



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS NIVELES URINARIOS DE CITRATO,
OXALATO Y CREATININA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON
HIPERCALCIURIA IDIOPÁTICA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

PAOLA MARIEEL MENDOZA MORQUECHO



MÉXICO, D.F.

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

| | | |
|-----------------------|-----------|----------------------------------|
| PRESIDENTE: | Profesor: | Martha Patricia Neri Paez |
| VOCAL: | Profesor: | Natividad García Escamilla |
| SECRETARIO: | Profesor: | Leonila Irma Laura Escobar Pérez |
| 1er. SUPLENTE: | Profesor: | Ruth Bustamante García |
| 2º SUPLENTE: | Profesor: | Laura Carmona Salazar |

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio 510 del edificio A en la Facultad de Medicina de la UNAM

ASESOR DEL TEMA

Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez

SUPERVISOR TÉCNICO

M. en C. Zinaeli López González

SUSTENTANTE

Paola Marieel Mendoza Morquecho

El financiamiento para la realización de este proyecto fue proporcionado por:

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT

Clave de proyecto: IN214613.

ÍNDICE

| | |
|---|----------|
| I. Abreviaturas..... | 6 |
| II. Introducción: | |
| Resumen..... | 8 |
| Marco Teórico: | |
| 1. Litiasis Renal..... | 9 |
| 2. Prevalencia e incidencia de la litiasis renal..... | 9 |
| 3. Litogénesis..... | 9 |
| 3.1 Cristalogénesis..... | 10 |
| 3.2 Calculogénesis..... | 11 |
| 4. Cálculos renales..... | 12 |
| 5. Etiología..... | 12 |
| 6. Fisiopatología..... | 13 |
| 7. Aumento de solutos..... | 14 |
| 7.1 Hipercalciuria idiopática..... | 14 |
| 7.1.1 Homeostasis del calcio..... | 14 |
| 7.1.2 Mecanismo patogénico de la hipercalciuria idiopática..... | 18 |
| 7.2 Hiperoxaluria..... | 21 |
| 7.2.1 Oxalato..... | 22 |
| 7.2.2 Causas de la hiperoxaluria..... | 24 |
| 7.3 Disminución de solvente..... | 25 |
| 8. Disminución de los inhibidores de la cristalización..... | 25 |
| 8.1 Hipocitraturia..... | 25 |
| 8.1.1 Citrato..... | 25 |
| 8.1.2 Fisiología renal del citrato..... | 26 |
| 8.1.3 Causas de la hipocitraturia..... | 28 |
| 8.1.4 Mecanismo de inhibición del citrato..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 9. Alteración del equilibrio metaestable..... | 31 |
| 9.1 Cambio de pH..... | 31 |
| 10. Cocientes urinarios..... | 31 |
| III. Planteamiento del problema..... | 33 |
| IV. Objetivos..... | 34 |
| Objetivos particulares..... | 34 |
| V. Hipótesis..... | 35 |
| VI. Procedimiento experimental..... | 36 |
| Materiales y equipos..... | 36 |
| Metodología experimental..... | 36 |
| VII. Resultados y discusión de resultados..... | 43 |
| VIII. Conclusiones..... | 53 |
| IX. Perspectivas..... | 54 |
| X. Anexos | |
| Anexo 1: Consentimiento informado..... | 55 |
| Anexo 2: Indicaciones para la toma de muestra urinaria en paciente pediátrico..... | 56 |
| Anexo 3: Protocolo para la conservación de la muestra de orina..... | 58 |
| Anexo 4: Protocolo para cuantificación de creatinina urinaria, mediante test Creatinine- J de Spinreact ®..... | 59 |
| Anexo 5: Protocolo para cuantificación de citratos urinarios con el test ácido cítrico de Boehringer Mannheim / r-Biopharm ®..... | 61 |
| Anexo 6: Protocolo para cuantificación de oxalatos urinarios, mediante el test de oxalato de Trinity Biotech ®..... | 63 |
| XI. Reactivos..... | 65 |
| XII. Bibliografía..... | 66 |

I. ABREVIATURAS

| | |
|---------------|-------------------------------------|
| HI | Hipercalciuria idiopática |
| AGT | Alanina Glioxilato Aminotransferasa |
| ATP-CL | ATP Citrato Liasa |
| BPL | Buenas Prácticas de Laboratorio |
| CaSR | Receptor Sensible a Calcio |
| CAT | Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos |
| CaT1 | Transportador de Calcio 1 |
| CL | Citrato Liasa |
| CLC-Kb | Canal de Cloruro Kb |
| DMAB | Ácido 3-(dimetilamino) benzoico |
| ECaC | Canal Epitelial de Calcio |
| GO | Glicolato Oxidasa |
| GR | Glioxilato Reductasa |
| IL-1 α | Interleucina -1 alfa |
| IL-6 | Interleucina- 6 |
| LDH | Lactato Deshidrogenasa |
| L-MDH | L-Malato Deshidrogenasa |
| L-LDH | L-Lactato Deshidrogenasa |
| MBTH | 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona |

| | |
|------------------|---|
| NADH | Nicotinamida Adenina Dinucleótido |
| NCX | Intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ |
| NKCC2 | Cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ |
| OxCa | Oxalato de Calcio |
| PGE ₂ | Prostaglandina E ₂ |
| PMCA | Calcio ATPasa de la Membrana Plasmática |
| PTH | Hormona Paratiroidea |
| ROMK | Canal de Potasio de la Porción Externa de la Médula Renal |
| RT | Reactivo de Trabajo |
| TCD | Túbulo Contorneado Distal |
| TCP | Túbulo Contorneado Próximo |
| TNF | Factor de Necrosis Tumoral |
| UI | Unidades Internacionales |
| VDR | Receptor de Vitamina D |
| VR | Valor de Referencia |

II. INTRODUCCIÓN

RESUMEN

La litiasis renal es una entidad clínica que se caracteriza por la aparición de piedras (cálculos o litos) en el aparato urinario. Se produce una orina litogénica cuando la orina es muy alcalina, o demasiado ácida, se consumen pocos líquidos, o hay un defecto en la excreción de sustancias que evitan la formación de piedras.

En México la litiasis renal es muy frecuente y puede presentarse desde la infancia hasta la vejez. El Hospital General de México reportó una frecuencia de 10-12 % en el 2007.

Una de las causas más comunes de la litiasis renal en la edad pediátrica es la hipercalciuria idiopática (HI), la cual es una anomalía metabólica caracterizada por el aumento en la eliminación calcio vía renal, en ausencia de hipercalcemia y de otras causas conocidas de hipercalciuria. La HI con mayor frecuencia favorece la formación de piedras de oxalato de calcio que son los cálculos que se presentan con mayor frecuencia.

Tanto en pacientes con sospecha de litiasis renal como en aquellos con HI es importante evaluar los niveles de los inhibidores y promotores de la cristalización, como son el citrato y el oxalato, ya que la concentración disminuida o elevada, respectivamente, favorece la formación de cálculos renales.

MARCO TEÓRICO

1. Litiasis renal

La litiasis renal es la presencia de cálculos que se forman en el aparato urinario, según define la OMS. Dependiendo de su localización se puede distinguir dos clasificaciones de la litiasis renal, la nefrolitiasis (cálculos en riñón y pelvis renal) y la urolitiasis (vías urinarias inferiores).

La litiasis renal es un proceso físico y químico el cual involucra una cascada de eventos que inician desde el filtrado glomerular en la nefrona, y que va desarrollándose en las cavidades renales debido a sobresaturación de sales que se precipitan en la orina formando cristales o núcleos, los cuales pueden fluir o quedarse retenidos en estas cavidades, promoviendo el crecimiento y la agregación de solutos, hasta formar el cálculo [7].

2. Prevalencia e incidencia de la litiasis

La prevalencia mundial varía de cuatro a diecisiete casos por cada mil habitantes (0.4 -1.7 %) y presenta una incidencia del 1 % anual en países industrializados. En nuestro país el Hospital General de México estima una incidencia de 24 casos por cada 10,000 habitantes (0.24%). En el estado de Yucatán se reporta una prevalencia de 10.3 % [11].

3. Litogénesis

La litogénesis es el término con el cual se designa al conjunto de procesos fisicoquímicos y biológicos que se producen desde la sobresaturación de la orina hasta la formación de un cálculo urinario.

La litogénesis se divide en dos etapas, la cristalogénesis y calculogénesis [6].

3.1. Cristalogénesis

Es un proceso multifactorial que se puede presentar en personas sanas como en aquellas que presentan litiasis, y cuyo objetivo principal es reducir la sobresaturación de la orina por uno o más solutos que se encuentran en ella en concentraciones excesivas. Consta de cuatro fases:

Y Fase 1. Sobresaturación de la orina por una o más sustancias cristalizables.

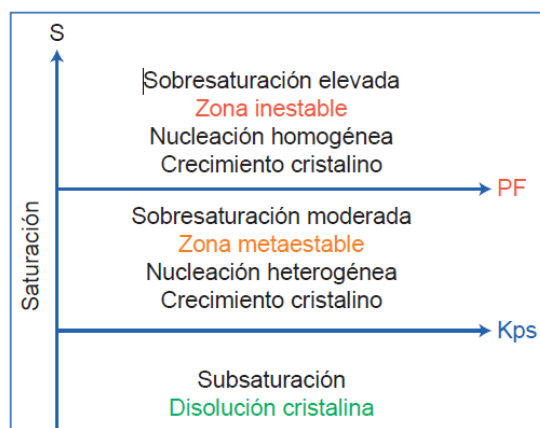


Figura 1. Niveles de saturación urinaria y consecuencia sobre la saturación (M. Daudn, 2014). El producto de formación (PF), corresponde al nivel de sobresaturación a partir del cual los cristales pueden formarse con rapidez. El producto de solubilidad (Kps) representa la concentración máxima soluble de una determinada especie cristalina.

Y Fase 2. Nucleación cristalina, es el paso al estado sólido de la especie que está sobresaturada [6,8].

Y Fase 3. Crecimiento cristalino, la fase donde hay un aumento en el tamaño del cristal sobre otras redes cristalinas [40].

Y Fase 4. Agregación cristalina, en esta fase se generan agregados de partículas cristalinas con macromoléculas urinarias [6].

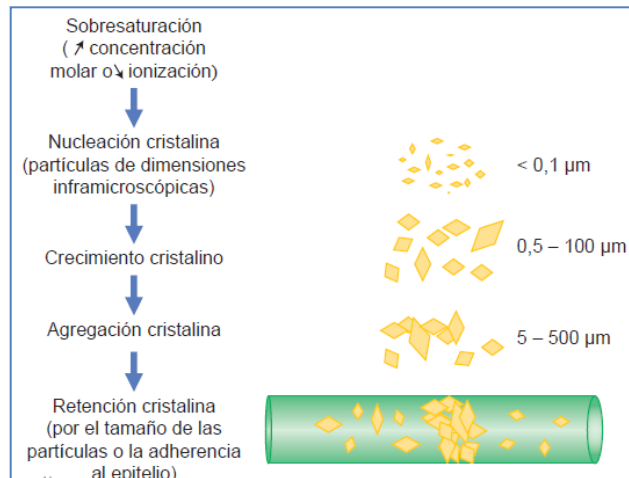


Figura 2. Litogénesis (M. Daudon, 2014)

3.2. Calculogénesis

Es la etapa propia de las personas con litiasis. En la calculogénesis se da una fase conocida como retención de los cristales, que constituye la etapa de formación del cálculo [6].

Para la retención de los cristales se han propuestos dos mecanismos generales: hipótesis de la partícula libre e hipótesis de la partícula fija.

Y Hipótesis de la partícula libre: La etapa de cristalogénesis se da en la luz tubular resultando en el atrapamiento del cristal en el conducto colector papilar y con ello la formación del cálculo.

Y Hipótesis de la partícula fija: Los cristales se adhieren a una superficie subyacente, como las células epiteliales del túbulo colector o a la punta de la papila. Esta adherencia puede verse facilitada debido a un defecto en la producción del glucocáliz, por agresión química o física previa, o por las placas de Randall (ruptura del epitelio papilar donde desembocan los túbulos colectores) [6,8].

Otro proceso que ocurre en la calculogénesis es la conversión de los cristales. Ejemplo de ello es la conversión de weddellita ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a whewellita, ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) por efectos de estabilidad termodinámica [6,10].

4. Cálculos renales

Los cálculos o litos son el resultado de todo el proceso litogénico que se lleva a cabo en la nefrona y en el sistema colector del riñón [3]. Dependiendo del tipo de cálculo renal, su etiología es variable.

Tabla 1. Tipo y frecuencia de los diferentes cálculos renales (López J, 2015; Arias J, 2000).

| Tipo | Frecuencia (%) | Etiología |
|-------------------|----------------|---|
| Oxalato de calcio | 31 | Hiper calciuria-hiperoxaluria, hiperuricosuria, hipocitraturia, hipomagnesuria, volumen urinario bajo |
| Fosfato de calcio | 8 | Hiperparatiroidismo primario, ATR (acidosis tubular renal), tratamiento alcalinizante con sodio |
| Ácido úrico | 6 | Diátesis gotosa, hiperuricosuria, síndrome diarreico crónico, deshidratación, pH urinario bajo |
| Otros | 6 | Depende del tipo de composición |
| Estruvita | 4 | Infecciones urinarias |
| Cistina | 2 | Cistinuria |

5. Etiología

La litiasis renal es una enfermedad multifactorial, la cual está influenciada por aspectos raciales, geográficos, hereditarios [11] y dietéticos que desembocan en trastornos del metabolismo primario. Entre las alteraciones más sobresalientes se encuentran la hiper calciuria (61%), la hiperuricosuria (36%), la hipocitrauria (31%), la hiperoxaluria (8%), la hipofosfaturia, la hiperacidez o la hiper alcalinidad [4, 6, 12, 15]. Las enfermedades que se asocian con un alto riesgo de producir estos desordenes metabólicos son la HI, el hiperparatiroidismo, la sarcoidosis, la enfermedad de Crohn, la acidosis tubular renal (prevalencia baja), la gota, las infecciones urinarias

de repetición, la hiperoxaluria primaria, entre otras [12,13]. También se han reportado anomalías anatómicas asociadas a la formación de cálculos [13].

Estas enfermedades solas o conjuntamente pueden dar como consecuencia la alteración del metabolismo primario. La alteración se ve reflejada en un desequilibrio, lo cual aumenta los factores de riesgo (aumento en promotores de la cristalización y/o disminución de inhibidores de la cristalización) para la formación de cálculos. Dentro de estas enfermedades la causa más frecuente para la formación de cálculos renales es la HI con un 40 % en la edad pediátrica y 60 % en la edad adulta [1].

Tabla 2. Promotores e inhibidores urinarios de la cristalización del oxalato de calcio (Riella M, et al 2003; Daudon M, 2014).

| Promotores | Inhibidores | |
|---------------------|--|---|
| | Inhibidores de Bajo peso molecular (<1000 dalton) | |
| | Cationes | Aniones |
| Calcio | * Magnesio ^{N,C} * Zinc | * Citrato ^{N,C,A} * Isocitrato |
| Oxalato | * Aluminio * Hierro | * Fosfocitrato * Pirofosfato ^{C,A} |
| Ácido úrico | | * Glutamato * Aspartato * Succinato * Tartato |
| | Inhibidores de alto peso molecular (<10000 dalton) | |
| Sodio | Glucosaminoglucanos ^{N,C,A}: | |
| Volumen urinario | * Sulfato de condroitina * Sulfato de heparán * Sulfato de dermatán * Ácido hialurónico | Proteínas: * Uropontina * Calprotectina * Fibronectina * Bikunina * Proteína de Tamm-Horsfall ^A * <i>Crystal adhesion inhibitor</i> |

Nota: Mecanismo de inhibición: **(N)** Inhibición de la nucleación. **(C)** Inhibición del crecimiento cristalino. **(A)** Inhibición de la agregación [40].

6. Fisiopatología

Los agentes etiológicos de la litiasis renal actúan fundamentalmente aumentando la concentración de solutos, alterando el equilibrio metaestable o bien disminuyendo los inhibidores de la cristalización [16]. La causa principal que altera la concentración de los solutos es la HI, por aumento de calcio en la orina. También influye el consumo

de líquidos y factores dietéticos. Otra causa es el aumento de oxalato. Una de las causas de alteración del equilibrio metaestable puede estar dada por cambios en el pH que favorecen la formación de litos, y por la disminución de inhibidores de la cristalización, que mantiene en solución a las sales y evitan que se forme el cálculo.

7. Aumento de solutos

7.1. Hipercalciuria

La HI es una anomalía metabólica de origen genético caracterizada por un aumento mantenido de la eliminación urinaria de calcio, en ausencia de hipercalcemia y de otras causas conocidas de hipercalciuria. La HI se diagnostica cuando los valores de calcio en la orina son mayores de 4 mg/kg/día ^[1]. Otro criterio utilizado es el cociente calcio/creatinina en orina recolectada en ayunas > 0.80 mg/g en niños de 0 a 6 meses; > 0.60 mg/g en niños de 7-12 meses; > 0.50 mg/g en niños de 12-24 meses y > 0.21 mg/g en niños \geq 2 años ^[1, 2, 28].

7.1.1. Homeostasis del calcio

El calcio es el catión divalente más abundante en el cuerpo. En la economía corporal se encuentra el 99% contenido dentro del tejido óseo en forma de hidroxapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) y calcio amorfo (CaHPO_4 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), este último en una menor proporción comparado con el primero ^[17,18]. Aproximadamente el 1% del calcio total se encuentra circulando en la sangre. Del calcio circulante, 40% se encuentra unido a proteínas (como albumina y globulinas), 47% circula en su forma ionizada, es biológicamente activo y el 13% se encuentra formando diferentes complejos ^[17]. Existen tres órganos blancos a través de los cuales se lleva a cabo un flujo importante de calcio con el fin de mantener las concentraciones intracelulares y extracelulares dentro de límites de normalidad: intestino (absorción), túbulos renales (reabsorción) y hueso (resorción) ^[3].

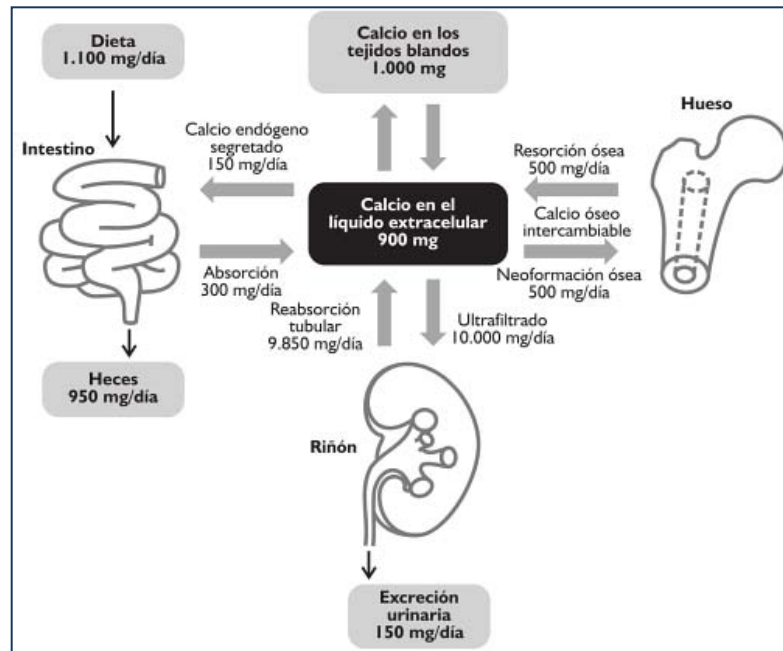


Figura 3. Balance normal de calcio en el adulto (Gal B, et al 2007).

Y Calcio intestinal

De la cantidad total de calcio ingerido en la dieta (aproximadamente 1 g por día) solo se absorben 300 mg de este en el intestino delgado y en el colon. El calcio ingerido se disocia por el ácido del estómago y permite su absorción en el intestino delgado (principalmente duodeno), se absorbe como catión divalente. Esta absorción se da por dos vías, la transcelular saturable y paracelular no saturable.

La vía transcelular predomina cuando existe una ingesta baja de calcio. Es un transporte activo, en donde el Ca^{2+} se une a transportadores proteicos como CaT1, ECaC (o también nombrado TRPV 5) en el borde de la membrana del enterocito, una vez dentro del enterocito, el Ca^{2+} es transportado por una proteína denominada Calbindina $\text{D}_{9\text{K}}$ hacia la membrana basolateral, seguido a ello el Ca^{2+} utiliza un transportador para su absorción hacia el torrente sanguíneo (PMCA, que es una ATPasa), y su mecanismo es dependiente de vitamina D.

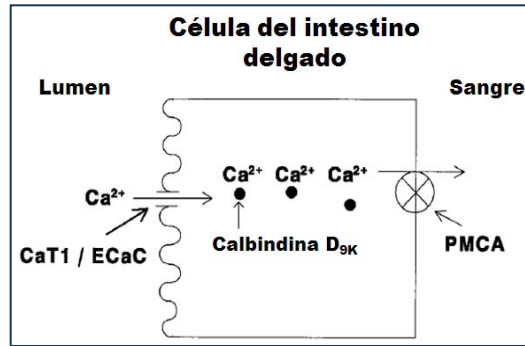


Figura 4. Transporte intestinal de Ca^{2+} (Modificado de Frick K, *et al* 2003).

La vía paracelular es un proceso pasivo que se da cuando existe una ingesta excesiva de calcio y, en consecuencia, se satura el transporte activo. Esta vía es una difusión simple de Ca^{2+} entre las uniones intercelulares [3, 18, 19,21].

Y Calcio en hueso

El hueso no es metabólicamente inerte, en él existen mecanismos independientes pero relacionados entre sí para el aporte de calcio al líquido extracelular. Uno de ellos es la regulación del calcio en el plasma con la introducción y extracción de 500 mg/día de calcio amorfo que es rápidamente intercambiable e independiente de la acción de hormonas tales como la paratiroidea (PTH) [18].

Otro proceso involucrado es la remodelación ósea por la acción de hormonas que activan a los osteoclastos y osteoblastos. El osteoclasto secreta protones y enzimas proteolíticas que disuelven las sales óseas y el colágeno presente, los residuos se internalizan y transportan por éste hacia la sangre. Después de la acción del osteoclasto, el osteoblasto deposita colágeno y polisacáridos. Seguido al proceso osteoblástico se deposita calcio y fósforo que consecuentemente se transformara en hidroxiapatita; cabe mencionar que es un proceso continuo y dinámico [19,20].

Y Calcio renal

Diariamente se filtran unos 10 g de calcio (iónico y unido a proteínas), de los cuales se reabsorbe el 98% y el 2% restante se excreta en la orina. El 70 % del calcio

filtrado se reabsorbe en el túbulo contorneado proximal mediante un mecanismo paracelular pasivo, el cual se da por arrastre de disolvente.

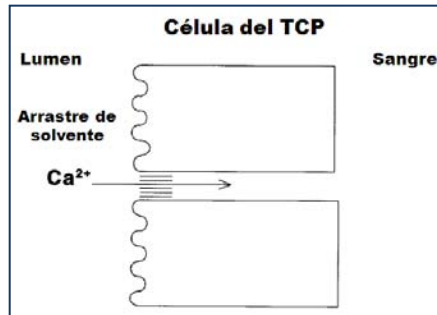


Figura 5. Reabsorción renal de Ca^{2+} en el túbulo contorneado proximal (Modificado de Frick K, et al 2003).

Un 20 % adicional del calcio filtrado se reabsorbe en el asa ascendente gruesa de Henle mediante un proceso paracelular y en menor medida por un proceso transcelular. El proceso paracelular se da por que existe una tensión positiva en el lumen debido a la reabsorción de $Na^+/K^+/2Cl^-$ por el transportador NKCC2. Para mantener una concentración intracelular baja de Na^+ y Cl^- , se activa una Na^+/K^+ -ATPasa de membrana basolateral que introduce K^+ a la célula y saca Na^+ hacia la sangre; para pasar el cloro a la sangre se expulsa mediante un canal denominado CLC-Kb. El potasio se excreta mediante un canal denominado ROMK, crea un voltaje positivo en el lumen tubular que impulsa la reabsorción de Ca^{2+} hacia la sangre a través de las uniones estrechas, compuestas en gran parte por paracelina-1. El sensor de calcio (CaSR) regula la actividad del ROMK y NKCC2. Si la concentración de calcio en el plasma aumenta, se activa el sensor para inhibir la actividad de los transportadores y ocasionar pérdida urinaria de calcio. Los CaSR se asocian a proteínas G inhibitorias "Gi" que, al activarse, reducen la producción de AMPc y, por lo tanto, la expresión del transportador de Ca^{2+} .

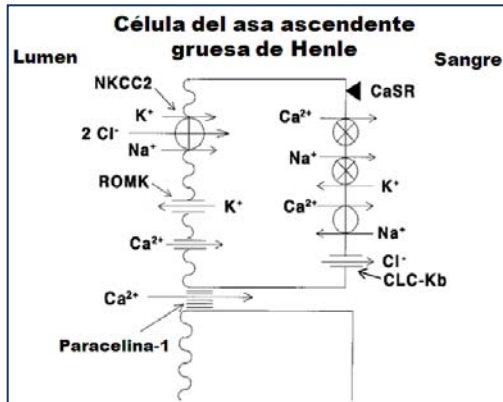


Figura 6. Reabsorción renal de Ca^{2+} en el asa ascendente gruesa de Henle (Modificado de Frick K, *et al* 2003).

El 8 % restante del calcio se reabsorbe en el túbulo contorneado distal (TCD) y túbulo colector (TC) de forma transcelular. [3, 21]. El Ca^{2+} se une al canal apical ECaC, quien lo internalizará a la célula, seguido a ello el Ca^{2+} es trasladado hacia el transportador basolateral PMCA y NCX (Intercambiador de Na^+/Ca^{2+}) mediante la proteína Calbindina D_{28K} [21].

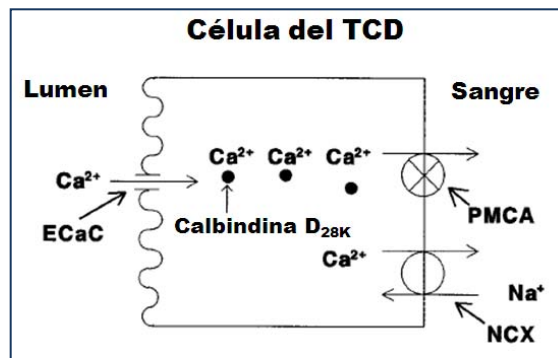


Figura 7. Reabsorción renal de Ca^{2+} en el TCD (Modificado de Frick K, *et al* 2003).

7.1.2. Mecanismos patogénicos de la HI

La patogenia de la HI es muy compleja, en los últimos años se ha propuesto un gran número de mecanismos para poder explicar su origen. Estos mecanismos involucran tres sitios de importancia reconocida para el aumento de la calciuria, uno de ellos es a nivel intestinal, donde existe un aumento en la absorción de calcio, que trae como consecuencia un aumento momentáneo de la calcemia y se restaura con el filtrado

glomerular. El otro sitio donde se regula la concentración de calcio urinario es el riñón por reabsorción tubular y, por último el hueso, donde existe una mayor resorción ósea, donde se libera el calcio.

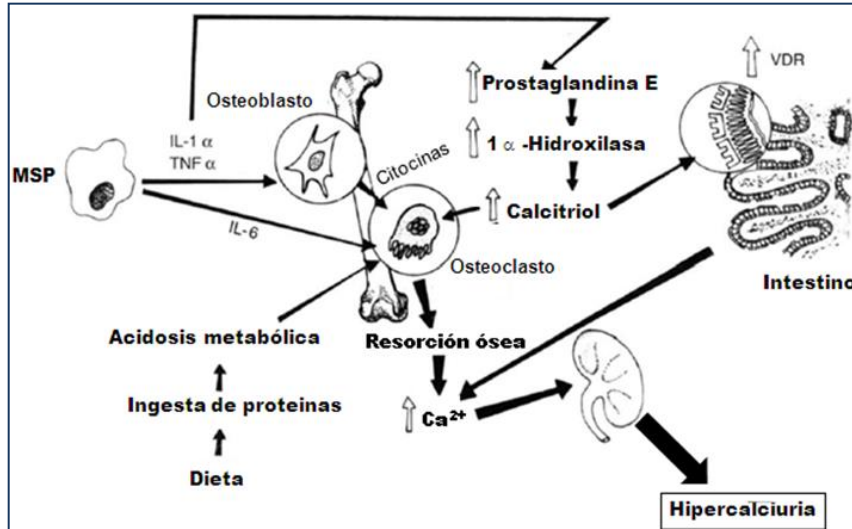


Figura 8. Mecanismo patogénico de la HI (Modificado de Weisinger J, 1996)

Se ha propuesto una gran variedad de estados que promueven la HI, entre uno de los más sobresalientes e importantes es el aumento de receptores de vitamina D (VDR) con niveles normales de calcitriol, hallado en un modelo animal que mostraba hipercalciuria (ratas GHS, *Genetic Hypercalciuric Stone-Forming*) [51]; el aumento se debe a que se extiende la vida media de los receptores. En contraste, en el humano con HI los niveles de calcitriol son elevados [57].

a) Incremento de receptores de vitamina D.

El incremento de receptores de vitamina D aumentan la capacidad funcional del complejo calcitriol-VDR [52], a través de la sobreexpresión de genes dependientes de vitamina D que codifican proteínas involucradas en el transporte de calcio [53]. Los sitios en donde hay aumento de los receptores son el hueso, intestino, riñón y monocitos.

En la investigación de Pacifit y colaboradores [1], se encontró que los pacientes con HI poseen una cantidad elevada de monocitos los cuales producen una cantidad

acrecentada de diversas citocinas, tales como IL-1 α , IL-6, el factor estimulante de colonias de los granulocitos-macrófagos o el factor de necrosis tumoral- α (TNF). Estas citocinas estimulan la regulación del ligando RANK-L, que se une a la proteína transmembranal (RANK) del precursor del osteoclasto, el resultado de esta unión es la diferenciación del osteoclasto hacia una forma madura y funcional, lo que aumenta la resorción ósea (disminución de masa ósea), por ende, el aumento de la calciuria [20]. El complejo calcitriol-VDR actúa sobre los monocitos estimulando la producción de las citocinas y a los osteoclastos jóvenes para que maduren [54,55], produciendo la resorción ósea con la consecuente liberación del calcio hacia la circulación lo que aumenta la calciuria.

Los monocitos producen IL-1, que estimula la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂), lo que a su vez estimula a la 1 α -hidroxilasa que incrementa la síntesis del calcitriol [1, 5, 24]. El calcitriol tiene efectos activadores en el osteoclasto, a nivel del enterocito y en las células tubulares renales.

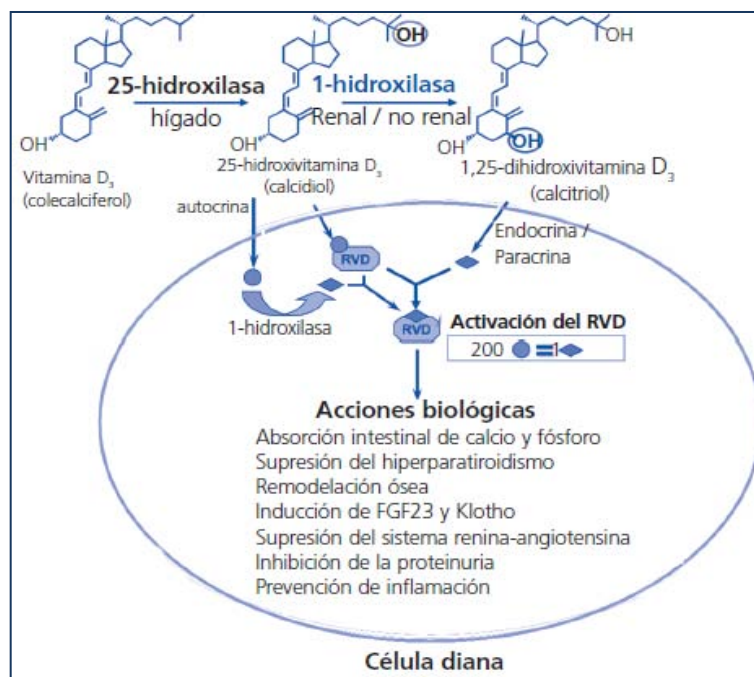


Figura 9. Biosíntesis de la vitamina D (Velásquez F, et al 2006). Para producir vitamina D el colesterol se fragmenta fotoquímicamente mediante la acción de los rayos UV y se produce la vitamina D₃ (colecalfiferol) que es biológicamente inactiva y sufre la primera hidroxilación en el hígado por la acción de la 25-hidroxilasa, dando como producto a la 25-hidroxitamina D₃ (calcidiol),

seguido a ello se da una segunda hidroxilación en el riñón (túbulo contorneado proximal) por la 1 α -hidroxilasa que forma el 1,25-dihidroxitamina D₃ (calcitriol) que es una hormona con actividad biológica que se une y activa al VDR (receptor de vitamina D) y este desencadena diversas acciones biológicas en la célula diana.

Las proteínas que se sobre expresan por el gran número de receptores en el intestino y túbulo contorneado distal son las calbindinas y los transportadores de calcio (ECaC y CaT1) [26, 27, 53, 56].

b) Otras causas asociadas

- El exceso de ingesta de proteínas animales reduce el contenido mineral óseo, esto por la acción buffer del hueso, debido al intercambio de los iones calcio por el exceso de iones hidrogeno que aporta la dieta ácida [28].
- El consumo alto de sodio inhibe la reabsorción tubular de calcio.
- La pérdida renal de fosfato disminuye los niveles de fosfatemia, incrementando de forma secundaria el aumento de calcitriol.
- La disminución primaria de la reabsorción tubular renal de calcio, acompañada de hiperparatiroidismo secundario.

7.2. Hiperoxaluria

La hiperoxaluria, es la excreción urinaria de oxalato mayor a 40 mg/día o también se puede definir con el cociente oxalato/creatinina cuando este es > 325 mmol/mol en niños de 0 a 6 meses; >132 mmol/mol en niños de 7 a 24 meses; > 98 mmol/mol en niños de 2 a 4.9 años; > 70 mmol/mol en niños de 5 a 9 años; > 53 mmol/mol en niños de 12 a 14 años y > 64 mmol/mol en niños mayores 14 años [29, 50].

La concentración elevada de oxalato y calcio producen la saturación de la orina lo que estimula el desarrollo de cálculos de oxalato de calcio (OxCa) [29].

7.2.1. Oxalato

El oxalato ($C_2O_4^{2-}$) es la sal del ácido oxálico y tiene una notable afinidad por los cationes divalentes, tales como el Ca^{2+} y Mg^{2+} [31, 33].

El metabolismo del oxalato es diferente al del calcio, aproximadamente 20 % del oxalato proviene de la dieta y el 80 % restante de vías endógenas [29].

a) Oxalato exógeno

El oxalato se absorbe por difusión pasiva en el tubo digestivo (50% en intestino delgado y 50 % en el colon). Los individuos con cálculos de oxalato e hiperoxaluria absorben más oxalato en respuesta a una carga mineral proveniente de la dieta, los factores que influyen en la absorción de oxalato son los cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+}) y bacterias degradadoras de oxalato (*Oxalobacter formigenes*). La cantidad de oxalato ingerido en la dieta se excreta casi completamente por la orina (98%) [29,32].

b) Oxalato endógeno

1. Biosíntesis del oxalato a partir de glioxilato

Un 40% del oxalato endógeno se produce en el hígado a partir del glioxilato. El glioxilato es una molécula generada del metabolismo intermedio de la glicina, hidroxiprolina y glicolato [29, 34]. La destoxicación del glioxilato se realiza mayormente en el peroxisoma del hepatocito humano por la enzima Alanina Glioxilato Aminotransferasa (AGT), convirtiendo el glioxilato en glicina. La vitamina B6 actúa como cofactor. En condiciones normales el glioxilato es transformado en oxalato mediante la Glicolato Oxidasa (GO) en el peroxisoma hepático o por medio del Lactato Deshidrogenasa (LDH) en el citosol. El glioxilato también puede ser reducido a glicolato en el citosol mediante la Glioxilato Reductasa (GR) [29, 32-36].

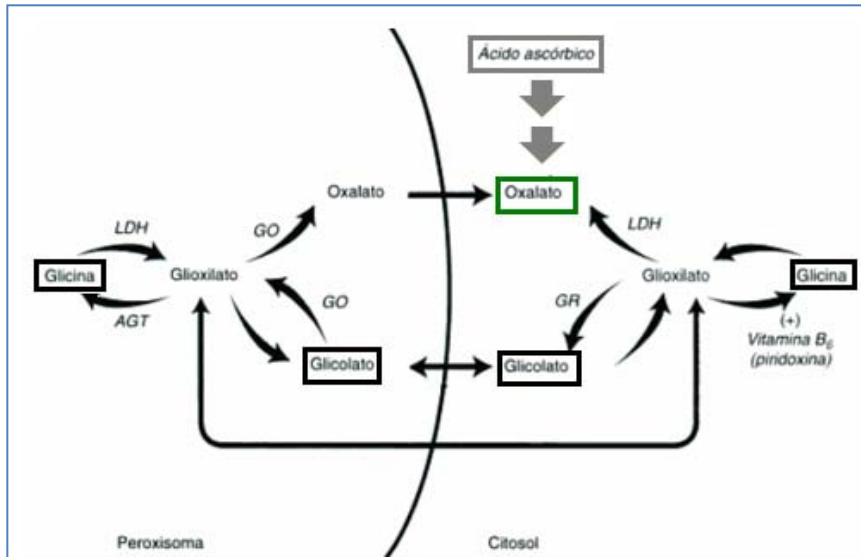


Figura 10. Biosíntesis del oxalato en hepatocito humano (Modificado de Wein A, *et al* 2008).

El oxalato no puede ser metabolizado ni ligado a proteínas en los mamíferos. Es filtrado por el glomérulo y también secretado por el túbulo, eliminándose sin cambios por vía renal [35].

2. Catabolismo del ácido ascórbico

El ácido L-ascórbico proveniente de la dieta se absorbe a través del intestino por transporte pasivo simple, después de su absorción se distribuye en el plasma y en todas las células. En las células hepáticas el sistema enzimático P-450 promueve la oxidación del ácido L-ascórbico produciendo ácido dehidroascórbico, el cual es posteriormente oxidado a ácido oxálico pasando por ácido diceto-L-gulónico [32, 37, 38].

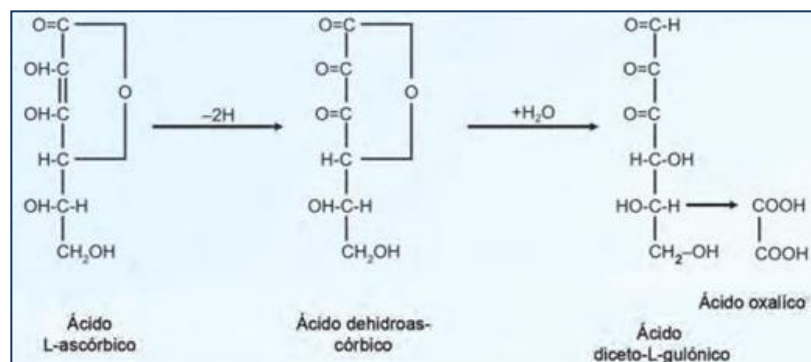


Figura 11. Oxidación del ácido ascórbico (Modificado de Vasudevan D, *et al* 2012)

7.2.2. Causas de la hiperoxaluria

a) Hiperoxaluria primaria.

Tipo 1: Esta patología es debida a un trastorno autosómico recesivo raro en el metabolismo del glioxilato (evita la transformación de glioxilato a glicina) y genera una conversión oxidativa preferencial del glioxilato a oxalato. Esto se debe a la mutación en el gen que codifica a la AGT (sustitución de glicina por arginina) y genera una enzima sin actividad.

Tipo 2: Es una mutación en el gen que codifica la GR hepática, estimulando la conversión del glioxilato citoplasmático a oxalato.

Estas mutaciones solas o en conjunto aumentan la concentración de oxalato (> 100 mg/día) [29].

b) Hiperoxaluria entérica

Es la causa más frecuente de hiperoxaluria, está asociada a estados diarreícos crónicos en los que la mala absorción de grasas induce la saponificación de los ácidos grasos con cationes divalentes disminuyendo la formación de complejos de oxalato de calcio y aumenta la biodisponibilidad del oxalato [4,29].

c) Hiperoxaluria dietética

Esta se da por el consumo de alimentos ricos en oxalato entre ellos está el consumo de proteínas de origen animal y suplementos de ácido ascórbico [29]. También influye el tipo de sal en la que se halla el oxalato, esto determina su absorción, ya que se puede presentar en forma soluble (sales de oxalato de sodio o de potasio) o insoluble (OxCa) [4].

La *Oxalobacter formigenes* es un microorganismo de biota normal en el intestino humano, modula la concentración del oxalato y la biodisponibilidad de este, mediante la degradación del oxalato a formas más simples (CO₂, formato) [29, 30, 31].

7.3. Disminución de solventes acuosos

La disminución de solventes acuosos tales como el agua, originado por la ingesta insuficiente de agua, así como sudoraciones profusas, desencadenan la precipitación de los solutos, tales como el calcio y el oxalato, entre otros. Esto porque al disminuir el solvente aumenta la concentración de los solutos que están presentes a nivel tubular, dando paso a una orina saturada o sobresaturada que promoverá el proceso de litogénesis [49].

8. Disminución de los inhibidores de la cristalización

Uno de los inhibidores más importantes de la cristalización es el citrato que tiene su acción localizada a nivel del túbulo contorneado proximal.

8.1. Hipocitraturia.

La hipocitraturia se define como una concentración urinaria de citrato menor a 320 mg/día o un cociente citrato/creatinina inferior a 400 mg/g en niños [5, 29].

8.1.1. Citrato

El ácido cítrico es un ácido tricarboxílico con pKa de 2.9, 4.3 y 5.6. Por lo tanto a pH fisiológico (7.4) más del 90% se encuentra como anión trivalente (citrato³⁻) [43]. La concentración plasmática de citrato es de 0.14 mM y circula unido a diversos cationes (Na⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺) o a grandes moléculas [39].

La gran mayoría de citrato plasmático tiene un origen endógeno siendo sus principales fuentes el hueso, el metabolismo intermedio hepático y muscular. Existe

una cantidad de citrato proveniente de la dieta que es de aproximadamente 4 g, pero este citrato exógeno no tiene efecto sobre las concentraciones plasmáticas, ya que al ser absorbido en el tracto gastrointestinal es rápidamente metabolizado a nivel hepático. Solo una sobrecarga oral de citrato incrementaría transitoriamente los niveles plasmáticos, como las sales de citrato [43].

a. Citrato endógeno

La principal fuente de citrato se consigue del metabolismo endógeno procedente de la primera reacción del ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs). El citrato se utiliza preferentemente en dos órganos: hígado y riñón. Cuando se llega a almacenar, éste se deposita en el hueso, que es su principal reservorio. Aproximadamente un 90% del citrato se encuentra en el hueso. El 1% del peso óseo corresponde a citrato y sus depósitos son movilizados fundamentalmente por los estrógenos, PTH y vitamina D [44].

El ciclo de Krebs se lleva a cabo en la mitocondria, el piruvato proveniente de la glucólisis se descarboxila produciendo Acetil-CoA y CO₂. El Acetil-CoA inicia el ciclo de Krebs al condensarse con el ácido oxaloacético, esta reacción es catalizada por la enzima Citrato Sintasa, produciendo ácido cítrico, a través de una serie de reacciones el citrato se convierte nuevamente en oxaloacetato, donde termina el ciclo [45].

8.1.2. Fisiología renal del citrato

El 90% del citrato total se filtra libremente por el riñón, del cual alrededor del 75% es reabsorbido en el túbulo contorneado proximal y el 25% restante se excreta en la orina.

a. Reabsorción de citrato en la membrana apical del túbulo contorneado proximal

El citrato libre se filtra en el glomérulo, y pasa a la luz tubular; dependiendo del pH existente en esta zona se encontrara que predomina una especie más que la otra [39,42].

El proceso de reabsorción se estimula por pH bajos intracelulares, dado que el citrato para ser transportado debe de estar en su forma divalente (citrato²⁻). Cuando el pH es alcalino, el transportador se encuentra inhibido y el citrato está en su mayoría completamente disociado en su forma trivalente (citrato³⁻) no reabsorbible. Por tanto, en situaciones de acidosis metabólica se facilita la entrada del citrato en la célula tubular incrementándose su proceso oxidativo en la mitocondria y disminuyendo el citrato urinario [42].

La reabsorción de citrato²⁻ se da en la membrana apical de las células del túbulo contorneado proximal, en un proceso dependiente de pH (estado de acidosis) y de Na⁺. El mecanismo implicado es el transporte de una molécula de citrato²⁻ por cada 3 iones sodio al interior de la célula, donde se genera una carga positiva, que se contrarresta con una bomba Na⁺/K⁺ ATPasa localizada en la membrana basolateral, esto para mantener la electroneutralidad de la célula [43,44]. El citrato que ingreso a la célula se transporta del citoplasma hacia la mitocondria por un transportador de ácidos tricarboxílicos. Además de la acidosis intracelular va a aumentar la metabolización intramitocondrial del citrato (ciclo del ácido cítrico) [39,46].

El complejo calcitriol-VDR está involucrado en el control genómico y no genómico que modula directamente el metabolismo intracelular del citrato y en la expresión de enzimas que participan en su transporte. El receptor de vitamina D está implicado en la regulación de la vía de las proteínas cinasas que modula la función del cotransportador 3Na⁺/citrato²⁻ [58,59].

b. Remoción peritubular en el túbulo contorneado proximal

En la membrana basolateral se localiza un transportador de citrato³⁻ que depende de sodio. A diferencia del la reabsorción en la membrana apical este cotransportador es independiente del pH [47].

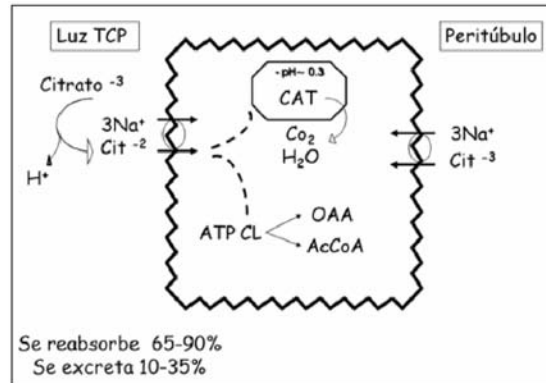


Figura 12. Reabsorción de citrato en túbulo contorneado proximal (TCP) en la membrana apical y basolateral (Del Valle, et al 2013) Una vez que el citrato ingreso a la célula puede ser metabolizado en: A) La mitocondria, donde entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) produciendo CO₂ y H₂O. B) En el citoplasma en donde el citrato es transformado en oxaloacetato y acetil coenzima A por la acción enzimática de la ATP Citrato Liasa (ATP CL).

8.1.3. Causas de la Hipocitraturia

La concentración urinaria baja de citrato se puede deber a diversos estados patológicos o nutricionales asociados con el balance ácido-base, ya que cuando se acidifica la orina aumenta la reabsorción de citrato:

- Y Estados diarreicos crónicos que se asocian a la pérdida de sustancias alcalinas por vía intestinal a través de las heces.
- Y Factores dietéticos: consumo de proteínas de origen animal que aumenta la acidez, menor absorción gastrointestinal de sustancias alcalinas, consumo excesivo de sodio (posiblemente por bicarbonaturia resultado de la expansión del líquido extracelular provocada por el exceso de sodio, que provoca una leve acidosis) [41].

- Y Estados de hipocalcemia que producen acidosis intracelular que aumenta la actividad de la de la ATP Citrato Liasa y aumenta la velocidad de reabsorción en la membrana apical (posiblemente por el aumento del número de transportadores de $3\text{Na}^+/\text{citrato}^{2-}$) [29, 39, 48].
- Y El ejercicio físico intenso (aumento de ácido láctico) y el ayuno prolongado disminuyen la excreción de citrato al aumentar su reabsorción a nivel del túbulo contorneado proximal, por acidosis sistémica.

Entre otras causas que se pueden favorecer una concentración urinaria baja de citratos:

- Y Infecciones bacterianas, que provocan la disminución de citrato, no está relacionada con el manejo renal del citrato. Existen algunas bacterias que degradan el citrato mediante enzimas y el producto resultante es utilizado como sustrato para el desarrollo de estas.
- Y Consumo de medicamentos que tienen entre sus principios activos tiazidas (provocan hipocalcemia) e inhibidores de la enzima convertidores de angiotensina (disminución del pH intracelular) [41].

8.1.4. Mecanismo de inhibición del citrato

El citrato es un inhibidor importante que puede reducir la formación de cálculos de calcio por varios mecanismos.

- a. Formación de complejos de calcio.

El citrato²⁻, forma complejos con el Ca^{2+} urinario y da como resultado una sal soluble, citrato de calcio. La solubilización del calcio iónico disminuye la saturación urinaria [39]. Esto provocara que exista una menor disponibilidad del ion para formar complejos insolubles con oxalato o fosfato.

b. Inhibición de la nucleación del OxCa.

Tanto el citrato como otros inhibidores de la nucleación homogénea o heterogénea (*Tabla 2*) son especies capaces de unirse a los núcleos cristalinos en formación, impidiendo que alcancen el tamaño crítico e inicien la formación de un nuevo cristal.

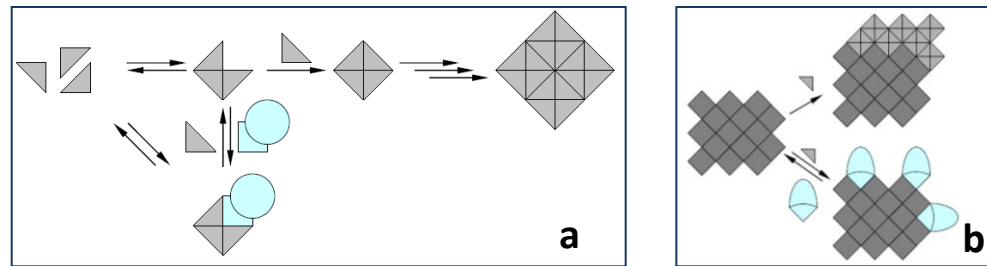


Figura 13. Mecanismo de inhibición de la nucleación (Muñoz, J. 2004). a) Nucleación homogénea, b) Nucleación heterogénea.

c. Inhibición de la agregación, crecimiento y sedimentación de los cristales de OxCa

Otro mecanismo de inhibición del citrato es evitar la agregación de cristales preformados de OxCa, especialmente la especie trivalente. Se une a la superficie de los cristales y forma un complejo OxCa-citrato impidiendo de esta manera la agregación de cristales ^[39]. Por lo cual el citrato y otros inhibidores del crecimiento cristalino son 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.

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 ^[40].

9. Alteración del equilibrio metaestable

9.1. Cambio de pH

Los cambios en el pH alteran las concentraciones de los inhibidores de la cristalización o la solubilización de las sales litogénas, alterando uno de los equilibrios de estas sustancias (metaestabilidad) ^[49].

Todos los trastornos que predispongan a una disminución del pH urinario pueden predisponer a la formación de cálculos. La acidosis aumenta la resorción ósea y eliminación de calcio por vía renal.

Por otra parte, en cálculos no cálcicos se puede ver que estos favorecen la formación de cálculos de OxCa. Ejemplo de ello es que a $\text{pH} < 5.5$ el ácido úrico se encuentra en forma no disociada, lo que estimula a la formación de cálculos de ácido úrico. Conforme se da la formación de los cristales de ácido úrico estos se unen con los cristales de OxCa formando un cálculo de nucleación heterogénea ^[29].

10. Cocientes urinarios

Los cocientes urinarios (o índices) son la forma más sencilla de expresar la eliminación de los solutos. Su cálculo se basa en la eliminación de creatinina (producto de desecho proveniente de la degradación de la creatina muscular) en ausencia de insuficiencia renal.

Estos cocientes urinarios se expresan en mg, μg , mmol, μmol o UI (Unidad Internacional) de la sustancia en estudio que aparece en la orina por cada mg o g de creatinina filtrada. Se calcula dividiendo la concentración de la sustancia en estudio entre los mg o g de creatinina filtrada.

Los valores para un mismo parámetro pueden modificarse con la edad, suelen ser más elevados en los lactantes y en los niños pequeños, seguramente por las bajas concentraciones de creatinina urinaria en estas edades (*Tabla 3*).

Tabla 3. Cocientes urinarios (García V, et al 2010).

| Cociente | Adulto | Edad (niños) | Valores de referencia (VR) |
|----------------------|---------------|--------------|----------------------------|
| Calcio / Creatinina | < 0.21mg/mg | 0-6 meses | < 0.80 mg/mg |
| | | 7-12 meses | < 0.60 mg/mg |
| | | 12-24 meses | < 0.50 mg/mg |
| | | > 2 años | < 0.21 mg/mg |
| Oxalato / Creatinina | 3-39 mmol/mol | 0-6 meses | 77-325 mmol/mol |
| | | 7-24 meses | 38-132 mmol/mol |
| | | 2-4,9 años | 18-98 mmol/mol |
| | | 5-9 años | 22-70 mmol/mol |
| | | 9- 12 años | 12-70 mmol/mol |
| | | 12-14 años | 16-53 mmol/mol |
| | | > 14 años | 10-64 mmol/mol |
| Citrato / Creatinina | > 250 mg/g | > 1 año | > 400 mg/g |

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El crecimiento es un hecho muy importante que se da en edad pediátrica, cuando los padres se percatan que su hijo no presenta un crecimiento acorde a su edad, recurren a la opinión del médico. Este solicita estudios de laboratorio a cada uno de estos niños, donde encuentra que algunos presentan hipercalciuria. También mediante la anamnesis que este realiza encuentra que los sujetos tienen antecedentes familiares de litiasis renal. Por lo cual se envía a los pacientes a realizar la cuantificación de los niveles de citraturia y oxaluria. En el presente trabajo se determinaron los índices urinarios de citrato y oxalato en pacientes pediátricos para que el médico tenga herramientas diagnósticas y pueda dar un diagnóstico correcto, tratamiento o seguimiento del mismo. También se identificó la influencia de los cambios de pH con la excreción urinaria de los solutos bajo estudio, oxalato y citrato.

Para poder llevar a cabo este protocolo se utilizó la primera orina de la mañana, ya que como es sabido los cálculos se forman en la noche ya que existe una disminución en el consumo de líquidos, provocando que haya una sobresaturación de solutos en la orina. Esta no es la única condición necesaria para la formación de los cálculos es necesario un conjunto de diversos factores físicos y químicos, tales como la citraturia, oxaluria y calciuria, principalmente.

IV. OBJETIVO

Determinar los niveles de citraturia y oxaluria en muestras de pacientes pediátricos con hipercalciuria idiopática.

OBJETIVO PARTICULARES

- Y Calcular el índice citrato/creatinina y oxalato/creatinina, para determinar el nivel de citraturia y oxaluria en pacientes pediátricos, por medio de métodos analíticos basados en espectrofotometría UV-visible. Y realizar la cuantificación de los analitos en muestra única de orina.

- Y Determinar el nivel citraturia en pacientes con HI.

- Y Determinar la influencia que existe entre el pH urinario y la concentración de citrato.

- Y Determinar el nivel de oxaluria en pacientes con HI.

V. HIPÓTESIS

- Y Los pacientes que presentan HI presentaran niveles elevados de oxalato urinario (hiperoxaluria)

- Y Los pacientes que presentan HI presentaran bajas concentraciones de citrato urinario (hipocitraturia)

- Y En $\text{pH} < 5.6$ el índice citrato/creatinina será menor a 400 mg/g (hipocitraturia) y a $\text{pH} > 5.6$ el índice citrato/creatinina se encontrara por arriba de 400 mg/g, esto en pacientes recién nacidos hasta 18 años.

VI. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

MATERIALES Y EQUIPOS

1. Muestra: primera orina de la mañana de pacientes pediátricos
2. Espectrofotómetro
3. pHmetro
4. Celda de cuarzo y vidrio
5. Micropipeta de 10.0 μ L, 20.0 μ L, 200.0 μ L y 500.0 μ L
6. Pipeta graduada con filtro de 5 mL
7. Centrífuga
8. Tubos falcón de 5 mL y eppendorf de 500 μ L
9. Kit Spinreact, Creatinina Jaffé. Colorimétrico-cinético ®
10. Kit Trinity Biotech, Oxalato ®
11. Kit R-Biopharm, Ácido Cítrico ®

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Se efectuó el análisis cuantitativo de citrato, oxalato y creatinina por métodos basados en colorimetría y cinética enzimática (kit R-Biopharm, kit Trinity Biotech y kit Spinreact, respectivamente) en la primera orina de la mañana de pacientes pediátricos provenientes de diversos centros médicos de la ciudad de México, de la especialidad de pediatría. Estas determinaciones fueron solicitadas por los médicos para saber si existen alteraciones bioquímicas como la hiperoxaluria e hipocitraturia que puedan provocar que se presente litiasis renal. Para cada una de las muestras se realizó la medición del pH a temperatura ambiente y se realizó por triplicado el análisis de cada uno de los analitos (creatinina, citrato y oxalato) y se reportó el promedio. Posteriormente, se obtuvo el índice citrato/creatinina (mg/g) y oxalato/creatinina (mmol/mol) de cada una de las muestras.

* **Obtención de la muestra urinaria**

El médico solicitó la prueba de oxalatos y/o citratos a los pacientes, de acuerdo a las valoraciones previas realizadas por el mismo. Para poder llevar a cabo los análisis correspondientes en las muestras de orina, se les informó y explicó a los padres o tutores de los pacientes en qué consistía el protocolo, si estaban de acuerdo en participar se les solicitó que firmaran un consentimiento informado (Anexo 1) para que se pudieran utilizar los datos obtenidos del análisis.

Para la recolección de la muestra se proporcionó a los padres la información necesaria para ello de acuerdo a lo indicado en el Anexo 2 (alimentación, tiempo de ayuno y forma de recolección)

❖ **Criterios de inclusión**

- i. Paciente pediátrico, recién nacido hasta 18 años ^[60,61].
- ii. Pacientes con HI (cociente calcio/creatinina mayor al valor de referencia de acuerdo a la edad) y sin HI (cociente calcio/creatinina menor al valor de referencia de acuerdo a la edad) de los cuales se tienen sospecha o antecedentes familiares de litiasis renal.

❖ **Criterios de rechazo y exclusión**

- i. El transporte de la muestra no se realizara de acuerdo a las indicaciones.
- ii. El paciente no siguió las indicaciones del anexo 2 (tiempo de ayuno, haber consumido los alimentos mencionados en las indicaciones, ingesta vitamina C para determinación de oxalatos)
- iii. Pacientes con tratamiento de citrato de potasio y antibióticos.

* **Conservación de las muestras**

A cada una de las muestra se les midió el pH a temperatura ambiente (20.0-25.0 °C). Se tomaron dos alícuotas de 5 mL de orina y se adicono 60 µL de HCl para el análisis de citrato y oxalato, y dos alícuotas de 500 µL de orina para la determinación de creatinina. Las muestras se congelaron a -15 °C para su preservación con un tiempo máximo de congelación 2 semanas [67].

* **Cuantificación de creatinina urinaria**

Fundamento

El ácido pícrico (reactivo 1) se mezcla con un volumen igual de NaOH (reactivo 2), formando picrato alcalino (reactivo de trabajo, RT). La creatinina reacciona con el picrato alcalino formando un complejo rojizo el cual tiene un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 492 nm. El intervalo de tiempo en el cual se realiza la lectura elimina las interferencias conocidas en el método.

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina presente en la muestra [65].



Método

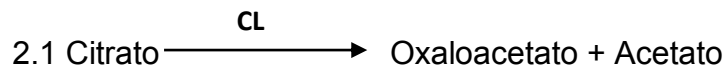
Para la cuantificación del control: se adiciona en una celda de vidrio 500 µL de RT más 50 µL de Spintrol H Normal. Se realiza la primera lectura de la absorbancia (A_1) en el espectrofotómetro al cabo de 30 segundos y al término de 90 segundos (A_2) después de la adición del control. El uso de Spintrol H Normal se utilizó como control de calidad interno. Ya que los datos obtenidos se encontraban dentro del rango de tolerancia para el Spintrol H Normal [1.12-1.60 mg/dL] se procedió a realizar la

cuantificación de creatinina en las muestras de los pacientes (esto por triplicado), determinando la A_1 y A_2 para cada muestra. Para calcular la concentración en mg/dL se realizó el promedio de las tres repeticiones.

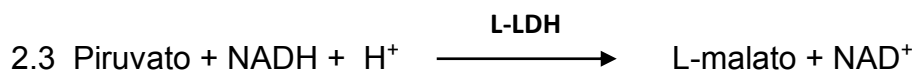
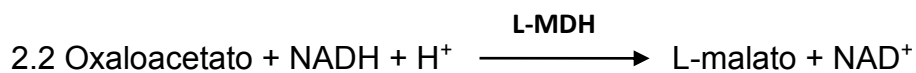
* **Cuantificación de citrato urinario**

Fundamento

El ácido cítrico (citrato) es convertido en oxaloacetato y en acetato en una reacción catalizada por la enzima Citrato Liasa (CL).



En presencia de la enzima L-Malato Deshidrogenasa (L-MDH) y la L-Lactato Deshidrogenasa (L-LDH), el oxaloacetato y su producto de descarboxilación (el piruvato) se reducen a L-malato y L-lactato respectivamente, por medio de la NADH. La disminución de la absorbancia es el resultado de la oxidación del NADH a NAD^+ , esta oxidación es proporcional a la cantidad de citrato presente en la muestra [65]. El NADH se mide a una longitud de onda de 340 nm.



Método

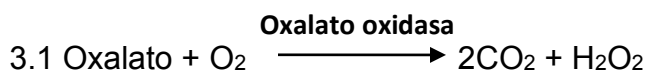
La determinación de citrato en el control se realiza colocando en una celda de cuarzo 500 μL de solución 1 (NADH, L-MDH y L-LDH), más 1000 μL de una dilución

1:10 del control. Se determina la absorbancia 1 a una longitud de onda de 340 nm, esto pasado 5 minutos desde el inicio de la reacción (A₁). Seguido a ello se adicionó 10 µL de solución 2 (CL), esta segunda reacción se lee nuevamente a una longitud de onda de 340 nm pasado 5 minutos (A₂). Se determinó la concentración del control, si este valor se encontraba dentro del rango de tolerancia reportado por el proveedor [36.72-44.88 mg/dL] se procedía a la cuantificación en las muestras de orina (muestras previamente acidificadas para su conservación). Las muestras de orina se llevaron a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 3.00±0.05, seguido a ello se centrifugaron a 2000 rpm durante 4 minutos, esto para obtener un sobrenadante claro, el cual se utilizó para la determinación de citrato, siguiendo la metodología con la cual se llevó a cabo el control. A cada muestra se le realizó la prueba por triplicado, y se tomó el promedio para determinar la concentración de citrato en mg/dL.

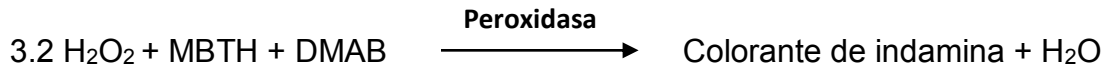
* **Cuantificación de oxalato urinario**

Fundamento

El oxalato es oxidado a dióxido de carbono y peróxido de hidrógeno por la acción enzimática de la oxalato oxidasa.



El peróxido de hidrógeno reacciona con 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona (MBTH) y el ácido 3-(dimetilamino) benzoico (DMAB) en presencia de la peroxidasa para formar un compuesto colorido de indamina que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 590 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de oxalato presente en la muestra ^[66].



Método

Se colocó en un tubo falcón 2.0 mL de diluyente, más 2.0 mL del control (normal o anormal alto) o la muestra de orina previamente acidificada. A cada una de estas diluciones se les ajusto el pH para que se encontraran en un rango de 5.0 a 7.0, posterior a ello se colocaron 2.0 mL de esta dilución en un tubo purificador el cual se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos y se rescato el sobrenadante, al cual se le determinó la concentración de oxalato.

En una celda de vidrio se colocaron 500 μL de reactivo de oxalato A (DMAB, MBTH), más 25 μL del control. Seguido a ellos se adiciono 50 μL del reactivo de oxalato B (Oxalato oxidasa y peroxidasa) y se realizó la lectura a una longitud de onda de 590 nm pasado 5 minutos desde el inicio de la reacción. Sí el control de calidad interno se encontraba dentro del rango de 0.25-0.37 mmol/L para el control normal o entre 0.89-1.26 mmol/L para el control anormal alto de acuerdo a lo reportado por el fabricante, se procedía a la cuantificación en los sobrenadantes de las muestras de orina de la misma forma como se determinó la concentración de los controles (control de calidad interno). A cada muestra se realizó la determinación por triplicado, y se calculo el promedio para obtener las mmol/L de oxalato en la muestra.

* Espectrofotometría

Fundamento

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en el análisis de la cantidad de radiación electromagnética (en el rango de longitud de onda del ultravioleta y visible) que puede absorber una muestra en función de la cantidad de sustancia presente. La sustancia absorbe una parte de la radiación incidente en este espectro y promueve la

transición entre los niveles energéticos pasando de un estado basal (E_0) a uno excitado (E_f), transmitiendo un haz de menor energía radiante (ΔE)

La proporción entre la intensidad de luz absorbida o transmitida y la concentración del analito viene definida por la ley de Lambert- Beer, esta ley expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución:

$$A = (\epsilon \times b \times c)$$

A= Absorbancia

ϵ = Coeficiente de absorción molar o coeficiente de extinción ($M^{-1}cm^{-1}$). Mide qué tanto una sustancia absorbe la radiación a una longitud de onda determinada.

b= Paso óptico, anchura de la celda que contiene la muestra (cm)

c= Concentración de la sustancia que estamos midiendo la absorbancia (M)

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

➤ Grupos de sujetos y número de pruebas realizadas

Se recibieron un total de 54 muestras en el período en el cuál se realizó el protocolo, de las cuales 14 se excluyeron de los resultados finales esto de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión. Por lo cual se conto con una n igual 40, solamente a 28 (70.0%) muestras se les calculó el índice citrato/creatinina, a 5 (12.5%) el índice oxalato/creatinina y a 7 (17.5%) ambos índices. Dentro de este grupo de pacientes, se identificaron a los niños que presentaban HI, para poder diferenciarlos se utilizó el cociente calcio/creatinina, de acuerdo a la edad a valores mayores al valor de referencia (VR) se consideraron pacientes pediátricos con HI. Este cociente se determinó en la unidad médica de la cual fueron enviados.

Se calculó el índice citrato/creatinina (mg/g) para poder determinar la citraturia en las muestras que se analizaron. Para determinar la influencia del pH sobre la concentración de citrato se dividieron a los sujetos con HI y sin HI tanto para muestras de pacientes masculinos como femeninos formando cuatro grupos, esta clasificación se realizó ya que son sistemas biológicos diferentes y porque con ello hay una mayor homogeneidad en los resultados presentados.

Otra de las pruebas que se llevo a cabo fue la determinación del índice oxalato/creatinina (mmol/mol) para determinar el nivel de oxaluria.

Tabla 4. Número total de pruebas realizadas para cada índice.

| Grupo de sujetos | Número de pruebas: | |
|------------------|--------------------|--------------------|
| | Citrato/Creatinina | Oxalato/Creatinina |
| HI | 12 (34.3%) | 7 (58.3%) |
| Femeninos | 5 (14.3%) | 5 (41.7%) |
| Masculinos | 7 (20.0%) | 2 (16.6%) |
| S/HI | 23 (65.7%) | 5 (41.7%) |
| Femeninos | 13 (37.1%) | 3 (25.0%) |
| Masculinos | 10 (28.6%) | 2 (16.7%) |
| Total | 35 (100%) | 12 (100%) |

➤ **Resultados de oxaluria y citraturia**

Se observó que el 54.3% de los sujetos con HI y sin HI presentaron citraturia mayor a los 400 mg/g (normocitraturia) y el 45.8% restante presentaron hipocitraturia, de los cuales 22.9 % fueron pacientes con HI y el otro 22.9% sin HI. Los datos obtenidos corresponden a una población de sujetos femeninos con HI y sin HI con una media de edad de 3.4 y 4.0 años respectivamente, para los sujetos masculinos con HI y sin HI la media es de 5.0 y 7.1 años, respectivamente.

Tabla 5. Resultados de sujetos con hipocitraturia y normocitraturia expresados en número de sujetos y el porcentaje que representan con respecto al número de pruebas totales realizadas (n=35).

| Grupo de sujetos | Número de sujetos y porcentaje con: | |
|------------------|---|--|
| | Citrato/Creatinina < 400mg/g (Hipocitraturia) | Citrato/Creatinina > 400mg/g (Normocitraturia) |
| HI | 8 (22.9%) | 4 (11.4%) |
| Femeninos | 3 (8.6%) | 2 (5.7%) |
| Masculinos | 5 (14.3%) | 2 (5.7%) |
| S/HI | 8 (22.9%) | 15 (42.9%) |
| Femeninos | 5 (14.3%) | 8 (22.9%) |
| Masculinos | 3 (8.6%) | 7 (20.0%) |
| Total | 16 (45.8%) | 19 (54.3%) |

Con el índice oxalato/creatinina no se obtuvieron sujetos con índices mayores al valor de referencia de acuerdo a la edad.

En la tabla 6 se presenta el promedio y desviación estándar, del índice citrato/creatinina (mg/g) y el pH. Para el índice se clasifico a los cuatro grupos de acuerdo al nivel de citraturia que presentaron en mayor o menor a 400 mg/g, porque se encontraron sujetos con hipocitraturia y normocitraturia.

Tabla 6. Nivel de citraturia y pH urinario de pacientes pediátricos. Se presentan media \pm desviación estándar con su n correspondiente, para cada nivel de citraturia.

| Parámetro | Masculino | | Femenino | |
|---|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | <400 mg/g (Hipocitraturia) | >400 mg/g (Normocitraturia) | <400 mg/g (Hipocitraturia) | >400 mg/g (normocitraturia) |
| Con HI Citrato/Creatinina (mg/g) | 242 \pm 153 | 490 \pm 78 | 253 \pm 123 | 450 \pm 24 |
| pH | 5.99 \pm 0.33 | 5.66 \pm 0.32 | 5.74 \pm 0.20 | 5.26 \pm 0.31 |
| n | 5 | 2 | 3 | 2 |
| Sin HI Citrato/Creatinina (mg/g) | 271 \pm 45 | 681 \pm 280 | 256 \pm 114 | 566 \pm 105 |
| pH | 5.78 \pm 0.60 | 6.70 \pm 0.86 | 6.15 \pm 0.22 | 6.23 \pm 0.89 |
| n | 3 | 7 | 5 | 8 |

➤ Índice citrato/creatinina (citraturia)

De acuerdo a la hipótesis planteada se esperaba que existiera una mayor concentración urinaria de citratos a un pH mayor de 5.6. Considera que el pKa del citrato trivalente es igual a pH ^[43], esto suponiendo que las concentraciones ácido-base son las mismas, de acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Se esperaría que a un pH mayor a 5.6, el ácido cítrico (C₆H₈O₇) se encuentre desprotonado en forma de citrato trivalente (C₆H₅O₇³⁻), la cuál es una especie que no se reabsorbe en el túbulo contorneado proximal, en este segmentó de la nefrona se reabsorbe citrato en forma divalente (C₆H₆O₇²⁻), que se forma a pH < 5.6, lo cual implica que existe una mayor disponibilidad del C₆H₅O₇³⁻ en la luz tubular, reflejándose en una mayor excreción urinaria ^[39, 42]. El método utilizado mide la concentración de NADH a una longitud de 340 nm, la cantidad de NADH oxidado es estequiométricamente igual a la cantidad de ion citrato que hay en la muestra (de acuerdo a la reacción 2.1, 2.2 y 2.3) y se expresa en los cálculos como mg de C₆H₅O₇³⁻ ^[65].

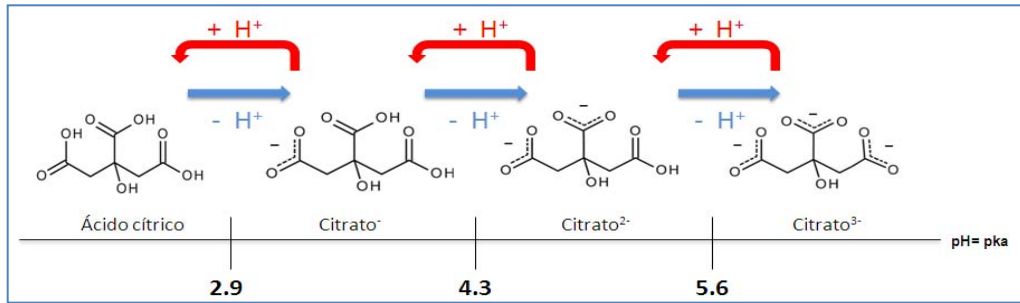
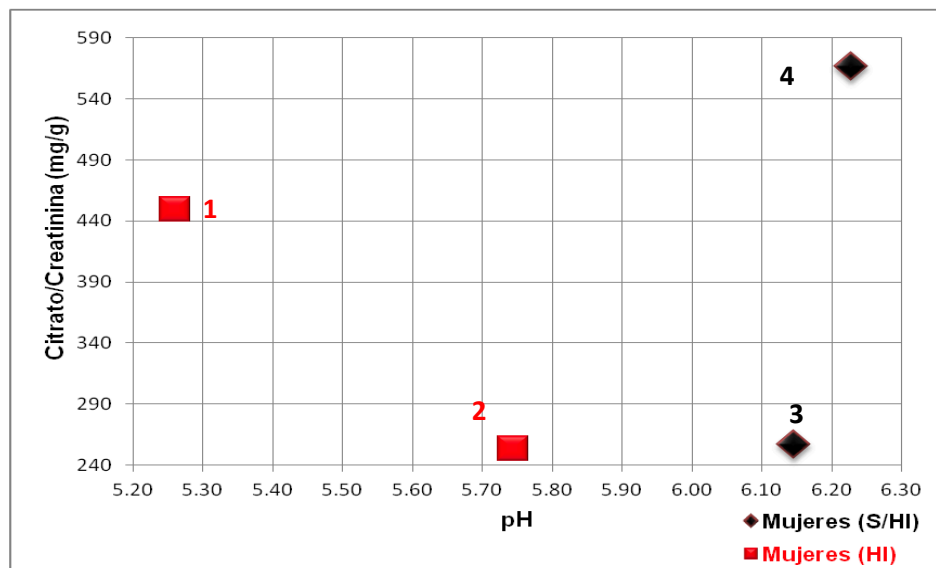
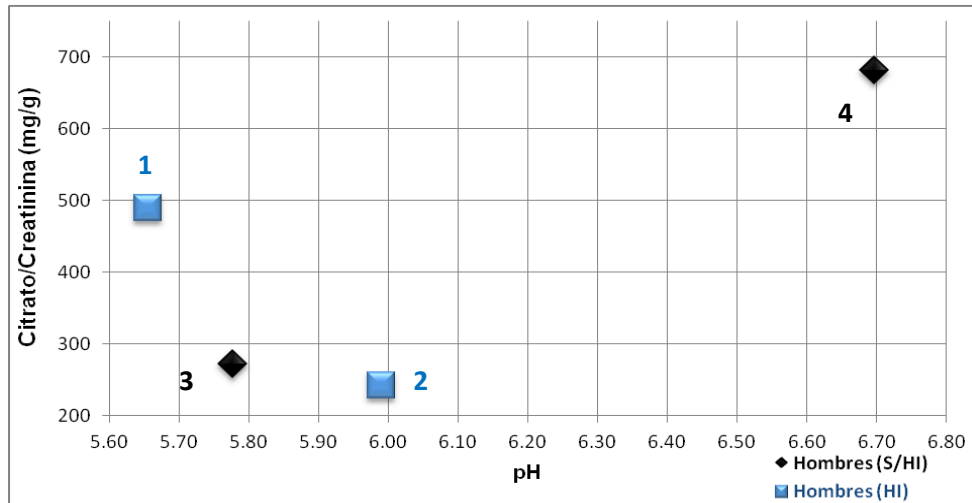


Figura 15. Estados de ionización del ácido cítrico. **Elaborado por Mendoza, P. 2015**

De acuerdo a los índices citrato/creatinina de la tabla 6 se realizaron los gráficos 1 y 2, para comparar el índice con el pH, de los sujetos femeninos y masculinos. En cada gráfico se compararon los grupos con HI y sin HI. Cada uno de los puntos de los gráficos corresponde al promedio de la citraturia mayor y menor a 400 mg/g, para cada grupo.



Gráfica 1. Relación entre el promedio de la citraturia y el pH urinario en sujetos femeninos con HI ($n_1=2$, $n_2= 3$) y sin HI (S/HI; $n_3= 5$, $n_4= 8$).



Gráfica 2. Relación entre el promedio de la citraturia y el pH urinario en sujetos masculinos con HI ($n_1=2$, $n_2=5$) y sin HI (S/HI; $n_3=3$, $n_4=7$).

De acuerdo con los gráficos 1 y 2, tanto en los sujetos femeninos como masculinos con HI al aumentar el pH en un rango de 5.26-5.99 disminuye la concentración de citrato trivalente, en contraste con los que no presentan HI, al aumentar el pH se ve un aumento en la concentración de citrato trivalente. El pH más bajo en el que observó que comenzaba la hipocitraturia en sujetos con HI es de 5.74.

Los sujetos sin HI presentan una mayor citraturia a medida que el pH aumenta; y los sujetos con HI al aumentar el pH urinario disminuyen la citraturia, lo cual puede explicarse por la concentración de calcio presente. Los sujetos con HI que presentan hipocitraturia tienen una concentración de citrato normal en la luz tubular de la nefrona, pero como estos tienen altas concentraciones de calcio, el citrato forma complejos solubles de Citrato-OxCa, que no se detectan con el método espectrofotométrico utilizado. Por lo tanto, el citrato que no forma complejos es el que da lugar a la serie de reacciones que hará posible la detección del NADH. No todo el citrato forma complejos con el calcio, ya que como toda reacción química, se rige por un equilibrio químico. Esta explicación se correlaciona con los resultados que se muestran en los gráficos 3, 5 y 6, en donde se muestra un índice calcio /creatinina elevado para los pacientes que presentan hipocitraturia, comparado con

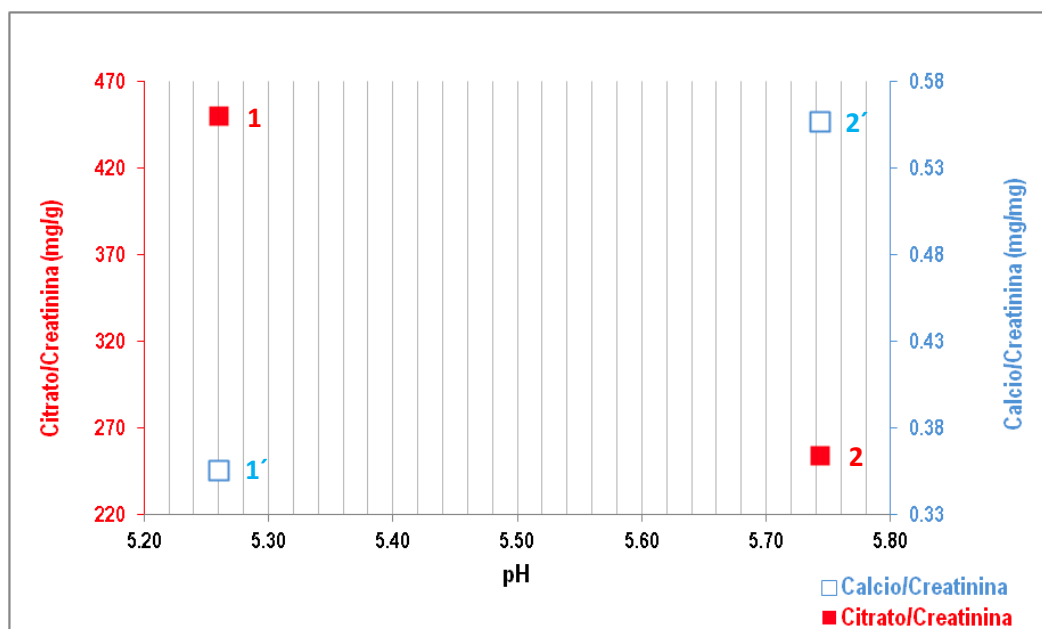
los que no la presentan, donde el índice de calcio/creatinina es menor. Esto demuestra la relación del calcio-citrato.

En el gráfico 4 no se presenta el mismo patrón que en los gráficos 3, 5 y 6, esto puede deberse a que es un modelo femenino sin HI. Este presenta un patrón de bajas concentraciones de citrato junto a una baja concentración de calcio debido a que una gran parte del aporte de éste proviene del hueso, ya que existe una menor resorción ósea. Con una menor resorción ósea se excreta una baja cantidad de citrato y calcio hacia la sangre que posteriormente será filtrada a nivel renal, reflejando una excreción baja de estos. Y viceversa, los que tienen una alta concentración de calcio y citrato tienen una mayor resorción ósea. Esto posiblemente se deba a una cuestión hormonal que es propia de los sujetos femeninos.

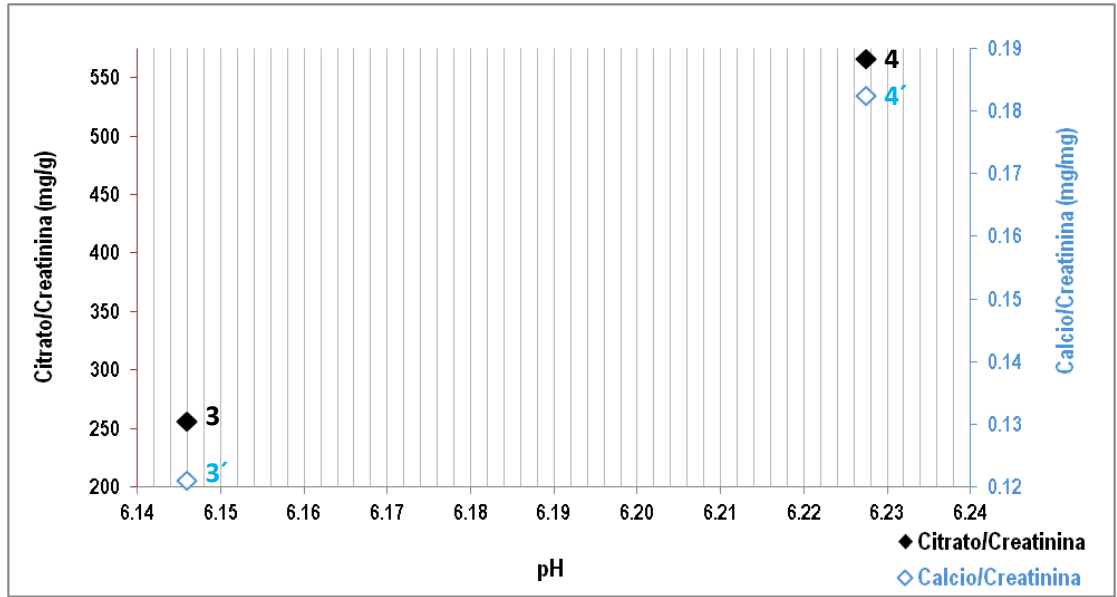
En condiciones normales se ha demostrado que los sujetos femeninos en edades de 6 meses a 7 años presentan una mayor concentración de estrógenos, específicamente estradiol, comparado con hombres sanos del mismo periodo de edad [68]. Además de la diferencia entre las concentraciones de los estrógenos, existe una mayor predominancia de los receptores estrogénicos alfa y beta en un hueso en pleno desarrollo, lo cual estimula una mayor interacción de ligando-receptor dando lugar a la acción biológica [69]. Como se sabe los estrógenos tienen influencia tanto en mujeres como en hombres, pero es mayor en las mujeres [70], por lo cual los sujetos masculinos sin HI no presentan este patrón. Por lo que se propone en el gráfico 4, los sujetos femeninos sin HI que tienen hipocitraturia tengan una mayor concentración de estradiol comparadas con las que presentan normocitraturia. Ya que el estradiol bloquea la producción de citocinas (IL-1, IL-6 y TNF), que son de importancia para madurar al osteoclasto [20]. Al no madurar el osteoclasto disminuirá la resorción del hueso, que es la principal fuente de reserva de citrato y calcio. Al no existir una resorción pronunciada se producirá el efecto observado (hipocitraturia con una baja excreción urinaria de calcio) [20, 43].

Se pensaría que las mujeres con HI también deberían presentar el mismo patrón ya que también están bajo la influencia de las mismas hormonas propias del género. Esto no se observó en el gráfico 3 ya que el aporte de calcio no solo proviene

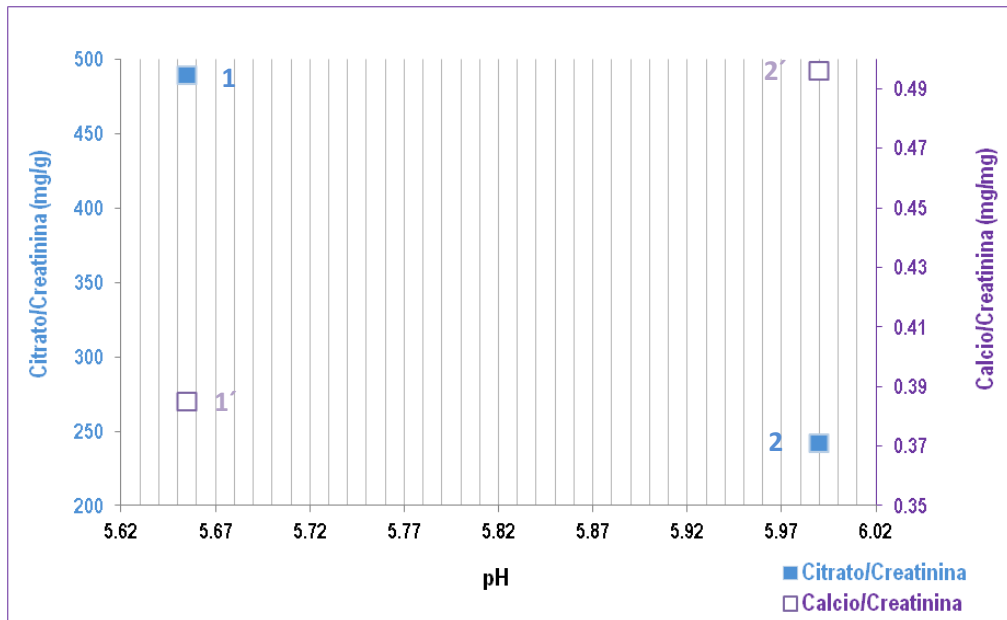
únicamente del hueso, también existe una mayor absorción intestinal y una menor resorción renal debido a que la HI afecta a estos tres niveles, por lo cual se encubre el efecto hormonal. Esto no quiere decir que las mujeres sin HI solo van a recibir el aporte de calcio del hueso, también lo reciben de la dieta, pero como no existe una hiperabsorción intestinal de calcio, como la que presentan las niñas con HI, sólo se propone que el aporte mayoritario es del hueso.



Gráfica 3. Promedio del índice citrato/creatinina ($n_1=2$ y $n_2=3$) eje izquierdo y del índice calcio/creatinina ($n_1=2$ y $n_2=3$) eje derecho en sujetos femeninos con HI.



Gráfica 4. Promedio del índice citrato/creatinina ($n_3=5$ y $n_4=8$) eje izquierdo y del índice calcio/creatinina ($n_3=5$ y $n_4=8$) eje derecho en sujetos femeninos sin HI



Gráfica 5. Promedio del índice citrato/creatinina ($n_1=2$ y $n_2=5$) eje izquierdo y del índice calcio/creatinina ($n_1=2$ y $n_2=5$) eje derecho en sujetos masculino con HI.

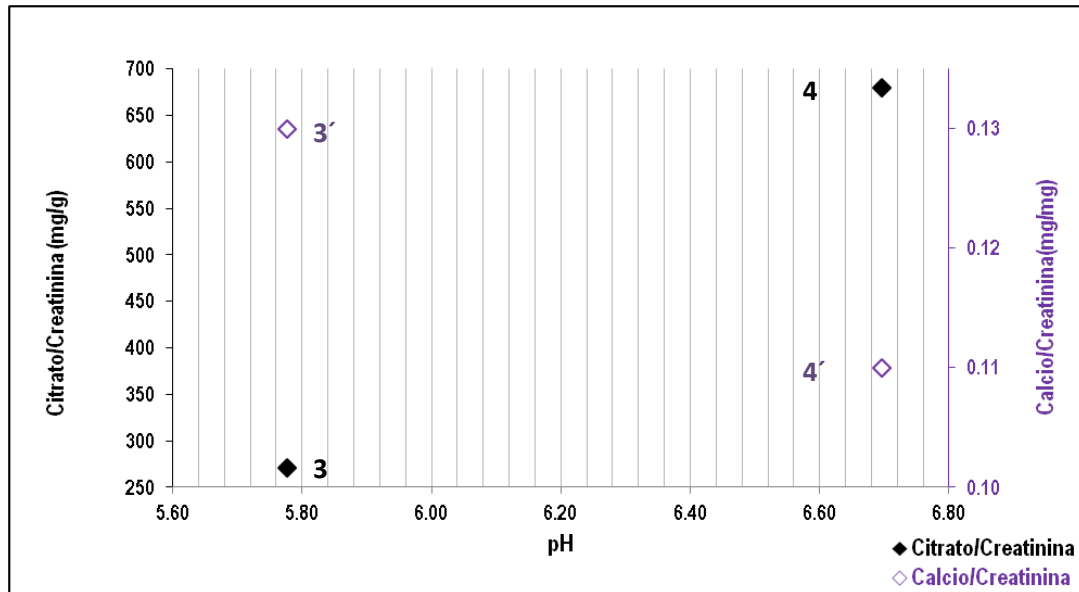


Gráfico 6. Promedio del índice citrato/creatinina ($n_3=3$ y $n_4=7$) y del índice calcio/creatinina ($n_3=3$ y $n_4=7$) en sujetos masculino sin HI.

➤ **Índice oxalato/creatinina (oxaluria)**

En el grafico 7 se presenta el índice oxalato/creatinina para cada uno de los sujetos a los cuales se les realizó el índice. En el grafico se indica el valor de referencia inferior y superior para cada uno de los sujetos, ya que este valor cambia de acuerdo a la edad.

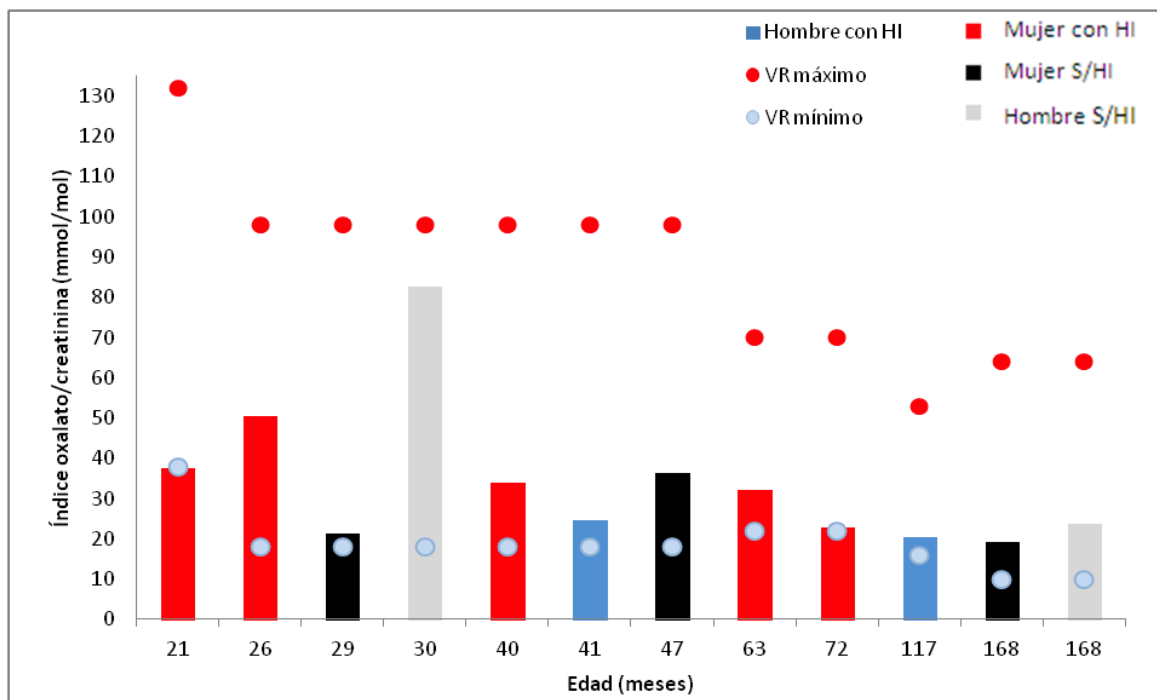


Gráfico No. 7 Índice oxalato/creatinina para cada uno de los sujetos en los cuales se realizó la determinación. Esto de acuerdo a la edad representada en meses. ($n_{total}=12$; $n_{M-HI}=5$; $n_{M-S/HI}=3$; $n_{H-HI}=2$; $n_{H-S/HI}=2$)

De la grafica anterior se puede observar que ninguno de los cuatro grupos presentó hiperoxaluria, los valores que se encontraron están dentro de su respectivo intervalo de referencia. Se puede decir que los cuatro grupos no presentan ninguna alteración de origen genético, dietético o entérico que aumenten la concentración de oxalato en la sangre y que desemboque en una hiperoxaluria [4,29-31].

Esta prueba se sugiere que se realice cuando se posea información de que el paciente puede tener alteraciones de tipo hepático, estados diarreicos recurrentes o una dieta en la cual se realice un consumo excesivo de alimentos ricos en oxalato.

VIII. CONCLUSIÓN

1. Se determino el nivel de citraturia y oxaluria en muestras de pacientes pediátricos utilizando el respectivo índice. Para determinarlo se analizaron tres analitos (citrato, oxalato y creatinina) por medio de metodologías analíticas basadas en espectrofotometría UV-Vis para cada muestra. Se encontró que el 45.8 % de los sujetos con y sin HI que se analizaron presentaban hipocitraturia y no se encontró ningún sujeto que presentara hiperoxaluria.
2. El 22.9% de los sujetos con HI presentaron hipocitraturia y el 11.4% no la presento.
3. Los sujetos con HI a pH mayor a 5.74 presentan hipocitraturia

IX. PERSPECTIVA

1. Determinar el nivel hormonal en los pacientes femeninos sin HI.
2. Analizar el sedimento urinario, en busca de cristales, en aquellos pacientes que presentan hipocitraturia.
3. Determinar el calcio urinario en la misma muestra urinaria en la cual se realiza la determinación de citrato.

X. ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento informado



CONSENTIMIENTO INFORMADO



Autorizar el uso de los resultados que sean obtenidos en el análisis de la muestra de orina proporcionada por el padre o tutor del paciente.

México D.F. a ____ de _____ de 2015.

Yo _____ (padre o tutor) autorizo el uso de los resultados obtenidos en el análisis realizado a la muestra de orina del niño (a) _____ (paciente) para fines de investigación.

Estoy consciente que sólo se utilizaran los resultados obtenidos en el análisis, los datos personales como nombre del paciente y número telefónico de este no se comentaran o divulgaran.

Además de ello sé que este análisis no representa riesgo alguno hacia el paciente ya que no se realiza ningún estudio sobre su persona.

Si usted está de acuerdo en lo antes descrito entregar una copia firmada de este documento a la persona que recibió la muestra biológica.

Acepto que estoy satisfecho con la información que se me ha proporcionado.

Firma del padre o tutor _____

Nombre del testigo 1 _____ Firma _____

Nombre del testigo 2 _____ Firma _____

ANEXO 2. Indicaciones para la toma de muestra urinaria en paciente pediátrico

Instrucciones generales

- * Ayuno de niños mayores de 3 años: mínimo de 8 hrs y máximo de 12 hrs.
- * Ayuno de pacientes pediátricos menores de 3 años: mínimo 4 hrs y máximo 6 hrs
- * Recolectar la primera orina de la mañana en un frasco colector limpio y seco.
- * **IMPORTANTE:** Colocar una etiqueta en el frasco indicando el nombre completo del paciente, edad, sexo, hora y fecha de la recolección, el nombre del médico que le solicita el estudio y las pruebas a realizar.
- * Si no puede llevar la muestra al laboratorio en la hora siguiente después de la recolección, refrigere la muestra.
- * Transportar la muestra a temperatura ambiente. Si el trayecto es de más de 2 h, hay que transportar la muestra en un recipiente con hielo.
- * Si se va a realizar la determinación de oxalatos evitar 48 hrs antes la ingesta de alimentos ricos en vitamina C (espinacas, fresa, papaya, kiwi, brócoli, betabel) y otros alimentos o bebidas como el chocolate, salvado de trigo, té y nueces.

Instrucciones para la recolección de la muestra con ayuda del padre o la madre (paciente masculino)

- * Lave sus manos con agua y jabón antes de obtener la muestra de orina.
- * Retraiga la piel del pene y lave la salida de la uretra con una toalla mojada (solo lavar con agua)
- * Limpie y seque con una toalla seca
- * Deje salir un primer chorro a la taza del baño
- * Deposite la porción siguiente en el frasco colector (cantidad mínima: 15 ml, equivalente a 4 cucharadas soperas)

Instrucciones para la recolección de la muestra con ayuda de la madre (paciente femenino)

- * Lave sus manos con agua y jabón antes de obtener la muestra
- * Separe sus labios. Limpie los genitales externos, de adelante hacia atrás, con tres toallas húmedas
- * Seque con una toalla seca.

- * Deje salir un primer chorro a la taza del baño.
- * Deposite la porción siguiente en el frasco colector (cantidad mínima: 15 ml, equivalente a 4 cucharadas soperas)

Instrucciones para la recolección de la muestra con ayuda de la madre (paciente neonato y bebés):

- * Limpieza de genitales externos con agua previamente hervida. No utilizar jabón.
- * Colocar la bolsa en la zona genital del paciente, no exceder por más de dos horas el uso de ella, realizar cambio si es necesario.
- * Retirar la bolsa colectora del paciente (quitar con cuidado los adhesivos evitando no tirar la muestra), recolectar un mínimo de 10 ml.

ANEXO 3. Protocolo para la conservación de las muestras de orina

- I. Recepción de la muestra de orina: Se verifica que el frasco este rotulado con los datos del paciente (el nombre completo del paciente, la edad, el sexo y hora de recolección), y se realiza el registro correspondiente.
- II. Se realizo la medición del pH a temperatura ambiente, previa calibración del pHmetro, y se registro la medición.
- III. Para determinación de oxalato y citrato: se etiquetaron dos tubos falcón con los datos del paciente y fecha de almacenamiento. A cada uno de los tubos se les colocó 5 mL de la muestra y 60 μ L de HCl, se congelo hasta su uso. Nota: el oxalato en orina acidificada es estable como máximo tres semanas en congelación, y el citrato es estable hasta un mes después de su recolección en condiciones de acidificación y congelación. Las muestras se procesan en un tiempo máximo de dos semanas.
- IV. Para determinación de creatinina: se separaron dos alícuotas en tubos eppendorf con 500 μ L de orina y se llevaron a congelación (-15° C hasta su procesamiento).

ANEXO 4. Protocolo para cuantificación de creatinina urinaria, mediante el test CREATININE- J DE SPINREACT ®.

- I. Se trabaja con los reactivos y muestras a temperatura ambiente. Se toma la cantidad requerida para las pruebas, en proporciones iguales se mezcla R1 y R2 para formar el RT, el cual es homogenizado para su uso. La resuspensión del SPINTROL H Normal y el patrón se realiza de acuerdo a lo indicado en el inserto correspondiente y con apego a las BPL, se preparan alícuotas que se congelan para su posterior uso (verificar tiempo de estabilidad de los reactivos reconstituidos).
- II. Se ajusta el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada con una celda de vidrio a una λ (longitud de onda) de 492 nm. Para el control de calidad interno, se determina la absorbancia del control humano normal (SPINTROL H Normal), colocando las cantidades indicadas a continuación en una celda de vidrio esto para cada prueba.

| Pipetear en la cubeta | Blanco (μ L) | Patrón (μ L) | SPINTROL H Normal (μ L) |
|------------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|
| RT | 500 | 500 | 500 |
| Patrón | | 50 | |
| SPINTROL H Normal | | | 50 |
| $\Delta A = A_2 - A_1$ | ΔA_B | ΔA_P | ΔA_M |

Enseguida se realiza la homogenización del reactivo de trabajo con la muestra mediante inversión manual de la celda, se colocó papel parafilm en la boca de la celda para evitar derrames. El tiempo empieza a correr desde el momento que se adiciona la muestra y se toma la primera lectura a los 30 segundos (A_1) y una segunda lectura al cabo de 90 segundos desde el inicio de la reacción (A_2). Para calcular la concentración del SPINTROL H Normal o de una muestra, se utiliza el siguiente cociente que se multiplica por la concentración del patrón.

$$\frac{\Delta A_M - \Delta A_B}{\Delta A_P - \Delta A_B} * 2 \frac{mg}{dl} = \frac{mg}{dl} \text{ de creatinina en orina}$$

Nota: los mg/dL se dividen entre 1000 para obtener g/dL

Si la concentración del SPINTROL H Normal esta dentro del intervalo indicado en el inserto del control (1.12-1.60 mg/dL) se procede a la cuantificación en las muestras de orina, utilizando ΔA_B y la ΔA_P para realizar los cálculos.

❖ Las muestras se diluye 1:50 con agua destilada, de esta dilución se toman 50 μ L y se le adicionaran 500 μ L de RT (procediendo como antes se describe) y determinando A_1 y A_2 . Cada muestra se realiza por triplicado y se calcula el promedio de ellas.

❖ Nota:

× Estabilidad de la creatinina en orina:

2-8 °C hasta 7 días

En congelación hasta 90 días

× Interferencias en la determinación de creatinina

Hemoglobina (1g/L)

Bilirrubina (55 mg/dL)

ANEXO 5. Protocolo para cuantificación de citratos urinarios con el test ÁCIDO CÍTRICO DE BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM ®.

- I. Se trabaja con los reactivos y muestras a temperatura ambiente. La solución 1 y 2 se reconstituyen de acuerdo a las indicaciones del inserto y se realizan alícuotas bien identificadas para cada reactivo. Se mantienen en congelación hasta su uso (verificar tiempo de estabilidad de los reactivos reconstituidos).
- II. Se ajusta a cero el espectrofotómetro con agua destilada, en una celda de cuarzo de 1 cm (paso de la luz) a una longitud de onda de 340 nm. Antes de proceder con la cuantificación de las muestras se debe de realizar el control de calidad interno. Se procede a la cuantificación de las muestras urinarias (sobrenadante*) cuando la concentración del control esta dentro del rango de tolerancia reportado en el inserto [36.72-44.88 mg/dL].

| Pipetear en la cubeta | Blanco (µl) | Control (µl) | Muestra (µl) |
|--|-------------|--------------|--------------|
| Solución 1 | 500 | 500 | 500 |
| Estándar | | 100 | |
| Sobrenadante de la muestra* | | | 100 |
| Agua desionizada | 1 000 | 900 | 900 |
| Mezclar, leer absorbancia a 340 nm pasados 5 min desde el inicio de la reacción (A ₁) | | | |
| Solución 2 | 10 | 10 | 10 |
| Mezclar, leer absorbancia a 340 nm pasados 5 min desde la adición de la solución 2 (A ₂) | | | |

Para calcular la concentración de citrato se utiliza la siguiente expresión:

$$C = \frac{V_f * MW}{\epsilon * d * V_M} * \Delta A = \frac{g}{L}$$

V_f =Volumen final (1.510 mL)

MW =Peso molecular del ion citrato (0.1891g/mmol)

ϵ = coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm (6.18 L*mmol⁻¹*cm⁻¹)

d = paso de la luz (1 cm)

V_M =Volumen de la muestra (0.100 mL)

ΔA = Cambio de la absorbancia $A_1 - A_2$

$$C = 0.4620 \frac{g}{L} * \Delta A = \frac{g}{L} * \frac{1000 \text{ mg} * 1 \text{ L}}{1 \text{ g} * 10 \text{ dL}} = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de citrato trivalente}$$

- III. Se homogeniza la orina y se ajusta el pH a temperatura ambiente con NaOH 0.1.N o HCl (dependiendo el caso) hasta que tenga un valor de 3.00-3.05, evitando no aumentar demasiado el volumen. Se centrifuga la muestra durante 4 minutos a 2000 rpm, de lo cual se obtendrá un sobrenadante* el cual se utilizara para la cuantificación de citrato. Para esta prueba se realiza por triplicado la cuantificación en el sobrenadante.

ANEXO 6. Protocolo para cuantificación de oxalatos urinarios, mediante el test de OXALATO DE TRINITY BIOTECH®

- I. Se trabaja con los reactivos y muestras a temperatura ambiente. La reconstitución del reactivo A y B se realiza de acuerdo a las indicaciones del inserto y siguiendo las BPL, y se preparan alícuotas bien identificadas que se congelan hasta su uso (verificar tiempo de estabilidad de los reactivos reconstituidos).
- II. El ajuste del espectrofotómetro a cero se hace con agua en una celda de vidrio a una longitud de onda de 590 nm. Antes de procesar las muestras se realiza el control de calidad interno (control normal o anormal alto). Si la concentración de los controles esta dentro del intervalo indicado en el inserto (control normal se encuentra entre 0.25-0.37 mmol/L y control anormal alto 0.89-1.26 mmol/L) se procede a la cuantificación en las muestras de orina.
- III. Preparación de las muestras o control: se toma un volumen de 2.0 mL de la muestra o de los controles y se adiciona 2.0 mL de diluyente a un tubo perfectamente identificado. Se homogeniza y se ajusta el pH a temperatura ambiente con NaOH 0.1N o HCl concentrado (dependiendo el caso) hasta que se encuentre en un pH de 5.00 a 7.00. Tomar de esta dilución 2.0 mL, que se colocaran en un tubo purificador que contiene carbón activado, se realiza el mezclado de este tubo durante 5 minutos y por último se centrifuga por 5 minutos a 2000 rpm. El resultado final es una sobrenadante claro, el cual es el que se utiliza para determinación de oxalatos.

| Pipetear en la cubeta | Blanco (µL) | Patrón (µL) | CN (µL) | CE (µL) | Muestra (µL) |
|--|-------------|-------------|---------|---------|--------------|
| Reactivo A | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| Patrón | | 25 | | | |
| Sobrenadante CN | | | 25 | | |
| Sobrenadante CE | | | | 25 | |
| Sobrenadante muestra | | | | | 25 |
| Reactivo B | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Mezclar por inversión y tomar la absorbancia a los 5 minutos | | | | | |

Para calcular la concentración de oxalato:

$$\frac{A_M - A_B}{A_P - A_B} * 0.5 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} * 2 = \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \text{ de oxalato}$$

Donde A_M , A_B y A_P es la absorbancia de la muestra (o de los controles), blanco y patrón respectivamente. Este cociente se multiplica por la concentración del patrón (0.5 mmol/L) y el factor de dilución (2).

Nota: Se multiplican las mmol/L por 90 mg/mmol para obtener mg/L. Donde 90 mg/mmol es la masa molecular del ácido oxálico. Para calcular el índice oxalato/creatinina en mmol/mol se utiliza la siguiente expresión:

$$\frac{\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{ oxalato}}{\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ creatinina}} * 89.7 \left(\frac{\text{mg creatinina} * \text{mmol oxalato}}{\text{mol creatinina} * \text{mg oxalato}} \right) = \frac{\text{mmol oxalato}}{\text{mol creatinina}}$$

XI. REACTIVOS

* **Kit Spinreact, Creatinina Jaffé. Colorimétrico-cinético** ®

R1: Ácido pícrico 17,5 mmol/L

R2: Hidróxido sódico 0,29 mol/L

* **Kit Trinity Biotech, Oxalato** ®

Reactivo A:

DMAB 3.2 mmol/L

MBTH 0.22 mmol/L

Buffer pH 3.1±0.1

Componentes no reactivos y estabilizadores

Diluyente:

EDTA 10 mmol/L

Buffer pH 7.6 ±0.1

Tubos con carbón activado

Reactivo B:

Oxalato oxidasa (cebada) 3000 U/L

Peroxidasa (rábano) 100,000 U/L

* **Kit R-Biopharm, Ácido Cítrico** ®

Solución 1:

Buffer de Glicina pH aprox 7.8

L-malato deshidrogenasa aprox. 136 U

L-lactato deshidrogenasa aprox. 280 U

NADH aprox. 5 mg

Solución 2: Citrato liasa 12 U

XII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] García Nieto V, Luis Yanes M. La enfermedad litiásica en al en la infancia. La Prelitiasis
- [2] Balestraccia A, Meni L, et al . Hipercalciuria idiopática en niños con infección del tracto urinario. Arch Argent Pediatr **2014**; 112(5): 428-433.
- [3] Stempa O. Hipercalciuria idiopática en pacientes con litiasis del tracto urinario. An Med (Mex) **2007**; 52 (1): 30-36
- [4] Riella M, Martins C. Nutrición y riñón. Ed. Médica Panamericana: Argentina, **2003**. p. 225-229, 652-654.
- [5] Fons J, García V. Hipercalciuria idiopática. Recuperado el 9 de enero de **2015**, de http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/16_3.pdf.
- [6] Daudon M. Litogénesis. EMC – Urología **2014**; 46 (1): 1-14
- [7] Consejo de Salubridad General. Diagnostico y tratamiento de la urolitiasis en adulto. GPC, Guía Práctica Clínica. Recuperado el 18 de Enero de **2015**, de http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/215_SSA_09_urolitiasis/GRR_SSA_215_09.pdf
- [8] Miller N, Andrew P, et al. Patogenia de los cálculos renales. Urol Clin N Am **2007**; 34: 295-313.
- [9] Evan A, Coe F, et al. Mechanism of formation of human calcium oxalate renal stones on Randall's plaque. The Anatomical Record **2007**; 290(10): 1315-1323.
- [10] Wikipedia. (2013). Weddellita. Recupeado el 20 de Enero de **2015**, de <http://es.wikipedia.org/wiki/Weddellita>.
- [11] Medina-Escobedo M, Mussaret Z, et al. Prevalencia y factores de riesgo en Yucatán, México, para litiasis urinaria. Salud Pública de México **2002**; 44(6): 541-545.
- [12] Valero M, Goñi E, et al. Litiasis renal. Cólico nefrítico Guía de Actuación Clínica en A. P. Recuperado el 18 de Enero de **2015**, de <http://www.san.gva.es/documents/246911/251004/quiasap023coliconefrítico.pdf>.
- [13] Consejo de Salubridad General. Resumen y Recomendaciones. Diagnostico y tratamiento de la urolitiasis en adulto. GPC, Guía Práctica Clínica. Recuperado el 18 de Enero de **2015**, de http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/215_SSA_09_urolitiasis/EYR_SSA_215_09.pdf
- [14] López García J. Litiasis renal. Recuperado el 21 de Enero de **2015**, de <http://www.ferrerfarma.com/Documentos/201208%20DOCUMENTEO%207%20DIAS.pdf>.
- [15] Rodrigo B, Camaggi M. Evaluación metabólica y nutricional en litiasis renal. Revista Médica Clínica **2010**; 21(4): 567-577.
- [16] Arias J, editor. Enfermería médico quirúrgica: II. Volumen 2 of Enfermería médico-quirúrgica. Ed. Tebar; **2000**. p. 420-423.
- [17] Guzmán F. Líquido y Electrolitos en Cirugía. Fisiopatología celular y bioquímica. Ed. Médica Panamericana; **2004**. p. 66-73
- [18] Gil A. Tratado de Nutrición: Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición, Vol. 1. Ed. Médica Panamericana; **2010**. p. 582-583
- [19] Gal B, López M, et al. Bases de la Fisiología. 2nd ed. Ed. Tébar; **2007**. p. 457-460
- [20] Albarrán J. Endocrinología. 2nd ed. Ed. Médica Panamericana; **2010**. p. 256-264
- [21] Frick K, Bushinsky D. Molecular Mechanisms of Primary Hypercalciuria. J Am Soc Nephrol **2003**; 14: 1082–1095.
- [22] Campos Otegui V. Guía Práctica de para la estandarización del procedimiento de las muestras de orina. Bio-Rad. Recuperado el 14 de Septiembre de 2014 de http://www.comerdelbajo.com.mx/wp-content/uploads/2013/05/quiapractica_.pdf
- [23] Komar B. Nuevos Conceptos de ayuno e hidratación en pediatría Rev. Arg. Anest **1997**; 55 (2): 84-86.
- [24] Velásquez F, Cabeza M, et al. Síndrome de exceso de prostaglandina E en niños. Bol Med Hosp Infant Mex **2006**; 63: 208-220
- [25] Dusso A. El sistema hormonal de la vitamina D: lo que sabemos y lo que nos queda por saber. Nefrología Sup Ext **2011**; 2(5):37-43
- [26] Figueas Guevara A. (2008). Efecto del calcitriol sobre la expresión génica de las calbindinas 9K y 28K y su relación con la peroxidación de lípidos en placenta de mujeres embarazadas sanas. Tesis de licenciatura en nutrición. Universidad del Estado de Hidalgo.
- [27] Carrillo N, Fernández J, et al. Papel de Calcio, Calcitriol y sus Receptores en la Regulación de la Paratiroides. Nefrología **2009**; 29(2): 103-108.

- [28] García V. Hipercalciuria idiopática. Generalidades. Diagnóstico y seguimiento en Atención Primaria. Bol. S Vasco-Nav Pediatr **2005**; 38 (1): 5-10.
- [29] Wein A, Kavoussi L, *et al.* Campbell-Walsh Urología. Tomo 2. Ed. Médica Panamericana; **2008**. p. 1363-1392.
- [30] Stewart C, Duncan S. *Oxalobacter formigenes* and its role in oxalate metabolism in the human gut. FEMS Microbiology Letters **2004**; 230: 1-7.
- [31] Allison M, Dawson K, *et al.* *Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. Arch Microbiol **1985**; 141(1): 1-7.
- [32] Tobellin J, Ghirlanda J, Gigler C. Litiasis renal. Ed. Librería-Editorial El Ateneo; **1996**. p.21-113, 155-207.
- [33] Lorenzo V, Torres A. Diagnóstico y tratamiento de la hiperoxaluria primaria. Nefrología **1996**; 16 (2): 119-127.
- [34] Pinto B. Litiasis Renal. 2nd ed. Masson-Salvat Medicina. España **1993**. p. 51-67, 97-133, 145-158.
- [35] Lorenzo V, Torres A, *et al.* Hiperoxaluria primaria. Nefrología **2014**; 34 (3): 398-412.
- [36] Girona E, Taravilla R, *et al.* Resultados del tratamiento con citrato y piridoxina en la hiperoxaluria primaria tipo I. An Esp Pediatr **1999**; 50: 397-401.
- [37] Vasudevan D, Sreekumari S. Texto de Bioquímica para estudiantes de medicina. Ed. JP Medical Ltd; **2012**. p. 408-409.
- [38] Moreno Rojas R. Nutrición y dietética para tecnología de los alimentos. Ed. Díaz Santos; **2013**. p. 142.
- [39] Sanchez A, Sarano D, *et al.* Nefrolitiasis. Fisiopatología, evaluación metabólica y manejo terapéutico. Actual. Osteol **2011**; 7(3): 195-234.
- [40] Muñoz J. (**2004**). Litiasis renal oxalocálcica. Avances en la comprensión de su etiología y mejoras en la metodología analítica para su estudio. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona.
- [41] Del Valle E, Spivacow F, *et al.* Citrato y litiasis renal. Medicina (Buenos Aires) **2013**; 73: 363-368.
- [42] Verdejo A, Martín M, *et al.* Efecto del citrato potásico en la profilaxis de la litiasis urinaria. Arch. Esp. de Urol. **2001**; 54(9): 1036-1046.
- [43] Goldberg H, Grass L, *et al.* Urine citrate and renal stone disease. CMAJ. **1989**; 141: 217-221
- [44] Martín M, Ruiz C. Proceso urolitiasis. Ferrer. Farma Hospita: Barcelona **2013**. p. 41-45
- [45] Müller W. Bioquímica. Fundamentos para medicina y ciencias de la vida. Reverte. **2008**. p. 504-506.
- [46] Simpson D. Citrate excretion: a window on renal metabolism. The American Physiological Society .**1983**; 244: 223-234.
- [47] Hamm L. Renal handling of citrate. Kidney International, **1990**; 38: 728-735.
- [48] Levi M, Mc Donald, *et al.* Chronic K depletion stimulates rat renal brush-border membrane Na-citrate cotransporter. American Journal of Physiology - Renal Physiology. **1991**; 261 (5): 767-773
- [49] Arias M. Hernando. Nefrología Clínica. 4 ed. Ed. Médica Panamericana. **2014**. p.652-654
- [50] García V, Rodríguez M. (**2010**). Capítulo 8. Pruebas de funcionamiento tubular. Nefrología al día. Sociedad Española de Nefrología p. 149-160. España.
- [51] Weisinger J. New insights into the pathogenesis of idiopathic hypercalciuria: The role of bone. Kidney International. **1996**; 49: 1507—1518.
- [52] Stechman J, Loh N, *et al.* Genetics of Hypercalciuric Nephrolithiasis. Annals of the New York Academy of Sciences. **2007**; 1116: 461-484
- [53] Yao J, Bai S, *et al.* Regulation of Renal Calcium Receptor Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Genetic Hypercalciuric Stone-Forming Rats. American Society of Nephrology. **2005**; 16: 1300–1309
- [54] Moreno A, López V. Vitamina D. Acciones. Nuevas aplicaciones en prevención de salud. Ed. Cont. Lab. Clin. **2011**; 14: 114-126
- [55] Costanzo P, Salerni. Hypovitaminosis D: afectaciones no clásicas. Rev. Argent. Endocrinol. Metab. **2009**; 46(1): 3-23
- [56] Karnauskas A, Leeuwen J. Mechanism and function of high vitamin D receptor levels in genetic hypercalciuric stone-forming rats. J Bone Miner Res. **2005**; 20(3): 447-454.
- [57] Goretti M, Sousa M. Bone disease in pediatric idiopathic hypercalciuria. World J Nephrol **2012**; 1(2): 54-62
- [58] Mossetti G, Vuotto P. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and tubular citrate handling in calcium nephrolithiasis. Journal of Internal Medicine **2003**; 253: 194–200

- [59] Mossetti G, Rendina D, The relationship of 3' vitamin D receptor haplotypes to urinary supersaturation of calcium oxalate salts and to age at onset and familial prevalence of nephrolithiasis. *Nephrol Dial Transplant*. **2004**; 19(9): 2259-2265.
- [60] Garcia M. Peculiaridades del Paciente Pediátrico. Recuperado el 8 de diciembre de 2014 de <http://www.scartd.org/garciagoriz.htm>
- [61] Instituto Nacional de Pediatría. Recuperado el 8 de diciembre de 2014 de <http://www.pediatria.gob.mx/>
- [62] Díaz N, Barcena A, *et al.* Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Recuperado el 10 de mayo de 2015 de http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA.pdf
- [63] Sánchez S. Material de apoyo para los estudiantes del curso Bioquímica experimental (0141). Recuperado el 10 de mayo de 2015 de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/MATERIALAPOYOANTECEDENTES_22427.pdf
- [64] Inserto Spinreact. Creatinina Jaffé- Colorimétrico-cinético. Recuperado 10 de mayo de 2015 de http://www.spinreact.com.mx/public/_pdf/1001111.pdf
- [65] Inserto Boehringer Mannheim / R-Biopharm. Ácido cítrico. Método UV. Para la determinación de ácido cítrico en alimentos y otros materiales. Recuperado 10 de mayo de 2015 de http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/4065/Roche_Inserto-SP_Citrico_2013-10.pdf
- [66] Inserto Trinity Biotech. Oxalate Kit. Recuperado el 10 de mayo de 2015 de <http://www.trinitybiotech.com/Product%20Documents/591C-591D-29%20ES.pdf>
- [67] Villanueva J, Medina M, *et al.* Excreción de oxalatos y citratos en pacientes adultos con litiasis urinaria. *Medigraphic*. **2007**; 32(4): 134-140.
- [68] Cortes Blanco A, Fernández Longas A, *et al.* Valores de referencia de FSH, LH, testosterona total, testosterona libre, 17- β -estradiol y SHBG en niños sanos Zaragozanos. *Anales Españoles de pediatría*. **1999**; 51(2): 159-166
- [69] Teppa Garran A, Terán Davila J. Nuevos aspectos bioquímicos y moleculares de la acción de los estrógenos. *Ginecol Obstet Mex*. **2005**; 73: 463-442.
- [70] Hernandez-Valencia M, Zarate A. Efecto genético y hormonal sobre la diferenciación sexual. Paradójicamente la mujer requiere andrógenos y el hombre estrógenos. *Ginecol Obstet Mex*. **2010**; 78 (7): 365-370.