

Concentración de Sulfato en Orina como Marcador Bioquímico de Urolitiasis.

María Belén Pantaley

Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Área: Ciencias Biológicas. Sub-área Bioquímica.

INTRODUCCIÓN

Los cálculos renales son la tercer patología más común del tracto urinario. En Argentina, la prevalencia de nefrolitiasis es de 1-3%, aunque se estima que llegaría al 12% al considerar los cálculos asintomáticos. Es un trastorno con alta recurrencia, siendo además responsable de un alto número de internaciones (13-20%) por complicaciones urológicas o infecciosas (Brusau y col., 2009). El éxito en la prevención y en los tratamientos depende del conocimiento de los parámetros fisicoquímicos, y de los estudios metabólicos, que permitan dilucidar la etiología de la formación de los cálculos. Los factores de riesgo se dividen en “factores metabólicos”: concentraciones urinarias de calcio, oxalato, ácido úrico, citrato y pH; “factores ambientales o dietarios”: volumen urinario, sodio, sulfato, fosfato y magnesio urinarios y “factores físicoquímicos” representados por la saturación de diversas sales que originan la matriz de los cálculos (Pak, C. y col., 1985; Millán-Rodríguez y col., 2011; Tobilli, J. Y col., 1996). La concentración de estos analitos es requerida por los programas informáticos que estiman el riesgo litogénico. Es importante la cuantificación de sulfato en orina ya que su incremento puede contribuir a la formación directa de cálculos de CaSO_4 (muy poco frecuentes) y de manera indirecta, a la formación de otros cálculos cálcicos. Altos contenidos de sulfato urinario sugieren dietas con alta carga ácida que ocasionan hipocitraturia compensadora. Al disminuir el citrato urinario aumenta la cantidad de calcio disponible para unirse con aniones que generan sales poco solubles (Orozco, R. y col., 2011; Salha Villanueva, J. Y col., 2007).

OBJETIVO

Determinar la concentración de sulfato en orina de 24 horas de alumnos de la carrera de bioquímica de la UNL, para luego utilizar esta información en la estimación del riesgo litogénico con el programa EQUIL-AT y calcular valores de referencia para este analito en la población seleccionada.

MATERIALES Y MÉTODOS

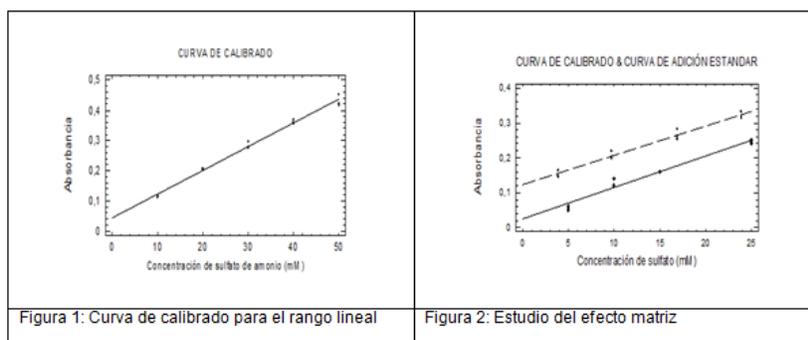
Muestra: Orina de 24 h de alumnos voluntarios (18 a 28 años), que firmaron su consentimiento luego de que se les informó sobre la enfermedad, medidas de prevención, forma de recolección y conservación de la muestra. Se midió el volumen, pH y densidad de las orinas. Se centrifugaron; el sobrenadante se acidificó con ácido clorhídrico y se fraccionó en viales que se mantuvieron a -20°C , hasta su procesamiento (CLSI, 2001).

CAI+D 2011: PI Código 50120110100332LI N° PACT: 15.” Aplicación de Electroforesis capilar zonal (ECZ) a la determinación de marcadores bioquímicos de urolitiasis. Determinación de valores de referencia para la población de Santa Fe”. Directora: MSc. Verónica Guillermina Fernández. Co-Directora: MSc. María Silvana Sobrero. Grupo investigador: Cecilia Brissón, Angela Pedro, Nilda Marsili.

Método: El ión sulfato presente en la muestra se precipitó en medio ácido con ión bario. Se estabilizó en suspensión por acción de la gelatina, se midió la turbidez. **Validación del método:** Se modificó el método de Lundquist y col.1980, por lo cual se determinó: Linealidad; Rango de trabajo; Límite de Detección y Cuantificación; Efecto Matriz; Precisión y Veracidad; Error Total (Duffau, 2010). **Equipos:** Centrífuga Rolco CM 2036, baño termostatzado DALVO BMKI-2, heladera con freezer, vórtex, espectrofotómetro Metrolab 1600 plus, balanza OHAIUS. **Reactivos:** Cloruro de bario dihidratado marca Cicarelli, lote 48184. Gelatina (RG) Se agita con vórtex. Timol, marca Merck; Ácido Tricloroacético (TCA), marca Biopack, ácido clorhídrico, marca Cicarelli; Sulfato de Amonio marca Biopack. **Procedimiento:** 50 microlitros de orina o solución acuosa de sulfato de amonio se mezclaron con 1 mL de TCA 8% (se centrifuga si precipita), luego se agregó 0,5 mL de RG y agua suficiente para obtener 2,5 ml, se vortereó la mezcla final. Se incubó 10 a 20 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a vorterear, y se leyó la turbidez a 600 nm contra blanco de agua destilada. **Análisis estadístico de los resultados:** se utilizó el programa estadístico Statgraphic Plus 5.1.

RESULTADOS

Se comprobó linealidad en el rango de 0 a 50 mM, con un $p=0,279$ para la falta de ajuste (Figura 1). Las muestras que excedieron el valor 50 mM, se diluyeron y procesaron nuevamente, afectando los cálculos, por la dilución realizada. El límite de detección del método es 4,1 mM; el límite de cuantificación 12,4 mM. La figura 2 permite observar las curvas de calibrado (solución acuosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y adición estándar (pool de orinas normales + adiciones de diferentes cantidades de solución acuosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). El ANOVA demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de las curvas comparadas ($p\text{-valor}= 0,396$), con una confianza de 95%, por lo tanto no hay efecto matriz. La precisión fue 5,1 y 4,5; la veracidad 0,7 y 2,0; el error total 9,1 y 9,5 para las muestras 1 y 2 respectivamente. Si bien no hay criterios clínicos sobre los valores de precisión y veracidad, los datos obtenidos se pueden considerar aceptables. El error total menor al 10% para un intervalo de confianza del 95%; indica que el método puede ser incorporado como método definitivo en la práctica de nuestro laboratorio.



La determinación de sulfato en muestras de orina de los alumnos, se utilizó para calcular el riesgo litogénico con el programa EQUIL-AT. El 61,5 % de los alumnos presentó riesgos. Predominó el riesgo de formación de cálculos de ácido úrico (58 %) y urato ácido de sodio (38%). Fue muy bajo el de oxalato de calcio (1,6%). Estos resultados difieren a los reportados por la bibliografía (Alken, 1979; Tobilli, 1996; Del Valle y col., 1999; Patiño

y col., 2005), lo que se podría vincular con consumo muy frecuente de proteínas animales, sal e hidratos de carbono.

Se calculó el intervalo de valores normales para nuestra población. Para obtenerlo se siguieron las recomendaciones del Expert Panel de la International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) que señala que se puede calcular con al menos 30 resultados que presenten distribución normal. El análisis descriptivo de los resultados se muestra en la tabla 2, donde además se los discrimina por sexo y con dos criterios de selección diferentes:

- Criterio de selección 1: Se retiraron los resultados de alumnos con tasa de filtrado glomerular baja (TFG < 90 ml/min/1,73m²).
- Criterio de selección 2: Se retiraron los resultados de alumnos con antecedentes personales o familiares relacionados a litogénesis, TFG baja o alteraciones en los resultados del análisis de orina.

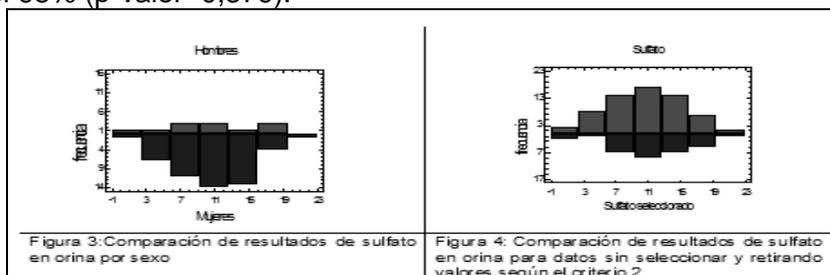
Tabla 1: Análisis descriptivo de los resultados

	Resultados sin seleccionar	Resultados hombres	Resultados mujeres	Resultados Selección 1	Resultados Selección 2
Frecuencia	63	12	51	55	32
Media*	10,72	10,81	10,71	10,69	11,64
Varianza*	21,65	32,76	19,64	22,39	24,18
Desviación *	4,65	5,72	4,43	4,73	4,92
Rango *	4,00-20,0	4,00-19,36	4,00-18,95	4,00-20,0	4,00-20,0
Asimetría	-0,045	0,030	-0,106	-0,224	-0,721
Curtosis	-0,996	-0,501	-0,877	-0,959	-0,283

*Datos expresados en mM sulfato/día. ** 95%. Selección 1: se retiran los resultados de alumnos con TFG baja. Selección 2: Se retiran los resultados de alumnos con antecedentes personales o familiares relacionados a litogénesis, TFG baja o alteraciones en los resultados del análisis de orina.

La distribución es normal en todos los casos (asimetría y curtosis comprendidos entre ± 2). El rango hallado es inferior al de la Lic. Cristina Servetto de la Facultad de Química, Carrera Bioquímico Clínico de la Universidad de la República de Uruguay (5 a 25 mM/24 h).

En la figura 3 se muestran los histogramas separados por sexo. Se hizo el t-test para comparar las medias de las dos muestras y se demostró que no existe diferencia significativa entre ambas para un nivel de confianza del 95% (p-valor=0,947). En la figura 4 se muestran los histogramas construidos con los resultados sin seleccionar y los del grupo con criterio de selección 2, con el propósito de hallar un intervalo de valores normales para describir a nuestra población. Al hacer el t-test para comparar las medias se pudo demostrar que no existe diferencia significativa entre ambas para un nivel de confianza del 95% (p-valor=0,379).



CONCLUSION

Se modificó y validó un método turbidimétrico para determinar sulfato en orina. Se procesaron 63 muestras hallando concentraciones entre 4,00 y 20,0 mM/24h. El intervalo de valores normales se desplaza hacia valores menores que los citados por la bibliografía, resultando más protectores para la población. El 61,5 % de los alumnos presentó riesgo litogénico, con 1,6% de riesgo de formación de cálculos cálculos que pueden ser influidos por concentraciones de sulfato elevadas, entre otras causas.

BIBLIOGRAFIA

- . **Brusau, E.V.; Camí, G.; Castro, F.; Narda, G.**, 2009. Estudio de la frecuencia de litiasis urinaria por espectroscopía infrarroja en San Luis, Argentina. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 43 (3).
- . **CLSI.** Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimen. Approved Guideline. Second Edition (GP16-A2) (2001). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- . **Del Valle, E.; Spivacow, R.; Zanchetta, J.**, 1999. Alteraciones Metabólicas en 2612 pacientes con Litiasis Renal. Instituto de Investigaciones Metabólicas. *Rev. Medicina.* (59): 407-422. Buenos Aires. Argentina.
- . **Duffau, B.; Rojas, F.; Guerrero, F.; Roa, L.; Rodriguez, L.; Soto, M.; Aguilera, M.; Sandoval, S.**, 2010. "Guía Técnica para Validación de Métodos y Determinación de la Incertidumbre de la Medición". Instituto de Salud Pública de Chile. Santiago. Chile.
- . **Lundquist, P.; Martensson, J.; Sorbo, B.; Ohman, S.**, 1980. Turbidimetry of inorganic sulfate, ester sulfate, and total sulfur in urine. *Clin. Chem.* 26(8): 1178-1181.
- Expert Panel de la International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC).
- . **Millán-Rodríguez, F.; Gracia-García, S.; Sánchez-Martín, F. M.; Angerri-Feu, O.; Rosaud-Barón, F.; Villavicencio-Mavrich, H.**, 2011. Un nuevo enfoque en el análisis de la litiasis urinaria en función de la combinación de sus componentes: experiencia con 7.949 casos. *Actas Urológicas Españolas.* 35(3): 138-143. Madrid. España.
- . **Orozco, R.; Camaggi, C.**, 2010. Evaluación Metabólica y Nutrición en Litiasis Renal. *Rev. Med. Clín. Condes.* 21(4) 567-577. Chile.
- . **Pack, Ch.; Skuela, C.; Harvey, J.**, 1985. Graphic display of urinary risk factors for renal stone formation. *The Journal Urology.* 134 (1), 72-78.
- . **Patiño, S.; Abitbol, M.; Rodríguez, N.; Perez, R.**, 2005. Perfil Metabólico Urinario del Paciente con Litiasis Urinaria. Serv. de Urología del Hosp. "J. C. Perrando". Resistencia. Argentina.
- . **Salha Villanueva, J.; Medina-Escobedo, M.; Arcos-Díaz, A.; Martín-Soberanis, G.**, 2007. Excreción de oxalatos y citratos en pacientes adultos con litiasis urinaria. *Uroanálisis.* Yucatán. México.
- . **Tobilli, J.; Ghirlanda, J.; Gigler C.**, 1996. Litiasis Renal. El Ateneo. Buenos Aires. Argentina.