longer reaction time (curve d). From these data it can be concluded that the presence of organic matter reduced the reaction rate, and that to avoid longer reaction times clean-up of the sample on activated carbon is recommended.

### Study of Interferences

Because the solubility of oxalate salts is pH-dependent, the effect of the urinary pH on the determination of oxalate was studied with real urine samples the pH of which were adjusted with HCl or NaOH before analysis (Table II). Urinary pH in the range 4.0–5.5 resulted in good recovery for all the samples studied. Higher pH can give rise to negative errors (see sample 1), probably because of the crystallisation of calcium phosphates which can adsorb oxalate. pH adjustment with HCl to within the range 4.0–5.0 is therefore recommended for urine samples.

Because of the possibility of calcium oxalate formation during urine analysis, which would result in negative interference, the effect of calcium concentration was also studied. The study was performed using real urine samples spiked with calcium; a recovery test for oxalate should then give information about any interference from calcium. As is apparent from Table III, good recovery was obtained for all the samples analysed. From these results it can be stated that calcium, within the physiological urinary range, did not interfere the oxalate determination. Obviously, any crystallisation reaction before analysis, for example during sample storage, can produce a negative error.

### Accuracy and Precision

The accuracy and potential matrix effects were tested by comparison of oxalic acid found in natural samples ( $Y$ ) with that found in spiked samples. The graph of  $Y$  against the amount of oxalic acid found in

**Table IV.** Determination of oxalic acid from sodium oxalate standards in the presence of HCl and calcium.

Sample	HCl (mol L <sup>-1</sup> )	Ca (mg L <sup>-1</sup> )	Oxalic acid (mg L <sup>-1</sup> )	Recovery (%)
1	2	–	1.2	99.8
	3	–	1.2	100.1
	4	–	1.2	99.8
	5	–	1.2	97.5
	6	–	1.2	95.6
2	7	–	1.2	93.4
	2	–	2.4	100.1
	3	–	2.4	100.0
	4	–	2.4	99.9
	5	–	2.4	98.3
3	6	–	2.4	95.6
	7	–	2.4	94.5
	4	50	2.4	100.1
	4	100	2.4	99.8
	4	200	2.4	99.9
	4	300	2.4	100.3
	4	400	2.4	99.6

**Table V.** Analysis of oxalic acid in renal stones by the proposed method.

Sample	Calculi composition	Amount of oxalic acid		Recovery (%)	CF* (%)
		Added (mg g <sup>-1</sup> )	Found (mg g <sup>-1</sup> )		
1	Uric acid	–	0.031	–	4.39
		0.150	0.176	96.7	–
		0.300	0.316	95.0	–
		0.471	0.492	97.9	–
2	Uric acid	–	0.090	–	4.84
		0.100	0.189	99.0	–
		0.200	0.288	99.0	–
		0.300	0.390	100.0	–
3	Uric acid	–	0.249	–	3.81
		0.050	0.298	98.0	–
		0.100	0.346	97.0	–
		0.150	0.399	100.0	–
4	Uric acid	–	0.102	–	3.56
		0.050	0.153	102.0	–
		0.100	0.201	99.0	–
		0.150	0.253	100.7	–
5	Hydroxyapatite	–	<0.01	–	–
		0.200	0.193	96.5	–
		0.400	0.401	100.3	–
6	Hydroxyapatite	–	0.801	–	–
		0.100	0.900	99.0	–
		0.200	1.002	100.5	–
7	Hydroxyapatite	–	1.099	99.3	–
		0.100	<0.01	–	–
		0.200	0.101	101.0	–
8	Struvite	–	0.199	99.5	–
		0.300	0.301	100.3	–
		–	0.198	–	2.45
9	Struvite	0.100	0.299	101.0	–
		0.200	0.397	99.5	–
		0.300	0.498	100.0	–
		–	0.097	–	4.11
10	Struvite	0.100	0.196	99.0	–
		0.200	0.298	100.5	–
		0.300	0.396	99.7	–
		–	0.249	–	3.07
		0.100	0.349	100.0	–
		0.200	0.450	100.6	–
		0.300	0.549	100.1	–

\* Three measurements.

spiked samples minus the amount of oxalic acid added ( $X$ ) was  $Y = 1.0015X - 0.0339$  ( $R^2 = 0.993$ ,  $S_{y/x} = 0.492$ ,  $n = 15$ ) which is comparable at the 95% confidence level to

the graph  $Y = X$ , which assumes 100% recovery for all samples. *RSD* values of 3.2, 2.9, and 2.1 were obtained from five replicate analyses of real samples which, ac-

**Table VI.** Analysis of oxalic acid in renal stones by the recommended procedure.

Sample	Calculi composition	Oxalic acid (mg g <sup>-1</sup> )
1	Uric acid	0.031
2	Uric acid	0.090
3	Uric acid	0.249
4	Uric acid	0.102
5	Uric acid	0.103
6	Uric acid	0.024
7	Uric acid	0.018
8	Uric acid	0.094
9	Uric acid	0.068
10	Uric acid	0.079
11	Uric acid	0.082
12	Uric acid	0.254
13	Uric acid	0.042
14	Hydroxyapatite	<0.01
15	Hydroxyapatite	<0.01
16	Hydroxyapatite	<0.01
17	Hydroxyapatite	<0.01
18	Hydroxyapatite	0.801
19	Hydroxyapatite	0.431
20	Struvite	0.198
21	Struvite	0.097
22	Struvite	0.249
23	Struvite	0.349
24	Struvite	0.198
25	Struvite	0.097
26	Struvite	0.449
27	Struvite	0.080

According to this procedure, contained 8.9, 11.7, and 15.0 mg oxalic acid L<sup>-1</sup>, respectively.

#### Determination of Oxalate in Renal Stones

The minor constituents of the 'core' of a calculus might give information about its origin – it has, for example, been postulated that the formation of micro-crystals of calcium phosphate can lead to the formation of a calcium oxalate stone [22]. For further deep investigation of such implications the corresponding analytical methods are necessary. As far as we are aware the presence of oxalate as a minor component of renal stones has not previously been investigated.

#### Interference Study

Determination of oxalate in renal stones of different composition (uric acid, hydroxyapatite, and struvite) was performed after solubilization of calcium oxalate in HCl. Because a large percentage of calcium in hydroxyapatite stones could cause interference in the determination of oxalate by formation of calcium oxalate, analysis of sodium oxalate standard was performed in the presence of different amounts of HCl and calcium. Results shown in Table IV suggest that no interference resulted from either species.

**Table VII.** Analysis of oxalic acid in food by the proposed method.

Sample	Amount of oxalic acid		Recovery
	Added (mg g <sup>-1</sup> )	Found (mg g <sup>-1</sup> )	
Broccoli	–	0.71	–
Carrot	1.0	1.70	99.0
Bean	–	2.21	–
Carob seed germ	1.0	3.22	101.0
Lentil	–	3.72	–
Chickpea	1.0	4.71	98.5
	–	2.15	–
	1.0	3.14	99.0
	–	3.12	–
	1.0	4.14	102.0
	–	6.27	–
	1.0	7.28	101.0

#### Accuracy and Precision

Table V summarises the data obtained from stones of different composition spiked with oxalate standard. It is apparent that recoveries were usually in the range 98–102%. The paired *t* test revealed the absence of significant differences between the concentrations added and those found. The precision of analysis of real samples ranged from 2.45 to 4.84%. These results demonstrated the applicability of the proposed method to the determination of trace amounts of oxalate in renal stones.

#### Results Obtained from Analysis of Several Samples

Twenty-seven different samples were analysed in this work. The results obtained are shown in Table VI. The average content of uric acid calculi (13 samples) was 0.11 mg oxalic acid L<sup>-1</sup> (*SD* = 0.08). A larger amount of oxalate was found in struvite calculi (mean value = 0.2 mg oxalic acid L<sup>-1</sup>, *SD* = 0.13, number of calculi analysed = 8). Six samples of hydroxyapatite were analysed (no more samples were available at that time); the results obtained suggest that hydroxyapatite stones can be classified according to their oxalate content into two groups – samples with very low oxalate content (below the *LOD* of the method) and samples containing large amounts of oxalate (0.431 and 0.801 mg oxalic acid g<sup>-1</sup>). Further clinical data from the patients producing the samples analysed in this work will provide information on the diagnostic value of these results.

#### Determination of Oxalate in Food Samples

To extend the use of the silylation reaction reported herein to all kinds of sample re-

lated, directly or indirectly, to urolithiasis, several food samples were also analysed. The sample treatment chosen is described elsewhere [23]; the results obtained are shown in Table VII.

#### Acknowledgement

J.A. Muñoz acknowledges the "Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya" for the scholar-grant received.

#### References

- [1] Schneider, H.J. In *Urolithiasis: Etiology, Diagnosis*. Schneider, H.J.; Peacock, M.; Robertson, W.G.; Vahlensieck, W., Eds. Springer, Berlin, 1985, p. 137.
- [2] Grasses, F.; Costa-Bauzá, A.; García-Ferragut, L. *Adv. Colloid Interface Sci.* 1998, 74, 169–194.
- [3] March, J.G.; Simonet, B.M.; Grasses, F. *Clin. Chim. Acta* 2001, 314, 187–194.
- [4] March, J.G.; Simonet, B.M.; Grasses, F. *J. Chromatogr. B* 2001, 757, 247–255.
- [5] Grasses, F.; Costa-Bauzá, A.; Ramm, M.; Montesinos, V.; Conte, A. *Clin. Chim. Acta* 2002, 322, 29–36.
- [6] Hesse, A.; Tiselius, H.G.; Jähnen, A. *Urinary Stones: Diagnostic, Treatment, and Prevention of Recurrence*. Karger, Basel, 1997.
- [7] Holmes, R.P.; Goodman, H.O.; Assimos, D.G. *Kidney Int.* 2001, 59, 270–276.
- [8] Williams, H.E.; Wandzilak, T.R. *J. Urol.* 1989, 141, 742–749.
- [9] Coe, F.L.; Fowl, M.J.; Pak, C.Y.C.; Parks, J.M.; Preminger, G.M. *Kidney Stones: Medical and Surgical Management*. Lippincott Raven, Washington, 1996.
- [10] Skottly, D.R.; Lee, W.Y.; Nieman, T.A. *Anal. Chem.* 1996, 68, 1530–1535.
- [11] von Unruh, G.E.; Langer, M.A.W.; Para, D.W.; Hesse, A. *J. Chromatogr. B* 1998, 776, 343–349.
- [12] Chen, Y.; Li, Q.; Yang, Z.; Zhang, F. *Sepu* 1989, 7, 226–228.



- [13] Moye, H.A.; Malagodi, M.H.; Clarke, D.H.; Miles, C.J. *Clin. Chim. Acta* **1981**, *114*, 173–185.
- [14] von Schnakenburg, Ch.; Byrd, D.J.; Latta, K.; Reusz, G.S.; Graf, D.; Brodehl, J. *Eur. J. Clin. Chem. Biochem.* **1994**, *32*, 27–29.
- [15] Trevaskis, M.; Trenerry, V.C. *Food Chem.* **1996**, *57*, 323–330.
- [16] Nelson, B.C.; Rockwell, G.F.; Campfield, T.; O'Grady, P.; Hernandez, R.M. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *410*, 1–10.
- [17] Milardovic, S.; Grabaric, Z.; Rumenjak, V.; Jukic, M. *Electroanalysis* **2000**, *12*, 1051–1058.
- [18] Kasidas, G.P.; Rose, G.A. *J. Hum. Nutr.* **1980**, *34*, 255–266.
- [19] Hassouna, M.E.M.; Elsuocary, S.A.A. *Talanta* **2002**, *56*, 193–202.
- [20] Seiboonlae, P.; Suwantrai, S.; Prasongwattana, V. *Clin. Chim. Acta* **1998**, *273*, 59–68.
- [21] Molnar-Perl, I.; Vasanits, A.; Horvath, K. *Chromatographia* **1998**, *48*, 111–119.
- [22] Grasses, F.; March, J.G.; Conte, A.; Costa-Bauza, A. *Eur. Urol.* **1993**, *24*, 381–386.
- [23] Fechtig, B.; Peter, H.; Bickel, H.; Vischer, E. *Helv. Chim. Acta* **1968**, *51*, 1108–1119.

Received: Jan 17, 2003  
 Revised manuscript  
 received: Feb 21, 2003  
 Accepted: Mar 5, 2003

**ANEXO 2**

**ONE SET DETERMINATION OF URINE METABOLITES (OXALATE, CITRATE,  
URIC ACID AND CREATININE) BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS**

J.A. Muñoz and M. Valiente\*

Centre Grup de Tècniques de Separació en Química (GTS), Química Analítica, Departament  
de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

\* Author for correspondence [Manuel.Valiente@uab.es](mailto:Manuel.Valiente@uab.es); Tel.: +34-93-581-29-03; Fax: +34-93-  
581-19-85

## **Abstract**

The markers of urolithiasis oxalate, citrate and uric acid as well as the renal function (creatinine) in urine samples are determined by a new one set multi-analyte assay using capillary zone electrophoresis. These four urine metabolites were determined by using a 50 cm x 75  $\mu\text{m}$  capillary and 50  $\text{mmol l}^{-1}$  phosphate buffer (pH 6.5) at constant voltage of  $-30\text{kV}$  (for oxalate and citrate) and  $30\text{kV}$  (for creatinine and uric acid), constant temperature of  $25^{\circ}\text{C}$  and UV detection at 195nm (for oxalate and citrate) and 234 nm (for uric acid and creatinine). Sample pre-treatment is minimum, just 5 and 20-fold dilution of the urine sample and acidification to pH 3-4 in order to obtain accurate recoveries of analytes. Validation parameters (linear range, sensitivity, accuracy, precision and detection limits) were evaluated for all the analytes. Effects of freezing as a conservation method of urine samples are also discussed in terms of recoveries of the analytes. Furthermore, results obtained with the developed method are statistically comparable to those obtained with the official methods normally used in the clinical practice. The developed analytical method is thus highly practical as a diagnostic tool for corresponding metabolic disorders due to its simplicity, time consuming, easy automation, cost efficiency and analytical effectiveness (linearity, sensitivity, reproducibility of migration times, accuracy and precision) that meets the clinical requirements.

**Keywords:** determination, oxalate, citrate, uric acid, creatinine, capillary electrophoresis

## **Introduction**

Urolithiasis is a common disease, which affect 12% of the European Union population along their life [1], characterized by high prevalence and incidence, high morbidity and high rates of recurrence. The recurrence rate during five years lies between 44-75% [2], independently that the lithiasic episode is being solved spontaneously or by urologic intervention. This fact is due to the persistence of the urinary alteration which causes the renal stone formation. Such alteration may be diagnosed and treated by dietetic changes, pharmacological treatment or both, decreasing the aggressiveness of the disease and, consequently, the number of recurrences [3].

The majority of stones are composed of calcium oxalate (70%); the rest are composed of calcium phosphate (hydroxyapatite or brushite), magnesium and ammonium phosphate (struvite), uric acid, cystine and others [4].

In the lithogenic process, it is accepted a combined theory: the main phenomena is the supersaturation of several compounds in urine that might crystallise forming solid concretions, influenced by the scarcity of crystallization inhibitors, the presence of crystallization promoters and morphoanatomic factors [5]. When the equilibrium between supersaturation, promoters, inhibitors and morphoanatomic factors is broken, it might lead to a lithiasic episode. It takes place, for example, in those cases with high concentration of lithogenic compounds (hypercalciuria, hyperoxaluria, hyperuricuria, hyperphosphaturia...) or those with low concentration of inhibitors (hypomagnesiuria, hypocitraturia...).

Accurate evaluation of alterations and its magnitude in each individual patient are required to develop efficient therapeutic treatments and diagnose the risk of lithiasic disease in healthy people or people with risk of developing such disease, with the consequent advantage in the prevention of the disease. The determination of the urinary levels of calcium, magnesium, phosphorus, oxalate, citrate and uric acid has long been recognized as an important factor in the evaluation and treatment of urolithiasic patients. Another interesting analyte is creatinine, which serves as one of the most widely used markers of renal function (indicator of the glomerular filtration rate of kidneys, that is the amount of fluid filtered per unit time). While calcium, magnesium and phosphorus are easily measured by atomic spectroscopy, measurement of oxalic acid, citric acid, uric acid and creatinine involve some practical drawbacks. Enzymatic techniques used for determining oxalate (6,7), citrate (11), uric acid (13) and creatinine (18) are characterized by consumption of large amounts of reagents, inability to test multiple analytes at a time and laborious sample treatment (requiring dilution, filtration, centrifugation, decolourization, pH adjusting, need of incubation time...) with

consequent slow analysis times, and lack of specificity for the target analyte [i.e. uricase method is interfered by guanine, xanthine and a few other structural analogs of uric acid(13)]. Chromatographic techniques (ion chromatography or high-performance liquid chromatography) used for determining oxalate (8,9), citrate (9,12), uric acid (15) and creatinine (15) are also characterized by consumption of large amounts of reagents and requirement of different kind of columns for the analysis of the four proposed analytes. Many other methods such as the phosphotungstic acid method (interfered by proteins, glucose, caffeine, ascorbic acid...present in urine) (13), electrochemical techniques (14) for uric acid or the Jaffé's reaction for creatinine (interfered by several substances in urine such as proteins, ascorbic acid, guanidine...) (13,17) have also important drawbacks such as consumption of large amounts of reagents, inability to test multiple analytes at a time or lack of specificity for the target analyte.

Nowadays capillary zone electrophoresis (CZE) has become an efficient analytical separation technique with an increasing impact in the clinical laboratory. Preliminary attempts in determining separately oxalate and citrate (10), and uric acid and creatinine (16) by capillary electrophoresis have been reported. CZE has several advantages including need of minute amounts of sample, low costs of analysis and simple sample treatment. Additional advantages of the technique are multicomponent analysis capabilities, specificity, high resolution, good reproducibility, high sample throughput and easy automation.

The aim of the present work was the validation of a method for direct measurement of oxalate, citrate, uric acid and creatinine in urine by using capillary zone electrophoresis. Effects of several significant factors such as the concentration and pH of running buffer and applied voltage on the resulting separation were studied. The method has been validated and successfully applied to urine samples, thus demonstrating the easy application and usefulness of the developed method.

## **Materials and methods**

### **Apparatus**

CZE was performed on a Beckman P/ACE MDQ (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA) equipped with a PDA (Photodiode Array) detector set at 195 and 234nm. Data collection and analysis were carried out by Beckman P/ACE System MDQ software on a personal computer.

Separations were performed on a polyimide-coated fused-silica capillary of 50 cm in total length, with an internal diameter of 75  $\mu\text{m}$ . The detector window was set at 40 cm from the inlet.

New capillaries were treated with a 60 min pressure wash of 1 mol  $\text{l}^{-1}$  NaOH and 10 min pressure wash of deionised water at 20 psi. Each day, the capillary was rinsed for 20 min with 0.1 mol  $\text{l}^{-1}$  NaOH, 2 min with deionised water, and 10 min with the related run buffer solution at 20 psi. Before each run, the capillary was rinsed for 1 min with 0.1 mol  $\text{l}^{-1}$  NaOH, 1 min with deionised water, and 2 min with the run buffer solution at 20 psi.

All experiments were carried out at 25°C. Sample injections were made by pressure of 0.5 p.s.i. for 5 s.

Whereas injection was made in the cathode and detection in the anode for oxalate and citrate with a separation voltage set at  $-30\text{kV}$ , injection was made in the anode and detection in the cathode for creatinine and uric acid by reversing the applied voltage to  $+30\text{kV}$ .

#### *Reagents*

All reagents used were of analytical grade. Sodium oxalate and uric acid were from Panreac (Barcelona, Spain). Sodium citrate was from Merck (Darmstadt, Germany). Creatinine was from Aldrich (Milwaukee, WI, USA).  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  was from Merck (Darmstadt, Germany) and NaOH from Panreac (Barcelona, Spain). Standard, buffer solutions and all dilutions were prepared with milli-Q water.

#### *Electrophoretic buffer*

The electrophoretic buffer was prepared by 10-fold dilution of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  500 mmol  $\text{l}^{-1}$  and adjustment to pH 6.5 with NaOH 1.0 mol  $\text{l}^{-1}$ . Fresh buffer was prepared daily.

#### *Samples*

Urine samples used for optimisation and validation of the proposed method were kindly provided by the members of our research group. They were analysed before and after storage at  $-20^\circ\text{C}$ . Sample pre-treatment is minimum. Prior to analysis, samples were shaken gently and diluted 1:5 with HCl 40 mmol  $\text{l}^{-1}$  (final pH 2-3) for oxalate and citrate analysis and 1:20 with HCl 40 mmol  $\text{l}^{-1}$  (final pH 2-3) for creatinine and uric acid analysis. Finally, all samples were filtered through 0.22 $\mu\text{m}$  pore-size filters before injection in the CE equipment.

#### *Comparison of present results by CZE procedure with official methods*

Six urine samples were analysed in the clinical laboratory of the Hospital Universitari de Bellvitge following the official methods: oxidase-peroxidase method for oxalate (Trinity Biotech, ref. 591-C), lyase-dehydrogenase method for citrate (Roche Diagnostics, ref. 139076), uricase-peroxidase method for uric acid (Roche Diagnostics) and Jaffé's method for

creatinine (Roche Diagnostics). Results of these analyses were compared with those obtained by applying the proposed CZE procedure.

## **Results and discussion**

Preliminary attempts of determining the four substances in a 1/5 diluted sample in a single run by using phosphate buffers (25-100 mM) with cetyltrimethylammonium bromide (0.05-1.0 mM) for reversing the electroosmotic flow at pH 5.5-7.5 and -10kV to -30 kV resulted in overlapped analyte peaks with some matrix components and/or saturation of photometric signal for uric acid and creatinine. For 1/10 or 1/20 diluted samples oxalate and citrate resulted in a insufficient sensitivity for its accurate determination.

Bearing in mind the complexity of urine matrix, the different concentration levels of the analytes in urine and the different sensitivity of CE for the analytes of interest, the determination of oxalate, citrate, uric acid and creatinine in urine can not be accomplished by a direct run by using UV photometric detection. This determination is best carried out by processing two aliquots of the urine sample, i.e. a low-diluted sample for oxalate and citrate analysis (low sensitivity of detection) and a high-diluted sample for uric acid and creatinine analysis (high sensitivity of detection). Our method applies such a double dilution of urine sample, and uses the same buffer with a different voltage polarity for each dilution condition. Thus, oxalate and citrate are determined by applying a voltage of -30kV with a 5-fold dilution (Figure 1a), whereas uric acid and creatinine are determined in the same buffer by applying a voltage of +30kV and 20-fold dilution (Figure 1b).

### *Method optimization. Study of variables*

Phosphate buffers are usually used when direct UV/Vis absorbance detection is used. Preliminary results indicated  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50  $\text{mmol l}^{-1}$  to be adequate for the proposed separation scheme, as a result of a compromise, i.e, lower concentrations (10-25  $\text{mmol l}^{-1}$ ) of the buffer resulted in an insufficient buffering for the injected urine samples leading to broadened peaks, whereas higher concentrations (100  $\text{mmol l}^{-1}$ ) produced high current through the capillary causing degradation of the separation and nonreproducible migration times. The pH of the buffer is the most critical parameter on altering the selectivity of the capillary between solutes in a CZE separation. At pH 6.0, oxalate and citrate result in overlapped peaks, without baseline resolution (Figures 2a,b). When pH increases up to 7.0, the resolution between oxalate and citrate and their interferences increases, resulting pH = 6.5 the optimum, offering enough resolution for both analytes and shorter extent of the analysis. Creatinine and uric acid are well-resolved for the three pH conditions assayed (Figure 2c). Thus, pH 6.5 is selected as



the optimum pH suitable for both determinations: oxalate and citrate, and creatinine and uric with the same buffer by simply reversing the polarity of the electrodes between the two runs. Applied voltage was set to  $-30\text{kV}$  and  $+30\text{kV}$ , respectively, since lower voltages ( $20$  and  $25\text{kV}$ ) not only do not improve the separation but do extent considerably the analysis.

### *Validation*

Main validation parameters of the method for oxalate, citrate, uric acid and creatinine are included in Table 1. As shown there, standards fit the linear model ( $R>0.999$ ) for all the analytes in the indicated ranges and no matrix effects were found for any of the analytes, since there are no statistically significant differences (at 95% confidence level ) in the slopes from direct calibration and those from standard additions.

The limits of detection (LOD) were determined as three times  $s_{y/x}$ , the standard deviation of the residuals in the calibration linear model, divided by the sensitivity (slope of the calibration linear model) for a given analyte (19). Similarly, the limits of quantification (LOQ) were calculated as ten times  $s_{y/x}$  divided by the sensitivity for a given analyte. LOD and LOQ for the analytes of interest are given in Table 1. Detection limits provided for the present method are under the lower values found in the randomly assayed samples and in the practice in the clinical laboratory. The linear ranges and limits of quantification are adequate to cover all urinary concentrations of the analysed markers in human urine, after corresponding dilution (5-fold dilution for oxalate and citrate and 20-fold dilution for uric acid and creatinine).

The accuracy of the method was determined by the evaluation of four analytes recoveries from 13 urine samples analysed by contrast with aliquots of spiked amounts of these analytes. Due to the possibility of calcium oxalate and calcium citrate complex formation during urine analysis, which would produce a negative interference, the effect of calcium concentration and pH of the samples was also studied. Recoveries were near 100%, ranging from 96 to 105% (Table 1) and being independent from calcium content in urine and pH of samples (not shown), accordingly with the adequate selectivity of the analytical method for the four analytes of interest. From these results it can be concluded that calcium and pH, into their physiological urinary range, do not interfere the oxalate and citrate determination. Obviously, any crystallisation reaction previous to the analysis, i.e. during sample storage, can produce a negative error. Thus, it is highly important to assure the total redissolution of the sample (by the combined action of dilution and acidification) prior to the analysis.

Assuming a 100% recovery for all the samples, a linear relationship,  $Y=X$ , should be obtained for an analyte concentration determined in natural samples,  $Y$ , versus the analyte concentration found in spiked samples,  $X$ , (corrected for the analyte added in the spike). Our

data (Figures 3a,b,c,d) fit to linear equations by the least-square method, which are statically comparable at a 95% confidence level to the graph  $Y=X$  for oxalate, citrate, uric acid and creatinine, respectively.

Executing 10 runs of the same standard and sample (at the middle concentration of the calibration curves), migration times showed RSDs under 3% (Table 1), repeatability low enough to consider the method acceptable, since peak assignment is performed mainly with this criterion. Peak areas showed RSDs under 3.2% (Table 1), low enough to perform adequate quantitative analysis.

Samples were frozen after the first assay and measured one month later to assess stability of the samples under frozen conditions (Table 2). On the other hand, fresh samples (in the acidified and diluted aliquots) were reanalysed after 24-48h of the first analysis to assess the stability of the analytes at room temperature (Table 2). ANOVA analysis at a 95% confidence level shows no significant differences in any of the mentioned conditions for any of the target analytes. Thus, urine diluted and acidified samples are stable during a minimum of 48h at room temperature for the analysis of oxalate, citrate, creatinine and uric acid. In case that no fresh urines are available, freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  assures the stability of the analytes of interest for at least during one month.

Finally, a comparison of the CZE measurement of urinary oxalate, citrate, uric and creatinine with the corresponding official methods is shown in Table 3. The paired Student t-test indicated that there is no statistical difference ( $P<95\%$ ) between the results obtained by both methods for the assayed metabolites.

## **Conclusion**

A method has been validated for measuring oxalate, citrate, uric acid and creatinine in urine samples by CZE. Accordingly with their concentration levels and sensitivity of detection, two different dilution factors are used for the determination of oxalate/citrate (1:5) and creatinine/uric acid (1:20) respectively by applying a corresponding reverse potential to each of the diluted urine samples.

The CE analysis offers many advantages to current testing methods, including simplicity, easy of automation, high throughput (time of analysis  $< 20\text{min}$ ), high specificity, minimal sample volume requirements, reduced cost of capillary and electrolyte materials, minimal sample preparation (requiring only dilution-acidification and filtration of the urine samples), the ability to simultaneously analyse multiple markers, accuracy and reproducibility. A further

potential advantage of CE is that it can also be used to measure other important urinary components.

The simplicity of the whole process, the demonstrated good performance and high throughput (50 samples per day) make it recommendable in routine clinical analysis.

### **Acknowledgements**

J.A. Muñoz acknowledges the “Departament d’Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya” for the scholar-grant received. The work has been carried out under the support of the research Grant PPQ2002-04267-C03-01.

## References

- [1] H.J. Schneider in Urolithiasis: Etiology, Diagnosis. Handbook of Urology, 1985, pp 137-145.
- [2] S. Ljunghall, B.G. Danielson. Br. J. Urol. 1988, 14, 381-385
- [3] P. Barcelo, A. Rousand in Temas actuales de urología y nefrología, Fundación Promedic, pp. 257-275, 1994.
- [4] L.C. Herring. J. Urol. 1962, 88 (4), 545-562
- [5] F. Grases, A. Costa-Bauzá, L. García-Ferragut. Advances in colloid and interface science 1998, 74, 169-194
- [6] P.C. Hallson, G.A. Rose. Clin. Chim. Acta 55 (1974) 29
- [7] G.P. Kasidas, G.A. Rose. J. Hum. Nutr. 34 (1980) 255
- [8] K. Pfeiffer, W. Berg, D. Bongartz, A. Hesse. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1997, 35(4), 305-8
- [9] M.H. Khaskhali, M.I. Bhangar, F.D. Khand. J. Chromatography B: Biomed. Appl. 1996, 675(1), 147-51
- [10] A. García, M. Muros, C. Barbas. J. Chromatography B 755 (2001) 287-295
- [11] M. Petrarulo, P. Facchini, E. Cerelli, M. Marangella, F. Linari. Clin. Chem. 1995, 41(10), 1518-21
- [12] Y. Ogawa, M. Morozumi, T. Tanaka, K. Yamaguchi. J. Urol. 1986 135 (1), 178-81
- [13] A. Whelton, A.J. Watson, R.C. Rock, in: C.A. Burtis, E.R. Ashwood (Eds.), Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders, Philadelphia, 1996, pp. 569-592
- [14] E. Popa, Y. Kubota, D.A. Tryk, A. Fujishima. Anal. Chem. 72 (2000) 1724-1727
- [15] J. Jen, S. Hsiao, K. Liu., Talanta 2002, 58(4), 711-717
- [16] E.A. Clark, J.C. Fanguy, C.S. Henry. J. Pharm. Biomed. Anal. 2001, 25, 795-801
- [17] R. Gatti, V. Lazzarotto, C.B. De Palo, E. Cappellin, P. Spinella, E.F. De Palo. Electrophoresis 20 (1999) 2917-2921
- [18] T. Fujita, S. Takata, Y. Sunahara. Clin. Chem. 1993, 39(10), 2130-6
- [19] J.C. Miller, J.N. Miller, Statistics for Analytical Chemistry, Second Edition, Ellis Horwood Ltd., London, England, 1988

Table 1. Main validation parameters of CE method.

<b>Standards Linearity</b>				
	R	a±C.L.	b±C.L.	Range (mg l <sup>-1</sup> )
Oxalate	0.9991	0±15	29±2	2-10
Citrate	0.9999	-19±20	10.3±0.2	40-200
Uric acid	0.9997	300±700	173±7	10-50
Creatinine	1.0000	300±500	237±7	20-100
<b>Standard Addition</b>				
	R	a±C.L.	b±C.L.	Sample dilution
Oxalate	0.9999	140±6	28.1±0.9	1:5
Citrate	0.9973	1090±60	10.0±1.0	1:5
Uric acid	0.9995	10500±700	166±6	1:20
Creatinine	0.9999	34900±600	239±5	1:20
<b>Limit of Detection (mg l<sup>-1</sup>)</b>				
Oxalate	0.46			
Citrate	2.6			
Uric acid	3.8			
Creatinine	1.3			
<b>Limit of Quantification (mg l<sup>-1</sup>)</b>				
Oxalate	1.5			
Citrate	8.7			
Uric acid	13			
Creatinine	4.3			
<b>Sample accuracy (n=13)</b>				
	Mean recovery (%)	RSD (%)	Range (%)	
Oxalate	101.0	2.6	96.3-104.7	
Citrate	99.6	2.6	96.7-103.9	
Uric acid	99.3	3.1	96.3-104.2	
Creatinine	100.5	2.9	96.1-104.0	
<b>Standards Precision (n=10)</b>				
	Migration time (min)	Migration time (% RSD)	Area (% RSD)	
Oxalate	3.98	2.0	2.7	
Citrate	7.13	2.2	1.8	
Uric acid	7.62	1.7	1.6	
Creatinine	2.73	1.1	1.2	
<b>Sample Precision (n=10)</b>				
	Migration time (min)	Migration time (% RSD)	Area (% RSD)	
Oxalate	4.14	2.3	3.2	
Citrate	7.33	2.8	2.4	
Uric acid	7.55	2.4	2.7	
Creatinine	2.80	1.6	1.5	

a, intercept; b, slope, C.L. confidence limits (95%)

Table 2. Measurements of oxalate, citrate, uric acid and creatinine in 13 fresh (analysed immediately after collection and reanalysed after 24h) and frozen samples.

Oxalate (mg l <sup>-1</sup> )			Citrate (mg l <sup>-1</sup> )			Creatinine (mg l <sup>-1</sup> )			Uric Acid (mg l <sup>-1</sup> )		
Fresh	24h	Frozen	Fresh	24h	Frozen	Fresh	24h	Frozen	Fresh	24h	Frozen
22.5	23.2	22.7	755.5	831.1	791.6	2264.6	2249.5	2242.9	808.7	834.6	842.3
30.2	31.1	31.5	461.4	447.2	471.4	2237.3	2220.7	2309.4	928.3	989.8	997.0
22.2	22.7	22.0	433.1	445.5	428.4	1753.1	1794.6	1756.6	937.4	939.5	873.1
8.4	11.2	11.4	141.4	196.3	155.1	676.5	698.1	719.1	350.3	367.6	350.2
14.6	12.7	14.2	384.9	382.5	348.1	1511.4	1475.9	1441.0	809.3	748.9	759.5
21.7	24.4	21.4	237.4	284.8	254.5	1328.1	1309.3	1315.4	828.0	798.4	789.6
55.0	55.7	55.6	937.6	930.3	942.0	994.7	941.2	1016.4	693.1	611.7	647.6
25.5	30.6	31.4	863.7	846.3	811.6	1667.5	1519.1	1557.0	1054.9	995.7	1030.3
6.5	2.6	4.6	317.0	307.3	320.2	540.3	412.0	450.6	257.2	269.1	231.2
5.4	8.9	7.7	222.8	180.8	194.8	178.9	206.1	187.8	77.7	97.6	95.0
8.4	8.1	8.0	368.4	418.6	388.1	214.4	174.6	141.6	134.6	119.4	131.9
30.3	27.0	29.9	648.3	689.8	644.8	1365.0	1185.7	1220.8	542.7	557.6	525.5
16.9	14.8	15.6	671.0	606.1	635.9	1123.7	1092.2	1030.0	560.6	535.1	518.7

Table 3. Measurements of oxalate, citrate, uric acid and creatinine by CZE and official methods in six urine samples<sup>a</sup>.

Sample	Oxalate (mg l <sup>-1</sup> )		Citrate (mg l <sup>-1</sup> )		Uric Acid (mg l <sup>-1</sup> )		Creatinine (mg l <sup>-1</sup> )	
	CZE	Official	CZE	Official	CZE	Official	CZE	Official
1	16,0	19,7	1574	1223	607	512	1566	1599
2	11,3	16,3	1041	1143	545	497	1982	2051
3	7,6	7,1	176	215	262	218	482	469
4	20,1	19,0	882	662	528	553	1687	1655
5	15,8	12,3	313	246	693	585	1084	1109
6	21,4	17,3	517	548	482	538	1783	1834

<sup>a</sup> Paired t-test: Oxalate,  $t_{cal} = 0.042$ ,  $t_{tabl} = 2.571$ ; Citrate,  $t_{cal} = 1.089$ ,  $t_{tabl} = 2.571$ ; Uric Acid,  $t_{cal} = 1.359$ ,  $t_{tabl} = 2.571$ ; Creatinine,  $t_{cal} = 1.416$ ,  $t_{tabl} = 2.571$ .

### Figure caption

Figure 1. (a) Electropherogram of a diluted (5-fold dilution) urine sample. Separation at –30kV in 50 mmol l<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 6.5), detection at 195nm. Ox: oxalate; Cit: citrate.

(b) Electropherogram of a diluted (20-fold dilution) urine sample. Separation at +30kV in 50 mmol l<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 6.5), detection at 234nm. Cr: creatinine; UA: uric acid.

Identification of the analytes peaks was carried out by spiking urine samples with an additional amount of the analyte to be tested.

Figure 2. (a) Effect of pH on oxalate separation. (b) Effect of pH on citrate separation. (c)

Effect of pH on creatinine and uric acid separation. Same conditions as in Fig. 1.

Figure 3. Analyte recoveries. Slopes and intercepts expressed as value±confidence interval at

a 95% confidence level. (a) Oxalate recovery.  $Y = (-0.3 \pm 0.6) + (1.00 \pm 0.03) \cdot X$ ;  $R = 0.9993$ ;  $n$

= 13. (b) Citrate recovery.  $Y = (2 \pm 15) + (1.00 \pm 0.03) \cdot X$ ;  $R = 0.9992$ ;  $n = 13$ . (c) Uric acid

recovery.  $Y = (14 \pm 15) + (0.98 \pm 0.02) \cdot X$ ;  $R = 0.9994$ ;  $n = 13$ . (d) Creatinine recovery.  $Y = (-$

$1 \pm 30) + (1.00 \pm 0.02) \cdot X$ ;  $R = 0.9995$ ;  $n = 13$



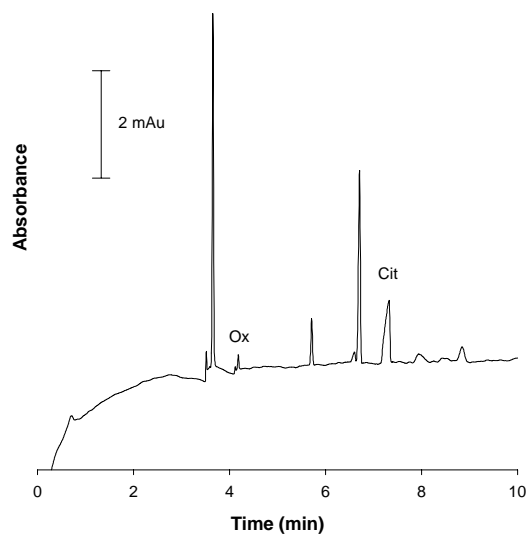


Figure 1a

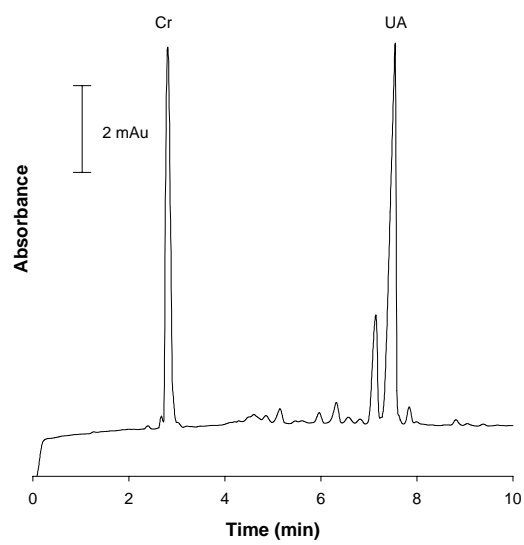


Figure 1b

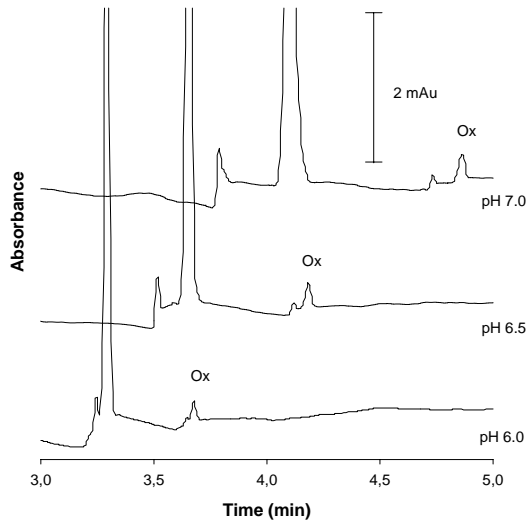


Figure 2a

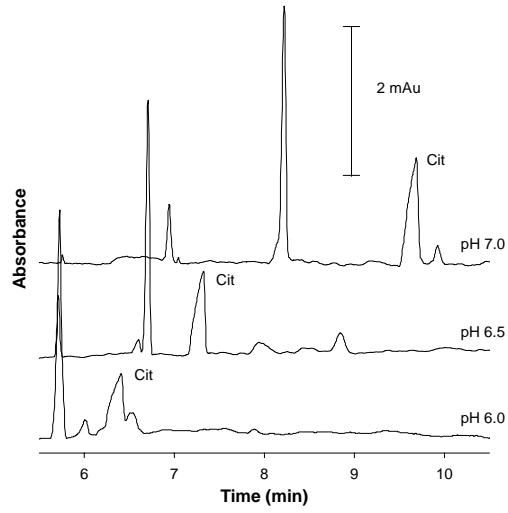


Figure 2b

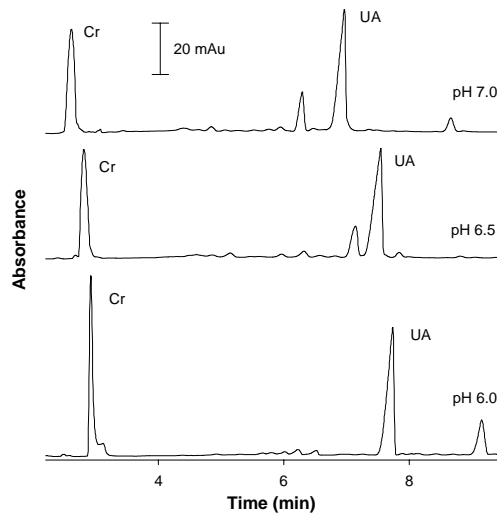


Figure 2c

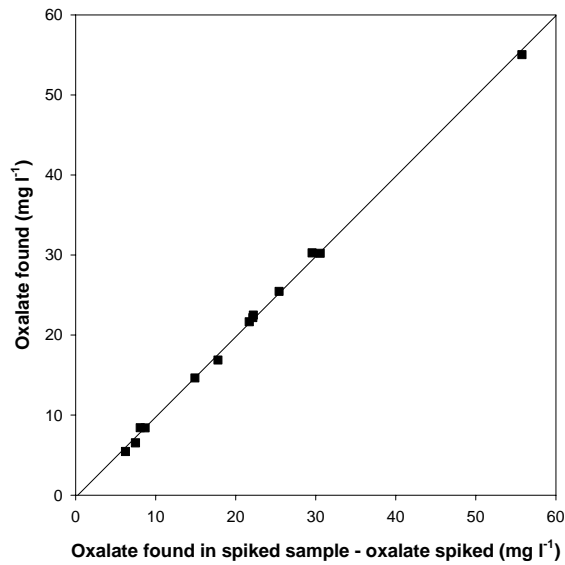


Figure 3a

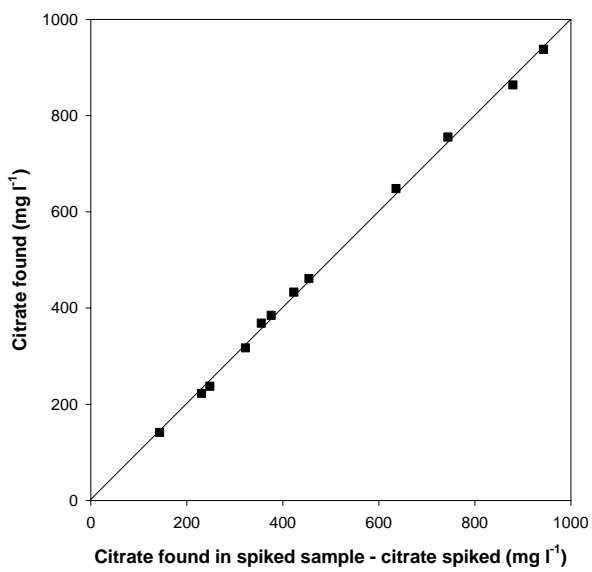


Figure 3b

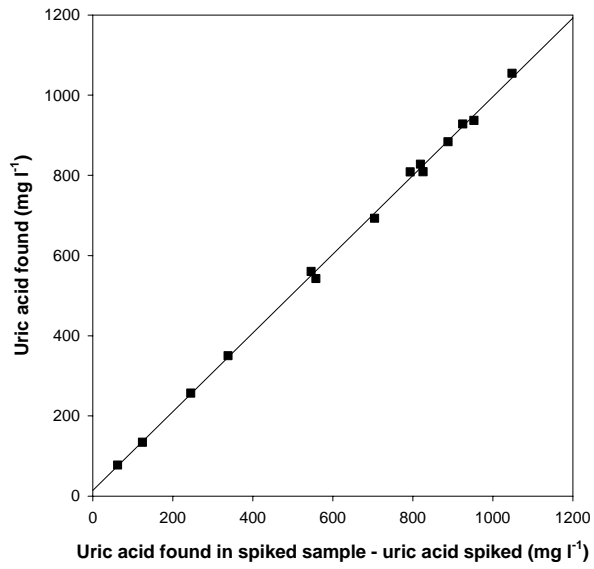


Figure 3c

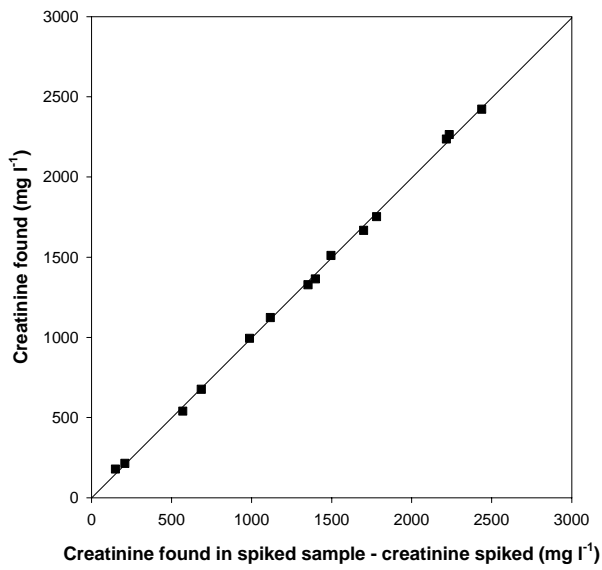


Figure 3d

**ANEXO 3**

# Determination of Phytic Acid in Urine by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

Jose A. Muñoz and Manuel Valiente\*

Grup de Tècniques de Separació en Química (GTS), UAB-Thermo Lab, Química Analítica, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

**An ICPMS method for the determination of phytic acid in human urine based on the total phosphorus measurement of purified extracts of phytic acid is described. Pretreatment of the sample is required to avoid interference in the ICPMS detection from other phosphorus compounds accompanying phytic acid in urine such as phosphate or pyrophosphate. This treatment consists of a simple filtration of the urine sample followed by complete separation of phytic acid from the mentioned phosphorus components using an anion-exchange solid-phase extraction. Separation/recovery conditions, optimized for standards of phytic acid prepared in water and artificial urine, were successfully applied to natural urine samples, resulting in adequate accuracy and precision. Linear range (0.02–0.6 mg of phytic acid L<sup>-1</sup>) and limit of detection (5 µg L<sup>-1</sup> phytic acid) are adequate for analysis of the usual amounts of phytic acid present in urine. Phosphate, pyrophosphate, and pH of urine samples at concentrations exceeding their normal physiological ranges do not affect the determination of phytic acid. Because of the simplicity, low sample requirement, and relatively high sample throughput (10 to 6 min per sample for runs between 50 and 100 samples, respectively), the present method presents the best alternative to current methods for phytic acid determination in urine. Results also show that the method is adequate for the differentiation of levels of phytic acid excretion from patients suffering from oxalocalcic urolithiasis and healthy controls, suggesting that low phytic acid concentrations in urine lead to elevated risk of oxalocalcic urolithiasis.**

Phytic acid (inositol hexakisphosphate) is a naturally occurring component in integral cereals and plant seeds.<sup>1</sup> In food chemistry and nutrition, important antinutritional consequences have been attributed to high levels of phytic acid ingestion because of its inhibitory effect on metallic element and protein intestinal adsorption due to its ability to chelate multicharged metal ions, especially Zn(II), Ca(II), and Fe(III), and reduce their solubility and bioavailability.<sup>2–4</sup> In contrast, a variety of benefits of phytic acid

on human health are now recognized, including prevention of carcinogenesis,<sup>5,6</sup> heart disease prevention,<sup>7</sup> and antioxidant properties.<sup>8</sup> Urinary phytic acid has an interesting beneficial action on some pathological processes such as calcium urolithiasis by preventing, at very low concentrations, the development of renal solid concretions. Consequently, it has been proposed as a promising drug to treat calcium oxalate and phosphate stone formers,<sup>9,10</sup> since in humans between 1 and 10% of the total ingested phytic acid is excreted by the urine.<sup>11</sup> Accordingly, increasing the urinary excretion of phytic acid is recommended to diminish the risk of calcium oxalate and calcium phosphate kidney stone recurrence.<sup>12,13</sup>

The growing interest in the biomedical implications of phytic acid and the inherent problems with its detection (poor spectral characteristics) are reflected in the diverse analytical techniques used for its determination. Direct methods to determine phytic acid involve capillary electrophoresis with mass spectrometric detection,<sup>14</sup> reversed-phase high-performance liquid chromatography with refractive index detection,<sup>15,16</sup> or ion chromatography with either spectrophotometric postcolumn derivatization<sup>17,18</sup> or conductometric detection with ion suppression.<sup>19,20</sup> Indirect methods involving hydrolysis of phytic acid to myoinositol and phosphate and determination of derivatized inositol by gas chromatography<sup>21,22</sup> or phosphate by UV–visible spectrophotom-

\* Corresponding author. E-mail: Manuel.Valiente@uab.es. Tel.: +34-93-581-29-03. Fax: +34-93-581-19-85.

(1) March, J. G.; Simonet, B. M.; Grases, F. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *409*, 9.  
(2) Maga, J. A. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 1.  
(3) Champagne, E. T.; Phillippy, B. Q. *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 587.  
(4) Nolan, K. B.; Duffin, P. A.; McWeeny, D. J. *J. Sci. Food Agric.* **1987**, *40*, 79.

(5) Kennedy, A. R. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 733.  
(6) Shamsuddin, A. M. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 725.  
(7) Thompson, L. U. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1994**, *34*, 473.  
(8) Graf, E.; Eaton, J. W. *Free Radical Biol. Med.* **1990**, *8*, 61.  
(9) Grases, F.; Garcia-Ferragut, L.; Costa-Bauzá, A.; March, J. G. *Nephron* **1996**, *73*, 561.  
(10) Modlin, M. *Lancet* **1980**, *2*, 1113.  
(11) Grases, F.; Llobera, A. *Anal. Lett.* **1996**, *29*, 1193.  
(12) Conte, A.; Pizá, P.; García-Raja, A.; Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Prieto, R. M. *Arch. Esp. Urol.* **1999**, *52*, 94.  
(13) Grases, F.; March, J. G.; Prieto, R. M.; Simonet, B. M.; Costa-Bauzá, A.; García-Raja, A.; Conte, A. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **2000**, *34*, 162.  
(14) Buscher, B. A. P.; Van der Hoeven, R. A. M.; Tjaden, U. R.; Andersson, E.; Van der Greef, J. *J. Chromatogr., A* **1995**, *712*, 235.  
(15) Burbano, C.; Muzquiz, M.; Osagie, A.; Ayet, G.; Cuadrado, C. *Food Chem.* **1995**, *52*, 321.  
(16) Graf, E.; Dintzis, F. R. *Anal. Biochem.* **1982**, *119*, 413.  
(17) Casals, I.; Villar, J. L.; Riera-Codina, M. *Anal. Biochem.* **2002**, *300*, 69.  
(18) Mayr, G. W. *Biochem. J.* **1988**, *254*, 585.  
(19) Sekiguchi, Y.; Matsunaga, A.; Yamamoto, A.; Inoue, Y. *J. Chromatogr., A* **2000**, *881*, 639.  
(20) Talamond, P.; Doubeau, S.; Rochette, I.; Guyot, J.; Treche, S. *J. Chromatogr., A* **2000**, *871*, 7.  
(21) De Koning, A. J. *Analyst* **1994**, *119*, 1319.  
(22) March, J. G.; Simonet, B. M.; Grases, F. *J. Chromatogr., B* **2001**, *757*, 247.

etry<sup>23,24</sup> have been also described. However, the sensitivity of most of the aforementioned methodologies does not permit ordinary laboratories an easy application to determine phytic acid in biological fluids (as urine) due to the low levels found in such a complex matrix. In fact, most phytic acid methods have been applied to food samples and pharmaceutical products with high content in phytic acid, since the applications in biological fluids are relatively scarce.<sup>22,24</sup>

As indicated before, an accurate analytical determination of phytic acid in urine is a recognized need. Previous methods for phytic acid determination in urine<sup>22,24</sup> are characterized by long, tedious sample treatment (purification, hydrolysis, derivatization, freeze-drying) preceding the measurement of the analytical signal. A preliminary attempt at phytic acid determination in urine based on the purification of phytic acid by anion-exchange and total phosphorus determination in the purified extract by inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES) has been also reported.<sup>11</sup> The low levels of phytic acid in urine lead to the need of excessive amounts of urine (500 mL) for the analysis. Tedious purification and preconcentration processes prior to the analysis by ICP-OES make the method impracticable in clinical laboratories. In this paper, a modification of this method is proposed by the use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) as a highly sensitive detection system. Thanks to its low detection limit, ICPMS as a detection system allows for an accurate determination of low amounts of phytic acid in urine through total phosphorus quantification after an effective anion-exchange separation process from other phosphorus compounds present in the sample matrix, with no need for a preconcentration step even when low amounts of sample (1 mL of urine) are used.

The aim of this work is to provide a simple and accurate analytical procedure to easily determine trace amounts of phytic acid in urine, in contrast with time-consuming reported procedures.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Reagents and Apparatus.** All chemical used were of analytical-reagent grade. Myoinositol hexaphosphoric acid hexasodium salt from corn was purchased from Sigma (Steinheim, Germany). Hydrochloric acid was from J. T. Baker (Deventer, Holland).  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and activated carbon were from Panreac (Barcelona, Spain). AG1-X8 200–400 mesh, chloride form, anion-exchange resin was from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA).

Total contents of phosphorus and calcium in urine were determined by ICP-OES using an ARL model 3410 with minitorch (Valencia, CA). pH was measured using a Crison pH meter micropH 2002 (Barcelona, Spain) with a combined glass electrode.

ICPMS model PQ-Excell (Thermo Elemental) was used for phytic acid determination by total phosphorus measurement. Details of the operating conditions used throughout this work are given in Table 1.

**Procedures.** To improve the mechanical characteristics of the anion-exchange separation of phytic acid from phosphate and other phosphorus compounds present in the urine matrix, urine samples are filtered through a  $0.45\text{-}\mu\text{m}$  pore filter prior to the purification process. Then, 1.0 mL of filtered urine is transferred

Table 1. Instrumental Operating Conditions for ICPMS System

	ICP System
instrument	Thermo Elemental PQ-Excell
rf power	1350 W
frequency	27.12 MHz
auxiliary gas flow rate	$0.92\text{ L min}^{-1}$
coolant gas flow rate	$13.30\text{ L min}^{-1}$
nebulizer gas flow rate	$0.89\text{ L min}^{-1}$
nebulizer	concentric pneumatic (Meinhard)
spray chamber	impact bead type quartz
sampler cone	nickel with 1.0-mm orifice
skimmer cone	nickel with 0.7-mm orifice
	Sample Introduction System
sample uptake flow rate	$2\text{ mL min}^{-1}$
delay time	100 s
wash time	40 s ( $\text{HNO}_3$ 1%)
	Data Acquisition Parameters
analyzer	quadrupole
scanning mode	peak jumping
sweeps per reading	100
number of replicates	3
dwel time	10 ms

quantitatively to a solid-phase extraction cartridge, prepared with a 1.5-mL syringe reservoir with  $20\text{-}\mu\text{m}$  frits containing 0.2 g of AG1-X8 resin, which was conditioned with  $50\text{ mmol L}^{-1}$  HCl before use. Phosphate and some other matrix components of urine are eluted with 50 mL of  $50\text{ mmol L}^{-1}$  HCl. Finally the column is washed with 2 mL of  $2\text{ mol L}^{-1}$  HCl to elute phytic acid. These purification processes are run by gravity (flow rate of  $0.33\text{ mL min}^{-1}$ ).

The 2 mL of purified extract is diluted to 10 mL in a volumetric flask to avoid problems related with total acid content in the ICPMS system. The determination of phytic acid is then carried out through  $^{31}\text{P}$  analysis of the purified extracts of phytic acid from urine by ICPMS using  $^{45}\text{Sc}$  ( $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ) as an internal standard.

For some of the analyzed samples, a hydrolyzed urine aliquot was also analyzed. Phytic acid hydrolysis was carried out by microwave treatment<sup>28</sup> by heating 5.0 mL of urine sample to  $180\text{ }^\circ\text{C}$  in a 4-min period and holding this temperature for 8 extra minutes. The hydrolysate was acidified to pH 3–5 and then treated as urine samples to evaluate and discard the possible phosphorus contamination in the purified extract of analyzed urine samples due to a deficient separation of phosphorus compounds different from phytic acid present initially in the urine matrix. The hydrolyzed content in major urine components such as Na, K, Ca, Mg, and P is not significantly different from the nonhydrolyzed urine, as confirmed by ICP-OES analysis.

Urine samples were analyzed immediately after collection in thermostatic containers. Otherwise urine samples should be acidified with HCl to pH 3–4 to avoid precipitation and subsequent adsorption of phytic acid on the precipitates formed, which could lead to deficient recoveries of phytic acid from analyzed samples.

(25) Brigando, C.; Mossoyan, J. C.; Favier, F.; Benlian, D. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, 4, 575.

(26) Dean, J. A., Ed. *Lange's Handbook of Chemistry*, McGraw-Hill Book Co.: New York, 1973.

(27) Grases, F.; Söhnel, O.; Vilacampa, A. I.; March, J. G. *Clin. Chim. Acta* **1996**, 244, 45.

(28) March, J. G.; Salvador, A.; Grases, F. *Microchem. J.* **1998**, 59, 413.

(23) March, J. G.; Villacampa, A.; Grases, F. *Anal. Chim. Acta* **1995**, 300, 269.

(24) March, J. G.; Simonet, B. M.; Grases, F.; Salvador, A. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 367, 63.

Table 2. Optimization of Phytic Acid Separation/Recovery Processes

phosphate (mg L <sup>-1</sup> )	eluent A <sup>a</sup> (mL)	eluent B <sup>b</sup> (mL)	phytic acid		
			added (mg L <sup>-1</sup> )	found (mg L <sup>-1</sup> )	recovery (%)
	50	5.0 (0.4)	4.00	0.98	24.5
	50	2.0 (1.0)	4.00	2.65	66.3
	50	1.0 (2.0)	4.00	3.20	80.0
	50	1.5 (2.0)	4.00	3.69	92.3
	10	2.0 (2.0)	4.00	3.98	99.5
	30	2.0 (2.0)	4.00	4.00	100.0
	50	2.0 (2.0)	4.00	4.01	100.3
1500	30	2.0 (2.0)		0.02	
2500	30	2.0 (2.0)		0.05	
3500	30	2.0 (2.0)		0.08	
1500	50	2.0 (2.0)		0.00	
2500	50	2.0 (2.0)		0.01	
3500	50	2.0 (2.0)		0.00	

<sup>a</sup> Eluent A was 50 mmol L<sup>-1</sup> HCl. <sup>b</sup> Values in parentheses are HCl in mmol L<sup>-1</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Study of the Separation/Recovery Processes.** The main problem of phytic acid determination in urine by ICP techniques lies in the presence of very low concentrations of phytic acid (10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) in a matrix rich in phosphate (10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>). Consequently, urinary phytic acid determination through phosphorus analysis by ICPMS requires an extensive purification of phytic acid.

According to previous papers, the best results of purification and recovery of phytic acid from anionic columns are obtained using AG1-X8 columns, which show an extremely high selectivity for phytate and the capability of concentrating phytate from very dilute extracts.<sup>2</sup> Thus, anion-exchange chromatography may be a useful technique to effectively separate phytic acid from inorganic phosphate. Separation is pH-dependent: phytic acid is strongly dissociated even at low pH values ( $pK_{a1} = -0.15$ ,  $pK_{a2} = 0.41$ ,  $pK_{a3} = 0.85$ ,  $pK_{a4} = 1.84$ )<sup>25</sup> and is strongly retained in the resin, whereas phosphate, which has a lower dissociation at low pH values ( $pK_{a1} = 2.12$ ,  $pK_{a2} = 7.20$ ,  $pK_{a3} = 12.36$ )<sup>26</sup> is relatively easily eluted from the resin by using dilute HCl.

Optimization of the phytic acid/phosphate separation and phytic acid recovery processes was carried out by using phosphate and phytic acid standards dissolved in water. Some of the results obtained after carrying out the separation/recovery process are summarized in Table 2. A 50-mL aliquot of eluent A (50 mmol L<sup>-1</sup> HCl) is required for the total elution of inorganic phosphate without significant elution of phytic acid, and 2 mL of 2.0 mol L<sup>-1</sup> HCl is required as eluent B for the subsequent elution of the retained phytic acid.

These conditions were used to evaluate the recovery of phytic acid from samples of artificial urine<sup>27</sup> containing both inorganic phosphate and phytic acid (Table 3). The results indicate a good efficiency of the prepared solid-phase extraction cartridges and eluents used in the separation/recovery processes. Thus, these conditions were selected to be used with real urine samples.

Some real urine samples were analyzed in the presence and in the absence of phytic acid spikes. The effect of activated carbon on sample pretreatment was also evaluated by passage of 5–10 mL of urine samples through chromatographic columns of 10-

Table 3. Recovery of Phytic Acid from Artificial Urine (Mean ± Standard Error of Prediction from Three Determinations)

phosphate (mg L <sup>-1</sup> )	phytic acid		
	added (mg L <sup>-1</sup> )	found (mg L <sup>-1</sup> )	recovery (%)
		0.00 ± 0.04	
	1.58	1.59 ± 0.03	100.6
1500		0.02 ± 0.04	
1500	1.58	1.59 ± 0.03	100.6
3500		0.01 ± 0.04	
3500	1.58	1.57 ± 0.03	99.4

Table 4. Analysis of Some Human Urine Samples (Mean ± Standard Error of Prediction; Three Determinations). Effect of Different Sample Pretreatment: Simple Filtration, Activated Carbon Treatment, and Hydrolysis Treatment

sample	phytic acid		
	added (mg L <sup>-1</sup> )	found (mg L <sup>-1</sup> )	recovery (%)
A		0.01 ± 0.05 <sup>a</sup>	
		0.87 ± 0.04 <sup>b</sup>	
	1.12	1.12 ± 0.04 <sup>b</sup>	22.3
	1.12	1.05 ± 0.04 <sup>c</sup>	
B		2.19 ± 0.03 <sup>c</sup>	101.8
		0.02 ± 0.05 <sup>a</sup>	
	0.97	1.48 ± 0.04 <sup>b</sup>	
	0.97	1.56 ± 0.04 <sup>b</sup>	5.4
C		1.59 ± 0.04 <sup>c</sup>	
	0.97	2.54 ± 0.03 <sup>c</sup>	97.8
	0.97	0.78 ± 0.05 <sup>b</sup>	
	0.97	1.09 ± 0.04 <sup>b</sup>	31.7
	0.86 ± 0.05 <sup>c</sup>		
	0.97	1.82 ± 0.04 <sup>c</sup>	99.2

<sup>a</sup> Sample analyzed after MW treatment to hydrolyze phytic acid.  
<sup>b</sup> Sample analyzed after preliminary cleanup with activated carbon.  
<sup>c</sup> Sample analyzed after preliminary cleanup by simple filtration.

mm i.d. containing 0.5 g of activated carbon. Pretreatment with activated carbon has been claimed to improve the mechanical characteristics of the posterior anion-exchange separation process.<sup>24</sup> Besides, for some of the analyzed samples, a hydrolyzed urine aliquot was also analyzed. Table 4 shows the results obtained for these urine samples. Our results of phytic acid recovery from real urine samples show that samples treated with activated carbon had low phytic acid recoveries (<40%), indicating phytic acid adsorption by the activated carbon, whereas samples with no treatment with activated carbon result in recoveries ranging from 98 to 102%, indicating a good accuracy in the phytic acid determination without the need of pretreatment other than filtering urine samples through 0.45-μm pore filters. Finally, hydrolyzed samples suggest no contamination of phosphate in the purified extracts of phytic acid, since the estimated concentration of phytic acid found is not significantly different from zero.

A complete separation of phytic acid from other phosphorus compounds (particularly phosphate), which is barely accomplished when 3–5 mL of sample is used,<sup>24</sup> is assured by reducing the amount of sample loaded in the chromatography column (1 mL of sample). This is possibly thanks to the high sensitivity of the ICPMS instrument used as the detection system (low LOD), even in samples with low phytic acid content.



**Analytical Features of the Method. Linearity.** The linearity of the  $^{31}\text{P}/^{45}\text{Sc}$  ratio with phytic acid concentration was examined. The regression line obtained from 12 standards (from 0.020 to 0.6  $\text{mg L}^{-1}$  phytic acid and 0.010  $\text{mg L}^{-1}$   $^{45}\text{Sc}$ ) was as follows:  $^{31}\text{P}/^{45}\text{Sc}$  signal ratio =  $(-0.0034 \pm 0.0043) + (140 \pm 1) \times 10^{-5}$  [phytic acid], ( $S_{y/x} = 0.0065$ ,  $n = 12$ ,  $R^2 = 0.9996$ , [phytic acid] represents  $\mu\text{g}$  of phytic acid  $\text{L}^{-1}$  referred to the analyzed solution, and slope and intercept are expressed as value  $\pm$  standard deviation).

The evaluated range is suitable for an accurate determination of the usual amounts of phytic acid present in urine (0.2–6.0  $\text{mg L}^{-1}$ ).<sup>22,24</sup>

**Limit of Detection (LOD).** The LOD was determined as three times the standard deviation ( $n = 3$ ) of the lowest studied concentration of the linear range. The LOD found was 5  $\mu\text{g}$  of phytic acid  $\text{L}^{-1}$  (concentration referred to the analyzed solution in the ICPMS). Similarly, the limit of quantification (LOQ) was calculated as 10 times the standard deviation ( $n = 3$ ) of the lowest studied concentration of the linear range. The LOQ found was 16  $\mu\text{g}$  of phytic acid  $\text{L}^{-1}$  (concentration also referred to the solution analyzed in the ICPMS), which means the ability of the method for measuring accurately samples containing less than 0.2  $\text{mg}$  of phytic acid  $\text{L}^{-1}$ .

**Study of Interferences.** Urine samples present a complex matrix that contains potentially interfering species. Main interferences could be the consequence of high amounts of inorganic phosphate, pyrophosphate, or both in the urine samples that could make difficult the separation process of phytic acid from other sources of phosphorus in the urine samples. The pH of the urine samples is another factor that could possibly affect the recovery of phytic acid from samples. Thus, the effect of phosphate, pyrophosphate, and pH have been studied by modifying different aliquots of a real urine sample through spiking them with different amounts of phosphate and pyrophosphate or varying the pH with NaOH or HCl addition. Then, a recovery test of phytic acid would provide information about any interference from these parameters. As seen in Table 5, a good recovery was obtained for almost all samples analyzed, except for those with the highest phosphate spike and highest pH, due to precipitation of calcium phosphates from urine and subsequent adsorption/occlusion of phytic acid in the precipitates formed. From these results it can be stated that phosphate, pyrophosphate and pH do not interfere with the phytic acid determination, even with values clearly exceeding the physiological urinary range. However, if a precipitate forms from urine, deficient recoveries of phytic acid from analyzed samples will be obtained. Thus, acidification with HCl to pH 3–4 to avoid precipitation from urine is greatly recommended, especially if the sample is not analyzed immediately after collection.

**Accuracy and Precision.** The accuracy of the method was determined by the evaluation of phytic acid recoveries from 18 first-morning urine samples analyzed by contrast with aliquots of spiked amounts of phytic acid. Recoveries ranged from 96 to 104%, independent from total phosphorus content in urine and pH of samples (not shown), in accord with the aforementioned results, which indicate adequate selectivity of the analytical method for phytic acid.

Assuming a 100% recovery for all the samples, a linear relationship,  $Y = X$ , should be obtained for phytic acid determined

Table 5. Study of Interferences. Determination of Phytic Acid in Presence of Phosphate, Pyrophosphate and pH Exceeding Their Usual Physiologic Ranges<sup>a</sup>

phosphate added ( $\text{mg L}^{-1}$ )	pyrophosphate added ( $\text{mg L}^{-1}$ )	pH	phytic acid	
			found ( $\text{mg L}^{-1}$ )	recovery (%)
		5.38	0.93	-
1500			0.94	101.2
3000			0.91	98.0
4500			0.92	99.0
6000			0.94	101.2
7500			0.88	94.7
	12.5		0.96	103.3
	25.0		0.96	103.3
	37.5		0.95	102.3
	50.0		0.91	98.0
		3.90	0.91	98.0
		4.98	0.95	102.3
		6.06	0.96	103.3
		7.00	0.83	89.3

<sup>a</sup> Original sample contained 1225  $\text{mg L}^{-1}$  total P and was pH 5.38. Normal physiologic values: phosphate ( $<1100 \text{ mg day}^{-1}$ ), pyrophosphate ( $3.5\text{--}7.0 \text{ mg day}^{-1}$ ), pH (5.5–6.5), and normal diuresis ( $800\text{--}1400 \text{ mL}$ ).

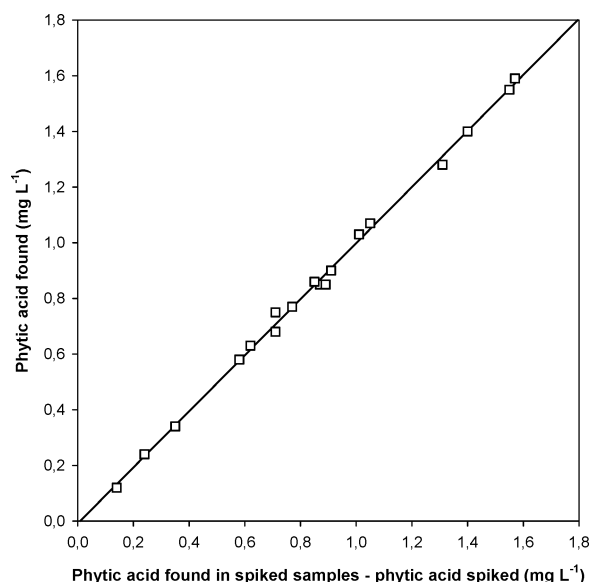


Figure 1. Recovery test of phytic acid in 18 natural urine samples showing the linear relationship  $Y = X$  between phytic acid found in samples and phytic acid found in spiked samples (subtracting the spiked amount).

in natural samples,  $Y$ , versus phytic acid found in spiked samples,  $X$  (corrected for the phytic acid added in the spike). Our data (Figure 1) fit to a linear equation by the least-squares method:  $Y = (-0.014 \pm 0.027) + (1.011 \pm 0.029)X$ , ( $S_{y/x} = 0.023$ ,  $n = 18$ ,  $R^2 = 0.997$ , slope and intercept expressed as value  $\pm$  confidence interval at a 95% confidence level), which is statically comparable at a 95% confidence level to the graph  $Y = X$ .

RSD values of 4.6, 2.8, and 2.0% were obtained from five replicates of real samples that, according to this procedure, contained 0.34, 0.90, and 1.59  $\text{mg}$  of phytic acid  $\text{L}^{-1}$ , respectively.

**Application of the Method to Urolithiasic Patients.** Applicability of the developed method was demonstrated by determining the phytic acid content of first-morning urine samples of healthy people as well as oxalocalcic lithiasic patients. Results

Table 6. Phytic Acid Concentration in First-Morning Urine of Oxalocalcic Lithiasic Patients and Healthy Controls (Values Are Represented as Mean  $\pm$  SD)

	healthy controls	oxalocalcic lithiasic patients
individuals	8	7
pH	5.67 $\pm$ 0.14	5.57 $\pm$ 0.20
Ca (mg L <sup>-1</sup> )	165 $\pm$ 50	210 $\pm$ 100
phytic acid (mg L <sup>-1</sup> )	1.19 $\pm$ 0.36	0.82 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>
phytic acid/Ca ( $\times 10^5$ )	45 $\pm$ 16	24 $\pm$ 13 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Significantly different from healthy controls by Student's *t*-test ( $p < 0.05$ ).

collected in Table 6 suggest that low urinary phytic acid concentration and low urinary phytic acid/calcium molar concentration ratios values are related to oxalocalcic urolithiasis. Thus, the proposed method can have a promising application in the prediction of risk to develop calcium urolithiasis illness.

#### CONCLUSIONS

The applicability of ICPMS facilities on the determination of phytic acid in urine has been demonstrated. The lack of selectivity of ICPMS measurement for phytic acid in urine is satisfactorily overcome by an extraordinarily selective anion-exchange purification process of phytic acid from other phosphorus components present in urine matrix. In contrast, ICPMS gives excellent sensibility and low detection limits for accurate determination of phytic acid through <sup>31</sup>P measurement, even when low amounts of sample are used. The good agreement obtained between the phytic acid content in spiked aliquots and the values found in synthetic and natural urines demonstrates the suitability of the proposed analytical procedure.

The main characteristics of the method are its simplicity, low sample requirement, relatively high sample throughput (10 to 6 min per sample for runs between 50 and 100 samples, respectively), and high selectivity and sensibility. Thus, the present method provides the best alternative to current methods suitable for phytic acid determination in biological samples (such as urine), especially when considering their scarcity and long sample pretreatments (including several steps for purification, hydrolysis, derivatization, etc.),<sup>22,24</sup> in contrast with the simplicity of the present method.

This method can contribute to elucidation of the action of phytic acid in urolithiasis and the possible relation of low phytic acid content in human samples with renal lithiasis. Accordingly, the developed method could be easily used by clinical chemists to establish normal and pathological levels of phytic acid in urine for a rational diagnostic or treatment of the urolithiasis illness.

#### ACKNOWLEDGMENT

J.A.M. acknowledges the "Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya" for the scholar-grant received. E. Colàs and J. Pacheco are gratefully acknowledged for their help with the ICPMS technique. All members of GTS are acknowledged for their collaboration in sample collection. The work has been carried out under the support of the research Grant PPQ2002-04267-C03-01.

Received for review May 30, 2003. Accepted September 5, 2003.

AC0345805

**ANEXO 4**

# A method for speciation of urinary phosphorous inhibitors of urolithiasis (pyrophosphate and phytic acid) with minimum handling by inductively coupled plasma mass spectrometry

J.A. Muñoz and M. Valiente

*Centre Grup de Tècniques de Separació en Química (GTS), Química Analítica, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain*

**Abstract.** An ICP-MS method for the determination of pyrophosphate (PPi) in human urine based on the total phosphorus measurement of purified extracts of PPi is described. Pre-treatment of the sample is required to avoid interference in the ICP-MS detection from other phosphorus compounds accompanying PPi in urine such as phosphate (Pi) or phytic acid (IP6). This treatment consists on a simple 3-fold dilution and filtration of the urine sample followed by complete separation of PPi from the mentioned phosphorus species using an off-line anion exchange solid phase extraction. Separation/recovery conditions, optimised for standards of PPi prepared in water and artificial urine, were successfully applied to natural urine samples, resulting in adequate accuracy and precision. Linear range (0.00 to 1.0 mg PPi L<sup>-1</sup>) and limit of detection (7 µg PPi L<sup>-1</sup>) are adequate for analysis of usual amounts of PPi present in urine. Pi, IP6 and pH of urine samples at concentrations exceeding their normal physiological ranges do not affect the determination of PPi. Because of the simplicity, low sample requirement and the relatively high sample throughput (10 to 6 minutes per sample for runs between 50 to 100 samples, respectively), the present method represents a clear alternative to current methods for PPi determination in urine. Versatility of the method has been also demonstrated with its easy application to include the determination of low amounts of IP6 in urine, allowing for a speciation of phosphorus inhibitors of urolithiasis in urine, thanks to the aforementioned selective purification process and the low detections limits of the ICP-MS instrumentation.

**Keywords:** speciation, determination, pyrophosphate, phytic acid, urine, ICP-MS

## *Introduction*

Pyrophosphate (PPi) and phytic acid (IP6) are naturally occurring phosphorous compounds with growing interest in the biomedical field.

Inorganic pyrophosphate (PPi) is generated in mammalian cells either as a metabolic byproduct of numerous biochemical and biosynthetic reactions<sup>1</sup> or directly by pyrophosphohydrolysis of purine and pyrimidine nucleoside triphosphates<sup>2</sup>. PPi regulates certain intracellular functions and extracellular crystal deposition in connective tissue matrices, the urinary tract and in other extracellular fluids<sup>3</sup>. Moreover, deregulated cellular PPi production, degradation and transport all have been associated with disease. On one hand, the ability of PPi to inhibit the formation of some calcium-containing crystals (including calcium oxalate and hydroxyapatite) appears physiologically significant. For example, urinary tract PPi serves as a natural inhibitor of urolithiasis<sup>4</sup>. Lower urinary PPi in lithiasic patients when compared with healthy controls has been reported<sup>5</sup>, indicating a deficient inhibitory capacity of urine against crystallization of calcium salts as a risk factor of urolithiasis. Thus, increasing urinary PPi in stone formers by therapeutic means has been recommended<sup>6</sup>. On the other hand, high concentrations of PPi can provoke pathological crystallization in cartilages, tendons and ligaments<sup>7</sup>. It seems obvious that determining

the PPi levels in biological fluids (in particular urine) could be of interest for diagnostic, treatment and monitoring of some of these diseases.

The procedures employed for PPi determination in urine include, among others, chemical and enzymatic methods. Chemical methods<sup>8,9</sup> are rather laborious, requiring a complete removal of the interfering phosphate (Pi) as a phosphomolybdate-triethylamine complex, in such a way that severe losses of PPi can occur. Selective detection of PPi is possible based on various enzymatic assays<sup>10-12</sup> that usually need special reagents which are rather expensive or commercially unavailable. Methods including either chromatographic<sup>13</sup> or electrophoretic<sup>14</sup> separation of PPi have been also reported, observing inconveniences associated with sample treatment, matrix interferences and lack of resolution.

Bearing in mind the drawbacks of existing methodologies and the increasing interest for a simple and accurate analytical determination of PPi in biological fluids, we thus focused on a development of a new method for urinary PPi based on the off-line purification of PPi (separating it from urinary Pi) by anion exchange chromatography (performed in solid-phase extraction cartridges) followed by the determination of the related phosphorus content in the purified extract using the high-sensitive ICP techniques, either ICP-OES (Inductively Coupled Plasma

Optical Emission Spectroscopy) or IPC-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry).

Thanks to the high selectivity of the anion-exchange separation process employed in this work, the developed method also includes the determination of IP6. A related method for the determination of IP6 in urine has been recently developed in our laboratory<sup>15</sup>. As PPI, IP6 is claimed to have a definite role as inhibitor of urolithiasis<sup>16-18</sup>. Thus, speciation of phosphorus inhibitors of urolithiasis (PPI and IP6 determination) in urine of stone-formers may be of value in diagnostic, treatment and monitoring of urolithiasis.

Consequently, the aim of this work was to develop, optimise, and validate a simple and accurate analytical procedure to easily determine low amounts of PPI and IP6 in human urine.

## Experimental Section

### Reagents and apparatus

Tetra-sodium pyrophosphate 10-hydrate (Panreac, Barcelona, Spain), myoinositol hexaphosphoric acid hexasodium salt from corn (Sigma, Steinheim, Germany), hydrochloric acid (J.T. Baker, Deventer, Holland) and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Panreac, Barcelona, Spain) were of analytical-reagent grade. AG 1x8 200-400 mesh, chloride form, anion exchange resin was from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

Total content of phosphorus in urine was determined by ICP-OES using an Iris Intrepid II (Thermo Electron, USA). pH was measured using a Crison pH meter microPH 2002 (Barcelona, Spain) provided with a combined glass electrode.

ICP-MS model PQ-Excell (Thermo Elemental, UK) was used for PPI and IP6 determination by measuring the related phosphorus content of the corresponding purified fraction. Details of the operating conditions used throughout this work are given in Table 1.

### Procedures

#### Determination of PPI by ICP-MS

In order to improve the mechanical characteristics of the anion-exchange separation of PPI from Pi and other phosphorus compounds present in the urine matrix, urine samples are filtered through a 0.45 μm pore filter prior to the purification process. Then, 1.0 mL of 3-fold diluted filtered urine is transferred quantitatively to a solid phase extraction cartridge, prepared with 1.5 mL-syringe reservoir with 20 μm frits containing 0.2 g of AG 1x8 resin. Pi and some other matrix components of urine are

eluted with 50 mL of HCl 10 mmol L<sup>-1</sup>. Finally the column is washed with 5 mL of HCl 100 mmol L<sup>-1</sup> to elute PPI. These purification processes are run by gravity (flow rate of 0.33 mL min<sup>-1</sup>). The determination of PPI is then carried out through <sup>31</sup>P analysis of the purified extracts by ICP-MS using <sup>45</sup>Sc (10 μg L<sup>-1</sup>) as an internal standard.

Urine samples were analysed immediately after collection in thermostatic containers. Otherwise urine samples should be acidified with HCl to pH 3-4 to avoid precipitation and subsequent adsorption of PPI on the precipitates formed, which could lead to deficient recoveries of PPI from target samples.

**Table 1.** Instrumental operating conditions for ICP-MS system

	ICP system
Instrument	Thermo Elemental PQ-Excell
Rf power	1350 W
Frequency	27.12 MHz
Auxiliary gas flow rate	0.92 L min <sup>-1</sup>
Coolant gas flow rate	13.30 L min <sup>-1</sup>
Nebulizer gas flow rate	0.89 L min <sup>-1</sup>
Nebulizer	Concentric pneumatic (Meinhard)
Spray chamber	Impact bead type quartz
Sampler cone	Nickel with 1.0 mm orifice
Skimmer cone	Nickel with 0.7 mm orifice
	Sample introduction system
Sample uptake flow rate	2 mL min <sup>-1</sup>
Delay time	100 s
Wash time	40 s (HNO <sub>3</sub> 1%)
	Data acquisition parameters
Analyser	Quadrupole
Scanning mode	Peak jumping
Sweeps per reading	100
Number of replicates	3
Dwell time	10 ms

#### Extended method for determination of IP6

One-set determination of PPI and IP6 can be performed by simple variation of the aforementioned procedure. Instead of 1.0 mL, 3.0 mL of 3-fold diluted urine are transferred quantitatively to a solid phase extraction cartridge. After Pi separation and PPI elution from the resin (in the same conditions as before), a IP6 purified extract can be recovered by elution of the remaining column content with 2 mL of 2 mol L<sup>-1</sup> HCl<sup>15</sup>. The 2 mL of the purified extract are diluted to 10 mL in a volumetric flask to avoid matrix problems related with total acid content in the ICP-MS system. The determination of IP6 is then carried out through <sup>31</sup>P analysis of the purified extracts of IP6 from urine by ICP-MS using <sup>45</sup>Sc (10 μg L<sup>-1</sup>) as an internal standard.

**Table 2.** Optimisation of Pi/PPi/ IP6 separation/recovery process

Sample	Pi (mg L <sup>-1</sup> )	IP6 (mg L <sup>-1</sup> )	eluent A (50 mL)	eluent B	PPi		
					added (mg L <sup>-1</sup> )	found (mg L <sup>-1</sup> )	recovery (%)
Standard	-	-	H <sub>2</sub> O	5.0 mL HCl 0.05M	5.00	0.62	12.4
	-	2.5	H <sub>2</sub> O	5.0 mL HCl 0.05M	-	0.00	-
	-	2.5	H <sub>2</sub> O	5.0 mL HCl 0.05M	5.00	0.63	12.6
Standard	-	-	H <sub>2</sub> O	5.0 mL HCl 0.10M	5.00	4.98	99.6
	-	2.5	H <sub>2</sub> O	5.0 mL HCl 0.10M	-	0.01	-
	-	2.5	H <sub>2</sub> O	5.0 mL HCl 0.10M	5.00	5.02	100.4
Standard	-	-	H <sub>2</sub> O	1.0 mL HCl 1.00M	5.00	5.03	100.6
	-	2.5	H <sub>2</sub> O	1.0 mL HCl 1.00M	-	1.19	-
	-	2.5	H <sub>2</sub> O	1.0 mL HCl 1.00M	5.00	6.17	123.4
Standard	-	-	HCl 10 mM	5.0 mL HCl 0.10M	6.00	6.02	100.3
	-	-	HCl 20 mM	5.0 mL HCl 0.10M	6.00	5.47	91.2
	-	-	HCl 30 mM	5.0 mL HCl 0.10M	6.00	0.04	0.7
Artificial Urine	1500	-	HCl 10 mM	5.0 mL HCl 0.10M	-	0.01	-
Urine	1500	-	HCl 10 mM	5.0 mL HCl 0.10M	6.00	1.43	23.8

**Table 3.** Effect of the ratio volume of artificial urine/mass of resin (loaded volume in solid-phase extraction cartridge) and artificial urine dilution on PPi recovery. Other conditions as stated in procedure section

Loaded Volume	Sample Dilution Factor	PPi		
		Added (mg L <sup>-1</sup> )	Found (mg L <sup>-1</sup> )	Recovery (%)
0.20	1	-	0.00	-
0.20	1	5.0	2.99	59.7
0.40	1	-	0.03	-
0.40	1	5.0	2.44	48.9
0.60	1	-	0.02	-
0.60	1	5.0	1.60	32.0
0.80	1	-	0.03	-
0.80	1	5.0	1.20	23.9
1.00	1	-	0.04	-
1.00	1	5.0	0.95	18.9
1.00	2	-	0.03	-
1.00	2	5.0	4.83	96.6
1.00	3	-	0.02	-
1.00	3	5.0	5.06	101.2
1.00	4	-	0.01	-
1.00	4	5.0	4.89	97.8
1.00	5	-	0.02	-
1.00	5	5.0	4.96	99.2

## Results and Discussion

### Study of the separation/recovery processes

The main problem of PPi determination in urine by ICP techniques lies in the presence of low concentrations of PPi ( $10^{-5}$ - $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) in a matrix rich in Pi ( $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>). Lower amounts of other phosphorus components, i.e. IP6, are also present in such a matrix. Consequently, urinary PPi determination through phosphorus analysis by ICP-MS requires a thorough purification of PPi.

Suitable purification and recovery of PPi can be achieved using appropriate anion-exchange solid-phase extraction cartridges. Separation is pH-dependant: PPi is strongly dissociated even at low pH values (pKa1 = 0.85, pKa2 = 1.49, pKa3 = 5.77, pKa4 = 8.22)<sup>19</sup> and is strongly retained in the resin,

**Table 4.** PPi recovery in the analysis of some human urine samples at different sample dilution factors. Other conditions as stated in procedure section

Sample	Loaded Volume	Sample Dilution Factor	PPi		
			Added (mg L <sup>-1</sup> )	Found (mg L <sup>-1</sup> )	Recovery (%)
Urine 1	1.00	1	-	<b>6.14</b>	-
	1.00	1	3.0	7.42	42.8
	1.00	2	-	<b>12.63</b>	-
	1.00	2	3.0	15.50	95.6
	1.00	3	-	<b>13.06</b>	-
	1.00	3	3.0	16.02	98.4
	1.00	4	-	<b>13.07</b>	-
	1.00	4	3.0	16.16	103.0
Urine 2	1.00	1	-	<b>3.40</b>	-
	1.00	1	3.0	4.26	28.7
	1.00	2	-	<b>6.10</b>	-
	1.00	2	3.0	9.00	96.9
	1.00	3	-	<b>6.39</b>	-
	1.00	3	3.0	9.46	102.4
	1.00	4	-	<b>6.42</b>	-
	1.00	4	3.0	9.37	98.5

whereas Pi, which has a lower dissociation at low pH values (pKa1 = 2.12, pKa2 = 7.20, pKa3 = 12.36)<sup>20</sup> is easier eluted from the resin by using diluted HCl. IP6 is highly selectively retained in the resin, as a consequence of its stronger dissociation at low pH values (pKa1 = -0.15, pKa2 = 0.41, pKa3 = 0.85, pKa4 = 1.84)<sup>21</sup>. Thus, suitable selection of eluting conditions may lead to highly purified extracts of PPi and IP6, respectively.

Optimisation of the Pi/PPi/IP6 separation and PPi/IP6 recovery processes were carried out by using Pi, PPi and IP6 standards dissolved in water and artificial urine. Some of the results obtained after carrying out the separation/recovery process are summarized in Table 2. 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl (5mL) allows a complete recovery of PPi from the resin, without significant elution of IP6. While more diluted HCl does not allow a complete recovery of PPi, more concentrated HCl produce a partial co-elution of IP6 together with PPi. Thus, conditions for separate recovery of PPi and IP6 are elution

with 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl (5mL) for PPi recovery and 2.0 mol L<sup>-1</sup> HCl (2.0 mL) for subsequent IP6 recovery<sup>15</sup>. Besides, in the first stage of the method (Pi elution), HCl above 10 mmol L<sup>-1</sup> elute PPi partially. Thus, 10 mmol L<sup>-1</sup> HCl (50 mL) is used for removal of Pi from urine. In artificial urine sample, this eluent produce a complete removal of Pi, but, in this matrix, PPi is not completely retained in the resin (in contrast with aqueous standards of PPi, which exhibited complete retention). Thus, it can be concluded that the anion matrix of the artificial urine is responsible for the partial elution of PPi from the resin during the loading of urine sample in the solid-phase extraction cartridge.

Two different strategies were then assayed to achieve complete retention of PPi in the resin: 1) decreasing the *volume of urine sample/mass of resin* ratio, to increase the number of functional groups on the resin available for the ion-exchange competition between PPi and interfering anions of the urine matrix; 2) diluting the urine sample before loading the solid-phase extraction cartridge, thus diminishing the adsorption competition of the interfering anions present in the urine matrix against PPi (dilution affects the electroselectivity of the ion-exchange process by favouring the retention of higher valence ions<sup>22</sup>). Results are shown in Table 3. As observed, the loading of lower volumes of urine sample in the resin increased the retention of PPi, but adsorption was never complete. In contrast, diluting the urine before loading in the solid-phase extraction cartridge yielded good recoveries of PPi when using sample dilution factors above 2. Results of PPi recovery with different sample dilution factors were confirmed by employing human urine samples (Table 4). Good accuracy on the PPi determination is obtained with no sample pre-treatment other than diluting urine samples 3-fold and filtering urine samples through 0.45µm pore filters. Besides, low amounts of sample (1 mL) are required, thanks to the high sensitivity of the ICP-MS instrument used as detection system (low LOD), even in samples with low PPi content.

#### *Analytical features of the method*

##### Linearity

The linearity of the <sup>31</sup>P/<sup>45</sup>Sc ratio with PPi concentration was examined. The regression line obtained from 6 standards (from 0.00 to 1.00 mg L<sup>-1</sup> PPi and 0.010 mg L<sup>-1</sup> of <sup>45</sup>Sc) was:

<sup>31</sup>P/<sup>45</sup>Sc signal ratio = (-0.019±0.014) + (178±2)·10<sup>-5</sup> [PPi], (S<sub>y/x</sub>=0.01315, n=6, R<sup>2</sup>=0.9996, [PPi] represents µg PPi L<sup>-1</sup> referred to the analysed solution, slope and intercept are expressed as value ± standard deviation).

The evaluated range is suitable for an accurate determination of usual amounts of PPi present in urine, 0.0 to 15.0 mg L<sup>-1</sup><sup>5,9,12</sup>.

##### Limit of detection

The limit of detection (LOD) was determined as three times the standard deviation (n=5) of the blank reagent for PPi recovery. The LOD found was 7 µg PPi L<sup>-1</sup> (concentration referred to the analysed solution in the ICP-MS). Similarly, the limit of quantification (LOQ) was calculated as ten times the standard deviation (n=5) of the blank reagent for PPi recovery. The LOQ found was 23 µg PPi L<sup>-1</sup> (concentration also referred to the solution analysed in the ICP-MS), what means the ability of the method for measuring accurately samples containing less than 0.34 mg PPi L<sup>-1</sup>.

##### Study of Interferences

Urine samples present a complex matrix that contains potentially interfering species. Main interferences could be consequence of relatively high amounts of Pi and strong interference of IP6 in the urine samples that could difficult the purification process of PPi from other sources of phosphorus in the urine samples. pH of urine samples is another factor that could possibly affect the recovery of PPi from samples. Thus, the effect of Pi, IP6 and pH have been studied by modifying different aliquots of human urine sample by spiking them with different amounts of Pi and IP6 or varying the pH by addition of NaOH or HCl. Then, a recovery test of PPi would reveal any interference from these parameters. As seen in Table 5, a good recovery was obtained all target samples, except for that with the highest Pi spike, due to the deficient separation of Pi from PPi and subsequent co-elution of Pi with PPi. From these results it can be stated that Pi, IP6 and pH do not interfere the PPi determination, even with values clearly exceeding the physiological urinary range. However, if a precipitate forms from urine, deficient recoveries of PPi from analysed samples will be obtained. Thus, acidification with HCl to pH 3-4 to avoid precipitation from urine is greatly recommended, especially if sample is not analysed immediately after collection.

##### Accuracy and precision

The accuracy of the method was determined by the evaluation of PPi recoveries from 12 urine samples of first-morning collection, analysed by contrast against aliquots of spiked amounts of PPi. Recoveries ranged from 96 to 104% being independent from total phosphorus content in urine, according with the aforementioned results which

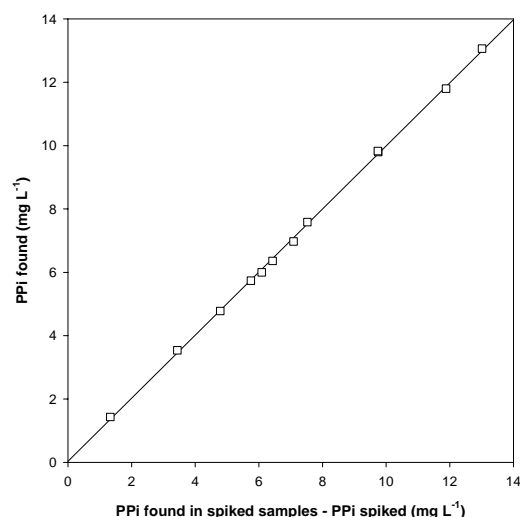
indicate adequate selectivity of the analytical method for PPi.

Assuming a 100% recovery for all the samples, a linear relationship,  $Y=X$ , should be obtained for PPi determined in natural samples, Y, versus PPi found in spiked samples, X, (corrected for the PPi added in the spike). Our data (Figure 1) fit to a linear equation by the least-square method:  $Y=(0.04\pm 0.06)+(0.996\pm 0.008)X$ , ( $S_{y/x}=0.0820$ ,  $n=12$ ,  $R^2=0.9995$ , slope and intercept expressed as value $\pm$ confidence interval at a 95% confidence level), which is statically comparable at a 95% confidence level to the graph  $Y=X$ .

RSD values of 3.1, 2.5 and 1.4% were obtained from four replicates of real samples that, according to this procedure, contained 1.44, 3.54 and 6.00 mg PPi L<sup>-1</sup>, respectively.

**Table 5.** Study of interferences. Determination of PPi in presence of Pi, IP6 and pH exceeding their usual physiologic ranges. Original sample contained 825 mg L<sup>-1</sup> of total P and pH 5.38. Normal physiologic values: Pi (<1100mg·day<sup>-1</sup>), IP6 (0.5-3.0 mg·L<sup>-1</sup>), pH (5.5-6.5), normal diuresis (800-1400 mL)

Pi added (mg L <sup>-1</sup> )	IP6 (mg L <sup>-1</sup> )	pH	PPi	
			Found (mg L <sup>-1</sup> )	Recovery (%)
-	-	6.05	7.03	-
1500	-	-	7.10	101.1
3000	-	-	7.12	101.3
4500	-	-	8.56	121.8
-	3.0	-	7.00	99.7
-	6.0	-	6.96	99.1
-	9.0	-	7.08	100.8
-	-	4.04	6.88	97.9
-	-	5.01	7.22	102.7
-	-	7.02	6.94	98.7



**Figure 1.** Recovery test of PPi in 12 natural urine samples showing the linear relationship  $Y=X$  between PPi found in samples and PPi found in spiked samples (subtracting the spiked amount).

### *Speciation of phosphorus inhibitors of urolithiasis: Application of the method to include the determination of IP6*

Obviously, a method is more attractive if it can be easily adapted for the determination of other analytes of interest in a given matrix. The present method is easily adapted to the determination of IP6 in urine, allowing for the speciation of phosphorus inhibitors of urolithiasis in urine, by simply loading 3.0 mL of 3-fold diluted urine in the solid-phase extraction cartridge. Separated purified extracts of PPi and IP6 can be recovered washing the column with 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl (5mL) and 2.0 mol L<sup>-1</sup> HCl (2mL), successively, after the complete removal of Pi with 10 mmol L<sup>-1</sup> HCl (50mL). Results in Table 6 demonstrated the applicability of the extended method for the one-set determination of PPi and IP6 in urine.

### Conclusions

The applicability of ICP-MS facilities on the differentiated determination of PPi and IP6 in human urine has been demonstrated. The lack of selectivity of ICP-MS measurement to discriminate PPi and IP6 in urine is satisfactorily overcome by a very selective and simple anion-exchange purification process of both PPi and IP6 from other phosphorus components present in urine matrix, mainly Pi. ICP-MS gives excellent sensibility and low detection limits for accurate determination of PPi and IP6 through <sup>31</sup>P measurement, with no need of pre-concentration step even when using relatively low amounts of sample (1 mL). The good agreement obtained between the PPi and IP6 content in spiked aliquots and the values found in synthetic and natural urines, demonstrate the suitability of the proposed analytical procedure.

Main characteristics of the method are its simplicity, low sample requirement, relatively high sample throughput (10 to 6 minutes per sample for runs between 50 to 100 samples, respectively), and high selectivity and sensibility. Thus, the present method provides an alternative to current methods suitable for PPi and IP6 determination in biological samples (such as urine), especially when considering the aforementioned drawbacks of the methods for PPi and IP6 determination and the gaining implementation of ICP-MS instrumentation in clinical chemistry.

In spite of the likely utility of PPi and IP6 levels in biological fluids for clinical chemistry, their determination is not common in clinical laboratories. This method contributes to facilitate the determination of PPi and IP6 in clinical analysis and thus to elucidate the action of PPi and IP6 in urolithiasis and the possible relation of low



**Table 6.** PPI and IP6 recovery in the analysis of some human urine samples with the extended method. Conditions as stated in procedure section

Sample	PPI			IP6		
	Added (mg L <sup>-1</sup> )	Found (mg L <sup>-1</sup> )	Recovery (%)	Added (mg L <sup>-1</sup> )	Found (mg L <sup>-1</sup> )	Recovery (%)
Urine 1	-	5,35	97,7	-	1,19	103,2
	2,8	8,09		0,85	2,07	
Urine 2	-	9,21	98,5	-	1,16	97,9
	2,8	11,97		0,85	1,99	
Urine 3	-	1,45	100,9	-	0,22	102,4
	2,8	4,27		0,85	1,10	
Urine 4	-	3,25	102,7	-	0,40	99,5
	2,8	6,12		0,85	1,24	
Urine 5	-	4,71	98,9	-	0,48	97,5
	2,8	7,48		0,85	1,31	

inhibitors content in urine samples of renal urolithiasic patients. Accordingly, the developed method could be easily used by clinical chemists to establish normal and pathological levels of PPI and IP6 in urine for a rational diagnostic and treatment of the urolithiasic disease.

#### Acknowledgements

J.A. Muñoz acknowledges the “Departament d’Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya” for the scholar-grant received. All members of GTS are acknowledged for their collaboration in sample collection. The work has been carried out under the support of the research Grant PPQ2002-04267-C03-01.

#### References

- (1) Rachow, J.; Ryan, L. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 1988, 14, 289
- (2) Johnson, K.; Vaingankar, S.; Chen, Y.; Moffa, A.; Goldring, M.B.; Sano, K.; Jin-Hua, P.; Sali, A.; Goding J.; Terkeltaub, R. *Arthritis Rheum.* 1999, 42, 1986
- (3) Terkeltaub, R.A. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2001, 281, C1
- (4) Fleisch, H. *Kidney Int.* 1978, 13, 361
- (5) Sharma, S.; Vaidyanathan, S.; Thind, S.K.; Nath, R. *Urol. Int.* 1992, 48, 404
- (6) Breslau, N.A.; Padalino, P.; Kok, D.J.; Kim, Y.G.; Pak, C.Y.C. *J. Bone Miner. Res.* 1995, 10, 394
- (7) Ryan, L.M., McCarty, D.J. In: *Arthritis and Allied Conditions: A textbook of Rheumatology*. Koopman W. (ed.), 1997, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 2103-2126
- (8) Heinonen, J.K.; Honkasalo, S.H.; Kukko, E.I. *Anal. Chem.* 1981, 117, 293
- (9) Chang, G.; Denq, R. *Int. J. Biochem.* 1985, 17, 733
- (10) O’Brien, W.E. *Anal. Biochem.* 1976, 76, 423
- (11) Cartier, P.H.; Thuillier, L. *Anal. Biochem.* 1974, 61, 416

- (12) Baykov, A.A.; Avaeva, S.M. *Anal. Biochem.* 1982, 119, 211
- (13) Yoza, N.; Akazaki, I.; Nakazato, T.; Veda, N.; Kodama, H.; Tateda, A. *Anal. Biochem.* 1991, 199, 279
- (14) Henin, O., Barbier, B.; Brack, A. *Anal. Biochem.* 1999, 270, 181
- (15) Muñoz, J.A.; Valiente, M. *Anal. Chem.* 2003, 75, 6374
- (16) Curhan, G.C.; Willett, W.C.; Knight, E.L.; Stampfer, M.J. *Arch Intern Med.* 2004, 164, 885
- (17) Grases, F.; Garcia-Ferragut, L.; Costa-Bauzá, A.; March, J.G. *Nephron* 1996, 73, 561
- (18) Modlin, M. *Lancet* 1980, 2, 1113
- (19) CRC Handbook of Chemistry and Physics, 63rd ed., Weast, R.C., ed., CRC Press, Inc., Boca Raton, 1982
- (20) Dean, J.A. (ed.), *Lange’s Handbook of Chemistry*, McGraw-Hill Book Company, New York, 1973
- (21) Brigando, C.; Mossoyan, J.C.; Favier, F.; Benlian, D. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1995, 4, 575
- (22) Dorfner K. Introduction to ion exchange and ion exchangers; in Dorfner K. (ed.): *Ion Exchangers*. Walter der Gruyter Publisher: Berlín, 1991, pp 7-187.

*Address for correspondence:* Prof. Dr. M. Valiente, Centre Grup de Tècniques de Separació en Química (GTS), Química Analítica, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Spain  
Phone: +34-93-581-29-03; Fax: +34-93-581-19-85  
E-mail: [Manuel.Valiente@uab.es](mailto:Manuel.Valiente@uab.es)

**ANEXO 5**

**CIRCADIAN VARIATIONS IN URINE COMPOSITION. EVALUATION OF NOCTURNAL URINE AS MOST APPROPRIATE URINARY SPECIMEN FOR CHARACTERIZATION OF UROLITHIASIS.**

J.A. Muñoz and M. Valiente\*

Centre Grup de Tècniques de Separació en Química (GTS), Química Analítica, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

\* Author for correspondence [Manuel.Valiente@uab.es](mailto:Manuel.Valiente@uab.es); Tel.: +34-93-581-29-03; Fax: +34-93-581-19-85

## **Abstract**

*Objective:* To demonstrate the variation of urine composition and crystallization properties during the 24 hours period and to evaluate the suitability of the nocturnal urines for the characterization of urolithiasis as an alternative specific urine specimen to replace 24-hour urinalyses in the evaluation and management of urolithiasis.

*Materials and methods:* The 24-hour variations of 14 urinary parameters (diuresis, pH, calcium, magnesium, phosphorus, sodium, potassium, oxalate, citrate, uric acid, creatinine, glycosaminoglycans, phytic acid, test of urinary lithogenic risk) were studied in five healthy individuals, collecting urine in one single portion during the night (from 12 p.m. to 9 a.m) and then in three-hourly fractions scheduled from 9 a.m. to 12 p.m

*Results:* Circadian variations in urinary parameters related to urolithiasis indicate a significant increased risk of lithogenesis at nocturnal rest period, thus showing the lack of representativity of 24-hour urinalysis to reflect properly the crystallization properties of a particular urine. Application of multivariate statistical analysis (PCA and HCA) to fractionated 24-h urines reveals night urines can be differentiated from the diurnal ones in function of their higher lithogenicity, also indicating some urinary homogeneity, not present in the other studied periods, to properly assess the risk of lithogenesis.

*Conclusions:* We propose nocturnal urines as most appropriate urinary specimen in assessing the risk of lithogenesis and the evaluation of urolithiasis, because of its inherent associated higher lithogenic risk and its urinary homogeneity, likely due to a lower affection by the habits of the individuals than the diurnal urines.

**Keywords** Urolithiasis, lithogenic risk, circadian variations, urine composition, calcium oxalate, multivariate analysis

## **Introduction**

Urolithiasis is a common disease, affecting 12% of the European Union population along their life [1], characterized by high prevalence and incidence, high morbidity and high rates of recurrence (44-75%) [2]. The alteration of the equilibrium involving supersaturation level of insoluble salts in urine, the presence of promoters or inhibitors of crystallization and morphoanatomic factors is accepted to be critical for a lithogenic process [3]. A careful analysis of urine composition regarding crystallization, normally done on 24-hours urines, is an essential part of the management of patients with urolithiasis [4,5]. However, the collection of 24-hour urine is associated with several problems, regarding the completeness of urine collection, since usually patients do not observe a correct extent of the 24-h period, and representativity of urine flow, since patients who are collecting urine tend to drink more than they usually do [6], leading to a lack of representativity of the concentration values obtained from 24-h urine samples [7,8]. Furthermore, the required conditions for crystal formation in the urinary tract are far from being homogeneous over the day, occurring just temporarily [8,9,10], arising doubts about 24-hour urinalysis to reflect properly the crystallization properties in a given individual.

Recently, some authors have suggested that for routine metabolic evaluation, spot urine samples are as valuable as the 24-h urine specimen because of significant correlation between spot urines and 24-hour samples with respect to urinary parameters involved in the lithogenic process (calcium, oxalate, citrate, magnesium, phosphate, uric acid...) [11,12]. However, other authors indicate that comprehensive metabolic evaluation based on 24-hour urine samples, in spite of being time-consuming and more expensive, should still be considered the gold standard for the medical evaluation and treatment of recurrent calcium stone formers because it yields significantly more useful diagnostic information and allows implementation of more specific therapeutic plans for the recurrent calcium stone formers [13,14].

Within this context, a first objective of this study is to demonstrate the inability of 24-hour urinalyses to reflect properly the crystallization properties of urine. Thus, circadian risk of calcium oxalate crystallization through the consideration of several urinary parameters (regarding supersaturation levels and crystallization inhibitors) was studied by performing 24-hour fractionated urinalyses. Another objective in this work is to propose an alternative specific urine specimen to replace 24-hour urinalyses in the evaluation and management of urolithiasis. In this sense, we studied whether the urines corresponding to the daily period with the highest risk of lithogenesis could be classified separately from the other urines corresponding to daily periods with less risk, by means of multivariate techniques of analysis

(principal component analysis and hierarchical cluster analysis), indicating thus enough urinary homogeneity in assessing the risk of lithogenesis.

## **Materials and methods**

*Circadian study of lithogenic risk.* The circadian variations of 14 urinary variables including diuresis, pH, calcium, magnesium, phosphorus, sodium, potassium, oxalate, citrate, uric acid, creatinine, chloride, sulphate, glycosaminoglycans, phytic acid, and test of urinary lithogenic risk –test ULR- have been studied in 5 healthy individuals. Urine was collected in one single portion during the night (from 12 p.m. to 9 a.m) and then in three-hourly fractions scheduled from 9 a.m. to 12 p.m., that correspond to 6 urine samples during the 24 hours period. All individuals were free of dietary or physical activity restrictions, but were synchronized for diurnal activity from 08h to 24h  $\pm$ 1h and nocturnal rest; meals were given at fixed clock hours (9h, 14h and 21h;  $\pm$ 1h). None of the participants was on medication that could alter the chemistry of the urine or influence circadian biology, and neither urinary obstruction nor infection was present at the time of investigation.

*Analysis of urine samples.* After collection of urine samples, the volume of each urine aliquot was recorded and pH was monitored potentiometrically using a glass combined electrode. The content of calcium, magnesium, phosphorus, sodium and potassium was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy [15]. Oxalate, citrate, uric acid and creatinine were measured by capillary zone electrophoresis [16]. Glycosaminoglycans [17] and test ULR analysis [18] were performed by colorimetry according to methods previously described. Phytic acid was analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry, following the method described elsewhere [19].

*Statistical analysis.* The mean and standard deviation for corresponding determinations of mentioned variables at each sampling period were calculated, as well as for accumulated diurnal and 24-hour periods (except for pH and test URL).

Student's t test (5% of significance) was used for a comparative evaluation of the different urine fractions by using all urinary parameters determined on the related temporal urine collections. Comparisons were made between each period and nocturnal period, and between nocturnal period and computed diurnal and 24-hour periods.

*Multivariate classification of urine samples.* Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA), used for visualization of inherent clustering of the 30 urines analysed through this work in function of their lithogenicity and their sampling period, were performed with the computer program SPSS 11.5 for Windows.

In clinical chemistry there is an increasing activity to determine numerous analytes in samples of blood or urine, thus obtaining multivariate data. A first comparison between samples use to be made on values of individual parameters. However, a step forward can be achieved by a simultaneous consideration of all collected analytical parameters using multivariate methods of analysis. A common problem in the multivariate analysis is that the volume of data can difficult the pattern recognition. In this concern, PCA allow for the reduction of dimensionality of data when they present significant correlation between variables, providing the visualization in two or three dimensions, with a good preservation of the related information.

PCA [20] involves a mathematical procedure that transforms a number of (possibly) correlated variables into a (smaller) number of uncorrelated variables named principal components (PCs). The aim of PCA is thus the reduction of dimensionality of matrix data without loss of information, by finding linear combinations of the original variables that account for as much of the original total variance as possible. The first PC accounts for as much of the variability in the data as possible, and each succeeding PC accounts for as much of the remaining variability as possible. In some problems it is considered that most of the random variation in the data is represented in the smaller PCs and the systematic variation, represented by the larger PCs, is used in further analysis. The projections of the points from the original data on PCs coordinates are named the scores of the objects on PC; that is, the position of the objects in the new reduced dimensional space. The loadings determine the weight of the original variables on the PCs.

HCA [21] is the term applied to a number of techniques of unsupervised pattern recognition that seek to differentiate a set of objects into several groups or clusters so that objects within the same group are more similar to each other than objects in different groups. These methods may be used to identify either the existence of group structure in a set of data, to test a hypothesis of grouping, to identify group members or to dissect data with no natural grouping into more convenient and homogeneous groups. There are several variations of hierarchical clustering techniques regarding the method for the quantification of similarity or dissimilarity between objects. In this study, we have used the Ward's method that uses the squares of the Euclidean distance.

## Results

The measured urinary parameters are shown in Table 1 (volume, pH, test URL and concentration of various urinary components).

The comparison reveals a significant decrease of the hourly urinary output at night ( $p < 0.05$ ) against the majority of the other sampling periods, including the computed urinary output during the day period (9-24h). pH varied from low values in the early morning, followed by an increase during the daytime and a final decrease in the night.

The results of the test ULR represent the amount of calcium precipitated in the corresponding assay [18], colorimetrically measured, in such a way that values of absorbance below 170 mAU indicate absence of crystallization, whereas values above 170 mAU indicate precipitation of calcium salts, typically being the absorbance values for oxalocalcic lithiasic patients above 300 mAU [18]. Thus, over the entire 24-hour period, the test ULR shows a significant higher risk for calcium salts precipitation during the night against the corresponding values for the daytime ( $p < 0.05$ ).

Urinary calcium and oxalate concentrations were considerably superior at night versus the majority of the diurnal samples (Table 1), including the computed urinary concentration during the day period (9-24h) and the obtained for the 24-hour period. In the case of phosphorus, its concentration is found higher during the night than in the morning urine, but not with respect to the whole day value, what is a consequence of the high standard deviation found in the studied population. On the contrary, citrate concentration and hourly excretion were significantly lower at night against the afternoon period (15-21h). Magnesium and phytic acid concentrations were significantly higher at night versus some of the diurnal sampling phases, including the urinary concentrations during the day period (9-24h).

No significant circadian variations have been observed for uric acid, glycosaminoglycans, creatinine, sodium and potassium urinary concentrations.

The aforementioned results are a first evidence that those urinary parameters related with an increased risk of urolithiasis at night might allow for a classification of urines regarding the sampling period of these urines (night vs. day urines). Since no single urinary parameter is able to cluster urines with respect to their sampling period, clustering of the 30 urines collected on different daily periods and analysed through this work by simultaneously considering those parameters more directly related to risk of calcium oxalate crystallization (volume/h, test ULR, oxalate, calcium, magnesium, oxalate, citrate and phytic acid) was evaluated by PCA and HCA multivariate methods of analysis. Application of PCA to the 7 aforementioned urinary variables, after re-scaling to unitary variance all variables to give



them the same weight on calculations, result in two PCs (eigenvalues above 1) which explain about 71% of the total variance. The scores plot of the 30 urine specimens (Figure 1) was examined for inherent clustering behaviour of urine samples in function of their lithogenicity revealing two major groups, one including the night urines and another one more scattered including the day urines (periods 1-5). Visual analysis of scores and loadings indicate an evident relationship of night urines with high values for the parameters test ULR, oxalate, phytic acid, calcium and magnesium and low values for volume/h, as expected given its major lithogenicity.

HCA was used to verify clustering of collected urines regarding the sampling interval of urine collection, as suggested by PCA analysis. A dendrogram to visualize the different groups according to their similarities (Figure 2) shows two main clusters: one formed by nocturnal urines and the other by diurnal urines. Some subgroups regarding urines corresponding to a specific individual can also be observed in the group of diurnal urines.

## **Discussion**

The formulation of rational principles for prophylactic treatment of stone disease requires information on the intervals with most pronounced risk for crystallization. Investigative procedures of fractionated 24-hour urines are likely to reveal periods of different risk of crystallization, characterized by fluctuations which can not be detected by using the conventional 24-hour urinalysis procedures.

In this study, fractionated determinations during the 24-h period have revealed important fluctuations in some urinary parameters, particularly observed in regard to potential inhibitors of lithogenesis (citrate, magnesium and phytic acid) and species involved in the lithogenic process (calcium and oxalate). It is noteworthy to observe how the test ULR shows a significant higher tendency towards precipitation of calcium oxalate at night against any diurnal sample, even though lower amounts of precipitated calcium oxalate than lithiasic patients were found. The test ULR evaluates the overall risk of calcium salts formation by taking in consideration the supersaturation of lithogenic substances, the presence of promoters and absence of inhibitors. Thus, the increased risk observed at night can be related to a higher supersaturation of calcium oxalate due to maximum concentrations of calcium and oxalate in the circadian course, which corresponds to the absence of concentration increase of inhibitors such as glycosaminoglycans and citrate. However, the naturally occurring higher inhibitory activity given by magnesium and phytic acid in this period might be of value in partly counteracting its higher crystallization tendency, explaining the aforementioned observation

that the amount of calcium precipitated in the ULR test is smaller than in stone-forming patients.

It is also important to note how 24-hour urines do not reflect properly the crystallization properties of urine, since the daily fluctuations in supersaturation, promoters or inhibitors are not detected through a 24-hour urinalysis. Thus, the main risk factors of urolithiasis in the nocturnal urine are masked by the diurnal one (with lower lithogenicity) when a total 24-hour urine is collected for analysis, giving as a result a lower apparent lithogenicity in the total 24-hour urine, which make more difficult the detection of possible urinary alterations in patients than if measured in the period with the highest risk of precipitation. This fact indicate the uselessness of the 24-hour urine collection and analysis for evaluation and management of urolithiasis illness.

It seems evident from the results, that nocturnal urine could be proposed as a good alternative to 24-hour urines in the evaluation and management of urolithiasis as a result of its inherent higher lithogenic risk, if certain homogeneity of these urines in function of their lithogenicity can be demonstrated. Results from PCA and HCA analyses indicate that diurnal urines collected from periods 1 to 5 are distributed more scattered than nocturnal ones, which form a group perfectly separated from the diurnal, when lithogenicity is the main factor considered for classification. The fact that diurnal urines could not be separated in function of their sampling period, as a result of their great dispersion, seems to be a good indicator of their major susceptibility to be affected by the habits of the individual (fluid intake, diet, exercise,...). Thus, we propose nocturnal urines as a possible urinary specimen of reference in assessing the risk of lithogenesis and the evaluation of urolithiasis, given its inherent associated higher lithogenic risk and its urinary homogeneity, likely due to lower affection by the habits of the individual than the diurnal urines.

## **Conclusions**

Nowadays, prevention of stone recurrence remains an important aspect of urological practice. There is a high pressure on urologists to provide the most cost-effective medical evaluation and treatment for urolithiasis. For this reason, it seems reasonable to examine critically diagnostic efficacy of 24-hour urinalysis evaluations. Several limitations of the metabolic evaluation through 24-hour urines have been highlighted in the introduction section. The lack of representativity of 24-hour urines on the evaluation of the urolithiasis risk has also been demonstrated along this work, as a consequence of important circadian variations in some

urinary parameters involved in the lithogenic process and potential inhibitors of lithogenesis, leading to daily changes in the lithogenic risk of calcium oxalate.

The results in this study suggest 9-hour night urines can be a suitable alternative to 24-hour urine in the evaluation and management of urolithiasic illnesses, with the consequent advantages on control and representativity of the sample collected by patients. Firstly, whereas it is doubtless difficult to control a 24-hour urine collection, it will be easier with shorter collection periods. Secondly, night urine can be most representative for determination of urolithiasic risk because of both being less affected by patients' habits and increased fluid intake after medical advise. Finally, it is important to notice how certain urinary homogeneity regarding lithogenicity, indicating a more concentrated and lithogenic urine, have been observed in nocturnal urines, in contrast to diurnal urines.

Of course, further study is required to evaluate the capacity of nocturnal urines to diagnose the urinary disorders in patients with urolithiasis.

### **Acknowledgements**

J.A. Muñoz acknowledges the "Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya" for the scholar-grant received. The work has been carried out under the support of the research Grant PPQ2002-04267-C03-01.

## References

- [1] Schneider HJ In Urolithiasis: Etiology, Diagnosis. (Handbook of Urology, Vol. 17/1). New York, Springer-Verlag 1985, pp 137-145.
- [2] Ljunghall S, Danielson BG. A prospective study of renal stone recurrences. *Brit J Urol* 1984;56:122-124
- [3] Grases F, Costa-Bauzá A, García-Ferragut L. Biopathological crystallization: a general view about the mechanisms of renal stone formation. *Adv Coll Interf Sci* 1998; 74:169-194
- [4] H.G. Tiselius, D. Ackermann, P. Alken, C. Buck, P. Conort, M. Galluci. Guidelines on urolithiasis. *Eur. Urol.* 2001, 40, 362-371
- [5] L.H. Smith. The medical aspects of urolithiasis: an overview. *J. Urol.* 1989, 141, 707-710
- [6] H.G. Tiselius. Standardized estimate of the ion activity product of calcium oxalate in urine from renal stone formers. *Eur. Urol.* 1989, 16, 48-50
- [7] H.G. Tiselius. An improved method for the routine biochemical evaluation of patients with recurrent calcium oxalate stone disease. *Clin. Chim. Acta*, 1982, 122, 409-418
- [8] Robert M, Roux JO, Bourelly F, Boularn AM, Guiter J, Monnier L. Circadian variations in the risk of urinary calcium oxalate stone formation. *Brit J Urol* 1994; 74:294-297
- [9] Ahlstrand C, Larsson L, Tiselius H. Variations in urine composition during the day in patients with calcium oxalate stone disease. *J Urol* 1984;131:77-81
- [10] Vahlensieck EW, Bach D, Hesse A. Circadian rhythm of lithogenic substances in the urine. *Urol Res* 1982;10:195-203
- [11] Y. Ogawa, H. Yonou, S. Hokama, M. Oda, M. Morozumi, K. Sugaya. Urinary saturation and risk factors for calcium oxalate stone disease based on spot and 24-hour urine specimens. *Frontiers in Bioscience* 8, 2003, A167-A176
- [12] W.L. Strohmaier, K. Hoelz, K. Bichler. Spot urine samples for the metabolic evaluation of urolithiasis patients. *Eur. Urol.* 32,1997, 294-300
- [13] E. Brandle, H. Melzer, B. Gomez-Anson, P. Flohr, K. Kleinschmidt, H.G. Sieberth, R.E. Hautmann. Can examination of spontaneous urine samples adequately replace 24-hour-urine samples for determining excretory rate of various lithogenic and inhibitory substances in metabolic evaluation of kidney calculi patients? *Urologe.* Ausgabe 35, 1996, 136-41
- [14] T. Yagisawa, P.S. Chandhoke, J. Fan. Comparison of comprehensive and limited metabolic evaluations in the treatment of patients with recurrent calcium urolithiasis. *J. Urol.* 1999, 161 (5), 1449-1452

- [15] Krejcova A, Cernohorsky T, Curdova E. Determination of sodium, potassium, magnesium and calcium in urine by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. The study of matrix effects. *J Anal At Spectr* 2001;16:1002-1005
- [16] Muñoz JA, Valiente M. One set determination of urine metabolites (oxalate, citrate, uric acid and creatinine) by capillary zone electrophoresis. To be submitted.
- [17] Jong JGN, Wevers RA, Laarakers C, Poorthuis JHM. Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. *Clin Chem* 1989;35:1472-1477
- [18] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A, Conte A, García-Raja A. Simple test to evaluate the risk of urinary calcium stone formation. *Clin Chim Acta* 1997;263:43-55
- [19] Muñoz JA, Valiente M. Determination of phytic acid in urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem* 2003;75:6374-6378
- [20] S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi. Principal Component Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2 (1987) 37-52
- [21] N. Bratchell. Cluster Analysis. *Chemometrics and Intelligent laboratory systems*, 6 (1989) 105-125
- [22] C. Berg, L. Larsson, H.G Tiselius. The composition of four-hour urine samples from patients with calcium oxalate stone disease. *Br. J. Urol.* 1987, 60, 301-6

Table 1. Circadian fluctuations in hourly urine volume excretion, pH, test ULR (urinary lithogenic risk) and various urinary components concentrations. Results represented as mean  $\pm$  standard deviation.

Sample Code	Night	Period1	Period2	Period3	Period4	Period5	24-hour	Day
<b>Time period</b>	0-9h	9-12h	12-15h	15-18h	18-21h	21-24h	0-24h	9-24h
<b>Volume (ml/h)</b>	34 $\pm$ 12	63 $\pm$ 20*	67 $\pm$ 22*	48 $\pm$ 12	60 $\pm$ 16*	62 $\pm$ 18*	53 $\pm$ 20	64 $\pm$ 24*
<b>PH</b>	5.65 $\pm$ 0.20	5.83 $\pm$ 0.88	5.72 $\pm$ 0.92	6.33 $\pm$ 0.77	6.69 $\pm$ 0.73*	5.62 $\pm$ 0.46	-	-
<b>Test ULR (mUA)</b>	248 $\pm$ 64	127 $\pm$ 9*	128 $\pm$ 9*	145 $\pm$ 22*	160 $\pm$ 44*	126 $\pm$ 22*	-	-
<b>Oxalate (mg/l)</b>	33.1 $\pm$ 8.8	17.9 $\pm$ 9.3*	14.9 $\pm$ 7.3*	19.0 $\pm$ 6.6*	16.8 $\pm$ 6.3*	16.1 $\pm$ 9.7*	20.7 $\pm$ 7.1*	16.7 $\pm$ 7.7*
<b>Calcium (mg/l)</b>	206 $\pm$ 62	125 $\pm$ 83	87 $\pm$ 22*	126 $\pm$ 24*	91 $\pm$ 44*	86 $\pm$ 38*	126 $\pm$ 41*	97 $\pm$ 31*
<b>Phosphorus (mg/l)</b>	1014 $\pm$ 444	371 $\pm$ 219*	254 $\pm$ 149*	695 $\pm$ 269	552 $\pm$ 332	768 $\pm$ 443	582 $\pm$ 323	507 $\pm$ 249
<b>Uric Acid (mg/l)</b>	601 $\pm$ 243	620 $\pm$ 336	444 $\pm$ 173	716 $\pm$ 279	532 $\pm$ 280	503 $\pm$ 275	549 $\pm$ 256	535 $\pm$ 262
<b>Magnesium (mg/l)</b>	135 $\pm$ 57	78 $\pm$ 42	55 $\pm$ 34*	86 $\pm$ 28	57 $\pm$ 24*	72 $\pm$ 41	83 $\pm$ 35	65 $\pm$ 25*
<b>Citrate (mg/l)</b>	492 $\pm$ 164	566 $\pm$ 260	362 $\pm$ 87	832 $\pm$ 43*	421 $\pm$ 184	409 $\pm$ 144	477 $\pm$ 123	478 $\pm$ 148
<b>Phytic Acid (mg/l)</b>	0.83 $\pm$ 0.22	0.53 $\pm$ 0.15*	0.49 $\pm$ 0.22*	0.67 $\pm$ 0.23	0.47 $\pm$ 0.17*	0.69 $\pm$ 0.35	0.60 $\pm$ 0.18	0.53 $\pm$ 0.17*
<b>Glycosaminoglycans (mg/l)</b>	9.1 $\pm$ 3.3	9.1 $\pm$ 7.5	8.8 $\pm$ 7.4	9.4 $\pm$ 4.4	5.3 $\pm$ 4.5	9.3 $\pm$ 5.5	7.9 $\pm$ 4.5	7.5 $\pm$ 5.2
<b>Creatinine (g/l)</b>	1.6 $\pm$ 1.0	1.3 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 0.6	1.6 $\pm$ 0.9	1.0 $\pm$ 0.6	1.4 $\pm$ 1.1	1.3 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 0.7
<b>Sodium (g/l)</b>	3.2 $\pm$ 1.0	3.0 $\pm$ 1.6	3.0 $\pm$ 1.4	3.7 $\pm$ 0.8	3.7 $\pm$ 1.8	3.0 $\pm$ 1.9	3.3 $\pm$ 1.3	3.3 $\pm$ 1.5
<b>Potassium (g/l)</b>	1.0 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 1.3	2.9 $\pm$ 1.4*	2.6 $\pm$ 0.8*	1.9 $\pm$ 1.1	2.2 $\pm$ 1.4	1.9 $\pm$ 1.0	2.3 $\pm$ 1.3

\* Significant differences ( $p < 0.05$ ) between nocturnal period and the other periods (periods 1-5, 24-hour and diurnal periods)

Figure 1. PCA map of the 2 first PCs. Scores of nocturnal urine (■) and day urines - period 1 (●), period 2 (○), period 3 (□), period 4 (+) and period 5 (▼) - are shown. Loadings multiplied by 2 for clarity and avoid overlapping (▲).

Figure 2. Dendrogram obtained with the 3 PCs (14 original variables). Samples are codified with a letter followed by a number. The letters g, i, m, a and j refers to each individual in the study. The number 0 indicate night urines, while numbers 1-5 indicate day periods from 1 to 5.

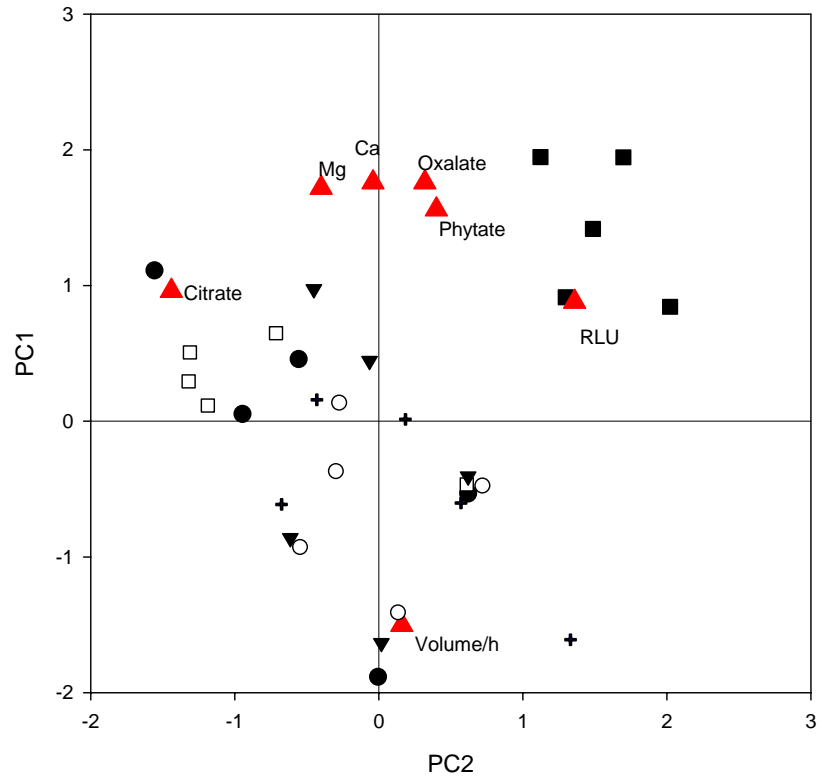


Figure 1



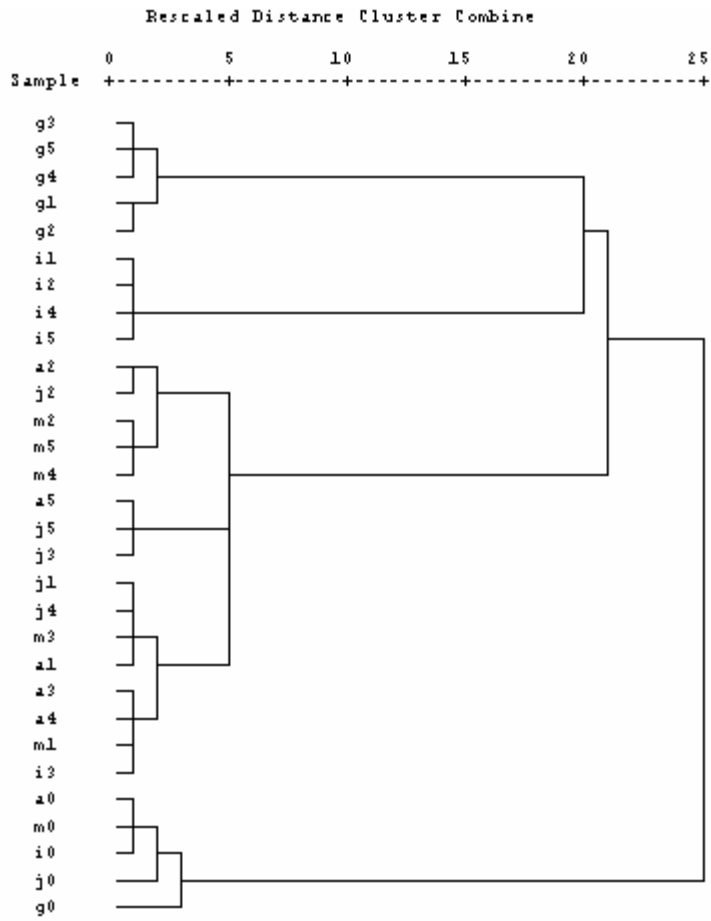


Figure 2

**ANEXO 6**

# Inhibitors of oxalocalcic lithiasis. Effects of their interactions on calcium oxalate crystallization.

J.A. Muñoz and M. Valiente

*Centre Grup de Tècniques de Separació en Química (GTS), Química Analítica, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain*

**Abstract.** The possible effects of interactions between some urinary components on inhibition of calcium oxalate crystallization are presented. Such interactions are susceptible to importantly change the inhibitory behaviour of some urinary components by producing either positive (synergic) or negative effects on preventing crystallization. A test of urinary lithogenic risk was used to follow the crystallization of calcium oxalate from artificial urine in presence of binary mixtures of known inhibitors of its crystallization (phytate, pyrophosphate, citrate and chondroitin sulphate), which were assayed in physiological concentrations. Only phytate + pyrophosphate and phytate + citrate mixtures manifested interaction effects on the calcium oxalate crystallization. While the former exhibited synergic effects, the latter showed negative effects on the inhibition. These effects are explained in terms of the affinity of the inhibitors for the calcium oxalate crystals surface and their concentrations in urine. It seems clear that the crystallization inhibitory capacity of urine could not be assigned to the inhibitory capacity of each individual substance but also to the deficient-known interactions between some of these substances in such a complex media as urine. This kind of interactions can be of great importance and value in designing prophylactic treatments of urolithiasis based on inhibitors.

**Keywords:** Calcium oxalate, urolithiasis inhibitors, phytate, pyrophosphate, citrate, glycosaminoglycans, interaction

## *Introduction*

The lithogenic process is understood as a combined process where the main phenomenon is the supersaturation of several compounds in urine that might crystallise forming solid concretions, influenced by the lack of crystallization inhibitors, the presence of crystallization promoters and some morphoanatomic factors [1]. When the equilibrium between supersaturation, promoters, inhibitors and morphoanatomic factors is broken, it might lead to a lithiasic episode. Thus, crystallization inhibitors can be considered critical for urolithiasis, even being used for preventive treatment of urolithiasis recurrences [2]. Although the inhibitory activity of some urinary components such as citrate, magnesium, phytate, pyrophosphate, and glycosaminoglycans has been extensively reported [3-6], their interactions in such a complex biological fluid as urine have been scarcely studied [7,8]. Such interactions are susceptible to significantly modify the inhibitory behaviour of some urinary components by producing either positive (synergic) or negative effects on preventing crystallization.

Several methods have been proposed to evaluate the crystallization properties of urine and to study the inhibitor capacity of specific substances in urine [9,10]. Most of them determine changes in supersaturation during the experiment, which may increase, remain constant or decay. Their ability to quantify various aspects of crystallisation often

reflects the extent to which nucleation, growth and aggregation can be measured independently, when two or three of these processes may be occurring simultaneously. In the last years, a very simple test (test of urinary lithogenic risk or test ULR) to evaluate the capacity of a urine to crystallize calcium salts has been presented [11]. The test ULR is based on the fact that when a non-protected non-renewed surface remains in contact with urine, sooner or later the contained supersaturated substances crystallize on this surface. Thus, by using an adequate surface (i.e. histologic paraffin or polyethylene), a healthy urine does not crystallize whereas a lithogenic urine induces the growth of calcium salts after a period of incubation of 24 hours at room temperature. The test has been applied to urines of both oxalocalcic stone formers and healthy people, revealing an excellent discrimination between abnormal and healthy urines. Thus, test URL represent a simple method to evaluate the capacity of a particular urine to crystallize calcium salts, what allows to evaluate the inhibition of calcium oxalate crystallization by in vitro studies. The advantages of this test include its simple application to artificial and real urines, its proved efficacy on screening the risk of calcium oxalate crystallization in stone-formers, its rapidity and low-cost.

Within this context, the aim of the present work is to study systematically the inhibitory activity of some substances on the calcium oxalate crystallization, considering the possible synergic or

negative effects on inhibition activity produced by their interactions.

## Materials and methods

### Reagents and solutions

Synthetic urine [12] was prepared immediately before use by mixing equal volumes of solutions A and B, both prepared with reagents of analytical-reagent grade and deionised-redistilled water, and adjusted to the working value of pH (5.5). Solution A contained 4.86 g/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1.02 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4.65 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 12.2 g/L  $\text{KCl}$  and 2.24 g/L  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Solution B contained 2.4 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3.0 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 13.12 g/L  $\text{NaCl}$  and 0.075 g/L  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ . The concentration of the different compounds in the synthetic urine solution was:  $\text{Na}^+$  171.7 mM,  $\text{K}^+$  81.3 mM,  $\text{NH}_4^+$  43.5 mM,  $\text{Ca}^{2+}$  4.7 mM,  $\text{Mg}^{2+}$  2.1 mM,  $\text{Cl}^-$  237.0 mM,  $\text{SO}_4^{2-}$  20.1 mM,  $\text{PO}_4^{3-}$  16.1 mM and oxalate 0.28 mM.

Tetra-sodium pyrophosphate 10-hydrate (Panreac, p.a., Barcelona, Spain), myoinositol hexaphosphoric acid hexasodium salt from corn (Sigma, Steinheim, Germany), tri-sodium citrate dihydrate (Merck, p.a., Darmstadt, Germany) and chondroitin sulphate A (glycosaminoglycan) from bovine trachea (Sigma, Steinheim, Germany) were used as inhibitors.

### Measurements of calcium oxalate crystallization

The characteristics and dimensions of the reaction unit are shown in Figure 1. Before its use, 500  $\mu\text{l}$  of an ethanolic 100 g/L solution of thymol (antiseptic action) was spread in each polypropylene container and ethanol was evaporated. Then, 30mL of artificial urine are placed in the polypropylene container and then stopped up, leaving the polyethylene tube in contact with the urine for 24h at room temperature. Then, the urine is discarded and the polyethylene tube, having the calcium oxalate crystals on its surface, is carefully rinsed with water. Calcium oxalate is finally redissolved by introducing the tube in a vial containing 4mL  $\text{HCl}$  0.3M, and calcium measured by ICP-OES (model Iris Intrepid II XLS from Thermo Electron, USA).

### Inhibitory effects of various compounds

To study the activity of some inhibitors on calcium oxalate crystallization and to evaluate the effect of their interactions, the amount of calcium precipitated from artificial urine containing the target inhibitors was determined by the described

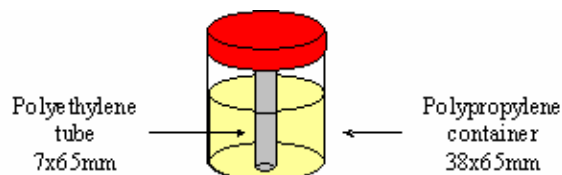


Figure 1. Reaction unit of test ULR.

test ULR. Thus, the effects of phytate in the concentration range 0-1.0 ppm, citrate in the concentration range 0-720 ppm, pyrophosphate in the concentration range 0-9.0 ppm and chondroitin sulphate in the concentration range 0-20.4 ppm were evaluated by addition of appropriate volumes of concentrated stock solutions of these substances to the artificial urine just before the test ULR application. The percentage of inhibition of calcium oxalate crystallization was determined for each experiment by comparison of the amount of calcium precipitated in each conditions to that of the assay in the absence of inhibitors. To evaluate the reproducibility of the obtained results, each experiment was repeated three times.

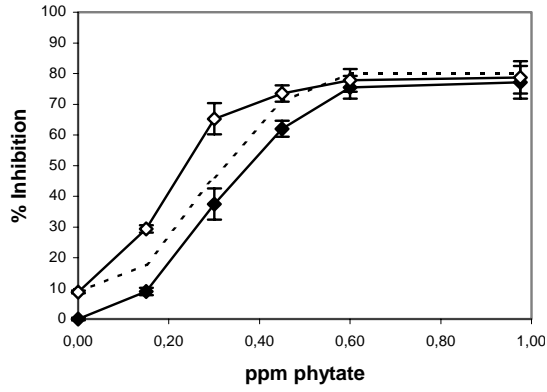
When the effect of citrate was studied, we took into account the decrease of free calcium in artificial urine because of the formation of calcium-citrate soluble complexes. Thus, a corresponding supplement of calcium was added by controlling the free calcium concentration using a calcium-selective electrode, in order to attain the same calcium oxalate supersaturation value that is found in absence of citrate. It must be considered that a decrease in the supersaturation would produce a decrease in the crystallization rate that can not be attributed to inhibitory effects. In the case of phytate, pyrophosphate or chondroitin sulphate, due to their low levels, the decrease in the free calcium concentration was negligible, resulting unnecessary the addition of a calcium supplement.

### Study of the formed solid phase

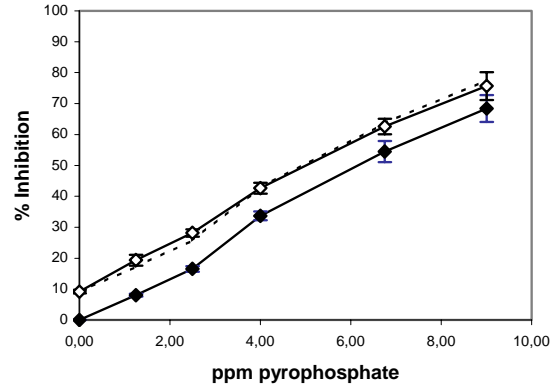
Solids formed on the surface of polyethylene tubes were also studied by scanning electron microscopy (model JSM-6300 from JEOL Ltd, Japan), demonstrating the formation of different calcium oxalate crystals in the above mentioned crystallization conditions.

## Results

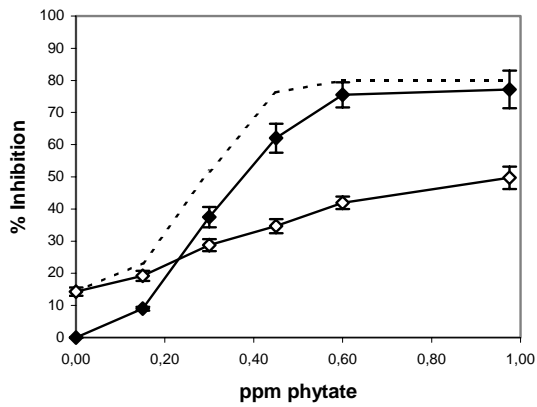
The effects of single target inhibitors on calcium oxalate crystallization were determined as described before and recorded in the form of % of inhibition vs. concentration of target compound.



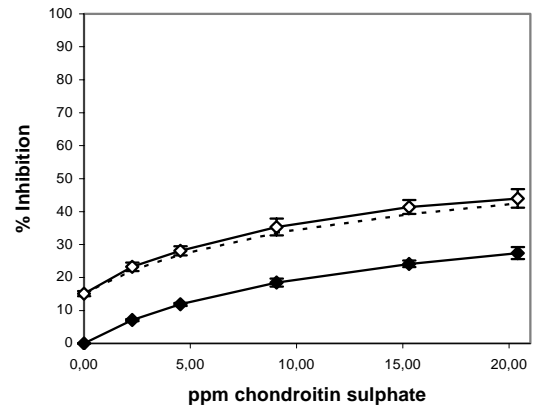
**Figure 2.** Effects of phytate + pyrophosphate mixtures on the crystallization of calcium oxalate. % Inhibition  $\pm$  SD in presence of different concentrations of phytate and absence of pyrophosphate (●) or presence of pyrophosphate 1.5 ppm (○). Dashed line is the line that would be obtained if only additive effects of inhibition were produced.



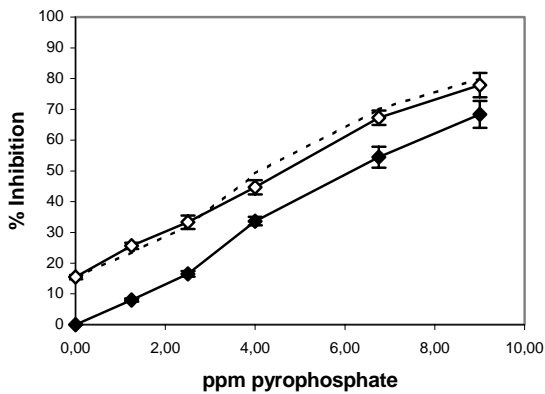
**Figure 5.** Effects of pyrophosphate + chondroitin sulphate mixtures on the crystallization of calcium oxalate. % Inhibition  $\pm$  SD in presence of different concentrations of pyrophosphate and absence of chondroitin sulphate (●) or presence of chondroitin sulphate 4,5 ppm (○). Dashed line is the line that would be obtained if only additive effects of inhibition were produced.



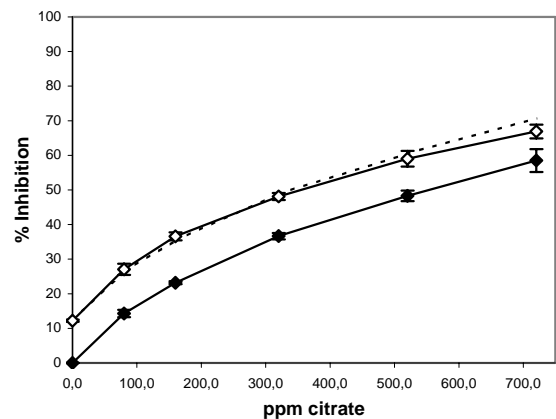
**Figure 3.** Effects of phytate + citrate mixtures on the crystallization of calcium oxalate. % Inhibition  $\pm$  SD in presence of different concentrations of phytate and absence of citrate (●) or presence of citrate 80 ppm (○). Dashed line is the line that would be obtained if only additive effects of inhibition were produced.



**Figure 6.** Effects of chondroitin sulphate + phytate mixtures on the crystallization of calcium oxalate. % Inhibition  $\pm$  SD in presence of different concentrations of chondroitin sulphate and absence of phytate (●) or presence of phytate 0.20 ppm (○). Dashed line is the line that would be obtained if only additive effects of inhibition were produced.



**Figure 4.** Effects of pyrophosphate + citrate mixtures on the crystallization of calcium oxalate. % Inhibition  $\pm$  SD in presence of different concentrations of pyrophosphate and absence of citrate (●) or presence of citrate 80 ppm (○). Dashed line is the line that would be obtained if only additive effects of inhibition were produced.



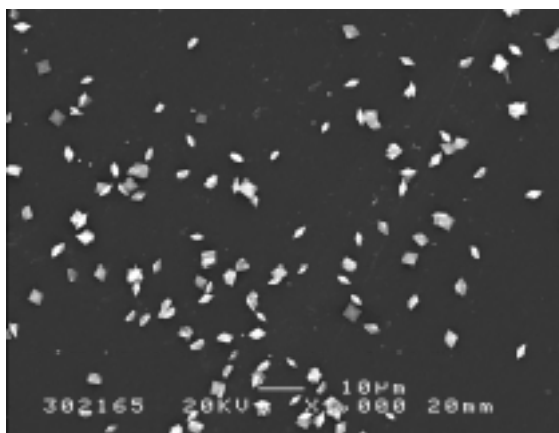
**Figure 7.** Effects of citrate + chondroitin sulphate mixtures on the crystallization of calcium oxalate. % Inhibition  $\pm$  SD in presence of different concentrations of citrate and absence of chondroitin sulphate (●) or presence of chondroitin sulphate 4.5 ppm (○). Dashed line is the line that would be obtained if only additive effects of inhibition were produced.

For binary mixtures, corresponding effects are shown in Figures 2-7. As can be seen, only phytate + pyrophosphate and phytate + citrate mixtures manifested effects different from additive inhibition on the calcium oxalate crystallization. While phytate + pyrophosphate mixtures (Figure 2) show significant synergic effects, phytate + citrate mixtures (Figure 3) show important negative effects on inhibition of calcium oxalate crystallization.

Maximum inhibition of calcium oxalate precipitation achieved during these experiments was around 80-85%. None of the assayed conditions achieved a total inhibition of calcium oxalate precipitation. The explanation of this fact is based on the co-precipitation of low amounts of calcium oxalate dihydrate together with calcium oxalate monohydrate (Figure 8). The former is known to be the kinetically-favoured phase of calcium oxalate in presence of high amounts of calcium in solution and, thus, its crystallization is more difficult to inhibit than that of calcium oxalate monohydrate. This effect is observed in Figure 8.



**Figure 8a.** Calcium oxalate crystals formed: in absence of inhibitors (basically hexagonal calcium oxalate monohydrate crystals can be observed)



**Figure 8b.** Calcium oxalate crystals formed in presence of phytate 1.0 ppm (only trigonal bipyramidal calcium oxalate dihydrate can be observed).

## Discussion

The inhibitory capacity of a given urine is related to the concentration of all compounds capable to disturb the formation or development of a specific insoluble salt. However, the abundant interactions of these compounds in the complex biological fluid of urine (growing crystal may be present) must be considered, since they are susceptible to remarkably modify the inhibitory behaviour of some urinary components. In this sense, it is interesting to note how phytate in concentrations ranging from 0.2 to 1.0 ppm, corresponding to normal concentrations found in human urine, is able to produce both significant synergistic effects on calcium oxalate precipitation in presence of pyrophosphate (1.5 ppm) and significant negative effects in presence of citrate (80 ppm), also resulting these other inhibitors at normal amounts found in urine.

Apart from complexing reactions (i.e. calcium-citrate complex formation), which decrease the calcium oxalate crystallization, the mechanisms of inhibition involve basically interactions between the inhibitor and the crystal. Such interactions induce important disturbances in the kinetics and development of the crystal phase [12]. Interactions can be classified as weak electrostatic adsorption or strong chemical interaction [13]. Inhibitors undergoing chemical interactions with the crystal are incorporated, to a certain extent, to the solid phase, as happens for phytate [14] and pyrophosphate [15] in calcium renal stones. Thus, simultaneous selective adsorption of both inhibitors on the crystal growth active sites, achieving a more effective cover of the crystal surface than the mere additive effect of two individual inhibitors, can be responsible for the aforementioned synergistic effects between phytate and pyrophosphate on the inhibition of calcium oxalate crystallization.

The negative effects on inhibition by phytate + citrate mixtures can be explained bearing in mind two different aspects: 1) phytate have extremely higher capacity to hinder calcium oxalate crystallization than citrate; 2) citrate is present in a higher concentration than phytate in the artificial urine used for inhibition experiments (citrate:phytate molar ratio ranging from 1850 to 300). The overall result of combining both aspects is that citrate, even though having less affinity for calcium, displaces phytate from the active sites of crystallization on the crystal surface, leading to the negative effect on inhibition observed in their mixtures as a consequence of the lower capacity of citrate for crystallization inhibition. This is consistent with the fact that inhibition increases when concentration of phytate increases in presence of a fixed amount of citrate, even though it remains lower than that in absence of citrate. In such conditions, when citrate:phytate molar ratio

decreases, a more efficient adsorption of phytate on the crystal surface can be achieved as a result of a diminished competitive effect by citrate.

In the case of pyrophosphate + citrate mixtures, additive effects on inhibition were observed. Negative effects that could be expected based on the previous mechanism, do not take place because citrate is present in only relatively slightly higher concentration than pyrophosphate in the artificial urine used for inhibition experiments (citrate:pyrophosphate molar ratio ranging from 60 to 6). Thus, displacement of pyrophosphate, with a higher affinity for calcium, from the active sites of crystallization by citrate is disfavoured and additive effects on inhibition are observed.

Finally, another urinary component such as chondroitin sulphate do not exhibit effects different from additive behaviour on inhibition of calcium oxalate crystallization when combined with phytate, pyrophosphate or citrate, which can be probably related both to its poor inhibitory effects (low affinity for calcium crystal surfaces) and the relatively low amounts of this substance in urine.

## Conclusions

Interactions between different urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and incipient crystals in urine can result either in synergic, additive or negative effects on the overall inhibition of insoluble urinary salts. Synergistic effects occur when substances with high affinity for calcium (i.e. phytate + pyrophosphate mixtures) are selectively adsorbed on active sites of calcium oxalate crystallization, disturbing the crystal surface more effectively than the mere additive effect of the individual inhibitors. Negative effects take place when a substance with high affinity for calcium (i.e. phytate) is in presence of high amounts of another substance with lower affinity (i.e. citrate), resulting in an effective displacement of the former from active sites of calcium oxalate crystallization, thus decreasing the overall inhibition below the expected additive effect. Finally, merely additive effects seem to occur when the substances involved in the inhibition have similar affinities for active sites of calcium oxalate crystallization and/or they are present in urine in concentrations that do not exceed considerably from each other.

As a consequence of the related effects, it can be concluded that the crystallization inhibitory capacity of urine could not be assigned to the inhibitory capacity of each individual substance but also to the possible interactions between these substances in the complex media of urine containing incipient crystals. Because of the scarce knowledge of such interactions, further investigation in this concern will contribute to best

assessment on designing prophylactic treatments of urolithiasis based on inhibitors. On one hand, the efforts of increasing a given inhibitor in urine may result disappointing because the presence of some other compounds can undergo negative effects on the overall inhibition. On the other hand, low increments of a given urinary inhibitor can cause high inhibitory capacity because of the existence of synergistic effects with some other substances present in urine.

## Acknowledgements

J.A. Muñoz acknowledges the "Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya" for the scholar-grant received. The work has been carried out under the support of the research Grant PPQ2002-04267-C03-01.

## References

- [1] Grases F, Costa-Bauzá A, García-Ferragut L. Biopathological crystallization: a general view about the mechanisms of renal stone formation. *Adv Coll Interf Sci* 1998; 74:169-194
- [2] Robertson WG, Peacock M. Pathogenesis of urolithiasis. In: Schenider HJ, Peacock M, Robertson WG, Vahlensieck W (eds). *Urolithiasis: Etiology. Diagnosis.* Springer-Verlag, New York, 1985; 185-334
- [3] Fleisch H. Inhibitors and promoters of stone formation. *Kidney Int* 1978;13:361
- [4] Ryall RL, Harnett RM, Marshal VR. The effect of urine, pyrophosphate, citrate, magnesium and glycosaminoglycans on the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. *Clin Chim Acta* 1981;112:349
- [5] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá, March JG. Study of the effects of different substances on the early stages of papillary stone formation. *Nephron* 1996;73:561
- [6] Meyer JL, Smith LH. Growth of calcium oxalate crystals. II. Inhibition by natural crystal growth inhibitors. *Invest Urol* 1975;13:36
- [7] Werness PG, Bergert JH, Lee KE. Urinary crystal growth: effect of inhibitor mixtures. *Clin Sci* 1981;61:487
- [8] Costa-Bauzá A, Barceló C, Perelló J, Grases F. Synergism between the brushite and hydroxyapatite urinary crystallization inhibitors. *Int Urol Nephrol* 2002;34:447
- [9] Baumann JM. How to measure crystallization conditions in urine: A comparison of 7 methods. *Urol Res* 1988;16:137

- [10] Kavanagh JP. Methods for the study of calcium oxalate crystallization and their application to urolithiasis research. *Scanning Microsc* 1992;6:685
- [11] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A, Conte A, García-Raja A. Simple test to evaluate the risk of urinary calcium stone formation. *Clin Chim Acta* 263, 1997, 43
- [12] Nancollas GH, Zawacki SJ. In: Jancic SJ, De Jong EJ (ed). *Inhibitors of crystallization and dissolution. Industrial crystallization*, vol 84. Elsevier, Amsterdam, 1984. p. 51
- [13] Grases F, Costa-Bauzá A, Söhnel O. *Cristalización en disolución: conceptos básicos*. Reverté, Barcelona, 2000
- [14] March JG, Simonet BM, Grases F. Determination of phytic acid by gas chromatography-mass spectrometry: application to biological samples. *J Chromatogr B* 757, 2001, 247
- [15] March JG, Simonet BM, Grases F. Determination of pyrophosphate in renal calculi and urine by means of an enzymatic method. *Clin Chim Acta* 314, 2001, 187

*Address for correspondence:* Prof. Dr. M. Valiente, Centre Grup de Tècniques de Separació en Química (GTS), Química Analítica, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Spain  
Phone: +34-93-581-29-03; Fax: +34-93-581-19-85  
E-mail: [Manuel.Valiente@uab.es](mailto:Manuel.Valiente@uab.es)



**ANEXO 6**

# Effects of trace metals on the inhibition of calcium oxalate crystallization

J.A. Muñoz and M. Valiente

*Centre Grup de Tècniques de Separació en Química (GTS), Química Analítica, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain*

**Abstract.** The possible effects of some trace metals on inhibition of calcium oxalate crystallization are presented. A test of urinary lithogenic risk was used to follow the crystallization of calcium oxalate from artificial urine in presence of several metals ions assayed in their physiological concentrations. Interactions of these metals ions with known inhibitors of such crystallization (phytate, pyrophosphate, citrate and chondroitin sulphate) were also investigated. Results indicated that none of the metals affect the inhibition of calcium oxalate crystallization at concentrations approximating those found in normal urine, with the exception of the  $\text{Fe}^{3+}$  ions. Interactions of  $\text{Fe}^{3+}$  with some urinary components are shown to produce both synergic (phytate and pyrophosphate) and negative (citrate) effects on preventing crystallization. These effects are explained in terms of the affinity of the inhibitors for the calcium oxalate crystals surface and their ability to form stable complexes in urine. In this sense, ferric ions, which exhibit an intrinsic high inhibitory capacity of calcium oxalate crystallization at physiological concentrations, even increased by concomitant presence of phytate and pyrophosphate, are probably unable to act as a powerful inhibitor in presence of physiological urinary concentrations of citrate, due to the formation of highly stable complexes in solution without inhibitory activity. Because of the minimal concentrations, we conclude that physiological concentrations of trace elements in urine have no significant influence on calcium oxalate crystallization.

**Keywords:** Calcium oxalate, inhibitors, phytate, pyrophosphate, citrate, glycosaminoglycans, interaction, trace metals, iron

## Introduction

Urolithiasis is a process is the results of combined factors where the main phenomena is the supersaturation of some compounds in urine that might crystallise forming solid concretions. This process is affected by the lack of crystallization inhibitors, the presence of crystallization promoters and some morphoanatomic factors [1]. A lithiasic episode may occur when the equilibrium between the mentioned factors is broken. Thus, crystallization inhibitors are critical for urolithiasis, being used for preventive treatment of urolithiasis recurrences [2].

In contrast to the well known inhibitory activity of some urinary components such as citrate, magnesium, phytate, pyrophosphate and glycosaminoglycans [3-6], little attention has been paid to trace elements [7,8]. On one hand, trace elements are known to influence the external morphology of crystals, as well as to speed or retard the crystallization process [9-12]. Unfortunately, the predominantly unphysiologically high concentrations used in these studies do not permit any reliable conclusion concerning the in vivo effect of trace elements on stone formation [13]. On the other hand, some attempts to study the interaction of metal ions with some urolithiasis inhibitors, such as several bisphosphonates [14] and citrate [15] have been reported. However, a great effort is required to ascertain the effects of trace

metals interactions with the main known inhibitors of urolithiasis.

Several procedures have been proposed to evaluate the crystallization properties of a urine and to study the inhibitor capacity of given substances in urine [16,17]. In the last years, a very simple test (test of urinary lithogenic risk or test ULR) to evaluate the capacity of a urine to crystallize calcium salts has been presented [18]. The test ULR is based on the fact that if a non-protected non-renewed surface (i.e. histologic paraffin or polyethylene) remains in contact with a urine, sooner or later the contained supersaturated substances crystallize on it. Thus, test URL represent a simple test to evaluate the capacity of urine to crystallize calcium salts. Its application to the evaluation of inhibition of calcium oxalate crystallization by trace metals is presented in this work. The advantages of this test are its ease of application to artificial and real urines, its proved efficacy on screening of increased risk of calcium oxalate crystallization in stone-formers, its rapidity and low-cost.

Within this context, the aim of this work is to study systematically the inhibitory activity of some trace metals, both the individual effect and in presence of the main inhibitors of calcium oxalate crystallization (i.e., phytate, pyrophosphate, citrate and glycosaminoglycans), considering the possible synergic or negative interactions on the inhibition activity.

## Materials and methods

### Reagents and solutions

Synthetic urine [19] was prepared immediately before use by mixing equal volumes of solutions A and B, both prepared with reagents of analytical-reagent grade and deionised-redistilled water, and adjusted to the working value of pH (5.5). Solution A contained 4.86 g/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1.02 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4.65 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 12.2 g/L  $\text{KCl}$  and 2.24 g/L  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Solution B contained 2.4 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3.0 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 13.12 g/L  $\text{NaCl}$  and 0.075 g/L  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ . The concentration of the different compounds in the synthetic urine solution was:  $\text{Na}^+$  171.7 mM,  $\text{K}^+$  81.3 mM,  $\text{NH}_4^+$  43.5 mM,  $\text{Ca}^{2+}$  4.7 mM,  $\text{Mg}^{2+}$  2.1 mM,  $\text{Cl}^-$  237.0 mM,  $\text{SO}_4^{2-}$  20.1 mM,  $\text{PO}_4^{3-}$  16.1 mM and oxalate 0.28 mM.

Tetra-sodium pyrophosphate 10-hydrate (Panreac, Barcelona, Spain), myoinositol hexaphosphoric acid hexasodium salt from corn (Sigma, Steinheim, Germany), tri-sodium citrate dihydrate (Merck, Darmstadt, Germany), chondroitin sulphate A from bovine trachea (Sigma, Steinheim, Germany) and certified analytical standard solutions (1000 mg  $\text{L}^{-1}$ ) of assayed metals (J.T. Baker, Deventer, Holland) were used as inhibitors.

### Measurements of calcium oxalate crystallization

Figure 1 shows the scheme of the reaction unit employed. Before the experiment, 500  $\mu\text{l}$  of an ethanolic 100 g/L solution of thymol (antiseptic action) was spread in each polypropylene container and ethanol was evaporated. Then, 30mL of artificial urine are placed in the polypropylene container and stopped up, leaving the polyethylene tube in contact with the urine for 24h at room temperature. Then, the urine is discarded and the polyethylene tube, bearing the calcium oxalate crystals on its surface, is carefully rinsed with water. Calcium oxalate is finally redissolved by introducing the tube in a vial containing 4mL  $\text{HCl}$  0.3M, and calcium measured by ICP-OES (model Iris Intrepid II XLS from Thermo Electron, USA).

### Inhibitory effects of various compounds

To study the activity of some inhibitors on calcium oxalate crystallization and to evaluate the effect of their interactions, the amount of calcium precipitated from artificial urine containing the target inhibitors was determined by the described test ULR. Both the inhibitory effects on calcium oxalate crystallization of several metal ions in the concentration ranges showed in Table 1 and the

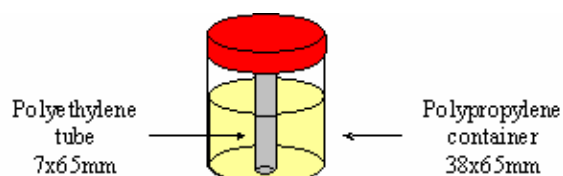


Figure 1. Reaction unit of test ULR.

effect of binary mixtures of these metals ions in presence of phytate (0.2 ppm), citrate (80 ppm), pyrophosphate (1.5 ppm) or chondroitin sulphate (4.5 ppm) were evaluated by addition of appropriate volumes of concentrated stock solutions of these substances to the artificial urine just before the test ULR application. The percentage of inhibition of calcium oxalate crystallization was determined for each experiment by comparison of the amount of calcium precipitated in each conditions to that of the assay in the absence of inhibitors. To evaluate the reproducibility of the obtained results, each experiment was repeated three times.

When the effect of citrate was studied, we took into account the decrease of free calcium in artificial urine because of the formation of calcium-citrate soluble complexes. Thus, a corresponding supplement of calcium was added by controlling the free calcium concentration using a calcium-selective electrode, in order to attain the same calcium oxalate supersaturation value that is found in absence of citrate. It must be considered that a decrease in the supersaturation would produce a decrease in the crystallization rate that can not be attributed to inhibitory effects. In the case of phytate, pyrophosphate or chondroitin sulphate, due to their low levels, the decrease in the free calcium concentration was negligible, resulting unnecessary the addition of a calcium supplement.

### Study of the formed solid phase

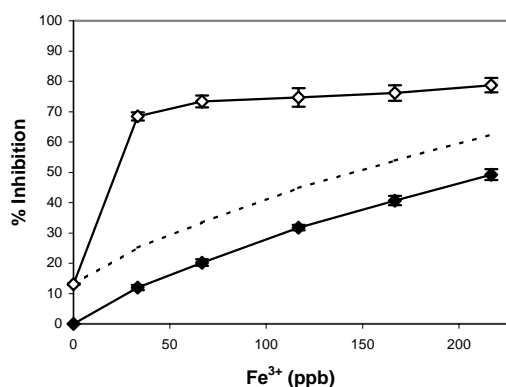
Solid formed on the surface of polyethylene tubes were also studied by scanning electron microscopy (model JSM-6300 from JEOL Ltd, Japan), demonstrating the formation of calcium oxalate crystals in the above-mentioned crystallization conditions.

## Results

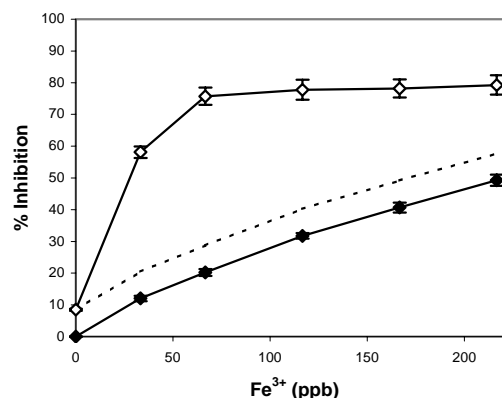
Results in Table 1 indicated that none of the metals affect the inhibition of calcium oxalate crystallization at concentrations approximating those found in normal urine, with the exception of the  $\text{Fe}^{3+}$  ions. Furthermore, the effect of some other substances such as phytate, citrate, chondroitin sulphate and pyrophosphate on

**Table 1.** Effect of individual trace metals on the inhibition of calcium oxalate crystallization. Representative ranges of these trace metals for normal urines are given for comparison [20,21].

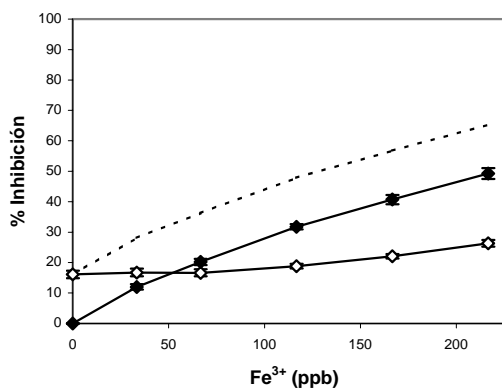
Metal Ion	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Sn <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>
Representative Range (µg L <sup>-1</sup> )	0-767	0-170	0-55	0-35	0-4	0-34	0-12	0-1	0-2
Assayed range (µg L <sup>-1</sup> )	0-2000	0-250	0-100	0-50	0-50	0-50	0-50	0-50	0-50
Maximum inhibition observed	6±3	55±4	3±2	2±2	3±2	4±2	0±1	1±1	2±1



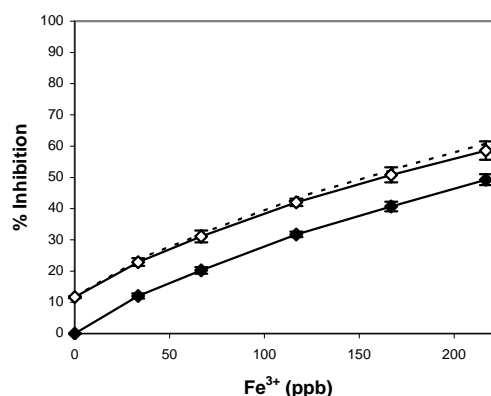
**Figure 2.** Effects of Fe<sup>3+</sup> + phytate mixtures on the crystallization of calcium oxalate. % Inhibition ± SD in presence of different concentrations of Fe<sup>3+</sup> and absence of phytate (●) or presence of phytate 0.2 ppm (○). Dashed line is the line that would be obtained if only additive effects of inhibition were produced.



**Figure 3.** Effects of Fe<sup>3+</sup> + pyrophosphate mixtures on the crystallization of calcium oxalate. % Inhibition ± SD in presence of different concentrations of Fe<sup>3+</sup> and absence of pyrophosphate (●) or presence of pyrophosphate 1.5 ppm (○). Dashed line is the line that would be obtained if only additive effects of inhibition were produced.



**Figure 4.** Effects of Fe<sup>3+</sup> + citrate mixtures on the crystallization of calcium oxalate. % Inhibition ± SD in presence of different concentrations of Fe<sup>3+</sup> and absence of citrate (●) or presence of citrate 80 ppm (○). Dashed line is the line that would be obtained if only additive effects of inhibition were produced.



**Figure 5.** Effects of Fe<sup>3+</sup> + chondroitin sulphate mixtures on the crystallization of calcium oxalate. % Inhibition ± SD in presence of different concentrations of Fe<sup>3+</sup> and absence of chondroitin sulphate (●) or presence of chondroitin sulphate 4.5 ppm (○). Dashed line is the line that would be obtained if only additive effects of inhibition were produced.

inhibition of calcium oxalate crystallization was not significantly influenced (neither increased nor decreased) by the assayed concentrations of metals ions, again with the unique exception of the Fe<sup>3+</sup> ions. The effects of binary mixtures of the aforementioned crystallization inhibitors of calcium oxalate crystallization together with Fe<sup>3+</sup> ions are shown in Figures 2-5. As can be seen, both phytate + Fe (Figure 2) and pyrophosphate + Fe (Figure 3)

mixtures manifested significant synergic effects, whereas citrate + Fe mixtures (Figure 4) show important negative effects on inhibition of calcium oxalate crystallization. Finally, combination of chondroitin sulphate with Fe<sup>3+</sup> ions (Figure 5) gives additive interactions as a result.

## Discussion

The essential trace elements As, Cr, Co, Cu, F, Fe, I, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Si, Sn, V and Zn must be present in the body in minimal concentrations to guarantee specific functions, such as enzymatic reactions, electronic transfer, redox reactions, etc... Although their presence in urinary stones had been proved [22,23], it remains unknown whether its presence is simply a result of external deposition from urine or whether the presence of excess amounts of elements such as iron, zinc and copper in a local environment may become an initiating factor in the process of rapid stone precipitation [24]. However, it seems clear that if a particular trace metal had an effect on the crystallization of a urinary stone component it must necessarily act at the surface of the crystals since the concentration of trace metals in urine is too small to affect the lattice ions in solution, being thus trapped and perhaps concentrated within the lattice of the crystals.  $\text{Fe}^{3+}$  presence in calculi is further explained by its adsorption on calcium oxalate crystals [25]. The ability of  $\text{Fe}^{3+}$  ions to establish highly stable chemical interactions with oxalate ions on the surface of calcium oxalate crystals, thus disturbing its development, explains its inhibitory effects on calcium oxalate crystallization.  $\text{Fe}^{3+}$  ions are those which more stably binds oxalate ions of all the metal ions assayed in this work [26], probably explaining why the other metals ions do not show significant inhibitory effect on calcium oxalate crystallization at physiological concentrations. Inhibitory properties previously reported for other metals ions, such as  $\text{Zn}^{2+}$  [9],  $\text{Al}^{3+}$  [9,15] or  $\text{Cu}^{2+}$  [13] were not confirmed by this study, probably due to unphysiologically high concentrations used in those studies.

It is even more interesting to note how the interactions between  $\text{Fe}^{3+}$  ions and the calcium oxalate surface can be modulated by the action of common urinary components, inducing important changes in its inhibitory properties. The important synergic effects on inhibition exhibited by phytate +  $\text{Fe}^{3+}$  and pyrophosphate +  $\text{Fe}^{3+}$  are likely to occur via anchored mixed-ligands complexes of  $\text{Fe}^{3+}$  or anchored binuclear complexes of phytate and pyrophosphate, which could cause greater blocking effect of the active sites on crystal surface than the individual components. Some stable mixed-ligands complexes of  $\text{Fe}^{3+}$  with carboxylate and phosphate groups have been reported [27]. Thus, analogous complexes with oxalate and phytate or pyrophosphate, anchored in the calcium oxalate crystal surface could explain the aforementioned synergic effects. Furthermore, the possible formation of binuclear complexes of phytate or pyrophosphate with  $\text{Fe}^{3+}$  ions and calcium, anchored by the latter to the calcium oxalate crystal surface, can also contribute to hinder the crystal

growth. Similar mechanism of actuation has been reported for the potentiation of bisphosphonate activity by Sn [14], in which any of the two phosphonate groups of the bisphosphonate molecule can act as separate unidentate ligand, with one group binding the  $\text{Sn}^{4+}$  ion and the other binding a calcium on the crystal surface.

Apart from synergic effects with phytate and pyrophosphate, negative effects on inhibition by  $\text{Fe}^{3+}$  ions in presence of citrate has been also observed. At high ratios of citrate to metal ion,  $\text{Fe}^{3+}$  is known to form highly stable low molecular weight complexes without inhibitory properties of calcium oxalate crystallization [15]. Such complexes are likely to avoid the interaction of ferric ions with the calcium oxalate surface, by displacing the  $\text{Fe}^{3+}$  ions from this surface, counteracting its inhibitory effect and resulting in the aforementioned negative effects of  $\text{Fe}^{3+}$ -citrate interaction on calcium oxalate crystallization.

## Conclusions

Renal lithiasis is known to be a multifactorial disease, where inhibitory crystallization deficit plays a major role together with supersaturation levels of different urinary salts, promoters of crystallization and diverse phenomena of crystal retention in the urinary tract. The inhibitory capacity of a given urinary compound can not be only related to its concentration, since the abundant likely interactions of this compound with other components of urine (complex formation, precipitation, chemisorption on crystal surface, displacement from crystal surface...) are proved to importantly change its ability to disturb the development of a specific insoluble salt, producing either negative or synergic effects. In this sense, ferric ions, which exhibit an intrinsic high inhibitory capacity of calcium oxalate crystallization at physiological concentrations, even increased by concomitant presence of phytate and pyrophosphate, are probably unable to act as a powerful inhibitor in presence of physiological concentrations of citrate, due to the formation of highly stable complexes in solution without inhibitory activity.

Because of the minimal concentrations, we conclude that physiological concentrations of trace elements in urine have no significant influence on calcium oxalate crystallization.

## Acknowledgements

J.A. Muñoz acknowledges the "Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya" for the scholar-grant received. The work has been carried out under the support of the research Grant PPQ2002-04267-C03-01.

## References

- [1] Grases F, Costa-Bauzá A, García-Ferragut L. Biopathological crystallization: a general view about the mechanisms of renal stone formation. *Adv Coll Interf Sci* 1998; 74:169-194
- [2] Robertson WG, Peacock M. Pathogenesis of urolithiasis. In: Scheneider HJ, Peacock M, Robertson WG, Vahlensieck W (eds). *Urolithiasis: Etiology. Diagnosis*. Springer-Verlag, New York, 1985; 185-334
- [3] Fleisch H. Inhibitors and promoters of stone formation. *Kidney Int* 1978;13:361
- [4] Ryall RL, Harnett RM, Marshal VR. The effect of urine, pyrophosphate, citrate, magnesium and glycosaminoglycans on the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. *Clin Chim Acta* 1981;112:349
- [5] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá, March JG. Study of the effects of different substances on the early stages of papillary stone formation. *Nephron* 1996;73:561
- [6] Meyer JL, Smith LH. Growth of calcium oxalate crystals. II. Inhibition by natural crystal growth inhibitors. *Invest Urol* 1975;13:36
- [7] Hofbauer J, Steffan I, Höbarth K, Vujicic G, Schwetz H, Reich G, Zechner. Trace elements and urinary stone formation: new aspects of the pathological mechanism of urinary stone formation. *J Urol* 1991;145:93
- [8] Elliot JS, Ribeiro ME. The urinary excretion of trace metals in patients with calcium oxalate urinary stone. *Invest Urol* 1973;10:253
- [9] Sutor DJ. Growth studies of calcium oxalate in the presence of various ions and ions. *Brit J Urol* 1969;41:171
- [10] Elliot JS, Eusebio E. Calcium oxalate solubility: the effect of trace metals. *Invest Urol* 1967;4:428
- [11] Eusebio E, Elliot JS. Effect of trace metals on the crystallization of calcium oxalate. *Invest Urol* 1967;4:431
- [12] Welshman SG, McGeown MG. A quantitative investigation of the effects of the growth of calcium oxalate crystals on potential inhibitors. *Br J Urol* 1972;44:67
- [13] Meyer JL, Angino EE. The role of trace metals in calcium urolithiasis. *Invest Urol* 1977;14:347
- [14] Wolf JS, Stoller ML. Inhibition of calculi fragment growth by metal-bisphosphonate complexes demonstrated with a new assay measuring the surface activity of urolithiasis inhibitors. *J Urol* 1994;152:1609
- [15] Meyer JL, Thomas WC. Trace metal-citric acid complexes as inhibitors of calcification and crystal growth. II. Effects of Fe(III), Cr(III) and Al(III) complexes on calcium oxalate crystal growth. *J Urol* 1982;128:1376
- [16] Baumann JM. How to measure crystallization conditions in urine: A comparison of 7 methods. *Urol Res* 1988;16:137
- [17] Kavanagh JP. Methods for the study of calcium oxalate crystallization and their application to urolithiasis research. *Scanning Microsc* 1992;6:685
- [18] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A, Conte A, García-Raja A. Simple test to evaluate the risk of urinary calcium stone formation. *Clin Chim Acta* 263, 1997, 43
- [19] Nancollas GH, Zawacki SJ. In: Jancic SJ, De Jong EJ (ed). *Inhibitors of crystallization and dissolution. Industrial crystallization*, vol 84. Elsevier, Amsterdam, 1984. p. 51
- [20] Komaromy-Hiller G, Ash KO, Costa R, Howerton K. Comparison of representative ranges based on US patient populations and literature reference intervals for urinary trace elements. *Clin Chim Acta* 2000;296:71
- [21] Caroli S, Alimonti A, Coni E, Petrucci F, Senofonte O, Violante N. The assessment of reference values for elements in human biological tissues and fluids. A systematic review. *Crit Rev Anal Chem* 1994;24:363
- [22] Wandt MAE, Pougnet MAB. Simultaneous determination of major and trace elements in urinary calculi by microwave-assisted digestion and inductively coupled plasma atomic emission spectrometric analysis. *Analyst* 1986;111:1249
- [23] Levinson AA, Nosal M, Davidman M, Prien EL, Stenvenson RG. Trace elements in kidney stones from three areas in the united states. *Invest Urol* 1978;15:270
- [24] Durak I, Kilic Z, Sahin A, Akpoyraz M. Analysis of calcium, iron, copper and zinc contents of nucleus and crust parts of urinary calculi. *Urol Res* 1992;20:23
- [25] Wandt MAE, Underhill LG. Covariance biplot analysis of trace element concentrations in urinary stones. *Br J Urol* 1988;61:474
- [26] Marthel AE, Smith RM. *Critical stability constants*. Plenum Press, New York, 1974
- [27] Isao Y. A spectrophotometric study on the mixed-ligands complexes of Iron(III)-N-(o-hydroxybenzyl)iminodiacetate with several anions. *Kenkyu Hokoku - Kumamoto Kogyo Daigaku* 1994;19:147

*Address for correspondence:* Prof. Dr. M. Valiente, Centre Grup de Tècniques de Separació en Química (GTS), Química Analítica, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Spain  
Phone: +34-93-581-29-03; Fax: +34-93-581-19-85  
E-mail: [Manuel.Valiente@uab.es](mailto:Manuel.Valiente@uab.es)

**ANEXO 8**

## Imágenes de los principales tipos de cálculos renales



**Cálculo papilar de COM**



**Cálculo de cavidad de COM**



**Cálculo de cavidad de COM**



**Cálculo de cavidad de COD**



**Cálculo mixto de COD y HAP**



**Cálculo de HAP**



**Cálculo de estruvita (infeccioso)**



**Cálculo de brushita**



**Cálculo compacto de AUA**



**Cálculo de AUD**



El trabajo que se presenta en esta Tesis se centra en el estudio de la litiasis oxalocálcica como enfermedad que afecta a un gran sector de la población, caracterizada por una alta prevalencia e incidencia, alta morbilidad y altas tasas de recidiva. Aún en la actualidad se desconocen una importante cantidad de aspectos relativos a los mecanismos de formación de los cálculos y su etiología, y en consecuencia no se dispone de las diagnosis ni de los tratamientos terapéuticos eficientes que serían deseables.

Este trabajo intenta abundar en una mejor comprensión de la etiología litiásica mediante el desarrollo de herramientas analíticas para una mayor eficacia en el diagnóstico de las alteraciones urinarias y en la prevención de esta enfermedad. Estos objetivos se han llevado a cabo trabajando a diferentes niveles: 1) Desarrollo de una serie de metodologías analíticas simples aplicables a la determinación de marcadores de la litogénesis. 2) Estudio de la variación temporal (diaria y estacional) del riesgo litógeno. 3) Caracterización *in vitro* de las propiedades inhibitoras de diferentes sustancias. 4) Evaluación de la idoneidad de la orina nocturna como espécimen más adecuado al estudio de las alteraciones responsables de la litogénesis, frente a los inconvenientes que presenta la orina de 24 horas, normalmente utilizada a estos efectos.



Centre Grup de Tècniques de Separació en Química

Universitat Autònoma de Barcelona  
Bellaterra

Membre de:



XARXA DE CENTRES  
DE SUPORT  
A LA INNOVACIÓ  
TECNOLÒGICA