



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

**Programa de Maestría y Doctorado en Investigación Clínica
Experimental en Salud**

TÍTULO:

**POLIMORFISMOS DE LOS GENES *SLC13A2* (NaDC1) Y *SLC13A3* (NaDC3) EN
PACIENTES CON LITIASIS RENAL DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M.C. MARIO JOSÉ BASULTO MARTÍNEZ.

TUTOR:

DRA. MARTA MENJÍVAR IRAHETA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

**DR. RAFAL VALDEZ ORTIZ. HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
DRA. MARÍA DEL CONSUELO PLATA RAMOS, INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., JUNIO DE 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de video, 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 lo 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.

Agradecimientos

Esta tesis representa el esfuerzo de muchas personas a lo largo de casi 3 años. En primer lugar, nada de esto hubiera sido posible sin la participación de los sujetos y pacientes que colaboraron desinteresadamente para sumar en la generación de conocimiento. Todo este gran esfuerzo es por ellos, para poder ser mejores cada día y brindarles mejor atención y acompañarlos y guiarlos en sus enfermedades para que logren recuperar su salud en nuestras manos.

A todos mis compañeros de laboratorio, agradezco su apoyo y comprensión en todo momento, han sido un grupo inigualable y retador, son todos personas tenaces a las que admiro y auguro éxito en sus encomiendas futuras. A mis queridos colegas del Servicio de Urología por siempre brindar su colaboración para emprender juntos las locuras que hoy nos han colocado como uno de los mejores servicios de urología del país.

Con mucho cariño y admiración agradezco a mis mentores: a la Dra. Marta Menjivar, por el constante estímulo para ser mejores y demostrarnos que es posible conducir ciencia de vanguardia en México; por siempre hacernos dar lo mejor de nosotros mismos bajo una metodología impecable y perfeccionista, sin perder de vista lo más importante, disfrutar lo que hacemos. Al Dr. Rafael Valdez, por fungir como una inspiración y modelo a seguir, demostrando que es plausible ser médico comprometido e investigador serio a la vez. Agradezco por siempre impulsarme al mundo de la academia médica y por brindarme su tiempo, paciencia y consejo para hacerme cada día un poco mejor.

A mi Comité Tutor: Dr. Hugo Manzanilla, Dr. Gerardo Gamba y Dr. Aarón Domínguez, por tomarse el tiempo y esfuerzo de emitir sus valiosos comentarios sobre este trabajo, por guiarnos con su vasta experiencia para llevar este proyecto a los mejores puertos.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Bárbara Peña Espinoza, por cuidar cada paso dado a lo largo de estos años, por su asesoría en el laboratorio, en el manejo de datos, en las presentaciones y elaboración de manuscritos. Gracias por dedicar mucho más que el tiempo reglamentario para formarme como investigador. Eres una mujer admirable, un ejemplo de perseverancia y excelencia y la mejor definición de productividad y *multitasking*.

Gracias Dra. Marta Menjívar y Dra. Bárbara Peña, por su apoyo incondicional, por su paciencia hacia mi lento aprendizaje, pero sobretodo, gracias por creer en mí. Está de más decirlo, pero sin ustedes, hoy no sería la persona en la que esta experiencia llamada maestría, me convirtió: un médico-investigador (muy feliz).

A mi gran amigo, jefe y mentor: Dr. Juan Pablo Flores Tapia, por creer en mi, en mis proyectos e ideas, por incluirme en los tuyos, y por tus atinadas gestiones para que todo sea posible y demostrarme con hechos que no existen límites. ¡Gracias a ti soy urólogo, amigo!

A mi familia, por siempre estar al pendiente y apoyarme. Mamá, gracias por tu ejemplo y hacerme sentir que soy capaz de todo. Papá, gracias por enseñarme en lado correcto de la medicina. Alex, gracias por ser un ejemplo para seguir en constancia y perseverancia. Fer, gracias por hacerme pensar fuera de la caja. Abuelo, gracias por tu legado y ejemplo, eje rector de mi vida.

A ti, mi esposa e incondicional compañera, María Eugenia, gracias por no permitirme caer, por estar junto a mi en cada paso y hacer que todo esto valga la pena. ¡Este logro es tuyo!

Índice

Agradecimientos	
Índice	
Abreviaturas	
Resumen	14
Introducción	16
Antecedentes	16
Factores genéticos	19
Alteraciones en el balance de minerales en orina	21
<i>SLC13A2</i> (NaDC1) y <i>SLC13A3</i> (NaDC3)	25
Planteamiento del problema	30
Justificación	31
Hipótesis	32
H0:	32
H1	32
Objetivos	33
Objetivo general	33
Objetivos específicos	33
Material y Métodos	34
Tipo de estudio	34
Diseño de estudio	34
-Fase de descubrimiento	34
-Fase genómica	34
Tamaño de muestra	36
Criterios de selección	36
Criterios de inclusión para los casos:	36
Criterios de inclusión para los controles:	37
Criterios de exclusión ambos grupos:	37
Criterios de eliminación	37
Obtención de variables clínicas	37
Definición de variables clínicas	38
Medidas somatométricas	38
Determinaciones bioquímicas en sangre	39
Determinaciones bioquímicas en orina	39
Extracción de ADN	40
Genotipificación del <i>SLC13A2</i> y <i>SLC13A3</i>	40

Análisis estadístico	41
Aspectos éticos	42
Resultados	47
Fase de descubrimiento	47
Fase genómica	52
Discusión	63
Conclusión	70
Bibliografía	71
Anexos	78
Anexo 1	79
Anexo 2	81
Anexo 3	84
3-A. Glucosa	84
3-B. Urea	84
3-C. Creatinina en suero y orina de 24 horas	85
3-D. Ácido úrico en sangre y orina de 24 horas	85
3-E. Citrato en orina de 24 hrs	86
3-F. Oxalato en orina de 24 hrs	86
3-G. Electrolitos en sangre y orina de 24 horas	87
Anexo 4. Extracción de ADN mediante la técnica modificada de Miller et. al. (35)	88
Anexo 5	89
Anexo 6	90
Anexo 7	94

Tablas y Figuras:

Tabla 1. Genes asociados a LU reportados

Tabla 2. Características de los contranportadores de citrato a nivel renal

Tabla 3. Estudios sobre el *NaDC1* y LU y el *NaDC3*

Tabla 4. Características clínicas y sociodemográficas de los pacientes con LU

Tabla 5. Medidas de tendencia central de las pruebas bioquímicas en sangre y orina de 24 horas

Tabla 6. Frecuencia de alteraciones metabólicas en sangre y orina

Tabla 7. Distribución de macro y micronutrientes de dieta habitual

Tabla 8. Características basales de los participantes

Tabla 9. Comparación de frecuencias alélicas

Tabla 10. Comparación de las características entre los casos y controles

Tabla 11. Comparación de metabolitos, volumen urinario y función renal, entre los diferentes modelos de herencia para *NaDC1* y *NaDC3*

Tabla 12. Regresión logística multinomial para la asociación de los diferetes modelos de herencia del *NaDC1* y *NaDC3*

Tabla 13. Comparación de las medianas de citrato entre los genotipos en los participantes y estratificado por casos y controles

Tabla 14. Regresión logística multinomial para la asociación de los diferentes modelos de herencia del *NaDC1* y *NaDC3* utilizando los nuevos puntos de corte propuestos para hipocitraturia

Figura 1. Estructura de los cotransportadores de citrato NaDC1 y NaDC3

Figura 2. Localización de los cotransportadores en el túbulo proximal renal

Figura 3. Esquema de diseño experimental. Fase de descubrimiento y fase genómica

Figura 4. Protocolo de ciclos del PCR-TR

Figura 5. Curvas ROC para citrato y litiasis urinaria

Abreviaturas

ABC: Área Bajo la Curva
ACT: Agua Corporal Total
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
C.B.: circunferencia del brazo
C.C.: circunferencia de cintura
Ca: Calcio
Cl: Cloro
dL: decilitros
g: gramos
GWAS: Estudios de Asociación de Genoma Completo (*Genome-Wide Association Studies*)
H.C.: Hidratos de Carbono
HCO₃: Bicarbonato
HRAPEY: Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán
ICT: Índice Cintura Talla
IMC: Índice de Masa Corporal
IMG: Índice de Masa Grasa
IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social
K: Potasio
Kcal: Kilocalorías
Lt: Litros
LU: Litiasis Urinaria
Mg: Magnesio
mL: mililitros
Na: Sodio
NOM: Norma Oficial Mexicana
PCR: Reacción en Cadena de la polimerasa
PO: Fósforo
PTH: Hormona Paratiroidea
qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa, Cuantitativa
SNP: polimorfismos de una sola base
TAC: Tomografía Axial Computarizada
TSFR: Terapia Sustitutiva de la Función Renal
µL: Microlitros

Resumen

La prevalencia de litiasis urinaria (LU) va en aumento a nivel mundial. En México, Yucatán tiene la prevalencia más alta, probablemente se deba a un medio ambiente facilitador y a la genética. El trasfondo genómico de la población Maya ha demostrado ser diferente al de los demás grupos étnicos de México. La alteración metabólica relacionada frecuentemente con el desarrollo de LU en Yucatán es la hipocitraturia. El polimorfismo I550V (rs11567842) del gen *SLC13A2* se ha asociado con hipocitraturia en población maya-mestiza. Este gen codifica para el contrantransportador NaDC1 localizado en la membrana apical del túbulo proximal, encargado de la reabsorción de citrato. Otro gen es el *SLC13A3*, el cual codifica para el NaDC3, localizado en la membrana basolateral, donde la variante rs126917 puede ser clave en el desarrollo de LU a través de la regulación indirecta de la excreción de citrato. El objetivo de este estudio fue evaluar la asociación de los polimorfismos de los genes *SLC13A2* y *SLC13A3* con la excreción urinaria de citrato y con LU en pacientes de Yucatán. Es un estudio transversal de casos (LU) y controles (sin LU) de Yucatán. Se obtuvo un perfil metabólico en sangre y orina de 24 horas. Se extrajo DNA de sangre periférica y se midió la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Se genotipificó mediante PCR en tiempo real. Se realizó una ANCOVA para comparar la concentración de metabolitos entre genotipos de las variantes estudiadas usando como covariables el sexo, edad, IMC y creatinuria de 24 hrs. Además, se llevó a cabo una regresión logística multinomial con variables fijas (sexo, edad, IMC y creatinuria de 24 hrs) para determinar la asociación de la hipocitraturia y la LU con la variante de riesgo de los genes seleccionados. El protocolo se aprobó por el comité de ética e investigación y todos los participantes firmaron consentimiento informado. Se reclutaron 141 participantes (96 casos y 45 controles) con media de edad 45.7 ± 13.8 años, se encontró una mayor prevalencia de hipocitraturia en los

casos con respecto de los controles (90.6 vs 71.4%, $p=0.0049$). La variante del gen del *NaDC1* se asoció con LU (OR: 0.42, IC 95% 0.18 – 0.96, $p=0.04$) y con hipocitraturia (OR: 0.38, IC 95% 0.16 – 0.91, $p=0.031$) bajo el modelo de herencia recesivo, además se determinó un punto de corte optimizado para el diagnóstico de hipocitraturia propio de la población yucateca.

Este trabajo demuestra que la hipocitraturia es la alteración metabólica más frecuentemente asociada con LU en la población de Yucatán y confirma la participación de la variante I550V del *NaDC1* en la regulación del citrato urinario. Este es el primer trabajo que evalúa el polimorfismo de *NaDC3* y lo asocia con cambios en las concentraciones de citrato urinario bajo el modelo de herencia dominante y recesivo. Los resultados revelan que la población yucateca presenta un componente genético que la hace susceptible al desarrollo de LU. Son necesarios más estudios de los factores genéticos de la LU en esta población que contribuyan a conocer grupos de riesgo, generar blancos terapéuticos y de prevención.

Introducción

Antecedentes

La litiasis urinaria (LU) se define como la saturación y cristalización de un grupo complejo de biomateriales en la orina en cualquier punto dentro de la vía urinaria (1). Según datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (NAHES, por sus siglas en inglés) publicada en 2012, el 8.8% de la población de los Estados Unidos de América sufre de esta patología, de los cuales el 10.6% son hombres y el 7.1% son mujeres; se observó un aumento global del 3.6% en relación con los resultados de esta misma encuesta en 1994 (2, 3).

En México, existen pocos estudios epidemiológicos sobre la LU; en 1984 Gómez et al., detectaron en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) una tasa de 2.4 casos de LU por cada 10,000 derechohabientes; en la estratificación por entidad federativa destacó a Yucatán con la tasa más elevada, con 5.8 casos por cada 10,000 derechohabientes. Un estudio realizado en Yucatán por Medina-Escobedo et al., en 2002 analizó los factores de riesgo para LU, se que reportó una prevalencia de 5.5% de LU definitiva y un 4.8% con probable LU, lo cual sumaría más del 10% de confirmarse los casos probables, datos que fueron obtenidos a través encuestas a casi 6,000 sujetos (4). En la actualidad, los datos del Departamento de Epidemiología del Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán (HRAEPY) reportan que el principal motivo de atención médica es la LU, ocupando el 5.7% de todas las consultas otorgadas y el 16% de todos los procedimientos quirúrgicos.

La LU es una enfermedad recurrente de origen multifactorial, asociada a diversos factores tanto ambientales como genéticos (5). Aunque los factores ambientales que se han relacionado con la LU se han descrito ampliamente, éstos no explican por completo la elevada prevalencia de LU en Yucatán. Si bien, se ha descrito que los factores ambientales y la genética contribuyen prácticamente en partes iguales para el desarrollo de la LU, existen

estudios en los que se ha demostrado una heredabilidad del 56% (6), lo que demuestra la contribución de los factores genéticos en el desarrollo de LU, por lo que quizá estos factores deberían considerarse como un factor de mayor importancia en la susceptibilidad de LU en la población de Yucatán.

Factores ambientales en Yucatán

La LU se caracteriza por ser una enfermedad recurrente, con una tasa de 30% a 10 años (7), y de origen multifactorial, incluyendo factores como: herencia, medioambientales, origen étnico, ocupación, nutricionales, estilo de vida, genéticos, enfermedades metabólicas asociadas, deshidratación crónica, ingesta de agua con un alto índice de minerales, estado socioeconómico bajo, entre otros (4, 5, 8).

Las personas en situación de vulnerabilidad desconocen los factores de riesgo para la litiasis, las consecuencias de la enfermedad y las medidas de prevención; de igual forma, el acceso a los sistemas de salud es limitado en este grupo de personas, causando la detección tardía de enfermedad y poniendo a las personas en riesgo de un daño irreversible en la función renal. Según la medición multidimensional de pobreza del CONEVAL, en 2012 en Yucatán, la carencia social de acceso a los servicios de salud fue del 15.7%, seguridad social del 58.8%, servicios básicos en la vivienda del 42.7% y la alimentación del 25.1%. Además, el 27% de los grupos vulnerables son por carencias sociales y de estos, un 6.3% es por carencias de ingresos. Cabe mencionar que el 5.5% de los hogares no disponen de agua entubada de la red pública, y que un alto porcentaje de la población con acceso a agua entubada consumirá esa agua con un alto contenido de minerales (agua dura). El 45.1% de la población de 15 años o más, tienen educación básica incompleta. Los malos hábitos nutricionales se verán influidos por el bajo nivel socioeconómico y educativo, y el acceso limitado a alimentos de calidad.

Las prolongadas jornadas laborales, los oficios que promueven la exposición al sol o altas temperaturas, aunadas a la baja o nula ingesta de agua, generalmente alta en minerales, y a la elevada ingesta de bebidas azucaradas o alimentos ricos en sal, promueven la formación de litos. Asimismo, el sedentarismo influye causando sobrepeso y obesidad, ambas relacionadas con la génesis de la LU.

Un factor muy importante a considerar, es la hidratación subóptima, debido a que el 85.5% de la superficie del estado presenta clima cálido subhúmedo. De acuerdo con el INEGI, la temperatura media anual en Yucatán es de 26°C, la máxima promedio es alrededor de los 36°C y siendo el mes de mayo el más caluroso, coincidiendo con un aumento en la demanda de servicios de salud por LU. Las personas en situación de vulnerabilidad que laboran largas jornadas con exposición a altas temperaturas y sin acceso a agua de calidad, son el grupo más afectado.

Un estudio de Medina-Escobedo et al. (4), analizó la calidad del agua en el estado de Yucatán, encontrando que en la totalidad de las muestras analizadas se superó el límite de sales permisible para el consumo humano recomendado por la Norma Oficial Mexicana (NOM) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Por otra parte, el consumo de agua se ha visto desplazado por la ingesta de bebidas embotelladas, consideradas como factor de riesgo para LU. Un estudio demostró que entre 1999 y 2012, las bebidas calóricas (azucaradas) fueron la principal fuente de energía en niños y adultos mexicanos (9).

Actualmente los programas de salud sobre LU, están dirigidos al tratamiento de la enfermedad activa, ya que la diversidad de los factores etiológicos, hace de su prevención un reto. Si a lo anterior agregamos que la generación y divulgación de conocimiento científico sobre LU en nuestro país es muy escasa, no es posible contar con datos estadísticos que permitan elaborar y planear acciones dirigidas a su prevención y manejo.

Factores genéticos

México constituye un mosaico poblacional, el cual alberga más de 60 grupos indígenas que comparten características genéticas similares. La población maya-mestiza de la Península de Yucatán posee un componente genético único ancestral que es considerablemente distinto a los grupos étnicos del resto del país. Esta peculiaridad en el genoma puede conferir una manera diferente de responder al medio ambiente, suponiendo un mayor riesgo a padecer algunas enfermedades en la población (10).

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) hace referencia a un cambio en la secuencia en un lugar determinado del gen. Cuando este cambio se localiza en regiones codificantes del ADN, se le conoce como variante exónica y puede implicar un cambio en la secuencia de aminoácidos en la proteína codificada por el gen. En otros casos, el cambio del nucleótido en la región exónica puede ocasionar variantes sinónimas, las cuales se producen al generar códigos que codifican para el mismo aminoácido, esto debido a la propiedad del código genético degenerado. Las variantes sinónimas, evidentemente, no generan ningún cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Asimismo, existen variantes exónicas en las que el cambio de nucleótido generará un codón de parada, dando lugar a proteínas de tamaño menor. Estos cambios en la estructura proteica resultantes de los SNPs, presumiblemente, conducen a un cambio en la función proteica.

Por su parte, los SNP que se encuentran en la región intrónica del gen, si bien no implican cambios estructurales y funcionales de la proteína, pueden dar lugar a modificaciones en la expresión del gen afectado.

Se han descrito asociaciones de diversas variantes genéticas con las alteraciones metabólicas de la LU, sugiriendo a ésta como una enfermedad compleja, debido a los diferentes genes y vías metabólicas involucradas. En una revisión sistemática (11), se mostraron más de 10

genes asociados con LU; sin embargo, aún no se tiene claro cómo participan en la fisiopatología de la LU. Estudios recientes sugieren que los genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de minerales, así como el proceso de inflamación crónica local, podrían estar participando en el desarrollo de LU (12, 13). Uno de los genes más estudiados es el *SLC13A2* que codifica para el cotransportador sodio/dicarboxilato 1 (NaDC1) que se localiza en la membrana apical del túbulo proximal y se encarga de la regulación del citrato urinario, los polimorfismos en este gen se han asociado a la excreción de citrato en orina, más que el fenotipo de LU; el NaDC3, localizado en la membrana basolateral, reabsorbe citrato hacia el espacio intracelular pero no hay estudios que lo asocien con el citrato urinario hasta el momento. Por la complejidad fenotípica de esta patología, existe controversia acerca de la mejor manera de abordar el estudio de los factores genéticos y su contribución al desarrollo de LU, sin embargo, la más empleada en los últimos años ha sido enfocada a las alteraciones metabólicas urinarias subyacentes (14-16). En la tabla 1 se sintetizan los genes que se han mostrado asociados a LU en estudios recientes.

En la población yucateca no se han identificado variantes genéticas que expliquen completamente la susceptibilidad para el desarrollo de la LU. El único estudio que se ha realizado en esta población demostró que el polimorfismo I550V del gen de *NaDC1* está asociado con LU, en especial en pacientes con hipocitraturia. Además, se reportó que los polimorfismos rs731236 (*TaqI*) y rs2228570 (*FokI*) del gen en *VDR* y el Ala62Thr del gen *ZNF365*, se encontraban asociados con mayor excreción urinaria de ácido úrico y menor excreción de citrato en heterocigotos respectivamente (17, 18).

Tabla 1. Genes asociados a LU reportados

GEN	CHR	PROTEÍNA
<i>AGT</i>	1q42.2	Angiotensina
<i>AGXT</i>	2q37.3	Alanino glucoxilato aminotransferasa
<i>AHSG</i>	3q27.3	alfa 2 HS glicoproteína
<i>AMBP</i>	9q32	Alfa-1-microglobulina / precursor de Bikunina
<i>APRT</i>	16q24.3	Adenina fosforibosil transferasa
<i>AQP1</i>	7p14.3	Acuaporina 1
<i>ATP6V1B1</i>	2p13.3	H ATPasa transportadora V1 subunidad B1
<i>CALCR</i>	7q21.3	Receptor de calcitonina
<i>CASR</i>	3q3.33- q21.2	Receptor sensible a calcio
<i>CD14</i>	5q31.3	CD14
<i>CDH1</i>	16q22.1	Cadherina 1
<i>CLCN5</i>	Xp11.23	Canal de cloro dependiente de voltaje 5
<i>CLDN14</i>	21q22.13	Claudina 14
<i>CLDN16</i>	3q28	Claudina 16
<i>DGKH</i>	13q14.11	Diacilglicerol kinasa eta
<i>F12</i>	5q35.3	Factor de coagulación 12
<i>FGF23</i>	12p13.32	Factor de crecimiento de fibroblastos 23
<i>GPXI</i>	3p21.31	Glutation peroxidasa 1
<i>GRHPR</i>	9p13.2	glucoxilato e hidroxipiruvato reductasa
<i>IL1B</i>	2q14.1	IL-1
<i>INMT</i>	7p14.3	indoletilamina-N-metiltransferasa
<i>KL</i>	13q13.1	Klotho
<i>LCN2</i>	9q34.11	Lipocalina 2
<i>MEN1</i>	11q13.1	Menina 1
<i>MGP</i>	12p12.3	Matriz Gla
<i>MIF-AS1</i>	22q11.23	MIF antisentido RNA 1
<i>MINDY4</i>	7p14.3	MINDY lisina 48 deubiquitinasa 4
<i>MIR155</i>	21q21.3	MicroRNA 155
<i>MTNR1A</i>	4q35.2	Receptor de melatonina 1A
<i>Ncl-ps1</i>	15p16	Pseudogen de nucleoleína 1
<i>OCRL</i>	Xq26.1	inositol polifosfato 5 fosfatasa OCRL
<i>OPLAH</i>	8q24.3	5 oxoprolinasa ATP hidrolizante
<i>ORAI1</i>	12q24.31	modulador de liberador ORAI calcio activado 1
<i>PFN3</i>	5q35.3	Profilina 3

<i>PRODH2</i>	19q13.12	Prolina deshidrogenasa 2
<i>PTH</i>	11p15.3	Hormona paratiroidea
<i>RGS14</i>	5q35.3	Proteína de señalización reguladora de proteína G 14
<i>SLC13A2</i>	17q11.2	Familia acarreadora de solutos 13, miembro 2
<i>SLC22A12</i>	11q13.1	Familia acarreadora de solutos 22 miembro 12
<i>SLC26A1</i>	4p16.3	Familia acarreadora de solutos 26 miembro 1
<i>SLC26A6</i>	3p21.31	Familia acarreadora de solutos 26 miembro A
<i>SLC2A9</i>	4p16.1	Familia acarreadora de solutos 2 miembro 9
<i>SLC34A1</i>	5q35.3	Familia acarreadora de solutos 34 miembro 1
<i>SLC3A1</i>	2p21	Familia acarreadora de solutos 3 miembro 1
<i>SLC6A20</i>	3p21.31	Familia acarreadora de solutos 6 miembro 20
<i>SLC9A3R1</i>	17q25.1	SLC9A3 regulador 1
<i>SPP1</i>	4q22.1	Fosfoproteína secretada 1
<i>TFF1</i>	21q22.3	Factor trefoil 1
<i>TRPV5</i>	7q34	Subfamilia 5 de receptor transitorio de canales de potencia de cationes miembro 5
<i>UGT1A</i>	2q37.1	UDP-glucuronosiltransferasas familia 1 miembro A
<i>UMOD</i>	16p12.3	Uromodulina o Tamm Horsfal
<i>VDR</i>	12q13.11	receptor de vitamina D
<i>ZNF365</i>	10q21.2	Proteína dedo de zinc 365

Alteraciones en el balance de minerales en orina

Diversas vías fisiopatológicas pueden culminar en la alteración en el balance bioquímico en la orina, favorecida por la hipersaturación de la misma, proceso en el cual se induce un aumento de las sustancias estimuladoras y disminución en las inhibidoras de la cristalización, o una combinación de ambas. Las alteraciones del calcio, citrato, oxalato y ácido úrico urinario son las más frecuentemente asociadas a LU, su identificación es crucial para el tratamiento de ésta, así como en la prevención de recurrencias. En una muestra de 109 niños de Yucatán, se identificó que el 44% presentaban alguna alteración metabólica en la orina y el 25.7% tenía más de una, siendo las más frecuentes la hipocitraturia (35.8%), la hiperuricosuria (22.9%), la hiperfosfaturia (20.2%) y la hipercalciuria (18.3%) (17).

-Hipocitraturia

El citrato es un compuesto proveniente del ciclo de Krebs, el cual es excretado en la orina al ser filtrado por el glomérulo y reabsorbido por el túbulo proximal en el cotransportador NaDC1, dando lugar a la cantidad final que se excretará, debido a que no hay secreción demostrada de éste. Sin embargo, el citrato en el túbulo renal forma complejos con el calcio, lo que promueve que haya una disminución de la cantidad libre de este ión para unirse al oxalato o fosfato, limitando la supersaturación del calcio e inhibiendo la agregación de cristales. El pH es el principal factor determinante de la excreción de citrato, ya que de éste depende su reabsorción. El citrato es reabsorbido como citrato⁻², pero la mayoría se encuentra como citrato⁻³; en la acidosis, se invierte esta proporción y se incrementa la reabsorción, por lo cual la hipocitraturia se asocia con litiasis recurrente. En un estudio realizado por Okamoto y colaboradores demostraron que la presencia del alelo B del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) I550V del receptor NaDC1 en pacientes formadores de LU de calcio y controles sanos. Por su parte, Rendina et al., demostraron una interacción epistática significativa entre el gen *SLC13A2*, que codifica para el NaDC1, y el *VDR*, que codifica para el receptor de la vitamina D, en pacientes hipocitratúricos formadores de LU en comparación con el control (14-16).

-Hiperuricosuria

El ácido úrico (AU) es el producto final del metabolismo de las purinas, alteraciones en el metabolismo de las mismas está asociado con el incremento en los niveles de AU en la orina, lo cual se asocia con aumento de riesgo de LU por AU y calcio. En hombres más de 800 mg/día o más de 750 mg/día en mujeres es considerado hiperuricosuria. Los dos factores etiológicos principales en la LU por AU son la reducción en la excreción urinaria de amonio

(NH⁴⁺) y aumento en la excreción neta de ácidos. Gianfrancesco et al. (19), demostraron que el polimorfismo Ala62Thr en el gen *ZNF365* que codifica para la proteína dedo de zinc, está asociado a LU por AU. Asimismo, otros estudios de los transportadores de uratos a nivel renal URAT1 y GLUT9, han sido propuestos como mecanismo de hiperuricosuria. Sin embargo, sólo existe un estudio que encontró el polimorfismos del gen *SLC2A9*, que codifica para GLUT9, asociados a LU en croatas (20). Fu et al. (21), determinaron la expresión de estas proteínas en tejido renal de pacientes con LU comparado con controles, pero no solo en formadores de LU por AU, sino también por OxCa, que pudieran generarse por la disminución del pH a nivel tubular debido al exceso de AU, lo que inhibe la excreción de citrato y permitiendo mayor disposición del calcio para complejarse. Dicho trabajo encontró mayor expresión de URAT1 en pacientes formadores de LU por AU en comparación con pacientes formadores de litos de OxCa y en los controles.

-Hiper calciuria

El calcio es el principal componente de los litos, aproximadamente el 85% de éstos lo contienen. El principal factor que predisponente a la formación de litos es la hiper calciuria idiopática (HCI). Se ha demostrado que este fenómeno puede ser heredable, pero también tiene causas ambientales tales como la dieta. La cantidad de calcio en la orina se debe considerar de riesgo para la formación de LU, cuando excede los 200 mg/día para ambos sexos. Las fugas renales de calcio también pueden constituir a la HCI, ya que ésta se puede dar por aumento en la filtración de calcio o disminución de su reabsorción tubular, siendo ésta última la más asociada. Mitra et al., demostraron una asociación entre el SNP rs1801197 del gen que codifica para el receptor de calcitonina (*CALCR*) y la presencia de LU en bengalíes. Otro gen que ha sido estudiado es el del receptor sensible a calcio (*CaSR*), debido

a su participación en la excreción de calcio urinario, pero hasta el momento no han sido concluyentes (22-24).

-Hiperoxaluria

El oxalato es un ácido dicarboxílico, la mayoría proviene del metabolismo hepático del glicoxilato y una parte de la dieta, la principal forma de eliminación de éste es a través de la orina. Existen hiperoxalurias primarias en enfermedades genéticas raras del metabolismo de glicoxilatos, en las que hay sobreproducción metabólica de oxalato. El incremento de oxalato en la orina conlleva a la saturación de esta con el subsecuente riesgo de LU, además, el oxalato es uno de los principales componentes de los litos ya que se acompleja con el calcio. Lu et al., estudiaron polimorfismos del gen *SLC26A6*, el cual está involucrado en el transporte de oxalato, encontrando que el alelo C del SNP rs184187143 es el más asociado con un incremento de riesgo para LU (25, 26).

SLC13A2 (NaDC1) y SLC13A3 (NaDC3)

El manejo renal de citratos depende de la actividad del NaDC1 y NaDC3. Como se ha mencionado, el NaDC1 es un cotransportador simporte de baja afinidad que está ubicado en la membrana apical del túbulo proximal renal y está constituido por 11 dominios transmembrana; en modelos animales, se evidenció que el onceavo dominio contiene un C-terminal que contiene residuos de aminoácidos que determinan la afinidad y reconocimiento del sustrato (Figura 1). Esta proteína se codifica en el gen *SLC13A2*, que se encuentra en el 17q11.2 que contiene 12 exones que codifican para 593 aminoácidos.

El SNP rs11567842, constituye el cambio de A/G en el exón 12, que se traduce en una sustitución de una isoleucina por una valina en el aminoácido 550 (I550V) ubicado en el dominio transmembrana 11. Se ha demostrado asociación de este SNP y la excreción renal

de citrato (14-16). Pajor et al. (27), demostró *in vitro* que tiene un efecto funcional modesto al disminuir en un 20% la abundancia proteica y actividad de transporte (28).

El *SLC13A3*, ubicado en el cromosoma 20q13.12, consta de 13 exones y codifica para la proteína NaDC3, que es un cotransportador de citrato que, a diferencia del NaDC1, es de alta afinidad y está localizado en la membrana basolateral del túbulo proximal (Figura 2). Consta de 11 dominios transmembrana. El SNP rs126917, se encuentra en la región intrónica del gen. Ambos cotransportadores introducirán citrato al citoplasma desde la orina (NaDC1) y del torrente sanguíneo (NaDC3) y presentan una similitud de aminoácidos del 48%, sin embargo, tienen otras características distintas, como se menciona en la tabla 2.

Actualmente, existe evidencia suficiente sobre el SNP I550V y la excreción de citrato en sujetos sanos y pacientes formadores de LU (14, 16, 17, 27, 29), sin embargo, el rol del NaDC3 en la LU/excreción renal de citrato, nunca ha sido estudiado, pues no reabsorbe el citrato de la orina, por lo que parecería lógico que no tenga injerencia en la cantidad de citrato excretado. Actualmente, solo un estudio (30) de asociación de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) ha encontrado asociación entre el rs126917 y diabetes mellitus tipo 2 (tabla 3). Desde otra perspectiva, es posible que exista participación del NaDC3 en la excreción de citrato a través de controlar la concentración intracelular de citrato y regular indirectamente la actividad y expresión del NaDC1, afectando así la cantidad final del citrato en la orina; las variantes del NaDC3 puedan afectar su función y permitir alteraciones en el citrato urinario bajo este mecanismo.

Aunque se han descrito los factores ambientales de manera extensiva, éstos no explican la gran susceptibilidad de la población de Yucatán a padecer LU, aún menos su alta tasa de recurrencia. Por esto, deben explorarse los factores genéticos, los cuales podrían darnos respuestas no sólo a la alta recurrencia en la población, sino también a los mecanismos

involucrados. De este modo la información generada podría permitirnos identificar marcadores genéticos para la prevención o seguimiento de la LU.

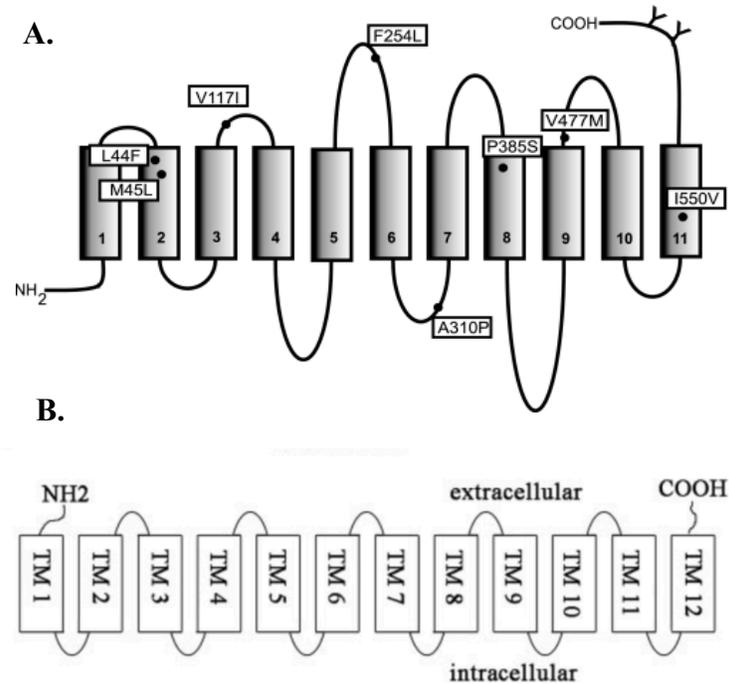


Figura 1. Estructura de los cotransportadores de citrato NaDC1 y NaDC3.

A. Estructura del cotransportador de citrato NaDC1. Se muestran los 11 dominios transmembrana y algunos SNPs identificados. Nótese el cambio I550V en el dominio 11, encargado de la afinidad y reconocimiento del sustrato. Tomado de Pajor y Sun. (27) **B.** Estructura del cotransportador de citrato NaDC3. Se muestran los 12 dominios transmembrana y los extremos N y C terminales. La variante intrónica propuesta no representa cambios en la estructura proteica. Tomado de Xue-Yuan Bai et al. (31).

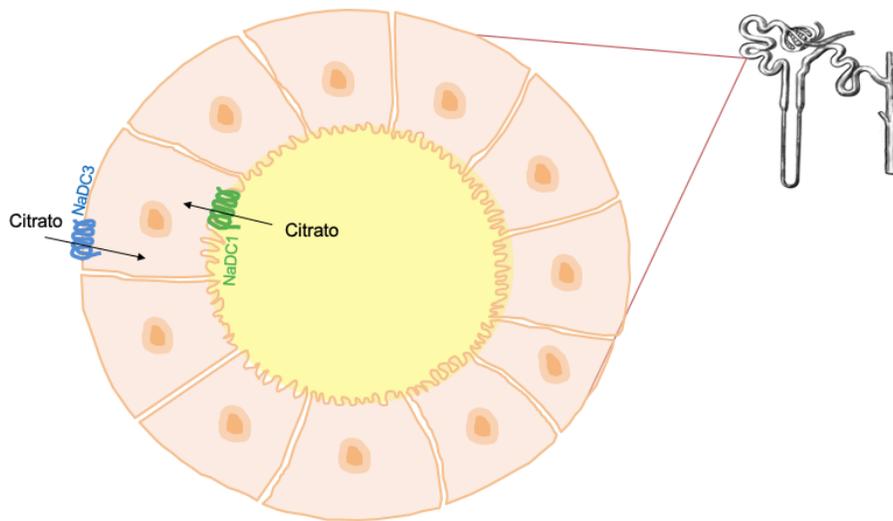


Figura 2. Localización de los cotransportadores en el túbulo proximal renal. NaDC1 en la membrana apical y NaDC3 en la membrana basolateral. (diseño original)

Tabla 2. Características de los cotransportadores de citrato a nivel renal (16, 27, 32).

NaDC1	NaDC3
Membrana apical	Membrana basolateral
Baja afinidad	Alta afinidad
Mayormente estimulado por pH bajo	Relativamente insensible. pH extremo
Transporta la forma divalente del citrato	Transporta la forma trivalente del citrato

Tabla 3. Estudios sobre el NaDC1 y LU y el NaDC3 (14, 16, 17, 30).

	Población	n	Método	Genes	SNPs	Fenotipo
Okamoto et al., 2007	Tokiotas	105	Secuenciación	NaDC1	I550V	OxCa y POCa
Medina-Escobedo et al., 2013	Yucatecos	139	Genotipificación	NaDC1	I550V	LU e Hipocitraturia
Rendina et al., 2016	Italianos	372	Genotipificación	NaDC1	I550V	Hipocitraturia y LU por OxCa
Udomsilp et al., 2018	Tailandeses	260	Genotipificación	NaDC1	I550V	LU
Bento et al., 2008	Americanos	300	GWAS	NaDC3	rs126917	DM2

OxCa: oxalato de calcio, POCa: fosfato de calcio, LU: litiasis urinaria, GWAS: estudios de asociación de genoma completo, DM2: diabetes mellitus tipo 2.

Planteamiento del problema

Yucatán es la entidad con mayor prevalencia de LU de México. Su alta incidencia y recurrencia saturan los servicios de salud, condicionan ausentismo laboral, afectan la economía familiar, impactando de manera negativa en la calidad de vida. Con los estudios realizados hasta ahora, no hay una clara explicación de la susceptibilidad de la población de Yucatán a LU y el componente genético. Asimismo, no se ha estudiado de manera integral esta etiología, por lo que no se conocen las alteraciones clínicas más frecuentes, los factores de riesgo asociados y las posibles variantes genómicas. Por este motivo consideramos necesario integrar el conocimiento derivado de los factores ambientales de susceptibilidad con los factores genéticos, y de esta manera poder identificar a aquel sector de la población en riesgo.

Justificación

La LU va en aumento a nivel mundial y también en Yucatán, donde es un problema endémico identificado. La LU es una enfermedad compleja y recurrente, que puede progresar a deterioro irreversible de la función renal, impactando negativamente en la calidad de vida y saturando los servicios de salud debido a su alta recurrencia. A pesar de los estudios que se han realizado acerca de la LU, la información disponible no explica la susceptibilidad de la población yucateca a esta patología. Entre las principales causas que participan en el desarrollo de LU se encuentran factores ambientales y genéticos, sin embargo, no se sabe la contribución de los factores genéticos al desarrollo de LU, por lo tanto, la caracterización poblacional y genética nos brindaría un importante panorama sobre los fenotipos y los genotipos más frecuentemente asociados a esta enfermedad en la región. Por otro lado, el estudio de los factores genéticos en esta población, lo que permitiría conocer posibles grupos de riesgo, generar blancos terapéuticos y establecer medidas de prevención de las recurrencias.

Hipótesis

Existe asociación entre los polimorfismos genéticos rs11567842 del gen *SLC13A2* (NaDC1) y rs126917 del gen *SLC13A3* (NaDC3) y la litiasis urinaria/hipocitraturia en pacientes de la península de Yucatán.

H0: No existe asociación entre los polimorfismos de los genes *SLC13A2* (NaDC1) y *SLC13A3* (NaDC3) en pacientes de la Península de Yucatán con litiasis renal/hipocitraturia

H1: Si existe asociación entre los polimorfismos de los genes *SLC13A2* (NaDC1) y *SLC13A3* (NaDC3) en pacientes de la Península de Yucatán con litiasis renal/hipocitraturia

Objetivos

Objetivo general

Identificar si existe asociación entre los polimorfismos genéticos rs11567842 del gen *SLC13A2* (NaDC1) y rs126917 del gen *SLC13A3* (NaDC3) en pacientes de la Península de Yucatán con litiasis renal/hipocitraturia

Objetivos específicos

- Conocer las características clínicas y sociodemográficas de los pacientes de la península de Yucatán con litiasis renal
- Conocer la frecuencia de las alteraciones metabólicas urinarias en pacientes de la península de Yucatán con litiasis renal
- Identificar si existe asociación entre los polimorfismos genéticos rs11567842 del gen *SLC13A2* (NaDC1) y rs126917 del gen *SLC13A3* (NaDC3) y la excreción urinaria de 24 horas de citrato.

Material y Métodos

Tipo de estudio

Estudio poblacional, transversal de casos y controles

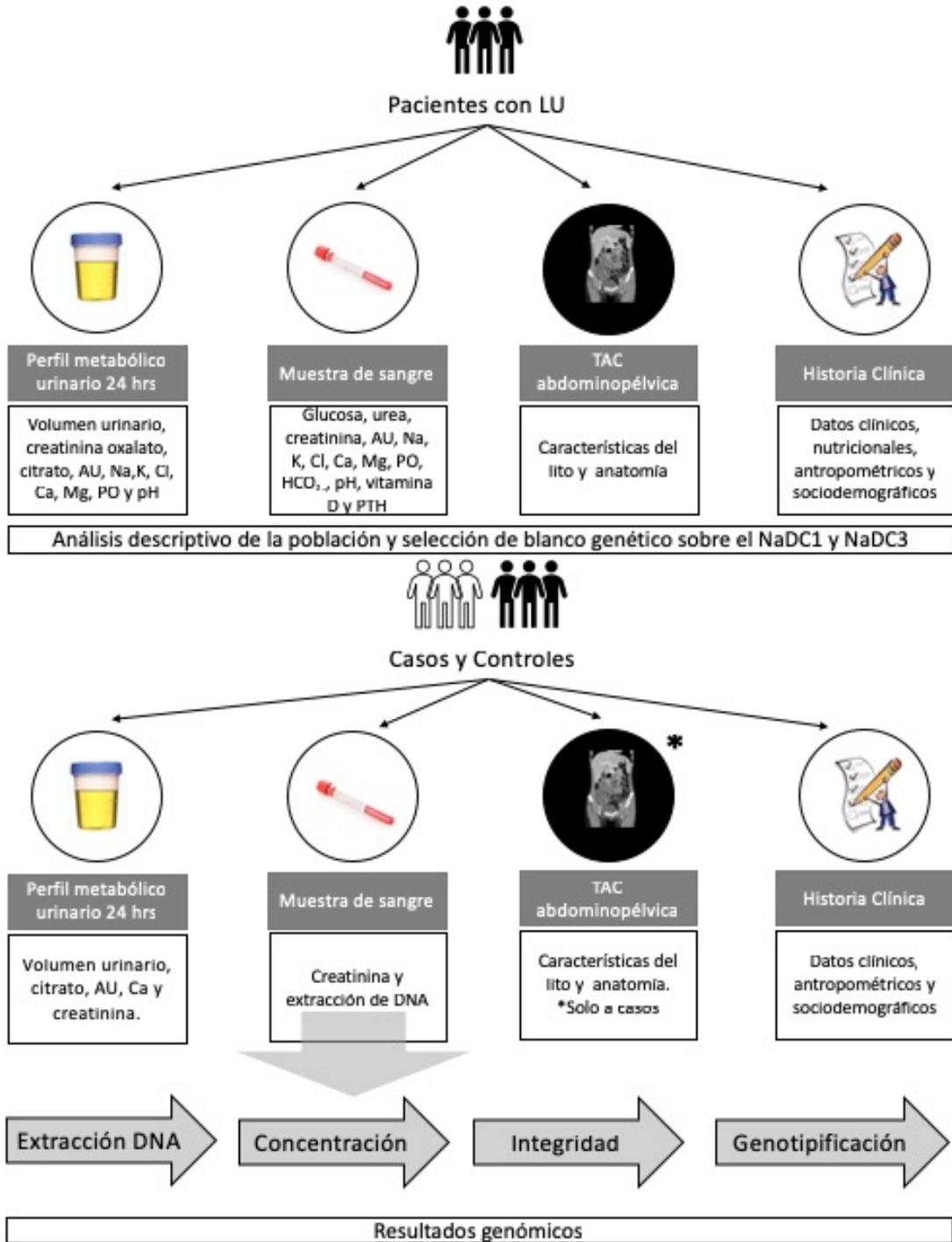
Diseño de estudio

Estudio experimental que estuvo dividido en dos fases: 1) fase de descubrimiento y 2) fase genómica.

-Fase de descubrimiento: prospectivamente se reclutaron de manera consecutiva y no probabilística a los pacientes con LU que acudieron de la Clínica de Litiasis del HRAEPY, a los que se les aplicó la historia clínica de litiasis y la historia clínica nutricional de la Clínica de Litiasis. Todos los pacientes contaron con una Tomografía Axial Computarizada abdominopélvica en fase simple. Se recabaron medidas somatométricas y se les realizaron determinaciones bioquímicas en sangre, que incluyeron: glucosa, urea, creatinina, ácido úrico (AU), sodio (Na), potasio (K), cloro (Cl), calcio (Ca), fósforo (PO), magnesio (Mg), bicarbonato (HCO_3^-), pH, vitamina D y PTH; y en orina de 24 horas: oxalato, citrato, creatinina, ácido úrico, sodio, potasio, cloro, calcio, fósforo, magnesio, así como la medición del volumen urinario. Estos datos se analizaron de manera descriptiva y se identificaron las principales alteraciones del metabolismo urinario subyacentes que se abordaron en la siguiente fase.

-Fase genómica: se reclutó de manera prospectiva a una muestra representativa de sujetos (casos y controles) habitantes de Yucatán de al menos 3 generaciones, y se les realizó una historia clínica, medidas antropométricas, pruebas bioquímicas y extracción de ADN, en sangre: creatinina; y en orina de 24 horas: Ca, citrato, AU y creatinina. Además, se obtuvo una muestra de sangre periférica de la cual se realizó la extracción de sangre periférica para la posterior genotipificación. En la **figura 3** se presenta un esquema del diseño experimental.

Figura 3. Esquema de diseño experimental. Fase de descubrimiento y fase genómica



Tamaño de muestra

Se calculó el tamaño de muestra con base a la frecuencia de casos nuevos de litiasis por año reportados por el Departamento de Estadística del HRAEPY (112) y una proporción esperada del 5% y una seguridad del 95% con un incremento de 15% de proporción esperado de pérdidas, empleando la siguiente fórmula:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

En donde:

N= Total, de casos nuevos por año. (cifras estadísticas HRAEPY 112)

Z_{α} = 1.96 al cuadrado para seguridad del 95%

p= Proporción esperada. 5%, =0.05 (4)

q= 1-p (1-0.05= 0.95)

d= error (5%)

$$n = \frac{112 * 1.96^2 * 0.05 * 0.95}{0.05^2 * (112 - 1) + 1.96^2 * 0.05 * 0.95} = 87$$

Más 15% de estimación de pérdidas = 101 para cada grupo

n=202

Criterios de selección

Criterios de inclusión para los casos:

- Pacientes con LU diagnosticada mediante TAC de abdomen
- Mayores de 18 años
- Originarios y habitantes, de al menos tres generaciones, de alguno de los tres estados de la Península de Yucatán (Yucatán, Campeche o Quintana-Roo)
- Atendidos en la Clínica de Litiasis del HRAEPY
- Que aceptan voluntariamente participar en el estudio y firmen consentimiento informado

Criterios de inclusión para los controles:

- Sujetos sin síntomas compatibles ni antecedentes previos de LU
- Que no tengan ningún familiar en primer grado con diagnóstico o antecedentes previos de LU
- Mayores de 18 años
- Originarios y habitantes, de al menos tres generaciones, de alguno de los tres Estados de la Península de Yucatán (Yucatán, Campeche o Quintana-Roo)
- Que aceptan voluntariamente participar en el estudio y firmen consentimiento informado

Criterios de exclusión ambos grupos:

- Consumo suplementos multivitamínicos o específicamente vitamina D o C
- Falla hepática
- Cáncer o neoplasias
- Enfermedades reumatológicas
- Enfermedad renal poliquística
- Postrasplantados de cualquier órgano
- Tratamiento sustitutivo de la función renal
- Tratamiento con diuréticos, antibióticos, alopurino, uricosúricos u otros medicamentos que alteren el metabolismo urinario.

Criterios de eliminación

- Sujetos que no deseen continuar en el estudio
- Sujetos del grupo control que durante el desarrollo del estudio hayan sido diagnosticados con LU

Obtención de variables clínicas

Para la obtención de los datos clínicos se empleó el formato de Historia Clínica de Litiasis (anexo 1) utilizada en la Clínica de Litiasis del HRAEPY y fue aplicada a todos los participantes del estudio por un médico previamente capacitado. Dicha historia comprende

datos de identificación del sujeto, así como antecedentes heredofamiliares, antecedentes personales patológicos, antecedentes personales de LU y procedimientos derivados y factores de riesgo. Durante la fase de descubrimiento, se aplicó la Historia Clínica Nutricional para pacientes con LU que se emplea en la Clínica de Litiasis del HRAEPY (anexo 2), misma que incluye datos específicos de hidratación, evaluación de la dieta habitual y frecuencia del consumo de alimentos.

Definición de variables clínicas

La función renal fue evaluada mediante el cálculo de la tasa de filtración glomerular mediante la ecuación del CKD-EPI (33) y estratificada de acuerdo con la clasificación de KDIGO (34). La hipociraturia se definió como un citrato urinario < 320 mg/24 hrs, hiperuricosuria como ácido úrico en orina > 600 mg/24 hrs, hipercalciuria como un índice calcio/creatinuria > 0.14 , hiperoxaluria como oxalato urinario > 40 mg/24 hrs e hipomagnesuria como magnesio urinario < 80 mg/24 hrs. En cuanto a la vitamina D sérica, < 30 pg/mL se consideró como deficiencia y < 10 pg/mL como deficiencia; hiperparatiroidismo se definió como PTH > 65 pg/mL. La ATRd se definió como pH sérico < 7.40 o normal, brecha aniónica sérica < 12 , cloro sérico > 108 mmol/L y cualquier valor positivo de brecha aniónica urinaria. La carga litiásica fue estimada de las TACs de pacientes con litos no operados previamente para su resolución, usando la fórmula $0.785 \times \text{largo}_{\text{máximo}} \times \text{ancho}_{\text{máximo}}$ en cm^2 (35).

Medidas somatométricas

El peso y la talla fue determinado usando una báscula de piso con estadímetro Hergom[®], a partir del cual se calculó el índice de masa corporal (IMC). Además, se midió la circunferencia de la cintura (CC) y circunferencia del brazo (CB) y se calculó el índice Cintura Talla (ICT). El Índice de Masa Grasa (IMG) y el Agua Corporal Total (ACT) se

calculó con las fórmulas de Deurenberg y de Watson, respectivamente, todas las mediciones fueron realizadas por personal de la salud calificado. El sobrepeso y la obesidad fue categorizado de acuerdo con las definiciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-008-SSA3-2017) para sujetos de talla baja (<150 cm).

Determinaciones bioquímicas en sangre

Tras un ayuno previo de 10 a 12 horas, se extrajeron 4 mL de sangre venosa periférica por flebotomía de antebrazo utilizando sistema de vacío sin anticoagulante y gel separador, se enviaron inmediatamente al Laboratorio Clínico del HRAEPY para su centrifugación y obtención del suero para proceder a las determinaciones de glucosa, urea, creatinina, AU, Na, K, Cl, Ca, Mg, PO, HCO₃⁻, pH, vitamina D y PTH. Los métodos empleados en cada técnica se describen en el anexo 3.

Determinaciones bioquímicas en orina

Se instruyó a los participantes para realizar una recolección de orina de 24 horas bajo su dieta habitual, en la cual, la primera orina de la mañana fue desechada y, a partir de ese momento, se inició la recolección durante las siguientes 24 horas anotando la hora de inicio y término, utilizando en un bote limpio y seco que se mantuvo en refrigeración hasta su traslado al día posterior al Laboratorio Clínico del HRAEPY, donde se recibió, se midió el volumen total, se homogenizó mediante agitación manual y se tomó una muestra de 12 mL, se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y se almacenó en refrigeración a -20 °C para medición de creatinina, oxalato, citrato, AU, Na, K, Cl, Ca, Mg, PO y pH. Las técnicas empleadas se detallan en el anexo 3.

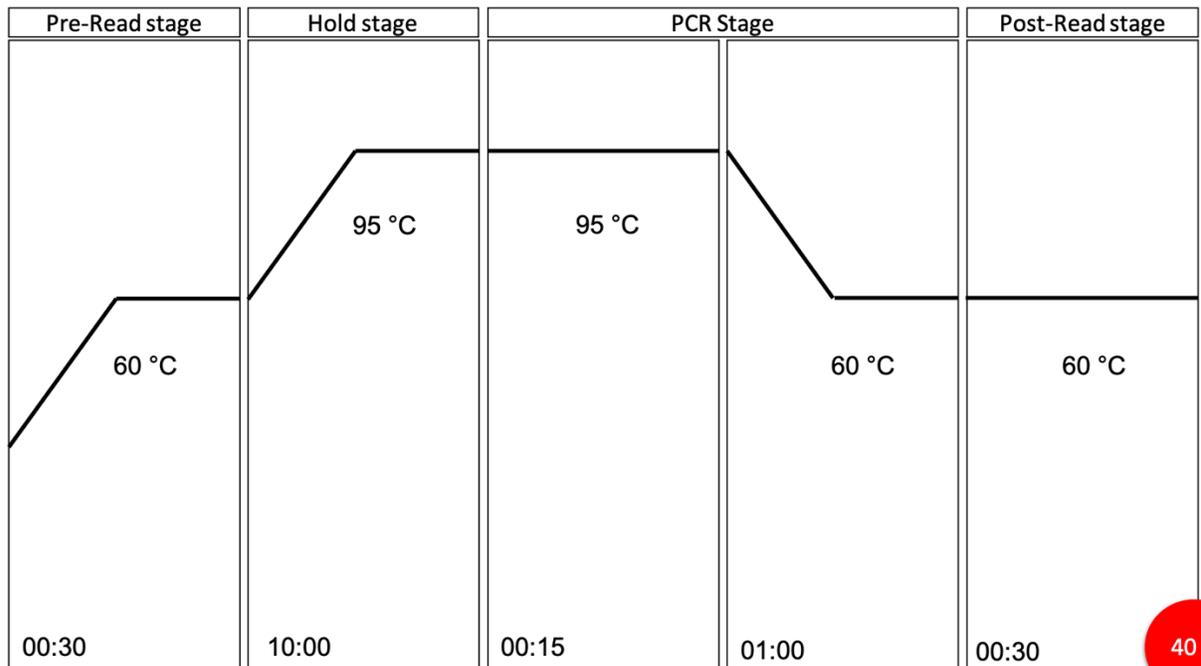
Extracción de ADN

A los participantes se les tomaron 4 mL de sangre venosa del antebrazo con el sistema de vacío en dos tubos con anticoagulante EDTA para extraer el ADN genómico a partir de 2 mL de sangre periférica mediante la técnica modificada de Miller et al. (36), como se describe en el anexo 4. Fueron cuantificadas en el espectrofotómetro *Multiskan G[®]* (*Thermo Scientific*), se verificó la integridad mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% a 90V por 30min y se realizaron diluciones a una concentración de 20ng/μL para el análisis de genotipificación.

Genotipificación del *SLC13A2* y *SLC13A3*

Se utilizaron las sondas *TaqMan[®]* (*Thermo Scientific*) para el SNP rs11567842 (C__22272264_10) del gen *SLC13A2* y el rs126917 (C__2238487_10) del *SLC13A3*. Para cada una de las sondas, se realizó la amplificación a partir de 1 μL de DNA, al cual se le agregó 5 μL de Máster Mix 2X (*Thermo Scientific*), 0.2 μL de cada sonda 40 X y 13.8 μL de agua grado biología molecular, por cada muestra. La genotipificación se realizó en el equipo de PCR en tiempo real usando el equipo *Quant Studio 5[®]* (*Thermo Scientific*) por discriminación alélica. Se programó con una fase de prelectura a 60 °C por 30 segundos, seguido de 95°C por 10 min, posteriormente 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 seg. y alineación 60°C por 1min, como se muestra en la gráfica siguiente. El 10% de las muestras fueron genotipificadas por duplicado para control de calidad.

Figura 4. Protocolo de ciclos del PCR-TR



Análisis estadístico

En la población de estudio se realizaron análisis descriptivos de los datos clínicos, somatométricos y bioquímicos. A las variables cuantitativas se les aplicó la prueba de normalidad Kolmogorov Smirnov para conocer la distribución; los datos con una distribución no normales se expresaron en mediana y cuartiles (Q_1 y Q_3), mientras que los que presentaron una distribución normal se expresaron como media y desviación estándar. Para determinar diferencias entre estas, se utilizó la prueba de t de Student o la U-Mann-Whitney, según corresponde. Las variables cuantitativas se expresaron como frecuencias (%). Se calcularon las frecuencias alélicas y el equilibrio de Hardy-Weinberg, posteriormente se utilizó la prueba de X^2 para determinar diferencias entre los valores observados y los obtenidos con una tabla de contingencia. Las asociaciones se realizaron por medio de regresión logística multinomial ajustado por edad, sexo e IMC. Los valores de $p < 0.05$ fueron

considerados como significativos. Los datos fueron capturados y analizados con el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 21®)

Aspectos éticos

El protocolo fue realizado de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012 para ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos y siguiendo las Declaraciones de Helsinki. Además, fue registrado y aprobado por el Comité de Ética e investigación del HRAEPY con número de registro CONBIOETICA-31-CEI-002-20170731 (anexo 5) Todos los sujetos que aceptaron participar en el estudio firmaron consentimiento informado (anexo 6).

Definición operacional de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Tipo de variable	Unidad de medida
Litiasis urinaria (LU)	Presencia de cúmulos de cristales en cualquier punto de la vía urinaria	Pacientes con diagnóstico por tomografía axial computada en fase simple con imágenes de densidad cálcica dentro de la vía urinaria superior o bien, defectos de llenado con aspecto de litios en la fase excretora. Así como pacientes con expulsión espontánea de litos por la orina	Nominal	Independiente Cualitativa. Dicotómica	Si/No
Edad	Tiempo que ha vivido una persona	Años transcurridos desde la fecha de nacimiento hasta el día de su inclusión en el estudio	Ordinal	Dependiente. Cuantitativa. Continua	Numérica. Años
Sexo	Grupo al que pertenecen los seres humanos de cada sexo	Género de cada paciente	Nominal	Dependiente Cualitativa. Dicotómica	Masculino /Femenino

Educación	Conjunto de cursos que un estudiante sigue en un establecimiento docente	Grado máximo de estudios culminado a la fecha, reportados por el participante	Ordinal	Dependiente. Cualitativa.	Grado académico
Antecedentes familiares de LU	Historia de familiares enfermos de LU	Familiar consanguíneo directo (abuelos, padre o hermanos) que hayan sido diagnosticados y/o tratados por LU	Nominal.	Dependiente. Cualitativa. Dicotómica	Si/No
IMC	Razón matemática que asocia la masa y la talla	Peso entre talla al cuadrado	Ordinal	Cualitativa	Normal Sobrepeso Obesidad I, II y III
pH urinario	pH en orina	Valor de pH calculado en la orina de los pacientes reportado en el EGO. -Ácido: pH < 5.5 -Normal: pH 5.5 – 6.5 -Alcalino: pH > 6.5	Ordinal.	Dependiente. Cualitativa. Dicotómica	Ácido Normal Alcalino
Hipocitraturia	Disminución de la excreción urinaria de citrato	Citrato en orina de 24 horas menor 320 mg (1.67 mmol)	Nominal.	Dependiente. Cualitativa. Dicotómica	Si/No
Hiperoxaluria	Aumento de la excreción urinaria de oxalato	Oxalato en orina de 24 horas \geq 45mg o 0.45mmoles/l/1.73m ²	Nominal.	Dependiente. Cualitativa. Dicotómica	Si/No
Hiperuricosuria	Aumento de la excreción urinaria de ácido úrico	Ácido úrico en orina de 24 horas mayor a 800 mg (4.8 mmol) en hombres y 750 mg (4.5 mmol) en mujeres	Nominal.	Dependiente. Cualitativa. Dicotómica	Si/No
Hipercalcia	Aumento de la excreción urinaria de calcio	Calcio en orina de 24 horas mayor a 200 mg/24 hrs o índice calcio/creatinuria mayor a 0.14	Nominal	Dependiente. Cualitativa. Dicotómica	Si/No
Na urinario	Cantidad de sodio en la orina	Valor de sodio en orina de 24 horas reportado por el laboratorio de acuerdo a sus valores de referencia	Ordinal	Dependiente. Cualitativa. Politómica	Bajo Normal Elevado
Mg Urinario	Cantidad de magnesio en la orina	Valor de magnesio en orina de 24 horas reportado por el laboratorio de acuerdo a sus valores de referencia	Ordinal	Dependiente. Cualitativa. Politómica	Bajo Normal Elevado

Cl urinario	Cantidad de cloro en la orina	Valor de cloro en orina de 24 horas reportado por el laboratorio de acuerdo a sus valores de referencia	Ordinal	Dependiente. Cualitativa. Politómica	Bajo Normal Elevado
K urinario	Cantidad de potasio en la orina	Valor de potasio en orina de 24 horas reportado por el laboratorio de acuerdo a sus valores de referencia	Ordinal	Dependiente. Cualitativa. Politómica	Bajo Normal Elevado
P urinario	Cantidad de fosfato en la orina	Valor de fosfato en orina de 24 horas reportado por el laboratorio de acuerdo a sus valores de referencia	Ordinal	Dependiente. Cualitativa. Politómica	Bajo Normal Elevado
Urocultivo	Estudio bacteriológico de la orina	Resultado del cultivo de orina reportado por el laboratorio	Nominal	Dependiente Cualitativa. Dicotómica	Positivo Negativo
Función renal	Cantidad medible del funcionamiento renal en un ser humano	Tasa de filtración glomerular obtenida por la depuración de creatinina en orina de 24 horas o calculada por CKD-EPI: $GFR = 141 \times \min(Scr < /\kappa, 1)^\alpha \times \max(Scr / \kappa, 1) - 1.209 \times 0.993 \text{Age} \times 1.018 [\text{si mujer}] \times 1.159 [\text{si afroamericano}]$	Ordinal	Cualitativa Dependiente Politómica	Escala de KDIGO
Volume n urinario	Cantidad de orina excretada por un sujeto en 24 horas	Volumen en mL reportado por el perfil metabólico urinario en orina de 24 horas	Continua	Cuantitativa Dependiente	Mililitros
Composición de lito	Compuestos químicos que integran un lito urinario	Resultado de análisis químico de composición del lito urinario	Nominal	Cualitativa. Dependiente	Compuesto químico
Glucemia	Cantidad de glucosa en sangre	Resultado reportado por el laboratorio de los valores de la prueba de glucosa sérica	Continua	Cuantitativa Dependiente	mg/dL
Urea	Cantidad de urea en sangre	Resultado reportado por el laboratorio de los valores de urea sérica	Continua	Cuantitativa Dependiente	mg/dL
Creatinina	Cantidad de creatinina en sangre	Resultado reportado por el laboratorio de los valores de creatinina sérica	Continua	Cuantitativa Dependiente	mg/dL
Ácido Úrico	Cantidad de ácido úrico en sangre	Resultado reportado por el laboratorio de los valores de ácido úrico sérico	Continua	Cuantitativa Dependiente	mg/dL

Na sérico	Cantidad de sodio en la sangre	Resultado reportado por el laboratorio de los valores de sodio sérico	Continua	Cuantitativa Dependiente	mEq/L
Cl sérico	Cantidad de cloro en la sangre	Resultado reportado por el laboratorio de los valores de cloro sérico	Continua	Cuantitativa Dependiente	mEq/L
K sérico	Cantidad de potasio en la sangre	Resultado reportado por el laboratorio de los valores de potasio sérico	Continua	Cuantitativa Dependiente	mEq/L
Mg sérico	Cantidad de magnesio en la sangre	Resultado reportado por el laboratorio de los valores de magnesio sérico	Continua	Cuantitativa Dependiente	mEq/L
P sérico	Cantidad de fosfato en la sangre	Resultado reportado por el laboratorio de los valores de fosfato sérico	Continua	Cuantitativa Dependiente	mEq/L
Ca sérico	Cantidad de calcio en la sangre	Resultado reportado por el laboratorio de los valores de calcio sérico	Continua	Cuantitativa Dependiente	mEq/L
Vitamina D sérica	Niveles de vitamina D3 en el suero	Cantidad de 25-OH vitamina D3 medida en el suero de los pacientes reportada por el laboratorio. -Deficiencia: ≤ 30 nmol/L; ≤ 12 ng/mL -Insuficiencia: > 30 nmol/L y ≤ 75 nmol/L; > 12 ng/mL y ≤ 30 ng/mL -Normal: > 75 nmol/L; > 30 ng/mL	Ordinal	Dependiente. Cualitativa. Politómica	Deficiencia, Insuficiencia y normal
PTH sérica	Niveles de PTH en la sangre	Niveles de PTH sérica reportados por el laboratorio con los valores de referencia brindados	Continua	Cuantitativa Dependiente	pg/mL
pH	pH de la sangre	Valor de pH reportado por el laboratorio en sangre venosa	Ordinal	Dependiente. Cualitativa. Politómica	Ácido Neutro Básico
HCO₃⁻	Cantidad de calcio en la sangre	Resultado reportado por el laboratorio de los valores de calcio sérico	Continua	Cuantitativa Dependiente	mEq/L
Polimorfismo	Variación en la secuencia de un lugar determinado del DNA entre los individuos de una población	Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) del gen propuesto con el alelo de riesgo según resultado de genotipificación	Nominal	Dependiente. Cualitativa. Dicotómica	Si/No

Resultados

Fase de descubrimiento

Se incluyeron 127 pacientes con LU, con una media de edad de 46.5 ± 12.7 años, con predominio del sexo femenino en 74.7%. El 18.9% tuvieron un empleo de riesgo y el 38.9% tiene antecedente familiar en primer grado de LU. Las demás variables clínicas y sociodemográficas basales de los pacientes se resumen en la **tabla 4**.

Tabla 4. Características clínicas y sociodemográficas de los pacientes con LU (n=127)

Sexo		Método de hidratación	
-Masculino	25.3%	-Agua simple	70.5%
-Femenino	74.7%	-Jugos naturales	20%
Edad	46.5 ± 12.7	-Bebidas embotelladas/carbonatadas	9.5%
Escolaridad		Fuente de agua	
-Analfabeta	26.3%	-Embotellada	96.8%
-Primaria	20%	-Grifo/hervida	3.2%
-Secundaria	30.5%	Debut	
-Bachillerato/Superior	23.1%	-Hallazgo de imagen	18.9%
Empleo de riesgo	18.9%	-Cólico	68.4%
Antecedente familiar	38.9%	-Hematuria	4.2%
Tabaquismo	8.4%	-Lituria	3.2%
Alcoholismo	7.4%	-ITU	4.2%
Ejercicio	11.6%	-Otro	1.1%
DM2	22.1%	IMC	30.94 ± 5.19
HAS	32.6%	-Sobrepeso	23.2%
Monorreno	21.1%	-Obesidad	69.5%
T.S.F.R.	4.2%	Años evolución	9 (3-16)

DM2: diabetes mellitus tipo 2; HAS: Hipertensión arterial sistémica; T.S.F.R.: Terapia sustitutiva de la función renal; ITU: infección del tracto urinario; IMC: Índice de Masa Corporal. IMC estratificado de acuerdo con la NOM para talla baja Lituria; haber orinado litos macroscópicamente visibles. Los años de evolución desde el momento del diagnóstico hasta la inclusión al estudio. Media ± desviación estándar, Mediana (cuartiles 25-75), frecuencias (%)

En las pruebas bioquímicas séricas, encontramos una mediana de creatinina de 1.09 (0.8 – 1-65) mg/dL, resultando con una función renal calculada mediante CKD-EPI de 65.9 ± 34.1 mL/min/1.73m². La media de calcio fue de 8.7 ± 1 mg/dL, mediana de PTH de 39.6 (23.5 – 66) y media de pH de 7.33 ± 0.06 . En las pruebas bioquímicas urinarias encontramos una media de volumen urinario de 2274.5 ± 985.6 mL/24 hrs, creatinina de 1.11 ± 0.46 g/24 hrs, calcio de 133.8 ± 91.7 mg/dL, magnesio de 63.5 (43.1 – 85) mg/24 hrs, oxalato 35.9 ± 17.3 mg/24 hrs y citrato de 72 (38 – 149) mg/24 hrs. La alteración más frecuentemente detectada en sangre fue la insuficiencia/deficiencia de vitamina D en 64.7% seguida de la hiperuricemia en 33.3%; en la orina de 24 horas, predominó la hipocitraturia con 91.3%, hipomagnesuria con 68.5% e hipercalciuria con 42.1%. Los resultados de todas las pruebas bioquímicas en sangre y orina y la frecuencia de las alteraciones metabólicas, se resumen en la **tabla 5 y 6**, respectivamente.

Tabla 5. Medidas de tendencia central de las pruebas bioquímicas en sangre y orina de 24 horas. (n=127)

Sangre		Orina de 24 hrs	
pH	7.33 ± 0.06	pH	6 (5 – 6.5)
Ácido úrico (mg/dL)	5.5 ± 1.7	Ácido úrico (mg/24h)	506.7 ± 221.1
Sodio (mmol/L)	139 (137.7 – 141)	Sodio (mmol/24h)	150.6 (117.4 – 231.5)
Potasio (mmol/L)	4.0 ± 0.54	Potasio (mmol/24h)	35.7 (25.1 – 48.3)
Cloro (mmol/L)	106.5 ± 4.0	Cloro (mmol/24h)	145.1 (109.4 – 218.3)
Calcio (mg/dL)	8.8 ± 1.0	Calcio (mg/24h)	135 ± 91
Magnesio (mg/dL)	1.9 (1.7 – 2.1)	Magnesio (mg/24h)	65 (47 – 86.7)
Fosfato (mg/dL)	3.6 ± 1.1	Fosfato (g/24h)	0.47 ± 0.21
Vitamina D (pg/mL)	26.3 (19.3 – 31)	Volumen (ml)	2286 ± 971.2
PTH (pg/mL)	39.1 (23.4 – 63.1)	Creatinina (mg/24 h)	1087.8 ± 456.5
Bicarbonato	21.5 ± 5.3	Citrato (mg/24 h)	79.5 (37.5 – 160)
Glucosa (mg/dL)	96.4 (89.6-109.2)	Oxalato (mg/24 h)	36.5 ± 18.8
Urea (mg/dL)	35.4 (24.4-57.8)	Calcio/Creatinuria	0.13 ± 0.08
Creatinina (mg/dL)	1.05 (0.76 – 1.68)	Calcio/Citrato	1.22 (0.67 – 3.11)
Hemoglobina (g/dL)	11.7 ± 2.2	Citrato/Creatinuria	0.07 (0.03 – 0.19)
Hematocrito (%)	36.4 ± 6.1		

Media ± desviación estándar, Mediana (cuartiles 25-75)

Tabla 6. Frecuencia de alteraciones metabólicas en sangre y orina. (n=127)

Sangre (%)		Orina de 24 hrs (%)	
Hiperuricemia	33.3	Orina ácida	35.2
Hipercalcemia	2.4	Hipocitraturia	91.3
Insuficiencia/deficiencia Vitamina D	64.7	Hiperoxaluria	36.5
Hiperparatiroidismo	23.7	Hiperuricosuria	26.6
Acidosis	50.4	Hiper calciuria	42.1
dTRA	5.6	Hipomagnesuria	68.5

Frecuencias presentadas en porcentajes (%). ATRd: acidosis tubular renal distal. Hiperuricemia: hombres >7 mg/dL y mujeres > 6 mg/dL; hipercalcemia > 10.2 mg/dL; deficiencia vitamina D <30 pg/mL; acidosis: pH sérico ácido <7.35; ATRd: pH sérico < 7.40 o normal, brecha aniónica sérica < 12, Cloro sérico <108 mmol y brecha aniónica urinaria positiva; pH urinario bajo <5.5; hipocitraturia <320 mg/24 hrs; hiperoxaluria > 40 mg/24 hrs; hiperuricosuria > 600 mg/24 hrs; hiper calciuria: índice calcio/creatinuria > 0.14 e hipomagnesuria < 80 mg/24 hrs.

La mediana citrato urinario fue significativamente menor en los pacientes monorrenos [37 (20 – 70.2) mg/dL] con respecto a los pacientes con ambos riñones funcionales [90 (48 – 155) mg/dL] (p=0.005), y similar entre pacientes normopeso y con sobrepeso/obesidad (p=0.938), sin embargo, el IMC se correlacionó significativamente con la carga litiásica (r=0.38, p<0.001). El citrato en orina se correlacionó inversamente con la glicemia (r= - 0.21, p=0.043) y la hipocitraturia se asoció con la DM2 (p=0.047). El magnesio urinario fue significativamente menor en mujeres [59.4 (40.2 – 78.8) mg/dL] que en hombres [73.8 (56.7 – 96.4) mg/dL] (p= 0.038). Tanto el citrato como el magnesio, mostraron correlaciones significativas con el calcio urinario (r=0.28, p=0.007; r= 0.38, p<0.001, respectivamente).

Antropométricamente encontramos una media de CC de 96.1 ± 16 cm, CB de 34 ± 4.9 cm, ICT de 0.64 ± 1.1 cm, IMG de 40.2 ± 9.2 % y el ACT de 32.9 ± 6 Lt. Las medidas de

tendencia central de la distribución de macro y micronutrientos de las dietas habituales se resumen en la **tabla 7**.

Tabla 7. Distribución de macro y micronutrientos de dieta habitual (n=127)

Macronutrientos		Micronutrientos		IDR
Kcal totales	1486.7 ± 485.4	Fibra (g)	14.1 ± 7.4	30 g
Proteínas		Vitamina A (µg)	224.2 (105.3 – 373.8)	800 µg
-g	62.9 ± 25.7	Vitamina B9 (µg)	74.2 ± 73.6	200 µg
-Kcal	256.4 ± 96.9	Vitamina C (mg)	27.3 (11.9 – 84.1)	60 mg
-%	17.4 ± 4.1	Hierro (mg)	10.9 ± 4.3	20 m
H.C.		Potasio (mg)	741.6 ± 514.3	2000 mg
-g	218.4 ± 68.8	Sodio (mg)	927.8 (583.3 – 1262.7)	< 2000 mg
-Kcal	873.5 ± 275.3	Selenio (µg)	28.8 ± 22.6	70 µg
-%	59.5 ± 9.5	Calcio (mg)	538.8 (310.8 – 811.4)	1000 mg
Lípidos		Fosforo (mg)	0 (0 - 120.4)	1000 mg
-g	42.1 ± 23.8			
-Kcal	379.4 ± 214.7			
-%	24.7 ± 9			

IDR: Ingesta diaria recomendada, Kcal: kilocalorías, g: gramos, µg: microgramos, mg: miligramos. Media ± desviación estándar, Mediana (cuartiles 25-75)

El ICT y el IMG se correlacionaron con el oxalato ($r = -0.29$, $p = 0.037$; $r = 0.29$, $p = 0.035$, respectivamente. Los demás indicadores somatométricos no mostraron correlación con los metabolitos urinarios. Por otra parte, el índice citrato urinario se correlacionó con el porcentaje de proteínas de la dieta ($r = -0.32$, $p = 0.022$) y los gramos de lípidos con el pH urinario ($r = -0.32$, $p = 0.022$). No se encontró impacto de los micronutrientos y los metabolitos urinarios.

Fase genómica

Se incluyeron un total de 141 participantes, 96 casos y 45 controles, con una media de edad de 45.7 ± 13.8 años, con predominio de sexo femenino (64.5%). La media de IMC fue de 29.4 ± 6 kg/m²; resultando en 27 pacientes (19.1%) con sobrepeso y 84 (59.6%) con obesidad. Además, el 23.4% de los participantes con DM2.

La mediana de creatinina sérica fue 0.95 (0.75 – 2.16) mg/dL, resultando en una mediana de función renal estimada por CKD-EPI de 81.7 (27.9 – 102.8) mL/min/1.73m²; la estratificación para enfermedad renal crónica mediante la escala de KDIGO resultó en: 44% estadio 1; 18.4% estadio 2; 6.4% estadio 3^a; 3.5% estadio 3b; 9.9% estadio 4; y 17.7% estadio 5. Asimismo, la media de volumen urinario fue de 2158.7 ± 991.8 mL/24 hrs. Se encontró hipocitraturia en 117 participantes (84.8%), con una mediana de citrato de 101 (42 – 250) mg/dL.

Las características basales, frecuencias alélicas y genotípicas de los participantes se resumen en la **tabla 8**. Al comparar la frecuencia alélica encontrada para el NaDC1 con lo reportado por el proyecto 1000 Genomas, y las frecuencias en población del continente Americano y europea, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$). En cuanto al NaDC3, las frecuencias alélicas fueron significativamente distintas a lo reportado en el 1000 Genomas, para población del continente Americano y europea ($p < 0.05$) como se muestra en la **tabla 9**. No se encontraron desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg para ninguno de los dos polimorfismos (NaDC1: $p = 0.708$, NaDC3: $p = 0.220$).

En la comparación entre casos y controles se encontró predominio del sexo femenino en el grupo de casos (72.9% vs 46.7%, $p = 0.002$), además los casos presentaron historia familiar de LU (46.9%) y el IMC significativamente mayor con respecto al grupo control (30.2 ± 6.2

vs $27.7 \pm 5.3 \text{ kg/m}^2$, $p=0.018$), por ende mayor frecuencia de obesidad (67.7 vs 42.2%, $p=0.004$). Por otra parte, la tasa de filtrado glomerular fue significativamente menor [58 (13.2 – 92.2) vs 102.9 (90.6 – 116.9); $p<0.001$] al igual que la mediana de citrato en el grupo de casos [78 (36 – 198)] que en los controles [218 (90 – 354)] ($p<0.001$).

Tabla 8. Características basales de los participantes

Variable	N	%
Sexo		
Hombre	50	35.5
Mujer	91	64.5
DM2	33	23.4
Sobrepeso	27	19.1
Obesidad	84	59.6
Hipocitraturia	117	84.8
Hiper calciuria	62	44.6
Hiperuricosuria	35	25.4
NaDC1		
AA	32	22.7
GG	41	29.1
AG	68	48.2
NaDC3		
AA	76	53.9
CC	14	9.9
AC	51	36.2
Frecuencia alélica		
NaDC1-A	0.53	
NaDC1-G	0.47	
NaDC3-A	0.28	
NaDC3-C	0.72	

DM2: diabetes mellitus tipo 2. Sobrepeso y obesidad de acuerdo a la NOM para talla baja, hipocitraturia < 320 mg/24 hrs, hiper calciuria: índice calcio/creatinuria > 0.14, hiperuricosuria > 600 mg/24 rs

Tabla 9. Comparación de frecuencias alélicas

	Encontrado	1000 g	P	AMR	P	EUR	P
NaDC1-A	53	53	1.00	47	0.396	63	0.151
NaDC1-G	47	47		53		37	
NaDC3-A	28	66	<0.05	71	<0.05	85	<0.05
NaDC3-C	72	34		29		15	

AMR: americano; EUR: europeo. * significancia estadística ($p < 0.05$). Prueba de X^2

Para conocer la concentración de metabolitos, función renal y CKD-EPI entre los diferentes modelos de herencia para ambos polimorfismos, se realizó una prueba de ANCOVA utilizando como covariables el sexo, edad, IMC y creatinuria en orina de 24 hrs. Se encontró que el modelo de herencia dominante del *NaDC1* tuvo menores concentraciones de citrato (162.9 ± 187.8 vs 243 ± 243 , $P=0.005$) y calcio (135.9 ± 101.5 vs 147.5 ± 92.2 , $p < 0.001$). El modelo de herencia recesivo del *NaDC1* mostró menor concentración urinaria de ácido úrico (468.2 ± 193.8 vs 503.4 ± 234.3 , $p < 0.001$), calcio (137 ± 115 vs 139.1 ± 92.6 , $p < 0.001$) e índice calcio/creatinuria (0.13 ± 0.08 vs 0.14 ± 0.09 , $p=0.007$); y mayores concentraciones de citrato (204.8 ± 219.4 vs 171 ± 196.7 , $p=0.008$).

El NaDC3, el modelo dominante mostró menores concentraciones urinarias de citrato (167.1 ± 190.2 vs 192.5 ± 214.3 , $p=0.012$) y mayores concentraciones de calcio (0.15 ± 0.11 vs 0.12 ± 0.07 , $p=0.002$). El modelo recesivo demostró mayores concentraciones en orina de calcio (141 ± 118.4 vs 138.2 ± 97.4 , <0.001) y menores concentraciones de citrato (95 ± 97 vs 190.4 ± 209.9 , $p=0.005$). Los resultados completos de este modelo se encuentran en la **tabla 11**.

Tabla 10. Comparación de las características entre los casos y controles

Variable (n=141)	Casos (n=96)	Controles (n=45)	P
Edad	46.7 ± 13.9	43.6 ± 13.5	0.221
Sexo			0.002*
- Hombre	27.1	53.3	
- Mujer	72.9	46.7	
Historia familiar de litiasis	46.9	--	--
IMC	30.2 ± 6.2	27.7 ± 5.3	0.018*
Sobrepeso	18.8	20	0.860
Obesidad	67.7	42.2	0.004*
DM2	24	22.2	0.820
Glucosa sérica	96.2 (90.9 – 104.8)	107.9 (88.7 – 150.2)	0.088
Creatinina sérica	1.2 (0.8 – 4.2)	0.8 (0.6 – 0.9)	0.000*
Creatinina urinaria	1076.9 ± 453.6	1061.5 ± 425.9	0.849
Ácido úrico urinario	497.1 ± 240.9	485.5 ± 183.5	0.774
Calcio urinario	132.6 ± 95.9	151 ± 106	0.304
Citrato urinario	78 (36 – 198)	218 (90 – 354)	0.000*
Volumen urinario	2216.8 ± 954.7	2035.2 ± 1067.3	0.313
Índice calcio/creatinuria	0.13 ± 0.09	0.14 ± 0.12	0.686
Índice citrato/creatinuria	90.1 (31.7 – 195.8)	173.6 (87.9 – 390)	0.000*
Hipocitraturia	90.6	71.4	0.004*
Hiper calciuria	42.1	48.9	0.384
Hiperuricosuria	26.6	22.7	0.626
Tasa de filtrado (CKD-EPI)	58 (13.2 – 92.9)	102.9 (90.6 – 116.9)	0.000*

*IMC: índice de masa corporal; DM2: diabetes mellitus tipo 2. Media ± desviación estándar o mediana (cuartiles 25-75) para variables cuantitativas, frecuencias para variables categóricas. Diferencia entre grupos mediante prueba t de Student o U-Mann-Whitney. *significancia estadística (p<0.05).*

Tabla 11. Comparación de metabolitos, volumen urinario y función renal, entre los diferentes modelos de herencia para *NaDC1* y *NaDC3*.

	Ác. Úrico urinario	Calcio urinario	Citrato urinario	Ca/ Creatinuria	Citrato/ Creatinuria	Volumen urinario	CKD-EPI
NaDC1 Dominante							
AA	491.1 ± 176.4	147.5 ± 92.2	243 ± 243	0.14 ± 0.08	0.25 ± 0.25	1963.9 ± 927.7	72.9 ± 44.4
AG/GG	492.2 ± 235.8	135.9 ± 101.5	162.9 ± 187.8	0.13 ± 0.09	0.15 ± 0.15	2216.1 ± 1006.8	60.6 ± 40.9
P	<0.001*	<0.001*	0.005*	0.009*	0.028*	0.339	0.032
NaDC3 Dominante							
AA	504.1 ± 239.2	131.1 ± 98	192.5 ± 214.3	0.12 ± 0.07	0.17 ± 0.17	2019.9 ± 942.8	67 ± 41.4
AC/CC	480.3 ± 203.7	147.1 ± 100.7	167.1 ± 190.2	0.15 ± 0.11	0.17 ± 0.19	2321.4 ± 1029.9	74.2 ± 41.7
P	<0.001*	<0.001*	0.012*	0.002*	0.336	0.232	0.027*
NaDC1 Recessivo							
AA/AG	503.4 ± 234.3	139.1 ± 92.6	171 ± 196.7	0.14 ± 0.09	0.17 ± 0.19	2218 ± 1044.3	66 ± 43.4
GG	468.2 ± 193.8	137 ± 115	204.8 ± 219.4	0.13 ± 0.08	0.18 ± 0.14	2014.6 ± 844.9	80.8 ± 35
P	<0.001*	<0.001*	0.008*	0.007*	0.339	0.491	0.005*
NaDC3 Recessivo							
AA/AC	480 ± 221.5	138.2 ± 97.4	190.4 ± 209.9	0.13 ± 0.08	0.18 ± 0.18	2097.2 ± 938.5	68.8 ± 41
CC	531.4 ± 244	141 ± 118.4	95 ± 97	0.18 ± 0.16	0.10 ± 0.12	2718.6 ± 1296.9	75.3 ± 47.7
P	<0.001*	<0.001*	0.005*	0.003*	0.169	0.129	0.031*

Media ± desviación estándar. ANCOVA utilizando sexo, edad, IMC y creatinuria en orina de 24 hrs como covariables. *significancia estadística ($p < 0.05$)

Se realizó una regresión logística multinomial utilizando como variables fijas el sexo, edad, IMC y creatinuria en orina de 24 hrs esta última para limpiar el efecto de la función renal sobre la excreción de citrato, para evaluar asociaciones entre los modelos de herencia de ambos genes y la LU e hipocitraturia. Como se muestra en la **tabla 12**, se asoció el *NaDC1* recesivo con la LU [OR: 0.42 (IC95%, 0.18 – 0.96) p=0.040].

No se encontraron diferencias significativas en la mediana de citrato urinario entre los diferentes genotipos en todos los participantes, ni al estratificarlos en casos y controles (**tabla 13**).

Tabla 12. Regresión logística multinomial para la asociación de los diferentes modelos de herencia del *NaDC1* y *NaDC3*.

	OR	IC 95%	P
NaDC1 Dominante			
Hipocitraturia	1.22	0.50 – 2.9	0.664
Litiasis urinaria	2.62	0.94 – 7.30	0.066
NaDC1 Recessivo			
Hipocitraturia	0.42	0.15 – 1.14	0.088
Litiasis urinaria	0.42	0.18 – 0.96	0.040*
NaDC3 Dominante			
Hipocitraturia	1.15	0.43 – 3.06	0.777
Litiasis urinaria	1.25	0.58 – 2.69	0.560
NaDC3 Recessivo			
Litiasis urinaria	0.64	0.20 – 2.06	0.454

Regresión logística multinomial utilizando variables fijas sexo, edad, IMC y creatinina en orina de 24 hrs.
**significancia estadística ($p < 0.05$)*

Tabla 13. Comparación de las medianas de citrato entre los genotipos en los participantes y estratificado por casos y controles

Todos	NaDC1	AA 189 (64 – 354)	NaDC3	AA 106 (38 – 276)
		GG 94 (50.2 – 296.7)		CC 55 (30.7 – 150.7)
		AG 84.5 (36 – 205.5)		AC 110 (53.2 – 252.7)
		P 0.060		P 0.194
Casos	NaDC1	AA 115 (46.5 – 254)	NaDC3	AA 79 (36 – 174)
		GG 77 (36 – 211)		CC 52.5 (28.2 – 67.5)
		AG 75 (36 – 159)		AC 110 (44.5 – 238)
		P 0.444		P 0.085
Controles	NaDC1	AA 234 (137 – 527)	NaDC3	AA 238 (155.2 – 504.7)
		GG 261 (81 – 448)		CC 187.5 (28.5 – 266.7)
		AG 144 (36 – 280)		AC 115 (81 – 368)
		P 0.286		P 0.258

*Prueba de Kruskal Wallis. Los datos se presentan como mediana (cuartiles 25 - 75) *significancia estadística ($p < 0.05$)*

Secundario a la alta frecuencia de hipocitraturia, tanto en casos como en controles, se propusieron nuevos puntos de corte para el citrato en orina de 24 hrs como factor de riesgo para LU en la población estudiada; esto derivado del análisis de las curvas ROC (**figura 5**) en los sujetos de la fase de descubrimiento más la fase genómica (n=267). Encontramos un área bajo la curva (ABC) de 0.695 (IC 95%: 0.59 – 0.79) $p < 0.001$. Se proponen como puntos

de corte para el citrato: 260 mg/24 hrs (sensibilidad 85% y especificidad 60%), con un VPP de 0.88, VPN de 0.34, razón de verosimilitudes de 13.85, $p < 0.001$.

Empleando este nuevo punto de corte para hipocitraturia, encontramos una frecuencia de 83.3% en los casos y 58.1% en los controles ($p < 0.001$) utilizando como punto de corte 260 mg/24 hrs. Además, se realizó la regresión logística multinomial utilizando las mismas variables fijas (sexo, edad, IMC y creatinina en orina de 24 hrs) pero con este nuevo punto de corte. Los resultados de estas asociaciones entre los modelos de herencia de ambos genes y la LU e hipocitraturia se presentan en el **tabla 14**, se muestra que el modelo recesivo del NaDC1 se asoció con hipocitraturia menor a 260 mg/dL [OR: 0.38 (IC 95% 0.16 – 0.91), $p = 0.031$]

Figura 5. Curvas ROC para citrato y litiasis urinaria

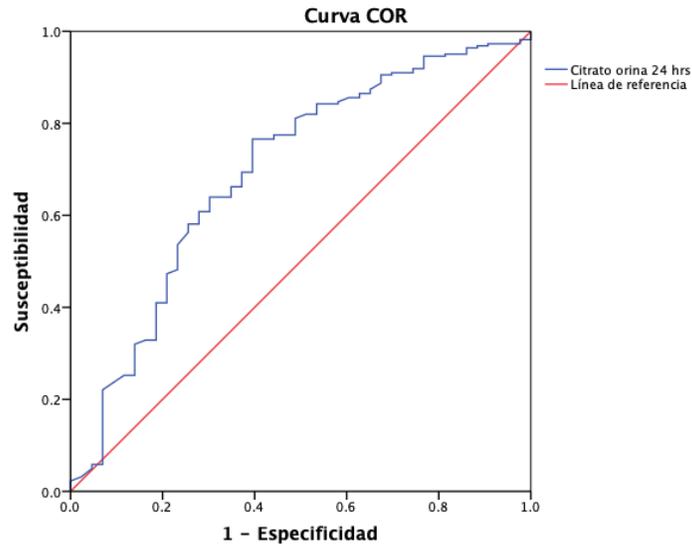


Tabla 14. Regresión logística multinomial para la asociación de los diferentes modelos de herencia del NaDC1 y NaDC3 utilizando el nuevo punto de corte propuesto para hipocitraturia.

	OR	IC 95%	P
NaDC1 Dominante			
Hipocitraturia (260 mg/24 hrs)	1.29	0.50 – 3.30	0.595
NaDC1 Recesivo			
Hipocitraturia (260 mg/24 hrs)	0.38	0.16 – 0.91	0.031*
NaDC3 Dominante			
Hipocitraturia (260 mg/24 hrs)	1.08	0.48 – 2.47	0.849
NaDC3 Recesivo			
Hipocitraturia (260 mg/24 hrs)	1.10	0.27 – 1.40	0.849

Regresión logística multinomial utilizando variables fijas sexo, edad, IMC y creatinina en orina de 24 hrs.

**significancia estadística ($p < 0.05$).*

Discusión

La fase de exploración del presente trabajo permitió conocer el perfil clínico de los pacientes atendidos en el HRAEPY con LU y se encuentran algunas particularidades. Tal es el caso del predominio del sexo femenino que, si bien, se ha sugerido que la brecha entre sexos se ha estrechado (3), los resultados muestran lo contrario. Es razonable pensar que pudiera deberse causas hormonales. En mujeres, se ha demostrado un aumento en el riesgo de padecer LU después de la menopausia (OR= 1.27, IC 95% 1.08 – 1.46), además, se ha encontrado disminución de sustancias inhibidoras de la litogénesis en la orina de postmenopáusicas como el citrato y el magnesio (37, 38). Si bien, la media de edad de nuestra población corresponde a la edad promedio de presentación de menopausia, se debe considerar que la mediana de tiempo de evolución de la LU fue de nueve años, lo que sugiere que quizás tuvo un origen varios años antes de la menopausia. Para aclarar este hallazgo, se requieren estudios longitudinales prospectivos.

Destaca que, desde la fase de exploración, los indicadores sugieren una posible causa genética. Si bien, se observó que el 38.9% de los pacientes manifestaron tener al menos un familiar en primera línea con litiasis, similar a lo reportado en otras series (6), se considera que esta proporción puede ser mayor, debido a la baja educación en salud y conocimiento de las enfermedades de los familiares, y el poco acceso a los servicios de salud, aunado al bajo nivel sociocultural de la población atendida en el HRAEPY, los cuales que provienen en su mayoría de comunidades distantes. Además, cuando se ha demostrado que un nivel educativo bajo y las distancias largas a recorrer hasta los centros de referencia, están asociados con encontrar litos de mayor tamaño (39). Otro indicativo de posible etiología genética es el hecho que solo el 18.9% manifestó tener un empleo laboral de riesgo para el desarrollo de

LU, además, prácticamente todos los pacientes manifestaban hidratarse con agua embotellada, lo que cuestionaría una posible asociación de la LU con el riesgo laboral y con la calidad del agua que consume en esta población. Por otra parte, no se cuenta con datos sobre las recurrencias, las cuales posiblemente se verían más favorecidas con una genética propicia, sin embargo, podemos observar que hay complicaciones propias de la enfermedad severa o recurrente, como es el caso de los pacientes que han perdido un riñón a causa de la LU (21%) y del 4.2% que se encuentran con T.S.F.R. Llamó la atención que el 19% de los pacientes fueron diagnosticados a manera de hallazgo estando asintomáticos, con impacto en el retraso de la detección y atención que propició estas cifras de complicaciones. Finalmente, destaca la alta prevalencia de sobrepeso/obesidad (92.7%) entre los pacientes, lo cual sugiere una posible vía metabólica común, reforzando lo sugerido en otros estudios (40).

Las alteraciones metabólicas urinarias asociadas con el desarrollo de LU varían mucho según la región geográfica (41-45), a pesar de esto, no existen reportes epidemiológicos en México sobre la frecuencia de estas alteraciones, de las cuales su conocimiento es indispensable para un adecuado manejo preventivo. Este trabajo, contrasta con las otras publicaciones de frecuencia de alteraciones metabólicas al encontrar la hipocitraturia como la etiología más prevalente (91.3%) y con niveles de hipocitraturia profunda (<100 mg/24 hrs). En la descripción nutricional, en la distribución de macronutrientes encontramos que la proporción de proteínas en la dieta se correlacionó con la excreción urinaria de citrato, sin embargo, dichas proporciones se encontraba dentro de lo recomendado. Asimismo, no se observaron correlaciones de los micronutrientes y la excreción urinaria de citrato. La alteración esperada por el aumento de proteínas en la dieta sería la hiperuricosuria, por el metabolismo de las purinas contenidas en las proteínas animales, sin embargo, no se encontró en este

trabajo, quizá debido a que no excede las proporciones recomendadas. Por otra parte, la cantidad de proteínas en la dieta proporciona una alta carga ácida, que necesitaría amortiguarse y reduciendo el citrato urinario para ser reabsorbido a la circulación sanguínea. Además de estos mecanismos, también el bajo consumo de frutas y fibra de origen vegetales perpetúa la situación, congruente con los resultados (46-48), estos resultados nos condujeron a buscar la posible susceptibilidad genética relacionada con la excreción urinaria de citrato.

Entre los casos y controles se encontraron diferencias esperables, donde a mayor IMC hay una peor función renal en los casos, consistente con lo que se ha demostrado en todas las series publicadas (17, 18, 20, 23, 24, 29). En cuanto a la concentración de metabolitos, destaca un citrato marcadamente más bajo en los casos, sin embargo, los niveles en el grupo control son, de cualquier forma, bajos según el punto de corte aceptado. Llama la atención que no hubo diferencias entre las concentraciones de ácido úrico y calcio urinarios entre los casos y los controles, ya que en la literatura señala que los pacientes con LU presentan hipercalciuria e hiperuricosuria (22).

Partiendo de que la hipocitraturia es la alteración metabólica subyacente más frecuentemente encontrada en nuestra población, este estudio buscó la asociación entre la LU e hipocitraturia con los polimorfismos de los genes encargados del manejo renal de citratos. El cotransportador NaDC1 es el principal regulador de la excreción renal de citrato urinario, y esta fuertemente regulado por el equilibrio ácido-base; aumenta la expresión de esta proteína con estados ácidos, permitiendo mayor reabsorción de citrato lo que resulta en menor cantidad de citrato en la orina (49). Por otra parte, un incremento en la absorción de citrato a través del NaDC3 en la membrana basolateral, puede conducir al aumento de la

concentración intracelular y alterar el pH urinario, lo que tiene un efecto indirecto en la expresión y actividad del NaDC1, como lo han propuesto otros autores (50).

La excreción de citrato fue significativamente distinta en los participantes bajo ambos modelos de herencia del *NaDC1*. Asimismo, se encontró asociación entre la LU y el *NaDC1* bajo el modelo recesivo [OR: 0.42 (IC 95% 0.18 – 0.96), $p=0.040$]. Los resultados son similares a otro estudio reportado en población maya-mestiza por Medina-Escobedo et al. (17), que encontró asociación con el alelo b del SNPs I550V del NaDC1 y LU [OR: 2.3 (IC 95%, 1.19 – 4.59)], sin embargo, no encontró asociación con la hipocitraturia, definida como citrato urinario <320 mg/24 hrs. Similar a los resultados aquí presentados, se detectó una elevada prevalencia de hipocitraturia en controles sanos (38.1%) lo que confirma nuestro hallazgo de hipocitraturia en sujetos sin LU (71.4%, utilizando 320 mg/24 hrs como punto de corte). Sin embargo, el estudio de Medina-Escobedo et al. (17), presenta dos posibles limitaciones, realiza el diagnóstico de LU mediante ultrasonido y radiografía abdominal convencional, los cuales se reconocen una menor sensibilidad y especificidad diagnóstica respecto con la TAC (como se empleó en nuestro estudio). Además, no se observó un ajuste de los datos obtenidos con otros datos clínicos tales como la función renal, el sexo e IMC, los cuales han demostrado tener un impacto tanto en LU como en hipocitraturia. Al igual que nuestro trabajo, es probable que estos resultados estén influenciados por la baja concentración de citrato urinario de los participantes. Udomsrip et al. (29), reportaron resultados muy similares en tailandeses. En su grupo control, encontraron una mediana de citrato urinario de 1.34 mmol/24 hrs (~257 mg) y en el grupo de casos de 0.55 mmol/24 hrs (~105 mg), por lo que emplearon curvas ROC para establecer un punto de corte para el citrato en su población, encontrando un ABC de 0.083 (IC 95%, 0.749-0.857) para distinguir a pacientes con o sin

LU, tomaron un punto de corte de 1.04 mmol/24 hrs (~200 mg) para definir hipocitraturia, encontrando así una prevalencia de hipocitraturia en casos y controles de 78.6% y 32.1%, respectivamente, muy similares a lo encontrando en el presente trabajo en el cual se empleo el punto de corte de 260 mg/dL. Estas variaciones poblacionales en sujetos sanos y con LU, sugieren fuertemente un componente genético en la excreción renal de citrato.

Con base a lo anterior, se empleó un nuevo punto de corte para reevaluar las asociaciones. Utilizando el punto de corte de citrato de 260 mg/dL, encontramos asociación de hipocitraturia con el *NaDC1* dominante [OR: 0.38 (IC 95%, 0.16 – 0.91) p=0.031], contrario a lo reportado por Udomslip et al., utilizando su punto de corte de 200 mg/24 hrs. Sin embargo, este mismo autor reportó que en el grupo de casos, existió asociación del genotipo GG e hipocitraturia [OR:0.15 (IC 95%, 0.05– 0.48) p=0.001]. Okamoto et al. (16), secuenciaron el SNP I550V del NaDC1 y reportaron una mayor frecuencia de hipocitraturia en tokiotas con el alelo B del SNP, tanto en los casos como en los controles (p<0.05) usando el punto de corte estándar. Es importante mencionar que no usaron un modelo ajustado a variables confusoras.

Estos resultados en conjunto comprueban la asociación del SNP I550V del NaDC1 en la LU y la hipocitraturia, aunque sugiere que hay otros mecanismos involucrados aún por dilucidar. La hipocitraturia es un importante factor etiológico para el desarrollo de la LU, al permitir la agregación del calcio urinario; de la misma forma, la hipercalcemia, o la combinación de hipercalcemia e hipocitraturia, suponen un riesgo mucho mayor para el desarrollo de la LU. Se ha sugerido que puede existir una vía común para la coexistencia de estas alteraciones metabólicas y, en específico, con la participación del NaDC1. Diversos estudios han delimitado el rol del receptor de los polimorfismos del receptor de vitamina D (VDR) y LU

a través del desarrollo de hipercalciuria. Recientemente, estos mismos SNPs han sido asociados a hipocitraturia, proponiendo una vía de señalización molecular que involucra la regulación del calcio extracelular y la vitamina D sobre el transporte de citrato a través del NaDC1, que aún no ha logrado esclarecerse (50). Un estudio publicado por Rendina et al. (14), reporta una interacción epistática entre las variantes del gen *NaDC1* (I550V) y el gen del *VDR* en pacientes con LU e hipocitraturia, proponiendo una supresión de la expresión *NaDC1* mediada por una variante sinónima del *VDR*.

Este trabajo demostró una elevada frecuencia de hipocitraturia en población maya-mestizo y la participación de la variante I550V del *NaDC1*, documentando una asociación de LU con hipocitraturia y utilizando un punto de corte optimizado para esta población bajo el modelo de herencia dominante. De forma interesante, se demostró que el genotipo AA del *NaDC3* se asoció con mayores concentraciones de citrato en la orina, lo que es congruente con nuestra hipótesis de una regulación indirecta a través de la concentración intracelular de citrato y la regulación del pH intracelular. Es importante enfatizar, que el calcio urinario mostró diferencias entre todos los genotipos para ambos genes, presentando mayores concentraciones para el alelo A del *NaDC1* y el alelo C del *NaDC3*, aún después de ajustarlo para sexo, edad e IMC. Adicionalmente, el alelo C del *NaDC3* persistió con mayores concentraciones de calcio urinario mediante el ICC, lo cual quizás limpió el efecto de la función renal.

Estos resultados abren las puertas a estudios posteriores sobre la regulación del calcio sobre el manejo renal de citratos a través de los cotransportadores NaDC1 y NaDC3, así como estudios sobre la regulación indirecta a través de la concentración intracelular de citrato y el pH.

Conclusión

La hipocitraturia es la principal alteración metabólica asociada con el desarrollo de LU en la población maya-mestizo de la Península de Yucatán y los niveles de citrato son llamativamente bajos tanto pacientes con LU como en controles. Los portadores del genotipo GG del *NaDC1* presenten menor riesgo de LU e hipocitraturia utilizando un punto de corte optimizado, sensible y específico. Además, los portadores del alelo C del *NaDC3*, tienen concentraciones de citrato urinario significativamente menores, sugiriendo fuertemente un rol en la excreción renal de citrato y el desarrollo de LU.

Bibliografía

1. Khan SR, Pearle MS, Robertson WG, Gambaro G, Canales BK, Doizi S, et al. Kidney stones. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2:16008.
2. Charles D. Scales J, Smith AC, Hanley JM, Saigal CS. Prevalence of Kidney Stones in the United States. *European Urology*. 2012;62(1):160-5.
3. Sorokin I, Mamoulakis C, Miyazawa K, Rodgers A, Talati J, Lotan Y. Epidemiology of stone disease across the world. *World Journal of Urology*. 2017;35(9):1301-20.
4. Medina-Escobedo M, Zaidi M, León ER-d, Orozco-Rivadeneira S. Prevalencia y factores de riesgo en Yucatán, México, para litiasis urinaria. *Salud Publica de Mexico*. 2002;44(6):541-5.
5. Romero V, Akpınar H, Assimos DG. Kidney Stones: A Global Picture of Prevalence, Incidence, and Associated Risk Factors. *Reviews in Urology*. 2010;12(2/3):86-96.
6. Goldfarb DS, Fischer ME, Keich Y, Goldberg J. A twin study of genetic and dietary influences on nephrolithiasis: a report from the Vietnam Era Twin (VET) Registry. *Kidney Int*. 2005;67(3):1053-61.
7. Saigal CS, Joyce G, Timilsina AR. Direct and indirect costs of nephrolithiasis in an employed population: opportunity for disease management? *Kidney Int*. 2005;68(4):1808-14.
8. Mello MF, Marchini GS, Camara C, Danilovic A, Levy R, Eluf-Neto J, et al. A large 15 - year database analysis on the influence of age, gender, race, obesity and income on hospitalization rates due to stone disease. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*. 2016;42(6):1150-9.

9. Aburto TC, Poti JM, Popkin BM. Patterns and trends in the intake distribution of manufactured and homemade sugar-sweetened beverages in pre-tax Mexico, 1999-2012. *Public health nutrition*. 2018;21(18):3296-306.
10. Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernandez-Lopez JC, Zakharia F, Sikora M, Contreras AV, et al. Human genetics. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science (New York, NY)*. 2014;344(6189):1280-5.
11. Taguchi K, Yasui T, Milliner DS, Hoppe B, Chi T. Genetic Risk Factors for Idiopathic Urolithiasis: A Systematic Review of the Literature and Causal Network Analysis. *European urology focus*. 2017;3(1):72-81.
12. Vezzoli G, Arcidiacono T, Paloschi V, Terranegra A, Biasion R, Soldati L. Update on the genetics of nephrolithiasis. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*. 2008;5(2):110-3.
13. Vasudevan V, Samson P, Smith AD, Okeke Z. The genetic framework for development of nephrolithiasis. *Asian journal of urology*. 2017;4(1):18-26.
14. Rendina D, De Filippo G, Gianfrancesco F, Muscariello R, Schiano di Cola M, Strazzullo P, et al. Evidence for epistatic interaction between VDR and SLC13A2 genes in the pathogenesis of hypocitraturia in recurrent calcium oxalate stone formers. *Journal of nephrology*. 2017;30(3):411-8.
15. Zuckerman JM, Assimos DG. Hypocitraturia: pathophysiology and medical management. *Rev Urol*. 2009;11(3):134-44.
16. Okamoto N, Aruga S, Matsuzaki S, Takahashi S, Matsushita K, Kitamura T. Associations between renal sodium-citrate cotransporter (hNaDC-1) gene polymorphism and

urinary citrate excretion in recurrent renal calcium stone formers and normal controls. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 2007;14(4):344-9.

17. Medina-Escobedo M, Franco-Bocanegra D, Villanueva-Jorge S, González-Herrera L. The I550V polymorphism in the renal human sodium/dicarboxylate cotransporter 1 (hNaDC-1) gene is associated with the risk for urolithiasis in adults from Southeastern, Mexico. *Open Journal of Genetics*. 2013;3(2):59-66.

18. Medina-Escobedo M, Gonzalez-Herrera L, Villanueva-Jorge S, Martin-Soberanis G. Metabolic abnormalities and polymorphisms of the vitamin D receptor (VDR) and ZNF365 genes in children with urolithiasis. *Urolithiasis*. 2014;42(5):395-400.

19. Gianfrancesco F, Esposito T, Ombra MN, Forabosco P, Maninchedda G, Fattorini M, et al. Identification of a novel gene and a common variant associated with uric acid nephrolithiasis in a Sardinian genetic isolate. *American journal of human genetics*. 2003;72(6):1479-91.

20. Polasek O, Gunjaca G, Kolcic I, Zgaga L, Dzijan S, Smolic R, et al. Association of nephrolithiasis and gene for glucose transporter type 9 (SLC2A9): study of 145 patients. *Croatian medical journal*. 2010;51(1):48-53.

21. Fu W, Li Q, Yao J, Zheng J, Lang L, Li W, et al. Protein expression of urate transporters in renal tissue of patients with uric acid nephrolithiasis. *Cell biochemistry and biophysics*. 2014;70(1):449-54.

22. Coe FL, Worcester EM, Evan AP. Idiopathic hypercalciuria and formation of calcium renal stones. *Nature reviews Nephrology*. 2016;12(9):519-33.

23. Mitra P, Guha M, Ghosh S, Mukherjee S, Bankura B, Pal DK, et al. Association of calcitonin receptor gene (CALCR) polymorphism with kidney stone disease in the population of West Bengal, India. *Gene*. 2017;622:23-8.
24. Besiroglu H, Sahin S, Otunctemur A, Ozbek E. Calcium-sensing receptor gene polymorphisms in patients with calcium urolithiasis: a systematic review. *Renal failure*. 2014;36(8):1187-92.
25. Whittamore JM, Hatch M. The role of intestinal oxalate transport in hyperoxaluria and the formation of kidney stones in animals and man. *Urolithiasis*. 2017;45(1):89-108.
26. Lu X, Sun D, Xu B, Pan J, Wei Y, Mao X, et al. In Silico Screening and Molecular Dynamic Study of Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Kidney Stones in the SLC26A6 Gene. *The Journal of urology*. 2016;196(1):118-23.
27. Pajor AM, Sun NN. Single nucleotide polymorphisms in the human Na⁺-dicarboxylate cotransporter affect transport activity and protein expression. *American journal of physiology Renal physiology*. 2010;299(4):F704-11.
28. Chen X, Tsukaguchi H, Chen XZ, Berger UV, Hediger MA. Molecular and functional analysis of SDCT2, a novel rat sodium-dependent dicarboxylate transporter. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(8):1159-68.
29. Udomsilp P, Saepoo S, Ittiwut R, Shotelersuk V, Dissayabutra T, Boonla C, et al. rs11567842 SNP in SLC13A2 gene associates with hypocitraturia in Thai patients with nephrolithiasis. *Genes & genomics*. 2018;40(9):965-72.
30. Bento JL, Palmer ND, Zhong M, Roh B, Lewis JP, Wing MR, et al. Heterogeneity in gene loci associated with type 2 diabetes on human chromosome 20q13.1. *Genomics*. 2008;92(4):226-34.

31. Bai XY, Chen X, Sun AQ, Feng Z, Hou K, Fu B. Membrane topology structure of human high-affinity, sodium-dependent dicarboxylate transporter. *Faseb j.* 2007;21(10):2409-17.
32. Schlessinger A, Sun NN, Colas C, Pajor AM. Determinants of substrate and cation transport in the human Na⁺/dicarboxylate cotransporter NaDC3. *The Journal of biological chemistry.* 2014;289(24):16998-7008.
33. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Annals of internal medicine.* 2009;150(9):604-12.
34. Stevens PE, Levin A. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Annals of internal medicine.* 2013;158(11):825-30.
35. Tiselius HG, Andersson A. Stone burden in an average Swedish population of stone formers requiring active stone removal: how can the stone size be estimated in the clinical routine? *Eur Urol.* 2003;43(3):275-81.
36. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research.* 1988;16(3):1215.
37. Prochaska M, Taylor EN, Curhan G. Menopause and Risk of Kidney Stones. *The Journal of urology.* 2018;200(4):823-8.
38. Mai Z, Li X, Jiang C, Liu Y, Chen Y, Wu W, et al. Comparison of metabolic changes for stone risks in 24-hour urine between non- and postmenopausal women. *PloS one.* 2019;14(1):e0208893.

39. Bayne D, Usawachintachit M, Armas-Phan M, Tzou D, Wiener S, Brown TT, et al. Influence of socioeconomic factors on stone burden at presentation to tertiary referral center: Data from the Registry for Stones of the Kidney and Ureter. *Urology*. 2019.
40. Aune D, Mahamat-Saleh Y, Norat T, Riboli E. Body fatness, diabetes, physical activity and risk of kidney stones: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *European journal of epidemiology*. 2018;33(11):1033-47.
41. Hadian B, Zafar-Mohtashami A, Ghorbani F. Study of Urine Composition of Patients With Recurrent Nephrolithiasis in Lorestan, Iran. *Iran J Kidney Dis*. 2018;12(1):22-6.
42. Spivacow FR, Del Valle EE, Lores E, Rey PG. Kidney stones: Composition, frequency and relation to metabolic diagnosis. *Medicina*. 2016;76(6):343-8.
43. Emami-Naini A, Eshraghi A, Shahidi S, Mortazavi M, Seyrafiyan S, Roomizadeh P, et al. Metabolic evaluation in patients with nephrolithiasis: A report from Isfahan, Iran. *Advanced biomedical research*. 2012;1:65.
44. Ferraro PM, Robertson WG, Johri N, Nair A, Gambaro G, Shavit L, et al. A London experience 1995-2012: demographic, dietary and biochemical characteristics of a large adult cohort of patients with renal stone disease. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2015;108(7):561-8.
45. Spivacow FR, del Valle EE, Negri AL, Fradinger E, Abib A, Rey P. Biochemical diagnosis in 3040 kidney stone formers in Argentina. *Urolithiasis*. 2015;43(4):323-30.
46. Pak CY. Medical management of urinary stone disease. *Nephron Clinical practice*. 2004;98(2):c49-53.
47. Hess B, Michel R, Takkinen R, Ackermann D, Jaeger P. Risk factors for low urinary citrate in calcium nephrolithiasis: low vegetable fibre intake and low urine volume to be

added to the list. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 1994;9(6):642-9.

48. Kok DJ, Iestra JA, Doorenbos CJ, Papapoulos SE. The effects of dietary excesses in animal protein and in sodium on the composition and the crystallization kinetics of calcium oxalate monohydrate in urines of healthy men. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1990;71(4):861-7.

49. Unwin RJ, Capasso G, Shirley DG. An overview of divalent cation and citrate handling by the kidney. Nephron Physiology. 2004;98(2):p15-20.

50. Bergeron MJ, Clemencon B, Hediger MA, Markovich D. SLC13 family of Na(+)-coupled di- and tri-carboxylate/sulfate transporters. Molecular aspects of medicine. 2013;34(2-3):299-312.

Anexos

Anexo 1. Historia Clínica de la Clínica de Litiasis HRAEPY



Historia Clínica Clínica de Urolitiasis

1. identificación

Apellidos: _____ Nombres: _____ Edad: _____

Sexo: Masc. Fem. Fecha de Nacimiento: (aaaa/mm/dd): _____ Expediente: _____

Municipio de nacimiento: _____ Municipio que habita actualmente: _____

Años que lleva viviendo en este municipio: _____ ¿Lleva al menos tres generaciones viviendo en el municipio en el que habita?: Si No Peso: _____ Talla: _____ NSE: _____

2. Antecedentes escolares y laborales

Escolaridad: Analfabeta Lee y escribe Primaria completa Secundaria completa Bachillerato completo Educación superior

Trabaja actualmente: Si No. ¿En que trabaja? _____

¿Cuántos años lleva en este empleo? _____ ¿de cuántas horas/semana es su jornada? _____

Durante su jornada laboral: -Se expone al sol: Si No -Se expone a altas temperaturas: Si No

3. Antecedentes familiares

Familiares con litiasis: Si No ¿Cuántos? _____ ¿Quiénes? Padres Hermanos Hijos

4. APNP

Tabaquismo: Si No. Alcoholismo: Si No. Drogas: Si No Cual: _____

Horas de sueño/noche: _____ Para dormir cuenta con: Ventilador A/C Ninguno

Ronca en las noches: Si No. Realiza rutinariamente ejercicio: Si No. Horas/semana: _____

Cuántas hrs/día ve TV: _____ Cuántos litros de agua toma aproximadamente por día: _____

Con qué se hidrata principalmente: Agua simple Jugos naturales Embotellados otros: _____

De dónde obtiene el agua que utiliza para beber/cocinar: Embotellada/garrafón Agua potable del grifo

Agua del pozo otros: _____

5. APP

Comorbilidades: DM 2 HAS ERC AR Cardiopatía isquémica EVC/secuelas

Hipertiroidismo Hipotiroidismo Gota Osteoporosis Otros: _____

Terapia sustitutiva de la función renal: Si No. Monorreno: Si No

Alteraciones anatómicas de la vía urinaria: Si No. Cual: _____

YUCATÁN

1. Abalá
2. Acancón
3. Akil
4. Baca
5. Bokobá
6. Bucutzotz
7. Cacalchén
8. Calotmul
9. Cansahcab
10. Cantamayec
11. Celestún
12. Cenotillo
13. Conkal
14. Cuncunul
15. Cuzamá
16. Chacsinkin
17. Chankom
18. Chapab
19. Chemax
20. Chicxulub Pueblo
21. Chichimilá
22. Chikindzonot
23. Chocholá
24. Chumayel
25. Dzan
26. Dzemul
27. Dzidzantún
28. Dzilam de Bravo
29. Dzilam González
30. Dzitás
31. Dzoncauich
32. Espita
33. Halachó

34. Hocabá
35. Hochtún
36. Homún
37. Huhí
38. Hunucmá
39. Ixil
40. Izamal
41. Kanasin
42. Kantunil
43. Kaua
44. Kinchil
45. Kopomá
46. Mama
47. Mani
48. Maxcanú
49. Mayapán
50. Mérida
51. Mocoohá
52. Motul
53. Muna
54. Muxupip
55. Opichén
56. Oxkutzcab
57. Panabá
58. Peto
59. Progreso
60. Quintana Roo
61. Río Lagartos
62. Sacalum
63. Samahil
64. Sanahcat
65. San Felipe
66. Santa Elena
67. Seyé

68. Sinanché
69. Sotuta
70. Suclilá
71. Sudzal
72. Suma de Hidalgo
73. Tahdziú
74. Tahmek
75. Teabo
76. Tecón
77. Tekal de Venegas
78. Tekantó
79. Tekax
80. Tekit
81. Tekom
82. Telchac Pueblo
83. Telchac Puerto
84. Temax
85. Temozón
86. Tepakán
87. Tetiz
88. Teya
89. Ticul
90. Timucuy
91. Tinum
92. Tixcacalcupul
93. Tixkokob
94. Tixméhuac
95. Tixpéhuac
96. Tizimin
97. Tunkás
98. Tzucacab
99. Uayma
100. Ucú
101. Umán

102. Valladolid
103. Xocchel
104. Yaxcabá
105. Yaxkukul
106. Yobain

CAMPECHE

1. Calkiní
2. Campeche
3. Carmen
4. Champotón
5. Hecelchakán
6. Hopelchén
7. Palizada
8. Tenabo
9. Escárcega
10. Calakmul
11. Candelaria

QUINTANA ROO

1. Cozumel
2. Felipe Carrillo Puerto
3. Isla Mujeres
4. Othón P. Blanco
5. Benito Juárez
6. José María Morelos
7. Lázaro Cárdenas
8. Solidaridad
9. Tulum
10. Bacalar
11. Puerto Morelos

Enliste todos los medicamentos, vitaminas, suplementos, herbolaria o remedios caseros que tome: _____

6. Litiasis renal

Edad de diagnóstico: _____ **Cómo descubrió que tenía litiasis:** Cólico Hallazgo radiológico/USG por otro motivo Disuria Dolor abdominal Lituria Otro: _____

Ha tenido: Lituria Hematuria Dolor en fosa renal Dolor abdominal Síntomas urinarios ITUs Otros: _____

Número de cirugías por litiasis: _____ **Número de hospitalizaciones por litiasis:** _____

Monorreno a causa de litiasis: Sí No. **Número de TACs realizadas por litiasis:** _____

Localización: RD RI UD UI Vesical Uretral **¿Catéter JJ?** Der Izq Bilateral

Hace alguna dieta especial para la litiasis: Sí No. **Tiene algún Tx para LU:** Sí No

Número telefónico: _____

Anexo 2. Historia Clínica Nutricional para pacientes de la Clínica de Litiasis del HRAEPY



Clínica de Urolitiasis
HRAEPY



RÍO ARRIENTE
FUNDACIÓN

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Ficha de identificación		Número de expediente: _____
Nombre: _____	Número Telefónico: _____	
Sexo: F / M	Edad: _____	Fecha de nacimiento (d/m/a): _____ / _____ / _____
Escolaridad: _____	Ocupación: _____	Localidad: _____ Municipio: _____

1.

Evaluación antropométrica

Indicador	Valor	Indicador	Valor	Indicador	Valor
Peso		ICT (Índice Cintura-Talla)		C. cuello	
Talla		C. cintura		% grasa	
IMC		C. brazo		% agua	

2. Evaluación socioeconómica

1. ¿Cuántas personas viven en su casa?

a) ≤ 2	b) 3	c) 4	d) ≥ 5
--------	------	------	--------

2. ¿Cuál es el ingreso de la familia sumando todas las aportaciones a la semana?

a) < \$1000	b) \$1000- \$3000	c) >\$3000-\$5000	d) \$5000-\$8000	e) >\$8000
-------------	-------------------	-------------------	------------------	------------

3. ¿Porcentaje de ingreso que se utiliza para su alimentación? _____

4. ¿Cuántas personas se alimentan con el dinero que usted/es gana/n? _____

3. Estilo de vida

1. ¿Realiza alguna actividad física? Si / No

2. ¿Cuál? _____ ¿Cuántas hrs/semana? _____

4. Hidratación

1. ¿Cuántos litros de refresco toma al día?

a) No toma	b) 0-500mL	c) 500 mL -1 L	d) 1-2 L	e) 2-3L	f) >3L
------------	------------	----------------	----------	---------	--------

2. ¿Cuántos litros de jugos embotellados toma al día?

a) No toma	b) 0-500mL	c) 500 mL -1 L	d) 1-2 L	e) 2-3L	f) >3L
------------	------------	----------------	----------	---------	--------

3. ¿Cuántos litros de bebidas alcohólicas toma a la semana?

a) No toma	b) 0-500mL	c) 500 mL -1 L	d) 1-2 L	e) 2-3L	f) >3L
------------	------------	----------------	----------	---------	--------

4. ¿Prepara aguas de fruta en casa? _____ ¿Cuál? _____

5. ¿Aproximadamente cuánta agua toma al día?

a) No toma	b) 0-500mL	c) 500 mL -1 L	d) 1-2 L	e) 2-3L	f) >3L
------------	------------	----------------	----------	---------	--------

6. ¿Qué tipo de agua es?

a) potable/grifo	b) purificada/garrafón	c) pozo	d) otros
------------------	------------------------	---------	----------

CUAL:

7. SI TOMA AGUA PURIFICADA, ¿Qué marca es el agua?

a) Cristal	b) Epura	c) Bonafont	d) Rellenable	e) Otros (¿Cuál?) _____
------------	----------	-------------	---------------	-------------------------

8. ¿Qué agua utiliza para cocinar?

a) potable/grifo	b) purificada/garrafón	c) pozo	d) otros
------------------	------------------------	---------	----------

9. ¿Cómo purifican el agua?

a) Hierven el agua	b) Cloran el agua	c) Usan filtros
--------------------	-------------------	-----------------

10. ¿Cultivan frutas o verduras en casa? ¿Cuál? _____

11. ¿Crían animales para consumo en la familia? ¿Cuál? _____



RÍO ARROYO
FUNDACIÓN

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



12. ¿Comen alimentos enlatados o en conserva?

a) Si	b) No
-------	-------

13. ¿En su casa quién decide que comida se cocina? _____

14. En su casa cuentan con:

a) Luz	b) Refrigerador	c) Gas/estufa
--------	-----------------	---------------

5. Evaluación dietética

5.1 Dieta habitual

DESAYUNO	COLACIÓN	ALMUERZO	COLACIÓN	CENA
Lugar: Hora:	Lugar: Hora:	Lugar: Hora:	Lugar: Hora:	Lugar: Hora:

1. ¿Agrega sal extra a la comida ya preparada?

a) si	b) no
-------	-------

2. Frecuencia de consumo de alimentos

2.1. ¿Quién prepara los alimentos que consume?

a) Usted	b) Esposo/a	c) Hijos	d) Madre/padre	e) Comprado	f) Otros
----------	-------------	----------	----------------	-------------	----------

2.2. ¿Ha modificado su alimentación en los últimos 6 meses?

a) si	b) no	¿Por qué?: _____
-------	-------	------------------

2.3. ¿Le ha causado algún efecto emocional su enfermedad? _____

2.4. ¿Ha utilizado algún método de herbolaria para combatir las piedras en los riñones? Si / No ¿Cuál? _____

Frecuencia de consumo de alimentos

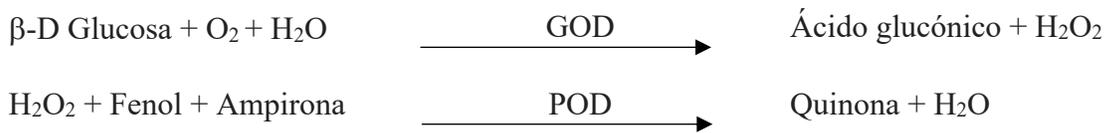
Lácteos	
Leche entera	
Leche semi	
Leche descremada/light	
Leche Deslactosada	
Yoghurt	
AOA	
Pollo	
Puerco (Purinas)	
Res (Purinas)	
Pescado (Purinas)	
Mariscos	
Huevo	
Embutidos (Sodio)	
Visceras (lengua, hígado, chicharra, mondongo, morcilla) (Purinas)	
Queso	
Queso Oaxaca	
Queso Panela	
Queso de bola (Sodio)	
Queso Manchego (Sodio)	
Queso Daysi (Sodio)	
Cereales	
Cereal de caja	
Arroz	
Tortilla de maíz	
Tortilla de harina	
Pan francés/ bolillo	
Pan de molde/tostado	
Pan dulce (Purinas)	
Pasta/ fideos	
Papa	
Eiote	
Cebada	
Avena	
Palomitas (Sodio)	
Verduras (general)	
Espinacas (+1)	
Remolacha/betabel (Oxalatos)	
Apio (Oxalatos)	
Brócoli (Oxalatos)	
Lechuga (Oxalatos)	
Chaya (Oxalatos)	
Tomate	

Verduras enlatadas (Sodio)	
Frutas (general)	
Cacahuates (Oxalatos)	
Nueces y almendras (Oxalatos)	
Leguminosas	
Frijol/ frijol blanco (Purinas)	
Lentejas (Purinas)	
Garbanzo (Purinas)	
Pepita de calabaza	
Espelón	
Grasas	
Mantequilla	
Margarina	
Manteca	
Aceite de cocina:	
Mayonesa (Sodio)	
Aguacate	
Media crema	
Frituras/botanas (Sodio)	
Azúcares	
Agua de sabor: Zuko/Tang/Nestea	
Azúcar	
Sustitutos de azúcar	
Galletas dulces o saladas (Sodio)	
Mermelada	
Miel	
Salsas y aderezos (+1)	
Chocolates en polvo/barra (Oxalatos)	
Refrescos embotellados (+1)	
Jugos industrializados	
Otros	
Infusión de té (Oxalatos)	
Café (Oxalatos)	
Consomé de pollo (Sodio)	
Tabaco	
Bebidas alcohólicas	
Drogas	

Anexo 3. Determinaciones bioquímicas

3-A. Glucosa

Para su determinación, la glucosa es oxidada a ácido glucónico en presencia de la enzima glucosa oxidasa (GOD). El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) producido en esta reacción, se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD):



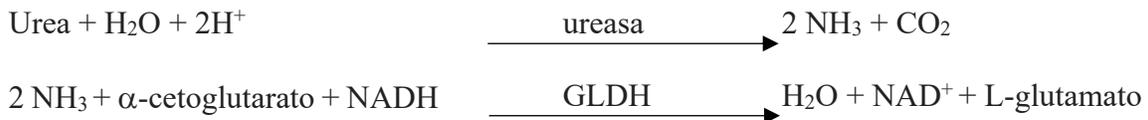
Condiciones del ensayo: 505nm longitud de onda, cubeta 1cm y temperatura 37°C

Valores de referencia: Suero o plasma 60-110mg/dL (3.33-6.10 mmol/L)

Esta prueba se realizó con el equipo *COBAS® 8000 (ROCHE)* en el laboratorio clínico del HRAEPY

3-B. Urea

Para su determinación la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea presente en la muestra, en amoníaco (NH₃) y anhídrido carbónico (CO₂). El amoníaco formado se incorpora al α -cetoglutarato por acción del glutamato deshidrogenasa (GLDH) con oxidación paralela de NADH a NAD. La disminución de la concentración de NAD⁺ en el medio es proporcional a la concentración de la muestra a analizar



Condiciones del ensayo: 340nm longitud de onda, cubeta 1cm y temperatura 37°C

Valores de referencia: suero 15-45mg/dL, orina 20-35gr/24hrs

3-C. Creatinina en suero y orina de 24 horas

El ensayo esta basada en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino produciendo un complejo rojizo descrito por Jaffé. El intervalo de tiempo elegido para las lecturas permite eliminar gran parte de las interferencias conocidas del método. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina de la muestra a analizar

Condiciones del ensayo: 492nm longitud de onda, cubeta 1cm y temperatura 37°C

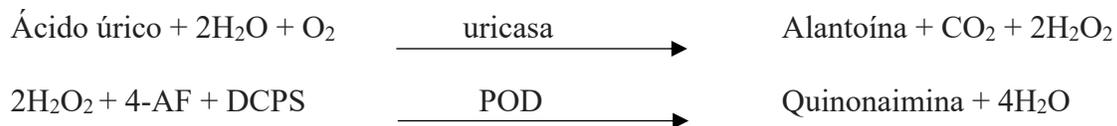
Valores de referencia: suero o plasma en hombres 0.7-1.4mg/dL y mujeres 0.6-1.1mg/dL.

Orina: 0.5 – 1.5 g/24hrs.

3-D. Ácido úrico en sangre y orina de 24 horas

El ácido úrico proviene del metabolismo del nitrógeno por degradación de las purinas y es tóxico en el organismo, por lo cual se elimina principalmente en orina.

Fundamento: el ácido úrico es oxidado por la uricasa produciendo alantoína y peróxido de hidrógeno (2 H₂O₂). Posteriormente, en presencia de la peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF) y 2-4 Diclorofenol Sulfonato (DCPS) forma un compuesto rosáceo.



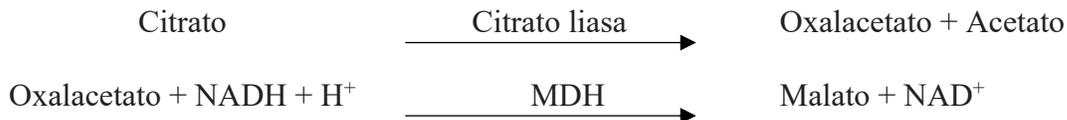
Condiciones del ensayo: 520nm longitud de onda, cubeta 1cm y temperatura 37°C

Valores de referencia: suero o plasma en hombres 3.6-7.7mg/dL y mujeres 2.5-6.8mg/dL. En orina < 600 mg/24 hrs.

3-E. Citrato en orina de 24 hrs

El citrato es un anión intermediario del ciclo del ácido cítrico y se excreta en orina donde es detectado por espectrofotometría. La muestra homogeneizada y congelada se procesó en el Laboratorio Clínico del HRAEPY dentro de los 3 días posteriores a su obtención.

Fundamento: el citrato es metabolizado a oxalacetato y acetato mediante la acción de la enzima citrato liasa. El citrato presente en la muestra se consume al adjuntar la enzima. Posteriormente, el oxalacetato y el NADH son reducidos por la enzima malato deshidrogenasa (MDH) permitiendo la cuantificación espectrofotométrica del NAD.



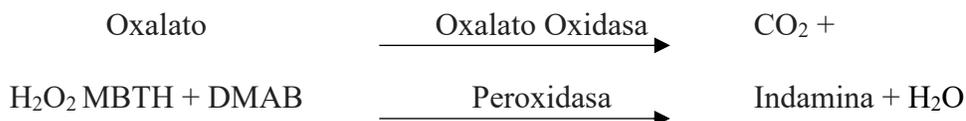
Condiciones del ensayo: 340 nm longitud de onda, cubeta 1 cm y temperatura 37°C.

Valores de referencia: > 320 mg/24 hrs.

3-F. Oxalato en orina de 24 hrs

El oxalato en la orina es un resultado de la dieta, de su absorción intestinal o de un defecto en el metabolismo de los glicoxilatos.

Fundamento: es un método enzimático, colorimétrico que puede ser medido por espectrofotometría. El oxalato presente en la muestra se oxida por la oxalato oxidasa formando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$. Posteriormente, el H_2O_2 , por acción de la peroxidasa general $\text{H}_2\text{O} +$ indamina, que puede ser detectada por espectrofotometría



Condiciones del ensayo: 600 nm longitud de onda, cubeta 1 cm y temperatura 37°C.

Valores de referencia: < 40 mg/24 hrs.

3-G. Electrolitos en sangre y orina de 24 horas

Se empleó la técnica ión selectivo, que es un método electroanalítico con un electrodo de referencia (constante y conocido) y un electrodo de trabajo (que es sensible a la especie electroactiva en cuestión). Se emplearon electrodos de trabajo distintos para los cationes y aniones, utilizando electrodos sensitivos de iones (de membrana).

Fundamento: en una dilución se mide el potencial con el electrodo selectivo para cada ión específico. El potencial se mide contra un electrodo de referencia de potencial estable y constante y la diferencia de potencial entre ambos electrodos dependerá de la actividad del ión específico. Dicha actividad se relaciona con la concentración del ión en estudio

Anexo 4. Extracción de ADN mediante la técnica modificada de Miller et al. (36).

1. En un tubo de 15mL colocar 2mL de sangre total (EDTA), agregar 5mL de una solución sacarosa tritón 2X frío, llevar a un volumen final de 10mL con agua estéril, mezclar suavemente por inversión e incubar en hielo 30min (mezclar de vez en cuando suavemente).
2. centrifugar a 2500rpm durante 15min a 4°C.
3. Decantar el sobrenadante y desechar.
4. Lavar el botón con 2mL de solución sacarosa-tritón 1X (frío).
5. centrifugar a 2500rpm durante 15min a 4°C.
6. Tirar el sobrenadante (con gasa estéril limpiar boca del tubo), el pellet debe verse rosado, si no, lavar nuevamente con sacarosa-tritón 1X
7. Agregar 800µL de buffer de lisis nuclear, 45µL de SDS 10% y 20µL de Proteinasa K, incubar a 37°C con agitación suave toda la noche
8. Pasada la incubación agregar 480µL de cloruro de sodio saturado y agitar vigorosamente
9. centrifugar a 3000rpm durante 20min a 4°C.
10. Incubar en hielo 20min
11. Transferir el sobrenadante a otro tubo cónico estéril
12. Agregar 2 volúmenes de etanol al 100% frío
13. Sacar el ADN con una pipeta Pasteur, mezclar por inversión y sacar el ADN restante.
14. Lavar el ADN con etanol al 70% dentro de un tubo de 600µL.
15. Dejar secar y depositar en 200µL de agua grado biología molecular en un tubo de 600µL por 30min a 37°C
16. Almacenar a -20 °C

Anexo 5. Carta de autorización por el Comité de Ética e Investigación del HRAEPY

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Hospital Regional de Alta Especialidad de la
Península de Yucatán



OFICIO CEI/007/2018
Comité de Ética en Investigación

Mérida, Yucatán a 9 de febrero de 2018

Asunto: Dictamen de protocolo 2017-017

Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta
Profesor Facultad Química UNAM
P R E S E N T E

Con relación al protocolo con número 2017-017, titulado "Identificación de polimorfismos asociados a litiasis urinaria en pacientes de la Península de Yucatán atendidos en el HRAEPY"; el cual, usted funge como investigador principal; y enviados a este comité por vía electrónica el día 22 de enero de 2018; y durante la sesión del 8 de febrero de 2018, se realizó la revisión de los siguientes documentos:

1. Datos de identificación
2. El protocolo en su versión 1
3. El consentimiento informado en su versión 1
4. Hoja de conflicto de interés
5. Instrumentos de recolección de datos (Hoja de recolección de datos)

Le informo, que al evaluar dicho protocolo como riesgo mínimo, y al cumplir con todos los requisitos establecidos, el dictamen fue:

APROBADO

Así mismo, se le hace entrega en forma impresa y por medio electrónico, del formato de consentimiento informado con fecha de autorización y de vigencia, el cual no podrá ser modificado por ningún medio.

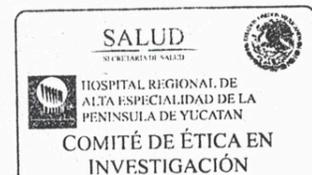
De igual manera le informo, que NO EXISTE, ningún conflicto de interés por los integrantes del comité de ética para la revisión de su protocolo.

La responsabilidad del CEI incluye el seguimiento del estudio, por lo que se le recuerda el compromiso que usted como investigador hizo a este comité, en donde se ponen los mecanismos de entrega de enmienda, término o cancelación del estudio.



Atentamente


Dra. Irasema Romero Baquedano
Presidente del Comité de Ética en investigación




C.c.p. Dra. Ana Ligia Gutiérrez Solís. Secretaria Técnica del Comité de Investigación
C.c.p. Archivo

CONBIOÉTICA-31-CEI-002-20170731

Calle 7, No. 433 por 20 y 22, Fracc. Altabrisa, C.P. 97130, Mérida, Yucatán
Tel. (999) 942 7600 www.hraeyucatan.salud.gob.mx

Anexo 6. Carta de consentimiento informado

 SALUD SECRETARÍA DE SALUD		Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán	
Protocolo 2017-017. “Identificación de polimorfismos asociados a litiasis urinaria en pacientes de la Península de Yucatán atendidos en el HRAEPY”			

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Identificación de polimorfismos asociados a litiasis urinaria en pacientes de la Península de Yucatán atendidos en el HRAEPY

El documento que se expone a continuación cumple con lo dispuesto por el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud. Artículos 1o., 2o., fracción VII, 3o. fracción IX, 4o., 7o., 13 apartado "A" fracciones I, IX, X, apartado "B" fracciones I y VI, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103 y demás relativos a la Ley General de Salud.

La litiasis urinaria (LU) se refiere a la enfermedad caracterizada por piedras en las vías urinarias (riñones y uréteres), padecimiento muy común y cuya incidencia va en aumento. Yucatán es el estado de México con mayor prevalencia de LU, sin embargo, no se conocen las causas. Muchos factores del estilo de vida, tales como los hábitos, la dieta, la ingesta de agua, la exposición al calor y ciertos empleos han sido asociados con un mayor riesgo de padecer LU. También algunas características que se encuentran en la península de Yucatán, como el clima y las condiciones sociales, están asociados a más riesgo de enfermarse de piedras en los riñones. Los estudios científicos han demostrado que las causas ambientales como las que se describieron previamente, son causantes al 50% de la LU, y la otra mitad es atribuida a cuestiones genéticas. En Yucatán hay muy pocos estudios de los genes de nuestra población y su asociación con la enfermedad.

El objetivo de este estudio es identificar las características epidemiológicas de LU e investigar su asociación con la presencia de polimorfismos (o formas alternas de un gen) en población de la península de Yucatán que acude al HRAEPY, asimismo se identificarán las causas de mayor riesgo de padecer esta enfermedad. Si al concluir el estudio se comprueba la relación, los resultados servirán para campañas de promoción de salud para tratar de alertar a la población sobre este riesgo y detectar de manera oportuna los casos para evitar que se presenten complicaciones e invitarlos a cambiar los factores de riesgo modificables.

Con base en lo anterior, se me ha invitado a participar en el protocolo de investigación. Mi participación consistirá en contestar preguntas sobre mis datos personales e historial médico, y autorizar que mi material genético (ADN) sea extraído de mis células mediante una toma de sangre. Mi muestra será almacenada temporalmente en el área de investigación del Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán y enviada al Laboratorio de Genómica de Diabetes de la Facultad de Química de la UNAM ubicado en el Parque Científico y Tecnológico Yucatán para su estudio, donde permanecerá bajo resguardo y se le podrán realizar otros estudios con la finalidad de identificar otros factores de riesgo para la LU, quedando enterado de que si cambio de opinión y ya no deseo que mi ADN sea analizado, le haré saber a los investigadores para que detengan el procedimiento a mi muestra. El estudio tendrá una

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN-HRAEPY
Registro no. CONBIOÉTICA-31-CEI-002-20170731
Fecha de aprobación: 9 de febrero de 2018
Vigencia: 9 de febrero de 2018 a 8 de febrero de 2019

Página 1 de 4

Protocolo 2017-017. “Identificación de polimorfismos asociados a litiasis urinaria en pacientes de la Península de Yucatán atendidos en el HRAEPY”

duración de 18 meses, sin embargo, mi participación será puntualmente durante la entrevista médica inicial y la consulta de seguimientos y entrega de resultados. En caso de dar por terminado el estudio de manera anticipada, seré notificado al respecto. Entiendo que los resultados que se generen de esta investigación serán divulgados en revistas especializadas y congresos científicos, siempre resguardando mi identidad.

El procedimiento que se va a realizar es parte de mi atención médica y la donación de la muestra sanguínea obtenida no implica ningún riesgo ni complicación. En caso de resultar con algún polimorfismo genético que resulte asociado a la enfermedad, seré informado al respecto y tendré el seguimiento de mi enfermedad clínica habitual en el Hospital, entendiéndolo que este hallazgo sería un descubrimiento médico nuevo y no se conoce ninguna otra asociación ni tiene un tratamiento descrito hasta el momento. Se me proporcionará oportunamente la información que resulte del trabajo de investigación y que pudiera impactar en mi decisión de continuar en el estudio.

Beneficios

Los gastos que se generen de mi participación en el protocolo de investigación no tendrán costo para mí. Así también, entiendo que puedo decidir no participar en este estudio; si lo hago, no seré penalizado. La decisión que yo tome no afectará en lo absoluto el tratamiento que recibo por parte de hospital actualmente, ni en el trato de las personas involucradas en mis tratamientos, ya que la investigación es independiente de la atención que se me brinda en esta institución.

Como paciente participante daré información exacta y veraz que me sea solicitada por los investigadores en la entrevista.

¿A quién puedo llamar si tengo preguntas sobre este proyecto?

La Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta, investigadora responsable del estudio y el Dr. Mario Basulto Martínez investigador participante me proporcionarán la información actualizada que se obtenga de esta investigación y garantizarán la confidencialidad de esta información. Teléfonos de localización: Dra. Marta Menjivar Iraheta(Teléfono: 9427600 ext. 54404). Dr. Basulto Martínez (Teléfono: 9993184656)

Si tiene alguna duda sobre el proceso expresado en este escrito no dude exponerla hasta resolver todas sus interrogantes; de la misma manera tiene todo el derecho de abandonar su participación en la investigación en el momento que usted lo decida sin que esto lo perjudique.

Protocolo 2017-017. “Identificación de polimorfismos asociados a litiasis urinaria en pacientes de la Península de Yucatán atendidos en el HRAEPY”

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO DEL SUJETO:

Mi participación en este estudio de investigación es voluntaria. Puedo decidir no ser parte o retirarme del estudio de investigación en cualquier momento sin sanciones ni pérdida de beneficios a los cuales tengo derecho.

Si cumpla con los criterios y deseo ser parte de este estudio en investigación, mi médico puede inscribirme en el estudio de investigación.

El estudio de investigación puede suspenderse en cualquier momento sin mi consentimiento

Se me ha dado la oportunidad de hacerle preguntas a mi investigador del estudio acerca de este estudio. Hasta ahora, mis preguntas han sido respondidas a mi entera satisfacción.

Se me ha informado lo siguiente:

- ✍ Cuánto tiempo estaré en el estudio de investigación
- ✍ Procedimientos y las pruebas que se realizarán durante el estudio de investigación
- ✍ Los posibles riesgos de participar en este estudio de investigación
- ✍ Los datos obtenidos potencialmente pueden ser divulgados con fines científicos manteniendo el anonimato de mi persona

Reiterando, el propósito de este estudio me ha sido explicado a mi entera satisfacción y todas mis dudas han sido resueltas. Yo, voluntariamente acepto participar en este estudio. Estoy enterado de que los datos obtenidos en esta investigación pueden ser publicados y difundidos con fines científicos, siempre manteniéndolos anónimos.

Protocolo 2017-017. “Identificación de polimorfismos asociados a litiasis urinaria en pacientes de la Península de Yucatán atendidos en el HRAEPY”

Acepto que se me realice la toma de muestra de sangre periférica.

Lugar y fecha _____

Nombre del participante: _____

Dirección: _____

Firma del participante: _____

¿Se le otorgó copia al participante? Sí No

Nombre y firma del Investigador _____

Testigo # 1 (Nombre con letra de molde)	Firma	Fecha dd/mmm/aaaa
---	-------	----------------------

Relación del testigo con el participante _____

Dirección del testigo # 1 _____

Testigo # 2 (Nombre con letra de molde)	Firma	Fecha dd/mmm/aaaa
---	-------	----------------------

Relación del testigo con el participante _____

Dirección del testigo # 2 _____

Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta

Firma del investigador responsable

Teléfono: (999) 942-7600 Extensión: 54404

Anexo 7. Preparación de reactivos:

7.1 Cloruro de sodio saturado (1L)

En un vaso de precipitado agregar 500mL de agua destilada y agregar poco a poco los 350g de cloruro de sodio (NaCl), solubilizar lo más posible y agregar posteriormente los otros 500mL de agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente

7.2 Sacarosa-Tritón 2X (1L)

Pesar 219g de sacarosa, 2.42g de tris base, 2.03g de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), y disolver en 500mL de agua destilada, solubilizar lo más posible y agregar lentamente 10mL de Tritón 100X, transferir la solución a un matraz aforado y ajustar la solución a 1000mL con agua destilada, filtrar y almacenar a 4°C.

7.3 Buffer de lisis nuclear (500mL)

En un vaso de precipitado con 500mL de agua destilada agregar 1.21g de tris base, 23.4 de NaCl y 0.75g de sal de sodio del ácido etilendiamino tetraacético (Na_2EDTA), solubilizar lo mas posible, esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

7.4 Buffer TBE 5X (500mL)

En un vaso de precipitado con 250mL de agua estéril agregar 27g de tris base y 13.75g de ácido bórico, disolver lo mas posible y transferir a un matraz aforado, agregar lentamente 10mL de EDTA 0.5M pH 8.0, ajustar a a marca de 500mL con agua destilada, filtrar y almacenar a temperatura ambiente.

7.5 Gel de agarosa al 1.5%

En un matraz de 250mL disolver 0.75g de agarosa con 50mL de buffer TBE 1X, calentar para disolver, esperar que enfríe aproximadamente a temperatura ambiente y agregar 0.5 μ L de colorante gel green, verter en el molde, agregar los peines y esperar que el gel se solidifique