



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL

2023

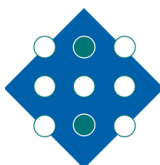
**MECANISMOS DE DESARROLLO DE DEPÓSITOS
SÓLIDOS SOBRE CATÉTERES DOBLE J URINARIOS
(*URETERAL STENTS*). ESTUDIO Y DESARROLLO DE
NUEVOS TRATAMIENTOS PROFILÁCTICOS.**

Paula Calvó Garcia



Universitat
de les Illes Balears

iUNiCS
Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut



Institut
d'Investigació Sanitària
Illes Balears

IdISBa



G CONSELLERIA
O FONS EUROPEUS,
I UNIVERSITAT I CULTURA
B DIRECCIÓ GENERAL
/ POLÍTICA UNIVERSITÀRIA
I RECERCA

Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL 2023

Programa de Doctorado en Investigación Traslacional en
Salud Pública y Enfermedades de Alta Prevalencia

MECANISMOS DE DESARROLLO DE DEPÓSITOS SÓLIDOS SOBRE CATÉTERES DOBLE J URINARIOS (*URETERAL STENTS*). ESTUDIO Y DESARROLLO DE NUEVOS TRATAMIENTOS PROFILÁCTICOS.

Paula Calvó Garcia

Directores: Dr. Félix Grases Freixedas
Dra. Antonia Costa Bauzá
Tutor: Dr. Félix Grases Freixedas

Doctora por la Universitat de les Illes Balears

CERTIFICADO DE LOS DIRECTORES

Los doctores Félix Grases Freixedas, catedrático de Química analítica de la Universitat de les Illes Balears, y Antonia Costa Bauzá, catedrática de Toxicología de la Universitat de les Illes Balears

DECLARAN:

Que la tesis doctoral que lleva por título "*Mecanismos de desarrollo de depósitos sólidos sobre catéteres doble j urinarios (ureteral stents). Estudio y desarrollo de nuevos tratamientos profilácticos*" presentada por Paula Calvó Garcia para la obtención del título de doctora, ha sido dirigida bajo nuestra supervisión.

Y para que quede constancia de ello firmamos este documento.

Firma,

Dr. Félix Grases Freixedas
Catedrático de Química Analítica
Universitat de les Illes Balears

Dra. Antonia Costa Bauzá
Catedrática de Toxicología
Universitat de les Illes Balears

Palma de Mallorca, 02/10/2023

**A la meva mare i al meu pare,
A la meva germana,
A na Robin,
I a la meva parella**

AGRAÏMENTS

El camí de la ciència no és un camí de roses i, per descomptat, el camí del doctorand no serà menys. Per això vull dedicar unes línies a totes aquelles persones que han fet possible que aquest camí arribi al final i m'hagin facilitat superar els nombrosos obstacles que m'he anat trobant durant aquesta etapa de la meua vida.

Primer de tot, agrair als meus directors de tesi, el Dr. Félix Grases Freixedas i Dra. Antònia Costa Bauzá que m'hagin deixat realitzar la tesi al Laboratori d'investigació en *Litiasi renal i patologies relacionades*, baix la seva tutela. Sense la seva guia, experiència i exigència no hauria estat possible obtenir uns treballs de tanta qualitat. He après moltíssim durant aquests sis anys que fa que vaig entrar al laboratori, i gran part és gràcies a vosaltres. Tot el viscut m'ha fet créixer tant com a persona com a investigadora.

Però un grup d'investigació no és un grup sense les persones que el componen i fan possible la seva existència, és per això que també vull agrair a tots els meus companys que m'han acompanyat durant aquest ardu camí.

A la Dra. Pilar Sanchís Cortés, la que sempre m'ha impulsat per poder arribar al final d'aquest trajecte. Gràcies pel teu suport, la teua bondat, per la teua companyia i per estar sempre disponible quan t'he necessitat. Gràcies per sempre escoltar-me i per comptar amb mi a l'hora de fer ciència. Confí que tota la confiança que has dipositat en mi t'hagi pogut ser recíproca. Esper poder continuar fent feina amb tu en un futur. M'agradaria també mencionar i donar les gràcies al seu marit, Dr. Miquel Adrover, per tots els invaluables consells que m'ha brindat i per també estar sempre disponible quan he tingut algun dubte.

A la meua companya de laboratori, Francesca Julià Florit, que és com la meua germana. Gràcies per estar sempre al meu costat i escoltar-me. Pel teu suport i per ser sempre tan comunicativa. Per ser tan noble, amb amics i desconeguts, et confiaria la meua vida. Crec que juntes hem format un gran equip de treball com mai s'ha vist. A na Maribel Tamayo, el meu gran descobriment. Qui diria que entraria una psicòloga al grup, per fer ni més

ni menys que un estudi amb rates! Ha estat un dur camí, però que ens ho hem passat de bé i que molt que hem après. Crec que ets una de les persones que més m'ha pogut comprendre durant aquest viatge. Gràcies pel teu suport, rialles i llàgrimes.

Als meus companys de Sanifit, la doctora Mar Pérez, en Marc i n'Andrea, però també a tots els altres treballadors que han anat passant pel laboratori i amb qui he tingut el plaer de compartir els meus dies. Sou exemple d'unió, confiança i de festa, però alhora també de serietat, compromís i dedicació. Gràcies per estar sempre amb nosaltres i fer-nos costat. Sense vosaltres res seria el mateix.

Però ningú tan bé com la meva família sap el que ha suposat per a mi tot aquest recorregut. És per això que també vull agrair a la meva mare i al meu pare, Francisca i Miquel, per estar sempre al meu costat, tant als bons com als mals moments, incondicionalment. Per educar-me i per tots els consells que m'heu donat al llarg del camí. Per tot el vostre suport, per aguantar-me sempre ni quan jo ho faig i estimar-me igualment, amb la mateixa intensitat. Ho sou tot per jo i vos estim moltíssim. Si pens en el significat de la vida, només em ve la vostra imatge. Ho sou tot per mi i sempre serà així. A la meva germana, Francisca, gràcies per sempre estar pul·lulant pel meu voltant, em dona la vida tenir-te tan a prop. Gràcies per sempre recolzar-me en els mals moments i per dir-me paraules de consol que ningú a casa és capaç de dir-me. Gràcies per ser sempre tan assertiva i per tots els teus intents de postres per fer-nos feliços a tots.

A les meves millors amigues de la infància, na Neus Moranta i na Joana Maria Moragues. Gràcies per acceptar-me sempre, amb les meves coses bones i dolentes, i per sempre recolzar-me en cada una de les eleccions que faig. Els nostres copeos, dinars i sopars sempre m'han ajudat a sortir de dins de la meva bombolla, que moltes vegades és ben necessari, i m'han donat la vida que tota persona es mereix. Tot i que ara mateix no ens veiem tot el que ens agradaria, amb vosaltres sempre m'he sentit escoltada i estimada en tot moment. Gràcies per ser un pilar fonamental en la meva vida. També vull agrair a na Caterina Ribot, que tot i que la vaig conèixer quan cursava el màster, es va convertir

en una persona molt important per jo. Gràcies per sempre pensar en mi i tenir-me en compte. Vos estimo molt a les tres, no sé què faria sense vosaltres.

Finalment, vull donar les gràcies al Biel, qui durant gran part d'aquest camí ha estat el meu company de vida. Gràcies per complementar-me tan bé. Gràcies per la teva tranquil·litat i per la teva absoluta confiança en què tot anirà bé. Gràcies per estar-hi i no preocupar-te el futur incert que ens envolta. Gràcies per la teva senzillesa que em fa veure què és el que importa en realitat. Gràcies, perquè amb tu descobresc cada dia nous significats de les paraules <vida> i <amor>. No podem saber que passarà al futur, però sí que sabem lo molt que ens estimam i lo feliços que som.

Ah, i no oblidar-me de na Robin. La meva filla, la que em treu del solc i em fa perdre els papers, però també la que em fa fondre el cor de tendresa i amor, t'estimo molt. Segurament ets la decisió més pura que he pres en el que duc de vida.

La realització d'aquesta tesis doctoral no hagués estat possible sense la beca predoctoral FPI_CAIB, pel la quan cosa vull agrair la concessió de l'ajuda a la Conselleria de Fons Europeus, Universitat i Cultura del Govern de les Illes Balears. Així mateix, també agrair al Programa Estatal d'R+D+i Orientada als Reptes de la Societat del Ministeri de Ciència, Innovació i Universitats per la concessió del Projecte d'R+D+i Reptes investigació amb referència PID2019-104331RB-I00 i titulat "Estudio de los mecanismos de formación de depósitos sobre catéteres ureterales doble J y desarrollo de estrategias profilácticas (DEPOSITES)".

Moltes gràcies a tots.

**“Cuando miras largo tiempo a un abismo, el abismo también
mira dentro de ti.”**

—Friedrich Nietzsche, libro *Más allá del bien y del mal*

ÍNDICE

RESUMEN	I
RESUM	III
ABSTRACT	V
LISTA DE ACRÓNIMOS	VII
LISTA DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS	IX
OBJETIVOS GENERALES	XI
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	
1. El proceso de cristalización: factores implicados y etapas del proceso	3
1.1. Factores implicados en el proceso de cristalización	3
1.1.1 Factores relacionados con la composición urinaria	4
1.1.1.1 Sobresaturación	4
1.1.1.2 Inhibidores de la cristalización	6
1.1.1.3 Promotores de la cristalización	7
1.1.1.4 Otros factores a tener en cuenta: el pH	7
1.1.2 Factores morfoanatómicos	8
1.2 Etapas del proceso de cristalización	9
1.2.1 Procesos físicoquímicos	9
1.2.1.1 Nucleación	10
1.2.1.2 Crecimiento cristalino	13
1.2.1.3 Agregación	14
1.2.2 Mecanismos de retención	16
2. Cristalización patológica: la litiasis renal	17
2.1 Epidemiología de la litiasis renal	18
2.2 Tipos de cálculos renales	20
3. Catéteres ureterales o doble J	23
3.1 Descripción general	23
3.2 Materiales de fabricación y recubrimientos más comunes	23
<i>Bibliografía</i>	27
CAPÍTULO 2. ESTUDIO DEL EFECTO DE DISTINTOS COMPUESTOS MEDIANTE CINÉTICAS DE CRISTALIZACIÓN	
<i>Objetivos</i>	37
<i>Introducción</i>	41
1. Inhibidores de la litiasis cálcica	43
1.1 Fitato	44
1.1.1 Características generales	44
1.1.2 Efecto antinutriente y dieta mediterránea	44
1.1.3 Fuentes de fitato, absorción, excreción y toxicidad	45
1.1.4 El fitato como inhibidor de la cristalización cálcica	47
1.1.5 Fitato (InsP6) y los inositoles fosfato (InsP)	48

ÍNDICE

1.2 Los bifosfonatos	50
1.3 El citrato	52
2. Inhibidores de la cristalización del ácido úrico	53
<i>Materiales y métodos</i>	57
1. Estudios cinéticos	59
1.1 Preparación de los hidrolizados de InsP6	59
1.2 Cuantificación de InsP	59
1.2.1 Cuantificación de InsP mediante espectrometría de masas	59
1.2.2 Cuantificación no específica de InsP mediante el método AIXO	59
1.2.3 Cuantificación de PPi	60
1.3 Sistema instrumental	60
1.4 Reactivos y disoluciones	61
1.4.1 Cinéticas de cristalización cálcica	61
1.4.1.1 Cinéticas de cristalización del oxalato cálcico	63
1.4.1.2 Cinéticas de cristalización de fosfato cálcico	63
1.4.2 Cinéticas de cristalización del ácido úrico	64
2. Determinación de metilxantinas: participantes, intervención nutricional y muestras de orinas	65
2.1 Voluntarios sanos	65
2.2 Voluntarios litiásicos sanos	66
2.3 Parámetros urinarios	66
2.4 Test de riesgo de cristalización del ácido úrico simplificado (RCAU-S)	67
3. Estudio cristalográfico	68
4. Análisis estadístico	68
<i>Resultados</i>	69
1. Estudios cinéticos de cristalización cálcica	71
1.1 Determinación semicuantitativa de los InsP mediante espectrometría de masas	71
1.2 Determinación de los InsP individuales mediante el método colorimétrico AIXO	72
1.3 Determinación de InsP y de fosfato inorgánico de las muestras de InsP6 hidrolizadas a distintos tiempos (0 a 72 horas) utilizadas para las cinéticas de cristalización	74
1.4 Cinéticas de cristalización del oxalato cálcico	76
1.5 Cinéticas de cristalización de la brushita	83
1.6 Cristalización de la hidroxiapatita	91
1.6.1 Optimización de las cinéticas de cristalización fosfocálcica	91
1.6.1.1 Condiciones de cristalización: 482 ppm P, 170 ppm Ca y distintos pHs	92
1.6.1.2 Condiciones de cristalización: 800 ppm P, 170 ppm Ca y pH 6,5	93
1.6.1.3 Condiciones de cristalización: 1053 ppm P, pH 6,7 y distintas concentraciones de Ca	94
1.6.1.4 Condiciones de cristalización: 1053 ppm P, pH 7 y distintas concentraciones de Ca	96
1.6.1.5 Condiciones de cristalización: 1053 ppm P, pH 6,9 y distintas concentraciones de Ca	98

ÍNDICE

1.6.1.6 Condiciones de cristalización: 990 ppm P, pH 7 y distintas concentraciones de Ca	99
1.6.1.7 Condiciones de cristalización: 482 ppm P, 120 ppm Ca y pH 7	100
1.6.2 Cinéticas de cristalización de la hidroxiapatita	102
2. Estudios cinéticos de cristalización del ácido úrico	105
2.1 Tiempos de mezclado para las cinéticas de cristalización del ácido úrico	105
2.2 Efectos de las metilxantinas en las cinéticas de cristalización del ácido úrico	106
3. Estudio de la concentración y relación de las metilxantinas en orinas de individuos sanos y litiásicos	113
<i>Discusión</i>	119
1. Estudios cinéticos de cristalización cálcica	121
1.1 Hidrólisis del InsP6 y cuantificación	121
1.2 Cinéticas de cristalización cálcica	124
1.2.1 Cinéticas de cristalización del oxalato cálcico	124
1.2.2 Cinéticas de cristalización de la brushita	126
1.2.3 Cinéticas de cristalización de la hidroxiapatita	128
2. Metilxantinas: efectos en las cinéticas de cristalización del ácido úrico y concentración en orinas de individuos sanos y litiásicos	130
2.1 Cinéticas de cristalización del ácido úrico	130
2.2. Metilxantinas en orinas de individuos sanos y litiásicos	134
<i>Conclusiones</i>	137
1. Estudios cinéticos de cristalización cálcica	139
2. Metilxantinas: efectos en las cinéticas de cristalización del ácido úrico y concentración en orinas de individuos sanos y litiásicos	140
<i>Bibliografía</i>	143
<i>Anexos</i>	157
Anexo 1. Rectas patrón de los InsP mediante el método AIXO	159
Anexo 2. Gráficos de las cinéticas de cristalización	163
1. Cinéticas de cristalización del oxalato cálcico	165
2. Cinéticas de cristalización de la brushita	170
3. Cinéticas de cristalización de la hidroxiapatita	176
4. Cinéticas de cristalización del ácido úrico	180
Anexo 3. Artículos científicos originales	187
CAPÍTULO 3. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE DEPÓSITOS SOBRE SECCIONES DE CATÉTERES DOBLE J	
<i>Objetivos</i>	229
<i>Introducción</i>	233
1. Complicaciones asociadas al uso de catéteres doble J	235
1.1 Infección del tracto urinario y formación del <i>biofilm</i> bacteriano	235
1.2 El <i>biofilm</i> bacteriano	236

ÍNDICE

1.2.1 Proceso de formación	236
1.2.2 Cepas más comunes e implicaciones	238
1.3 Incrustación del catéter doble J	240
1.4. <i>Biofilms</i> no cristalinos	243
1.5 Manejo y tratamiento del implante de catéteres ureterales	244
2. La albúmina	246
2.1 Descripción general	246
2.2 Efecto dual de las proteínas en la cristalización	247
<i>Materiales y métodos</i>	249
1. Estudio del efecto del fitato en la formación de depósitos cálcicos y la adhesión bacteriana	251
1.1 Reactivos y disoluciones	251
1.2 Sistema de cristalización en estático (<i>Batch</i>)	252
1.3 Ensayos de adhesión bacteriana	252
1.4 Protocolo de determinación del calcio para el estudio del efecto del fitato en la cristalización cálcica y la adhesión bacteriana	254
2. Estudio del efecto de la albúmina y de distintos compuestos en la formación de depósitos cálcicos y de ácido úrico en estático y flujo	254
2.1 Reactivos y disoluciones	254
2.1.1 Experimentos de formación de depósitos cálcicos	255
2.1.1.1 Experimentos de formación de depósitos de brushita y oxalato cálcico	255
2.1.1.2 Experimentos de formación de depósitos de hidroxiapatita	255
2.1.2 Experimentos de formación de depósitos de ácido úrico	256
2.2. Sistemas de cristalización para el estudio de formación de depósitos cálcicos y de ácido úrico sobre secciones de la marca tygon	256
2.2.1 Sistema de cristalización en estático (<i>Batch</i>)	257
2.2.2 Sistema de cristalización en flujo.	257
2.3. Procedimiento para el revestimiento de secciones tygon con albúmina	259
2.4. Adaptación del método de Lowry para la determinación de la albúmina en placas de 96 pocillos	259
2.4.1 Reactivos	259
2.4.2 Procedimiento	260
2.5 Protocolo de determinación del calcio para el estudio del efecto de la albúmina y de distintos compuestos en la cristalización en estático y flujo	261
2.6 Método de determinación de ácido úrico para los cristales formados en la superficie de las secciones tygon adaptado a placas de 96 pocillos	261
2.6.1 Fundamento	261
2.6.2 Procesamiento de las secciones de tygon 3350	261
2.6.3 Recta patrón	262
2.6.4 Reactivos y lectura de la placa	262
3. Estudio cristalográfico	262
4. Análisis estadístico	263
<i>Resultados</i>	265

1. Estudio del efecto del fitato en la formación de depósitos cálcicos y la adhesión bacteriana	267
1.1 Optimización de la cristalización sobre catéter doble J en ausencia de fitato	267
1.2 Efecto del fitato en la formación de depósitos de fosfato y oxalato cálcico y en la adhesión bacteriana	268
2. Estudio del efecto de la albúmina en la formación de depósitos cálcicos y de ácido úrico en estático y flujo	271
2.1 Optimización de la metodología	271
2.1.1 Ensayos de cristalización en estático con tubo Tygon 3350: comparación de los niveles de cristalización sobre catéter doble J vs. Tygon 3350	271
2.1.2 Efecto de la albúmina y mucina en disolución en la formación de depósitos cálcicos sobre tygon 3350	272
2.1.3 Prueba de revestimiento de las secciones tygon con albúmina durante distintos tiempos	273
2.2 Efecto de la albúmina en la formación de depósitos cálcicos: cristalización de la brushita	275
2.2.1 Experimentos mediante el sistema en estático (<i>Batch</i>)	275
2.2.2 Experimentos mediante el sistema en flujo	279
2.3 Efecto de la albúmina en la formación de depósitos cálcicos: cristalización del oxalato cálcico	283
2.3.1 Experimentos mediante el sistema en estático (<i>Batch</i>)	283
2.3.2 Experimentos mediante el sistema en flujo	288
2.4 Efecto de la albúmina en la formación de depósitos cálcicos: cristalización de la hidroxiapatita	290
2.4.1 Optimización de la formación de depósitos de hidroxiapatita en distintas condiciones de pH, fosforo y calcio sobre secciones de tygon	290
2.4.1.1 Optimización de la formación de depósitos de hidroxiapatita: cristalizaciones mediante el sistema en estático (<i>Batch</i>)	291
2.4.1.1.1 Experimentos realizados en orina artificial a un pH de 6,3	291
2.4.1.1.2 Experimentos realizados en orina artificial a un pH de 6,4	293
2.4.1.1.3 Experimentos realizados en orina artificial a un pH de 6,5	295
2.4.1.1.4 Resultados obtenidos en función del pH y la concentración de fósforo de la orina artificial	298
2.4.1.2 Optimización de la formación de depósitos de hidroxiapatita: cristalizaciones mediante el sistema en flujo	300
2.4.1.2.1 Condiciones experimentales: 482 ppm P, 170 ppm Ca y distintos pHs	300
2.4.1.2.2 Condiciones experimentales: 482 ppm P, pH 7 y distintas concentraciones de calcio	303
2.4.2 Estudio del efecto de la albúmina en la formación de depósitos de hidroxiapatita sobre secciones tygon.	304
2.4.2.1 Experimentos mediante el sistema en estático (<i>Batch</i>)	304
2.4.2.2 Experimentos mediante el sistema en flujo	307
2.5 Efecto de la albúmina en la formación de depósitos de ácido úrico	311

2.5.1 Optimización de la formación de depósitos de ácido úrico sobre secciones tygon	311
2.5.1.1 Optimización de la formación de depósitos de ácido úrico: cristalizaciones mediante el sistema en estático (<i>Batch</i>)	311
2.5.1.2 Optimización de la formación de depósitos de ácido úrico: cristalizaciones mediante el sistema en flujo	314
2.5.2 Estudio del efecto de la presencia de albúmina en la formación de depósitos de ácido úrico en estático (<i>Batch</i>)	316
3. Estudio de los compuestos con efecto inhibidor en la formación de depósitos cálcicos (brushita, oxalato cálcico e hidroxiapatita) y del ácido úrico sobre secciones tygon	319
3.1 Efectos inhibidores en la formación de depósitos de brushita con COM minoritario sobre secciones tygon	320
3.1.1 Experimentos mediante el sistema en estático (<i>Batch</i>)	320
3.1.2 Experimentos mediante el sistema en flujo	322
3.2 Efectos inhibidores en la formación de depósitos de oxalato cálcico	325
3.2.1 Experimentos mediante el sistema en estático (<i>Batch</i>)	325
3.2.2 Experimentos mediante el sistema en flujo	327
3.3 Efectos inhibidores en la formación de depósitos de hidroxiapatita	330
3.3.1 Experimentos mediante el sistema en estático (<i>Batch</i>)	330
3.3.2 Experimentos mediante el sistema en flujo	332
3.4 Efectos inhibidores en la formación de depósitos de ácido úrico	334
3.4.1 Experimentos mediante el sistema en estático (<i>Batch</i>)	334
Discusión	337
1. Estudio del efecto del fitato en la cristalización cálcica y la adhesión bacteriana	339
2. Estudio del efecto de la albúmina en la formación de depósitos cálcicos y de ácido úrico mediante el sistema en estático y en flujo	341
2.1 Efecto de la presencia de albúmina en la formación de depósitos cálcicos: cristalización de la brushita	343
2.2 Efecto de la presencia de albúmina en la formación de depósitos cálcicos: cristalización del oxalato cálcico	347
2.3 Efecto de la presencia de albúmina en la formación de depósitos cálcicos: cristalización de la hidroxiapatita	350
2.4 Efecto de la presencia de albúmina en la formación de depósitos de ácido úrico	354
2.5 Comentarios finales	355
3. Estudio de los compuestos con efecto inhibidor en la formación de depósitos cálcicos (brushita, oxalato cálcico e hidroxiapatita) y del ácido úrico sobre secciones tygon	357
3.1 Inhibición de la formación de depósitos cálcicos (brushita, oxalato cálcico e hidroxiapatita)	357
3.1.1 Inhibición de la formación de depósitos de brushita	357
3.1.2 Inhibición de la formación de depósitos de oxalato cálcico	359
3.1.3 Inhibición de la formación de depósitos de hidroxiapatita	360
3.2 Inhibición de la formación de depósitos de ácido úrico	360

ÍNDICE

Conclusiones	363
1. Estudio del efecto del fitato en la cristalización cálcica y la adhesión bacteriana	365
2. Estudio del efecto de la albúmina en la formación de depósitos cálcicos y de ácido úrico en estático y flujo	365
3. Estudio de los compuestos con efecto inhibidor en la formación de depósitos cálcicos (brushita, oxalato cálcico e hidroxiapatita) y del ácido úrico sobre secciones tygon	366
Bibliografía	367
Anexos	377
Anexo 1. Adaptación del método de Lowry para placas de 96 pocillos	379
Anexo 2. Optimización de la determinación de ácido úrico en tygon 3350	383
Anexo 3. Determinación de InsP y fosfato inorgánico de la muestra de InsP6 hidrolizada durante 16 horas	387
Anexo 4. Artículos científicos originales	391
CONCLUSIONES GENERALES	399

RESÚMEN

El uso del catéter ureteral doble J puede provocar efectos adversos, como el desarrollo de infección en el sistema urinario (ITU) debido a la colonización bacteriana de la superficie del catéter, lo que lleva a la formación del *biofilm* bacteriano. La presencia de bacterias productoras de ureasa en el *biofilm* eleva el pH de la orina mediante la formación de amoníaco. Cuando el pH de la orina es superior a 6,2 pueden formarse depósitos de hidroxapatita (HAP), brushita (BRU) y estruvita (FAM) en el catéter, causando incrustaciones y bloqueo del flujo. Estas grandes masas cristalinas funcionan como *nidus* permitiendo la adhesión de aún más bacterias. El fitato (InsP6) es capaz de reducir el desarrollo de calcificaciones patológicas, como calcificaciones cardiovasculares y cálculos renales. Así, el primer estudio evaluó el efecto del InsP6 sobre la adhesión bacteriana a la superficie del catéter en condiciones que favorecen la cristalización cálcica. Las secciones del catéter doble J se incubaron en orina artificial (OA) a pH 6,5 en presencia y ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* y fitato. La formación de depósitos de fosfato cálcico (BRU y HAP) y de oxalato cálcico monohidrato (COM), así como la cantidad de bacterias adheridas disminuyó exitosamente en presencia del fitato.

El proceso de formación del *biofilm* comienza con la interacción del catéter con los fluidos corporales, generando el primer depósito de moléculas extracelulares que conforman el *conditioning film*. La albúmina, fibrinógeno y uromodulina son componentes clave de este *film* en los catéteres ureterales. Así, el siguiente estudio investigó cómo la albúmina afecta la formación de depósitos de distintos cristales sobre secciones de la marca tygon, después de observar que el grado de cristalización sobre estas es parecido al que se produce en las secciones de catéter doble J en las mismas condiciones. Los experimentos se llevaron a cabo en un sistema estático y otro en flujo. Se observó que la albúmina, tanto como recubrimiento como en disolución, reduce la deposición de ciertos cristales, como BRU, HAP y ácido úrico (AU), en condiciones estáticas y de flujo, aunque aumentó la deposición de COM en ciertos casos.

La desfosforilación del InsP6 puede generar una cantidad significativa de derivados InsP que también podrían presentar importantes funciones biológicas. Así, una vez estudiado el efecto de la albúmina se pasó a evaluar los efectos del fitato, las mezclas de sus

productos de hidrólisis, distintos bifosfonatos (alendronato, pamidronato, ibandronato y etidronato) y el citrato en la formación de depósitos de BRU, COM y HAP. También se examinó la capacidad de metilxantinas, incluida la teobromina y sus metabolitos, para inhibir la cristalización del AU. Primero se testaron los compuestos en ensayos turbidimétricos y posteriormente se seleccionaron los más efectivos para probarlos en los ensayos de formación de deposiciones sobre secciones tygon incubadas en OA en condiciones que favorecieron la cristalización de cada uno de los tipos cristalinos. El InsP6 y sus productos de fosforilación inhibieron la deposición de OxCa y BRU, pero no de HAP sobre las secciones. El alendronato y citrato mostraron efectos reducidos. Los principales metabolitos de la teobromina (la 7-metilxantina, el 3,7-dimetilúrico y la 3-metilxantina) presentaron efecto inhibitorio de la cristalización del AU, siendo las dos primeras las más efectivas. Finalmente, al cuantificar la teobromina y sus metabolitos en orina de pacientes litiásicos y voluntarios sanos se observó que aquellos con riesgo de cristalización úrica que no desarrollaron cristales en el test RCAU-S presentaron orinas con una concentración significativamente mayor de teobromina y sus metabolitos. Por otro lado, los individuos con menor riesgo de cristalización del AU pero que presentaron cristales tuvieron orinas con una concentración significativamente menor de teobromina y sus metabolitos.

RESUM

L'ús del catèter ureteral doble J pot provocar efectes adversos, com el desenvolupament d'infeccions al sistema urinari (ITU) a causa de la colonització bacteriana de la superfície del catèter, la qual cosa condueix a la formació del biofilm bacterià. La presència de bacteris productors d'ureasa en el biofilm eleva el pH de l'orina mitjançant la formació d'amoni. Quan el pH de l'orina és superior a 6,2, poden formar-se dipòsits de hidroxiapatita (HAP), brushita (BRU) i estruvita (FAM) en el catèter, provocant incrustacions i bloqueig del flux. Aquestes grans masses cristal·lines actuen com a *nidus*, permetent l'adhesió d'encara més bacteris. El fitat (InsP6) té la capacitat de reduir el desenvolupament de calcificacions patològiques, com les calcificacions cardiovasculars i els càlculs renals. Així, el primer estudi va avaluar l'efecte de l'InsP6 sobre l'adhesió bacteriana a la superfície del catèter en condicions que afavoreixen la cristal·lització de calci. Les seccions del catèter doble J es van incubar en orina artificial (OA) amb un pH de 6,5, en presència i absència de *Pseudomonas aeruginosa* i fitat. La formació de dipòsits de fosfat de calci (BRU i HAP) i d'oxalat càlcic monohidrat (COM), així com la quantitat de bacteris adherits, va disminuir amb èxit en presència del fitat.

El procés de formació del *biofilm* comença amb la interacció del catèter amb els fluids corporals, generant el primer dipòsit de molècules extracel·lulars que formen el *conditioning film*. L'albumina, el fibrinogen i l'uromodulina són components clau d'aquest *film* als catèters ureterals. Així, el següent estudi va investigar com l'albumina afecta la formació de dipòsits de diferents cristalls a les seccions de la marca tygon, després d'observar que el grau de cristal·lització en aquestes és semblant al que es produeix a les seccions del catèter doble J en les mateixes condicions. Els experiments es van dur a terme en un sistema estàtic i un altre en flux. Es va observar que l'albumina, ja sigui com a recobriment o en dissolució, redueix la deposició de certs cristalls, com BRU, HAP i àcid úric (AU), en condicions estàtiques i de flux, tot i que en alguns casos va augmentar la deposició de COM.

La desfosforilació de l'InsP6 pot generar una quantitat significativa de derivats InsP que també podrien presentar importants funcions biològiques. Així, un cop estudiat l'efecte

de l'albumina, es va procedir a avaluar els efectes del fitat, les barreges dels seus productes d'hidròlisi, diferents bifosfonats (alendronat, pamidronat, ibandronat i etidronat) i el citrat en la formació de dipòsits de BRU, COM i HAP. També es va examinar la capacitat de metilxantines, inclosa la teobromina i els seus metabòlits, per inhibir la cristal·lització de l'AU. En primer lloc, es van provar aquests compostos en assaigs turbidimètrics i posteriorment es van seleccionar els més efectius per provar-los en els assaigs de formació de deposicions en seccions tygon incubades en OA en condicions que afavorien la cristal·lització de cadascun dels tipus de cristalls. L'InsP6 i els seus productes de fosforilació van inhibir la deposició d'OxCa i BRU, però no de HAP a les seccions. L'alendronat i el citrat van mostrar efectes reduïts. Els principals metabòlits de la teobromina (la 7-metilxantina, el 3,7-dimetilúric i la 3-metilxantina) van presentar un efecte inhibitor en la cristal·lització de l'AU, essent les dues primeres les més efectives. Finalment, en quantificar la teobromina i els seus metabòlits en la orina de pacients amb litiasis renal i voluntaris sans, es va observar que aquells amb risc de cristal·lització úrica que no van desenvolupar cristalls en la prova RCAU-S presentaven orines amb una concentració significativament major de teobromina i els seus metabòlits. D'altra banda, els individus amb menor risc de cristal·lització de l'AU però que van presentar cristalls tenien orines amb una concentració significativament menor de teobromina i els seus metabòlits.

ABSTRAT

The use of double-J ureteral catheters can lead to adverse effects, such as the development of urinary tract infection (UTI) due to bacterial colonization of the catheter surface, leading to the formation of bacterial biofilm. The presence of urease-producing bacteria in the biofilm raises the urine pH through the formation of ammonia. When the urine pH is above 6.2, deposits of hydroxyapatite (HAP), brushite (BRU), and struvite (FAM) can form on the catheter, causing encrustations and flow blockage. These large crystalline masses act as nidus, allowing for the adhesion of even more bacteria. Phytate (InsP6) can reduce the development of pathological calcifications, such as cardiovascular calcifications and kidney stones. Thus, the first study evaluated the effect of InsP6 on bacterial adhesion to the catheter surface under conditions that promote calcium crystallization. Double-J catheter sections were incubated in artificial urine at pH 6.5 in the presence and absence of *Pseudomonas aeruginosa* and phytate. The formation of calcium phosphate deposits (BRU and HAP) and calcium oxalate monohydrate (COM), as well as the quantity of adherent bacteria, decreased successfully in the presence of phytate.

The process of biofilm formation begins with the interaction of the catheter with bodily fluids, generating the initial deposit of extracellular molecules that constitute the conditioning film. Albumin, fibrinogen, and uromodulin are key components of this film in ureteral catheters. Thus, the following study investigated how albumin affects the formation of deposits of different crystals on sections of the tygon brand, after observing that the degree of crystallization on these sections is similar to that which occurs on double-J catheter sections under the same conditions. The experiments were conducted in a static system and another under flow conditions. It was observed that albumin, both as a coating and in solution, reduces the deposition of certain crystals, such as BRU, HAP, and uric acid (AU), under static and flow conditions, although it increased the deposition of COM in certain cases.

The dephosphorylation of InsP6 can generate a significant amount of InsP derivatives that could also have important biological functions. Thus, once the effect of albumin was

studied, an evaluation of the effects of phytate, mixtures of its hydrolysis products, different bisphosphonates (alendronate, pamidronate, ibandronate, and etidronate), and citrate on the formation of deposits of BRU, COM, and HAP was conducted. The capacity of methylxanthines, including theobromine and its metabolites, to inhibit the crystallization of AU was also examined. Firstly, the compounds were tested in turbidimetric assays, and subsequently, the most effective ones were selected for testing in deposition formation assays on tygon sections incubated in artificial urine under conditions favouring the crystallization of each crystal type. InsP6 and its phosphorylation products inhibited the deposition of OxCa and BRU but not HAP on the sections. Alendronate and citrate showed reduced effects. The main metabolites of theobromine (7-methylxanthine, 3,7-dimethyluric, and 3-methylxanthine) exhibited inhibitory effects on the crystallization of AU, with the first two being the most effective. Finally, when quantifying theobromine and its metabolites in the urine of lithiasis patients and healthy volunteers, it was observed that those at risk of uric crystallization who did not develop crystals in the RCAU-S test had significantly higher concentrations of theobromine and its metabolites in their urine. On the other hand, individuals with a lower risk of AU crystallization but who developed crystals had significantly lower concentrations of theobromine and its metabolites in their urine.

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

1MX	1-metilxantina
37DMUA	3,7-dimetilúrico
3MX	3-metilxantina
7MX	7-metilxantina
Abs	Absorbancia
Al	Aluminio
Alb	Albúmina
AU	Ácido úrico
BRU	Brushita
Ca	Calcio
CaP	Fosfato cálcico
Conc.	Concentración
DF	Difilina
FAM	Fosfato amónico magnésico/estruvita
h	Horas
HAP	Hidroxiapatita
HETeo	Hidroxietilteofilina
InsP	Inositolfosfato
ITU	Infecciones del tracto urinario
min	Minutos
MO	Materia orgánica
MS	Espectrometría de masas
OA	Orina artificial
OADC	Orina artificial doble concentrada
OxCa	Oxalato cálcico
P	Fósforo
PBS	Disolución salina tamponada con fosfato
PPI	Fosfato inorgánico
PX	Paraxantina
PXF	Pentoxifilina
SEM	Error estándar de la media
TB	Teobromina
t_i	Tiempo de inducción
Δt_i	Incremento del tiempo de inducción

1. Calvó, P.; Mateu-Borras, M.; Costa-Bauza, A.; Albertí, S.; Grases, F. Effect of Phytate on Crystallization on Ureteral Stents and Bacterial Attachment: An in Vitro Study. *Urolithiasis* **2022**, 50, 737–742, doi:10.1007/S00240-022-01350-1.
2. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Calvó, P.; Julià, F.; Dietrich, J.; Gomila, R.M.; Martorell, G.; Sanchis, P. Phytate Dephosphorylation Products Also Act as Potent Inhibitors of Calcium Oxalate Crystallization. *Molecules* **2022**, 27, doi:10.3390/MOLECULES27175463.
3. Calvó, P.; Costa-Bauza, A.; Grases, F. Effect of Phytate (InsP6) and Other Inositol-Phosphates (InsP5, InsP4, InsP3, InsP2) on Crystallization of Calcium Oxalate, Brushite, and Hydroxyapatite. *Biomolecules* **2023**, Vol. 13, Page 1061 2023, 13, 1061, doi:10.3390/BIOM13071061.
4. Costa-Bauzá, A.; Calvó, P.; Hernández, Y.; Grases, F. Efficacy of Theobromine and Its Metabolites in Reducing the Risk of Uric Acid Lithiasis. *Int J Mol Sci* **2023**, 24, 10879, doi:10.3390/IJMS241310879.

OBJETIVOS GENERALES DE LA TESIS

Los objetivos de esta Tesis Doctoral se enmarcan dentro de los objetivos generales del grupo de Investigación en Litiasis renal y patologías relacionadas, en cuanto a profundizar en el conocimiento del proceso de biomineralización en general y de la formación de incrustaciones, obstrucciones y bloqueos de los catéteres doble J en particular. Estos estudios tienen el fin de elucidar los procesos que subyacen tras estos fenómenos para poder desarrollar nuevas intervenciones terapéuticas para su diagnóstico, prevención y tratamiento.

Los objetivos generales de esta Tesis Doctoral son:

- Estudiar los factores que intervienen en la formación de los depósitos sólidos de HAP, BRU, OxCa y AU que aparecen sobre catéteres urinarios doble J, que generan su obstrucción y dificultan o impiden su retirada, con graves consecuencias para el paciente.
- Evaluar los efectos de compuestos que podrían evitar su desarrollo.

Capítulo 1. Introducción general

1. El proceso de cristalización: factores implicados y etapas del proceso

La **cristalización** consiste en la formación de una red sólida y bien definida de átomos y moléculas. Para que este proceso sea espontáneo se produce una disminución del estado energético de los componentes que compensa pasar de un estado desordenado a uno de mayor orden. Este proceso de cristalización se da de forma natural en los organismos, aunque también es usado con mucha frecuencia en el ámbito industrial (como fase de separación y purificación).

La cristalización de minerales llevada a cabo en los seres vivos se denomina **biomineralización** y se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Concretamente en los humanos la encontramos en procesos fisiológicos que llevan a cabo la formación de los huesos y los dientes. Se trata de un proceso que suele darse sólo en situaciones biológicamente controladas, por lo que convergen unos factores que permiten tener este proceso bien regulado y evitar cristalizaciones indiscriminadas dentro del organismo[1–3].

1.1. Factores implicados en el proceso de cristalización

El tiempo necesario para que en un sistema sobresaturado se inicie la cristalización depende de varios factores, por lo que puede tardar desde décimas de segundo a años. La alteración de algunos de estos factores que regulan el proceso de cristalización puede dar lugar a trastornos en el proceso normal de mineralización, desencadenando una serie de patologías como es por ejemplo la litiasis renal. Este fenómeno resalta la importancia de los factores que regulan la cristalización y el equilibrio existente entre ellos.

En la actualidad la litiasis renal ya es ampliamente conocida como una enfermedad multifactorial, de tal manera que sus factores etiológicos pueden agruparse en dos grandes categorías: los factores relacionados con la composición de la orina y los factores morfoanatómicos[4].

1.1.1 Factores relacionados con la composición urinaria

Los principales factores relacionados con la composición de la orina cuyo desequilibrio da lugar a los procesos de cristalización patológica son los siguientes[3]:

- Sobresaturación: la relación entre la concentración de sustancias precipitantes en la orina y la solubilidad de la fase mineral formada del compuesto.
- Presencia de inhibidores de la cristalización.
- Presencia de promotores de la cristalización o nucleantes.

1.1.1.1 Sobresaturación

Cuando una disolución contiene una cantidad de soluto superior a la permitida por su solubilidad se dice que el sistema está sobresaturado (SS). La sobresaturación se define para una disolución como

$$SS = c/c_{eq}$$

donde c es la concentración actual de la disolución y c_{eq} la concentración de la disolución saturada (también denominada solubilidad de la sustancia). Así, cuando una disolución está saturada SS es igual a 1. Niveles por encima de 1 indican de la disolución está sobresaturada, momento en el que los cristales pueden nuclear y crecer, promoviendo la formación de cálculos, mientras que se disuelven en niveles por debajo de 1.

El intervalo entre la concentración de saturación (solubilidad, S) y la concentración a partir de la cual se produce la precipitación instantánea se denomina **región metaestable** (Figura 1.1 Región A). Incluso en esta zona, el medio se encuentra en una situación inestable desde el punto de vista termodinámico, es decir, en unas condiciones en que el sistema tarde o temprano cristalizará (con la finalidad de llegar al estado de equilibrio termodinámico). Eso es debido a que incluso en disoluciones metaestables, la nucleación podrá darse si la sobresaturación aumenta lo suficiente. En este punto se dice que se ha alcanzado el **límite superior de metaestabilidad**[5] (Figura 1.1 curva de sobresaturación). En la zona con mayor sobresaturación, la **región lábil** (Figura 1.1 Región B) los cristales se forman rápidamente en disolución y en grandes

cantidades. Finalmente se encuentra la región **región estable** (no saturada) por debajo de la curva de saturación (también llamada solubilidad), donde no es posible la cristalización (Figura 1.1 Región C). Un cristal de soluto se disolverá en la región estable (también llamada insaturada); un cristal crecerá en la región metaestable o en la lábil, y la nucleación se producirá exclusivamente en la región lábil[6].

Por lo tanto, la disolución sobresaturada es estable sólo durante un periodo de tiempo limitado, dependiendo de la sobresaturación existente, de manera que, a mayor sobresaturación, menor es el tiempo de estabilidad aparente[7]. La sobresaturación suele ser mayor en pacientes con cálculos renales recurrentes que en los que no los tienen, y el tipo de la piedra que se forma se correlaciona con la sobresaturación urinaria[5,8].

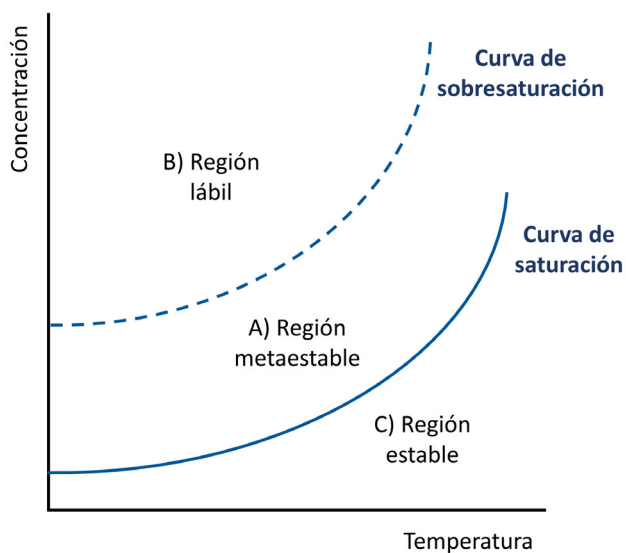


Figura 1.1 Diagrama de saturación-sobresaturación. Con línea continua se encuentra indicada la curva de saturación, y con línea discontinua la curva de sobresaturación. Así mismo también se encuentran representadas A) la región metaestable; B) la región lábil y C) la región estable.

El tiempo que transcurre desde el momento del establecimiento de la sobresaturación hasta que se observa un cambio en la propiedad física del sistema como consecuencia de la cristalización se llama **tiempo de inducción** (también denominado período de inducción).

Una metodología para llevar a cabo la medida del tiempo de inducción son las cinéticas de cristalización. Este método experimental permite seguir la cinética de nucleación, así como la formación de los núcleos críticos hasta que alcanzan un

determinado tamaño que es valorado mediante turbidimetría, por lo que la propiedad observada del sistema es la turbidez de la disolución.

Así, a nivel fisiológico la orina está sobresaturada respecto al OxCa [9], y dependiendo el pH, puede encontrarse sobresaturada respecto al ácido úrico (AU, pH < 5,5) o al fosfato cálcico (CaP, pH > 6,0)[2,10]. En cuanto a la sangre y los otros fluidos intersticiales, estos se encuentran sobresaturados respecto al CaP.

Por lo tanto, la orina y la sangre se encuentran sobresaturadas respecto distintas especies y no por ello se inicia el proceso de cristalización, por lo que la sobresaturación (factor termodinámico) por sí sola no es suficiente para el desarrollo del cálculo, sino que también intervienen otros factores en el proceso.

1.1.1.2 Inhibidores de la cristalización

La presencia en la orina de inhibidores de la cristalización puede explicar por qué no se da la cristalización en las condiciones expuestas anteriormente. Los inhibidores de la cristalización son todas aquellas sustancias, tanto orgánicas como inorgánicas, que impiden o retrasan la formación de un material cristalino, por lo que se tratan de factores cinéticos.

Pueden encontrarse, al menos, cuatro tipos de inhibidores de la cristalización en la orina: aniones orgánicos como el fitato, el citrato y bifosfonatos, aniones inorgánicos como los pirofosfatos, cationes metálicos multivalentes como el magnesio o macromoléculas como la osteopontina y la proteína de Tamm-Horsfall[5,11]. Estos compuestos pueden actuar tanto en la etapa de formación del cristal (nucleación), como en su crecimiento cristalino y/o agregación.

La efectividad del compuesto dependerá tanto de su propia concentración como de la sobresaturación de las especies insolubles, siendo los efectos del compuesto especialmente decisivos en aquellos casos en que no se alcanzan sobresaturaciones demasiado elevadas[12].

1.1.1.3 Promotores de la cristalización

Los promotores de la cristalización son todas aquellas sustancias que producen o facilitan el inicio de la cristalización, por lo que al igual que los inhibidores, se trata de factores cinéticos.

Estos promotores también son comúnmente conocidos como nucleantes heterogéneos, ya que promueven la cristalización mediante su capacidad de actuar como núcleo sobre el cual pueda formarse el futuro cristal, disminuyendo así el período de inducción necesario para la formación del cristal.

Al ser la sobresaturación de los compuestos urinarios un factor cíclico, la presencia de estos promotores puede ser debida a la precipitación de los compuestos insolubles de la orina que dan lugar a pequeñas partículas. De estas pequeñas partículas, algunas serán expulsadas, pero otras podrán quedarse retenidas en el tracto urinario, ejerciendo el papel de nucleante heterogéneo y dando lugar al desarrollo de una concreción mayor que posteriormente podría convertirse en un cálculo renal[13].

Dentro del grupo de nucleantes nos encontramos con distintas macromoléculas como proteínas y glicosaminoglicanos que actuarían como moduladores de la formación de cálculos[14]; núcleos compuestos por AU en orinas que han pasado por un período de acidez (pH 5,5)[15] y núcleos de CaP en orinas muy básicas (pH > 6,5)[16,17].

1.1.1.4 Otros factores a tener en cuenta: el pH

El pH constituye un factor que no puede decirse que sea un inhibidor ni un promotor de la formación de cálculos, ya que tiene efectos tanto beneficiosos como perjudiciales según el componente del cálculo que se esté considerando[18]. Por ejemplo, el pH alcalino inhibe la formación de cálculos de cistina y AU, que tienden a formarse en la orina ácida. Por otro lado, favorece la cristalización del fosfato no infeccioso, como la hidroxiapatita (HAP) y brushita (BRU), así como el fosfato infeccioso (fosfato amónico magnésico, FAM) [5]. La precipitación del CaP además puede servir como nucleante heterogéneo de la cristalización del OxCa, como se comentó anteriormente[17].

Por otro lado, una orina con un pH excesivamente ácido conduce a la precipitación de cristales de AU, pudiendo provocar no solo litiasis úrica, sino también la cristalización del OxCa debido a la nucleación heterogénea, en la que los cristales de AU actuarían de núcleo favoreciendo así la cristalización de un segundo tipo de cristal[15].

No se puede afirmar que un pH bajo promueva la cristalización de la cistina, ya que la solubilidad de esta sustancia es mínima en la mayoría de los valores habituales de pH urinario. Por otro lado, su solubilidad aumenta significativamente a valores de pH superiores a 7,5[19].

En circunstancias normales los elementos que componen el factor inhibidor están equilibrados con aquellos factores que promueven la cristalización, lo que evita la aparición de precipitaciones indeseadas. No obstante, cuando ocurre una leve alteración en alguno de estos elementos que conforman los dos grupos, pueden generarse cristales de forma anómala, lo que finalmente desencadena procesos de cristalización patológica como la litiasis renal.

1.1.2 Factores morfoanatómicos

En general, el cálculo renal se forma como consecuencia de la concurrencia simultánea de varios de los factores comentados anteriormente. Aun así, hay otra condición que puede conducir a la formación de cálculos: la retención de cristales en el riñón.

La morfoanatomía renal lleva a cabo también un papel decisivo en la formación de los cálculos renales que se relaciona con el aumento del tiempo de permanencia de la orina en el interior del riñón. Por un lado, nos encontramos con el hecho de que la retención de la orina facilitaría la generación de partículas que en condiciones normales se desarrollarían una vez la orina ha sido excretada. Por lo tanto, esto sugiere que la presencia de morfologías renales poco usuales y complejas, llamadas cavidades de baja eficacia urodinámica (como por ejemplo cálices inferiores profundos), así como deformaciones morfoanatómicas que permitan la retención de la orina durante un

tiempo considerable, facilitarían que los procesos de cristalización se puedan producir en el interior del organismo[4].

Por otro lado, aunque se lleguen a formar precipitados, en la mayoría de los casos estos agregados cristalinos serían demasiado pequeños para ocluir un conducto colector durante el tiempo suficiente para dar lugar a un cálculo[20]. Por lo tanto, se sugiere que en algunos casos los cristales deben unirse de alguna manera a las células epiteliales para permitirles crecer hasta el tamaño de convertirse en un cálculo renal[2].

Entonces, si un cristal se retiene en el riñón, entendiendo este concepto de retención tanto como el estado de adhesión (explicado más adelante en el apartado de mecanismos de retención), así como también al movimiento de una partícula a través del tracto urinario a una velocidad menor que la del flujo urinario[21], el crecimiento puede ocurrir durante largos períodos de tiempo cada vez que se produce una sobresaturación urinaria o agregación de nuevos cristales. Muchos cálculos renales tienen una estructura en capas que sugiere un crecimiento intermitente, muy probablemente durante los períodos de elevada sobresaturación.

1.2 Etapas del proceso de cristalización

1.2.1 Procesos físicoquímicos

Teniendo en cuenta que la orina es un fluido extracelular que se encuentra sobresaturado respecto a las especies químicas mencionadas anteriormente, el proceso de formación de un cristal no se puede explicar sólo desde el punto de vista de la termodinámica (cuando el sistema está sobresaturado), debiendo recurrir además al ámbito de la cinética (presencia de inhibidores y promotores de la cristalización), que determinan la velocidad en que ocurre dicho proceso de cristalización. Aunque la cristalización puede ser de distintos tipos, todos ellos están gobernados por los mismos principios y procesos que son básicamente idénticos[7,22]: la nucleación, el crecimiento cristalino y la agregación de los cristales.

1.2.1.1 Nucleación

La primera etapa del proceso de cristalización es la formación de los núcleos cristalinos. En este paso inicial se produce la transformación de una fase disuelta (líquida) en otra sólida (precipitada), formando amontonamientos de los constituyentes de la nueva fase en *clusters*. Este inicio de la cristalización puede producirse en disoluciones localizadas en distintos microambientes, como los que pueden encontrarse en distintos puntos de la nefrona[23], así como en superficies celulares[24]. Por lo tanto, no solo es importante la cristalización que se da en la disolución libre, sino también la que se produce en los túbulos renales, en células normales o dañadas, en áreas despojadas de células por ciertas formas de lesión o en sitios intersticiales[25].

Para la formación de los *clusters* es necesario que sus constituyentes choquen entre ellos y se agreguen, de manera que si el tamaño es inferior a cierto valor crítico son inestables y se desintegran, pero si es superior al crítico son estables y permanecen, formándose, así, la partícula mínima capaz de seguir creciendo hasta alcanzar una estructura macroscópica[7].

El tipo de nucleación que tenga lugar dependerá del mecanismo a partir el cual la partícula mínima se haya constituido[26], de manera que los mecanismos de nucleación pueden dividirse según el esquema mostrado en la Figura 1.2.

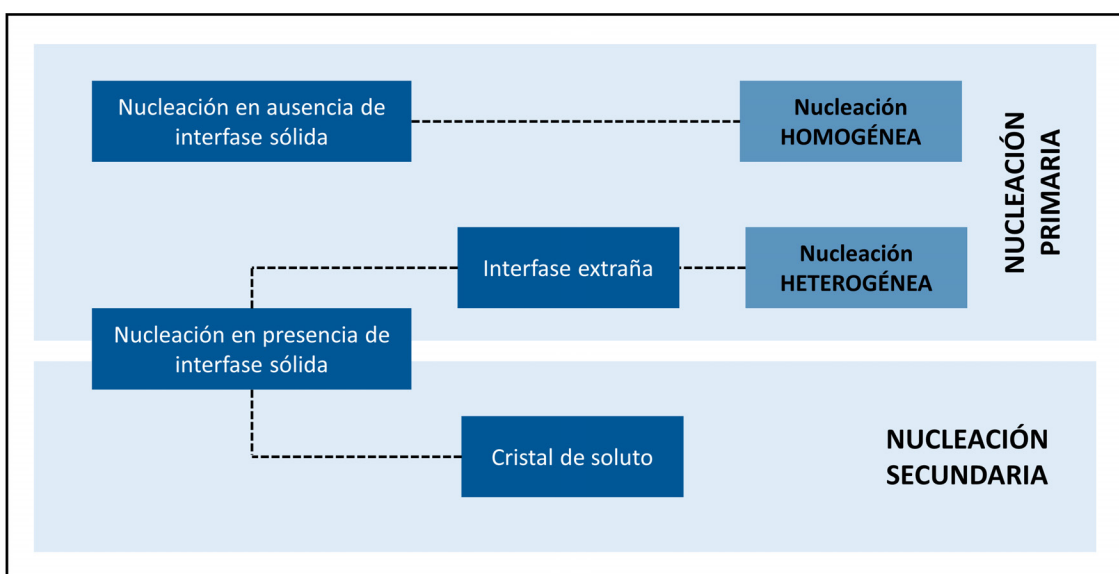


Figura 1.2 Clasificación de los mecanismos de nucleación.

La **nucleación primaria** es aquella en la cual el origen de la fase sólida nueva se da en una disolución libre de cualquier clase de partícula de la fase sólida, o bien en una disolución que contenga únicamente partículas distintas a la fase sólida que se origina. Por lo tanto, se trata de la de una nucleación que no está condicionada ni influida por la presencia de la fase sólida que se origina. Dependiendo de si se da en ausencia de interfase sólida (es decir, en una disolución libre de partículas) o en presencia de partículas extrañas que influyen en la nucleación, se distinguen dos mecanismos de la nucleación primaria: nucleación homogénea y heterogénea, respectivamente.

La **nucleación homogénea** es un proceso poco frecuente ya que se necesitan sobresaturaciones muy elevadas para que tenga lugar. Aun así, ha sido ampliamente estudiado con un modelo teórico completo, que permite la predicción del comportamiento del sistema en unas condiciones dadas y de una forma cuantitativa, pudiéndose comprobar su validez de forma experimental[7]. Un ejemplo de ello son las cinéticas de cristalización.

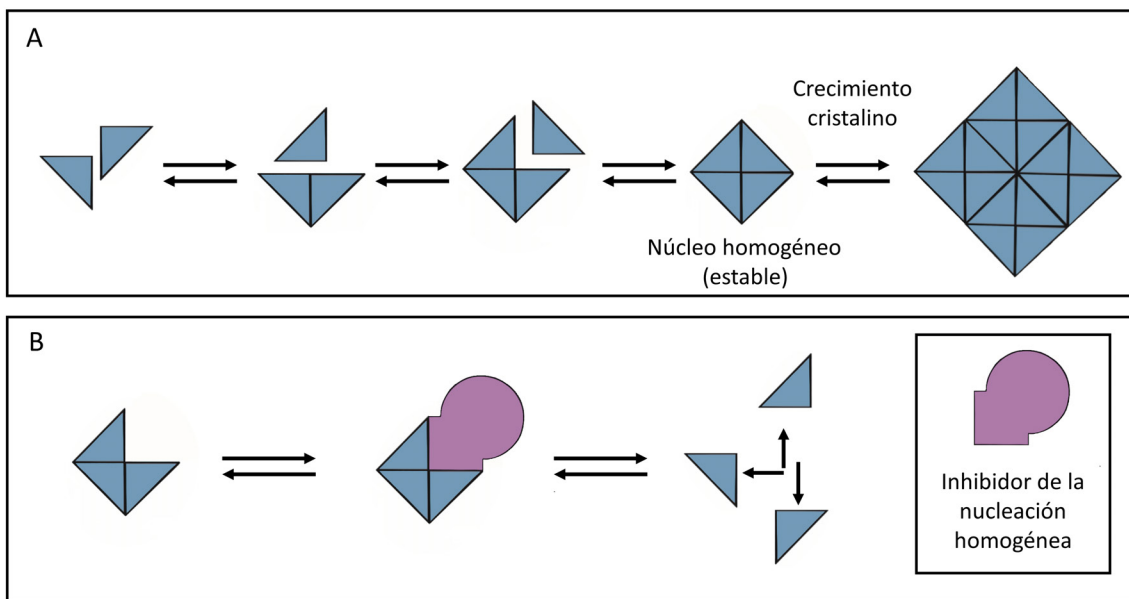


Figura 1.3 Nucleación homogénea: A) Etapas de formación de un núcleo homogéneo. B) Mecanismo de acción de un inhibidor de la nucleación homogénea.

En esta disolución sobresaturada se formarán *clusters* de distinto tamaño a través de choques graduales de los correspondientes átomos o moléculas individuales, primero entre ellos i más tarde entre los *clusters* ya formados. Los *clusters* que alcancen el tamaño crítico aumentaran su tamaño mientras la disolución se mantenga saturada,

de manera que si el crecimiento continúa en el tiempo pueden llegar a alcanzar tamaños macroscópicos. Por lo tanto, en este tipo de nucleación la composición del núcleo será idéntica a la composición del resto del cristal (Figura 1.3 A). Los inhibidores de la nucleación homogénea serán aquellas sustancias capaces de unirse a las micropartículas de tamaño inferior al crítico, impidiendo que se forme la partícula mínima capaz de seguir creciendo (Figura 1.3 B).

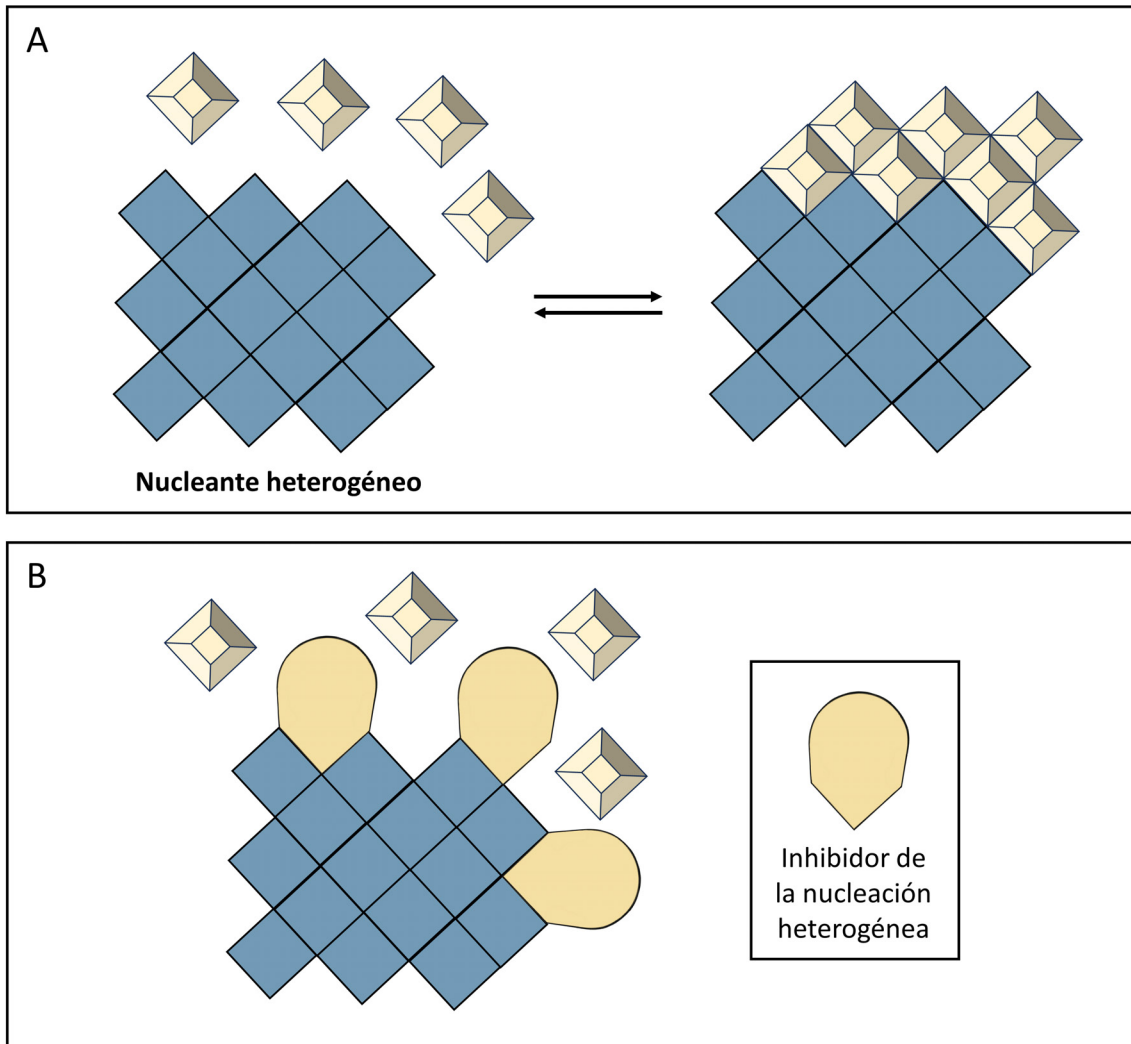


Figura 1.4 Nucleación heterogénea: A) Etapas de formación de un núcleo heterogéneo. B) Mecanismo de acción de un inhibidor de la nucleación heterogénea.

La **nucleación heterogénea**, en cambio, se da con mayor facilidad que la homogénea, ya que exige niveles más bajos de sobresaturación (inferiores al valor crítico para la nucleación homogénea) al existir en el medio partículas sólidas (nucleantes heterogéneos) cuya superficie facilita la formación de la nueva fase[27]. Así, estas partículas capaces de atraer y retener en su superficie las especies que van a

constituir el futuro cristal actúan facilitando la nucleación. Por lo tanto, en este tipo de nucleación, el núcleo presenta una composición diferente al resto del cristal (Figura 1.4 A). Los inhibidores de la nucleación heterogénea serán aquellas sustancias que evitan que los posibles núcleos heterogéneos actúen como tales, ya sea porque impiden su formación o bien porque dificultan la unión con las especies que constituirían el futuro nuevo cristal (Figura 1.4 B). En la orina, mayoritariamente todos los procesos de nucleación son heterogéneos, ya que las células epiteliales, la materia orgánica (MO) y otros cristales pueden actuar como centros de nucleación en la orina[28].

La nucleación secundaria es aquel proceso de formación de cristales de la nueva fase que está condicionado por la presencia de partículas de la misma fase en el sistema sobresaturado y que, a causa de éstas, existe. Se trata de un mecanismo muy extendido y que juega un papel importante en la cristalización a nivel industrial.

1.2.1.2 Crecimiento cristalino

Una vez que el núcleo de un cristal ha alcanzado un tamaño crítico y la sobresaturación del sistema se mantiene, las partículas presentes en este sistema se pueden incorporar gradualmente sobre las caras más favorecidas (Figura 1.5 A), de manera que la energía libre total disminuye al añadir nuevos componentes de cristal al núcleo. Este proceso se llama crecimiento cristalino.

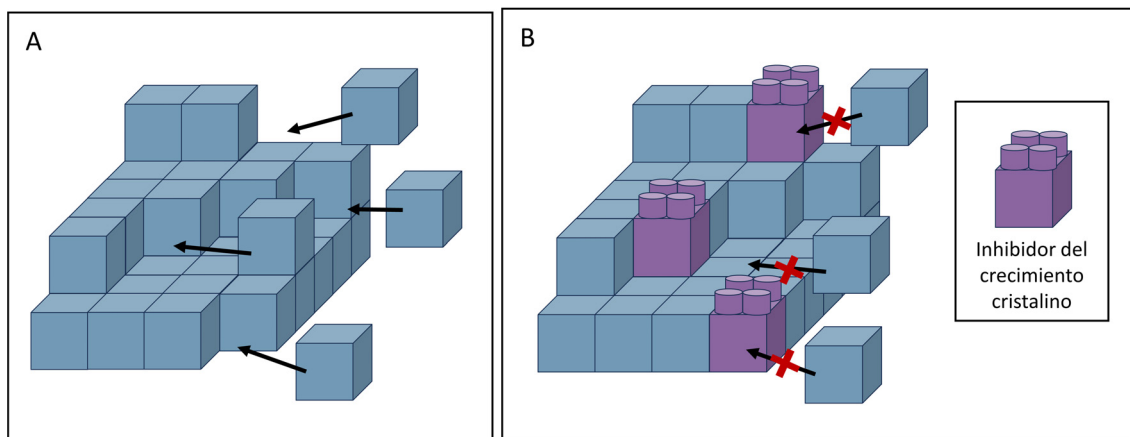


Figura 1.5 Crecimiento cristalino: A) Diagrama del crecimiento cristalino. B) Mecanismo de acción de un inhibidor del crecimiento cristalino.

El crecimiento de cristales es uno de los requisitos para la formación posterior de partículas mayores y, por lo tanto, para la formación de cálculos renales[29]. Los inhibidores del crecimiento cristalino son aquellas sustancias que se adsorben sobre la superficie del cristal ya formado, impidiendo o dificultando la incorporación de nuevas unidades al mismo (Figura 1.5 B).

1.2.1.3 Agregación

El proceso por el cual los cristales en disolución se unen para formar partículas más grandes se llama agregación. En el caso de los cálculos de OxCa, aunque el crecimiento cristalino supone un paso en la formación del cálculo, el proceso de crecimiento es demasiado lento para que los cristales puedan llegar a ser lo suficientemente grandes como para obstruir los túbulos renales y ser retenidos allí. Por esta razón, se cree que el paso más crítico es la agregación de cristales[21]. Durante el proceso de cristalización principalmente se forman agregados (primarios y secundarios) en lugar de cristales individuales. Así, se puede distinguir:

Agregación primaria: se produce la formación de nuevos cristales (llamados cristales hijos) impulsada por los ya constituidos (denominados cristales padres). Los cristales padres actúan favoreciendo el crecimiento de los nuevos sobre sus propias caras (Figura 1.6), los cuales nuclean en las imperfecciones de las superficies de los cristales ya formados o cerca de sus aristas, pudiendo llegar a un tamaño similar al del cristal padre[30]. Se forman así los aglomerados compuestos por cristales sin ninguna orientación predominante sobre las caras de los otros (Figura 1.6) y también cristales colocados simétricamente[31–33]. Este tipo de agregación es, por ejemplo, el mecanismo predominante que se observa en la formación de cristales grandes de COM en experimentos in vitro y también en los núcleos de cálculos COM, por lo que representa un mecanismo importante del desarrollo de este tipo cálculos renales[32,34,35].

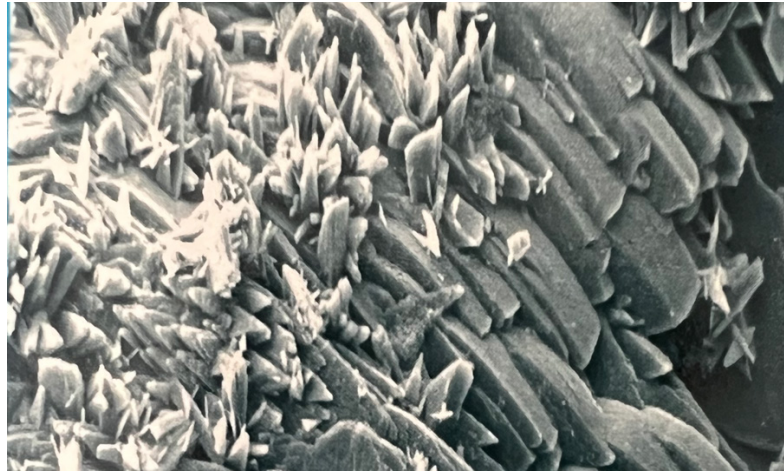


Figura 1.6 Cristales de OxCa. Se observa una fracción significativa de cristales hijos constituyendo un aglomerado que se desarrolló a partir de los cristales originales (padres).

Agregación secundaria: consiste en la unión de cristales ya formados entre sí mediante enlaces débiles que se establecen entre ellos. Mediante este tipo de agregación se forman aglomerados débilmente unidos, frecuentemente casi desconectados, dispuestos en estructuras desordenadas (Figura 1.7 A). La agregación secundaria tiene un papel importante en aquellos medios donde existe una gran cantidad de cristales (como en la litiasis infecciosa o de CaP). Los inhibidores de la agregación secundaria son sustancias cargadas que se adsorben sobre las superficies de los cristales confiriéndoles carga eléctrica del mismo signo. De esta manera, se generan repulsiones entre los cristales y el proceso de unión para formar el agregado secundario se ve impedido o dificultado (Figura 1.7 B).

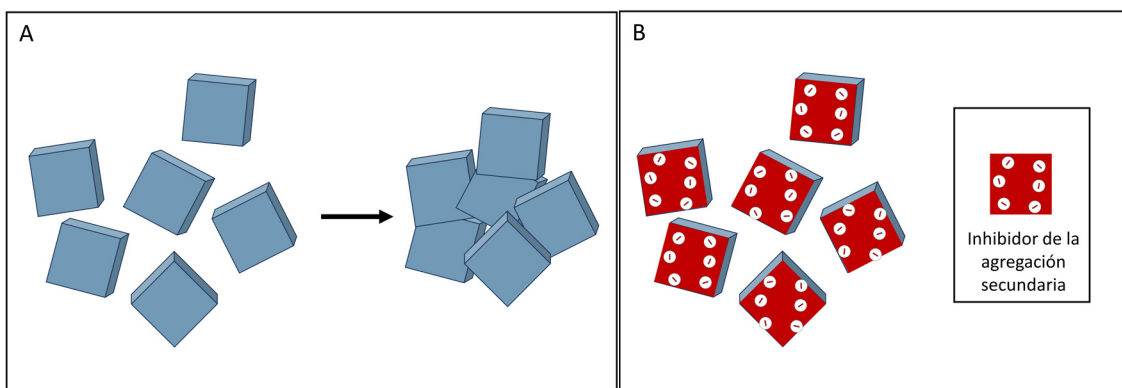


Figura 1.7 Agregación secundaria: A) Diagrama de agregación secundaria B) Mecanismo de acción de los inhibidores de la agregación secundaria.

1.2.2 Mecanismos de retención

Estos mecanismos deben explicar por qué los cristales que se generan en condiciones fisiológicas normales forman cálculos en algunas personas, pero no en otras. A diferencia de la sobresaturación y la formación inicial de cristales (nucleación), los procesos mediante los cuales los cristales se retienen, anclan o adhieren dentro del tracto urinario se denominan mecanismos de retención.

Como ya se ha explicado anteriormente en el apartado “1.1.2 Factores morfoanatómicos”, el término retención se puede entender como un estado de adhesión, pero también como el movimiento de una partícula a través del tracto urinario a una velocidad menor que la del flujo urinario debido a la presencia de cavidades de baja eficiencia urodinámica.

Para la formación de cálculos de COM o COD papilares, la presencia de alguna alteración del epitelio de la papila renal, como la reducción de la capa protectora de glicosaminoglicanos, la necrosis papilar y la consecuente formación de detritus [36] facilitaría la unión de cristales de $OxCa$ en el tejido, y, como consecuencia, el desarrollo inicial de partículas adheridas que culminaría en el desarrollo de una concreción cristalina macroscópica [37]. Macromoléculas urinarias como, por ejemplo, los glicosaminoglicanos, la glucoproteína de Tamm-Horsfall, el fragmento 1 de protrombina urinaria y el inhibidor inter- α inhiben esta adhesión al formar una capa protectora sobre los cristales [38–40]. La formación de esta capa dificulta o impide la capacidad de los cristales para interactuar con las células renales.

Por otro lado, una alteración de la función tubular renal podría dar lugar a un mayor transporte de solutos hacia las células o los espacios intersticiales provocando el depósito de cristales de HAP los cuales pueden actuar como nucleante heterogéneo [38,40–43].

2. Cristalización patológica: la litiasis renal

Como se ha comentado con anterioridad, las cristalizaciones patológicas son aquellas que se producen en otros tejidos que no sean hueso, cartílago y diente. En el caso de la litiasis renal se produce la formación de cálculos o arenillas en el interior de los riñones o de las vías urinarias. Los cálculos renales varían en su composición pudiéndose encontrar OxCa, CaP, FAM, AU, cistina, etc.

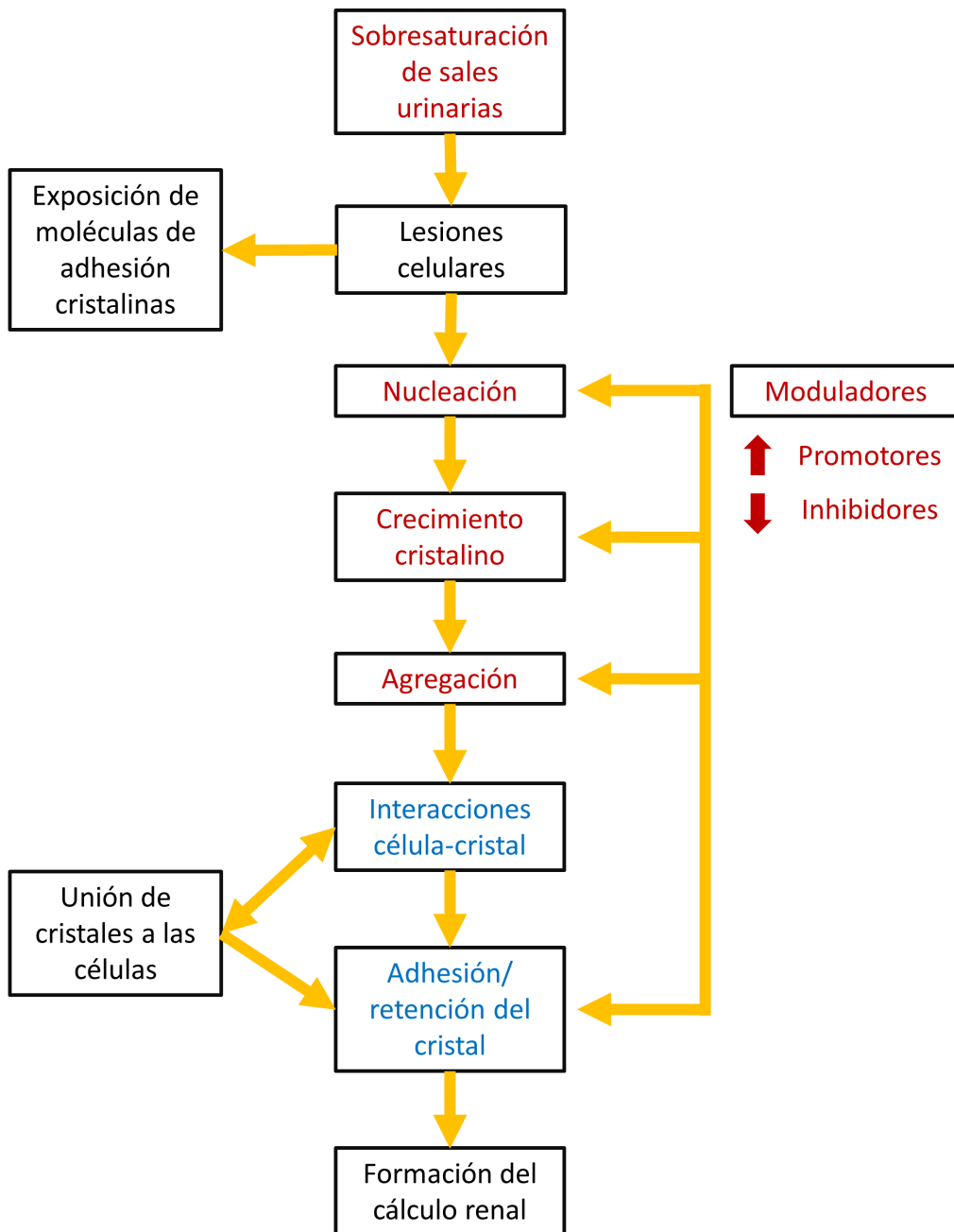


Figura 1.8 Esquema secuencial con los procesos celulares y extracelulares que tienen lugar para la formación del cálculo renal.

A pesar de todo el conocimiento sobre los mecanismos fisicoquímicos (y otros, como de adhesión) de la formación de cálculos renales que se ha ido acumulando durante los últimos 50 años, aún no ha surgido una vía mecanicista única, paso a paso y unificadora[44]. Aun así, se ha intentado resumir todos los posibles mecanismos que intervendrían en el proceso (Figura 1.8) y que ya se han comentado en los apartados anteriores. En este esquema los procesos fisicoquímicos se muestran en rojo, mientras que los procesos que se muestran en azul involucran eventos de adhesión y retención entre células y cristales.

En la investigación sobre los cálculos renales, primeramente, nos encontramos con los procesos fisicoquímicos que incluyen, entre otros, la composición química de la orina, la solubilidad y sobresaturación de las sales urinarias. Las lesiones celulares tanto físicas como químicas, aparte de favorecer la adhesión de los cristales a la membrana, también favorecen la nucleación, el crecimiento y la agregación de los cristales. Aunque la cristalización está determinada por las leyes de sobresaturación (factor termodinámico), también está gobernada por factores cinéticos que determinan la velocidad a la que ocurren estos procesos, como son los inhibidores y promotores. El nombre genérico bajo el cual caen estos modificadores de la cristalización es “moduladores”. La posterior interacción célula cristal y la retención/ adhesión de este hace posible su culminación en un cálculo renal.

2.1 Epidemiología de la litiasis renal

Así, se define como litiasis renal la presencia de cálculos (llamados comúnmente piedras) en las vías urinarias. Se trata de una patología multifactorial que involucra la formación de una estructura sólida en el interior del riñón o las vías urinarias, en la cual cristales y MO coexisten en un medio líquido complejo: la orina. Los síntomas pueden variar dependiendo del tamaño y ubicación de los cálculos, y en algunos casos, el paso de los cálculos a través del sistema urinario puede causar dolor y molestias.

Al ser multifactorial, es importante tener en cuenta que esta condición puede estar influenciada por diversos factores, como la dieta, el nivel de hidratación, la predisposición genética y otros aspectos relacionados con el estilo de vida[45,46]. Es

indudable que estos factores, a su vez, se encuentran enmarcados dentro de un contexto geográfico, el cual va a influenciar en cada uno de ellos. Debido a este hecho la incidencia de la litiasis renal puede ser muy variable dependiendo del área geográfica[47].

En la actualidad esta patología sigue afectando a un sector amplísimo de la población, de manera que su prevalencia mundial se encuentra entre un 1 y un 20%, siendo mayor en los países económicamente desarrollados[48,49]. En particular, en España se evidencia una prevalencia global de litiasis renal del 15,5% en población de 40 a 65 años de edad[50], encontrándose la prevalencia de esta afección en claro incremento[51,52]. Más concretamente, en las Islas baleares, mediante una encuesta poblacional que contó con la participación de 1500 personas se reveló una prevalencia media del 14.3 %. También se observaron diferentes valores según los diferentes grupos de edad, llegando a alcanzar casi el 20 % en los participantes mayores de 50 años[53].

Asimismo, se ha observado que esta enfermedad exhibe una alta tasa de recurrencia, llegando incluso al 50%. De esta manera, un porcentaje muy elevado de pacientes que han generado un cálculo van a generar otro en un período de 3 a 5 años[54,55].

Especialmente en los países industrializados, donde se encuentra una elevada prevalencia y recurrencia de la litiasis renal, esta enfermedad representa un verdadero problema de salud pública debido al enorme impacto socioeconómico. Así, el valor del mercado mundial de los catéteres doble J se valoró en 423 millones de dólares en 2019 y está previsto que su tasa de crecimiento anual sea del 7 % hasta 2027[56].

Todos estos datos ponen en manifiesto la importancia de tener en cuenta que la epidemiología de la litiasis renal puede cambiar con el tiempo debido a los distintos factores nombrados anteriormente y dependiendo el acceso a la atención médica. Así, los estudios continuos y la vigilancia epidemiológica son esenciales para comprender y abordar mejor esta afección.

2.2 Tipos de cálculos renales

En la actualidad, el análisis y estudio de los cálculos urinarios son de vital importancia para establecer un diagnóstico preciso y un tratamiento terapéutico efectivo. La composición del cálculo proporciona información valiosa sobre cómo se formó y los factores que han contribuido a su desarrollo. Esta información es esencial para clasificar al paciente en una forma clínica específica y, en consecuencia, diseñar un tratamiento adecuado[57].

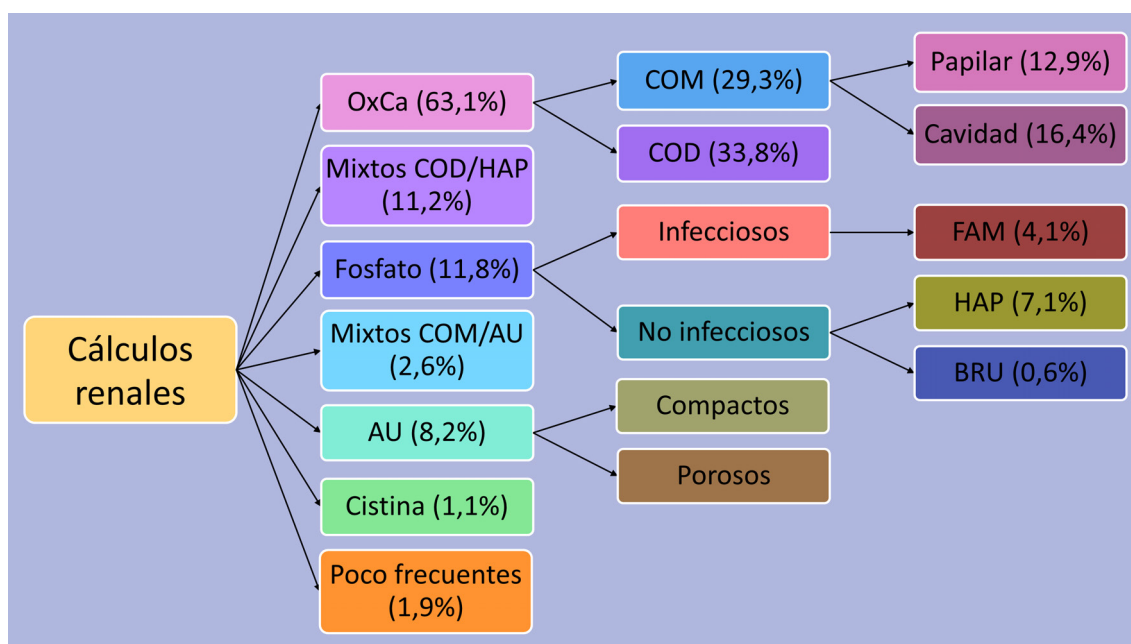


Figura 1.9 Esquema de los tipos de litiasis con su porcentaje aproximado de incidencia.

Así los cálculos renales pueden agruparse en cuatro grandes grupos: de OxCa; de fosfato, de AU y de cistina (Figura 1.9)[58]. Cada variante de cálculo urinario representa una forma clínica específica de la litiasis renal, y cada una de estas presentaciones clínicas se caracteriza por tener una fisiopatología, evolución, pronóstico y tratamiento distintos.

No hay que perder de vista el contexto en el cual se lleva a cabo la formación de las concreciones, que es dentro del riñón, de manera que los distintos tipos de cálculos nombrados anteriormente también pueden clasificarse según la localización del riñón en la cual se desarrollan. De este modo nos encontramos con los cálculos adheridos al epitelio papilar y los desarrollados en cavidades sin ningún apego al urotelio (Figura 1.10)[37].

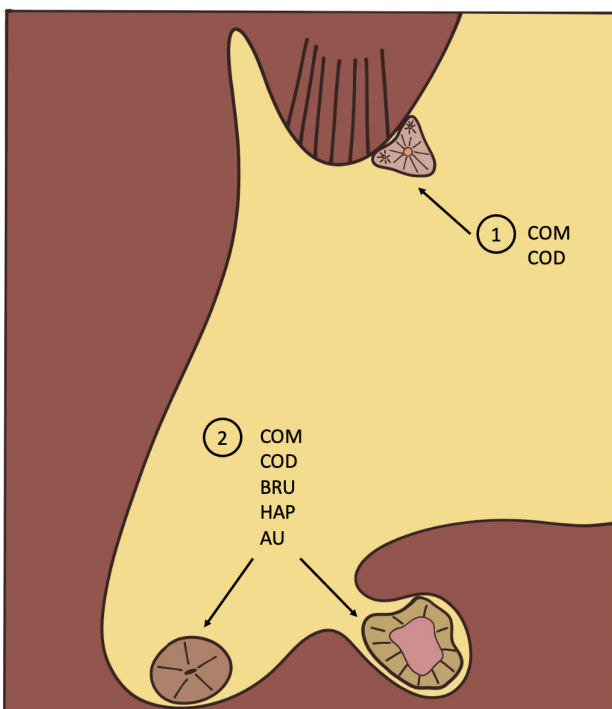


Figura 1.10 Representación del riñón y localización del lugar de formación de 1) los cálculos papilares y 2) no papilares (cáliz inferior o cavidad con baja eficacia urodinámica).

Los valores urinarios de riesgo metabólico y litógeno en litiasis se recogen en la Tabla 1.1. Los valores urinarios de riesgo litógeno se utilizan para describir las concentraciones de diversas sustancias presentes en la orina, las cuales crean un ambiente propicio para la cristalización durante el tiempo que la orina permanece en el tracto urinario. Además, los factores etiológicos para cada tipo de cálculo se resumen en la Tabla 1.2 [58,59].

Tabla 1.1 Valores urinarios de riesgo metabólico y litógeno en litiasis.

Parámetro	Umbral de riesgo metabólico (excreción en 24 h)		Umbral de riesgo litógeno (concentración)	
	mmol	mg	mmol/L	mg/L
Ca	> 6,25 (mujeres) >7 (hombres)	> 250 (mujeres) > 300 (hombres)	> 4,2	> 170
P	> 39	> 1200	> 32	> 1000
Mg	<3	< 73	< 2.1	< 50
AU	> 4,5 (mujeres) > 4,8 (hombres)	> 750 (mujeres) > 800 (hombres)	> 3,6	> 600
Creatinina	> 18	> 2000		
Oxalato	> 0,5	> 45	> 0,34	> 30
Citrato	< 1,5	< 288	< 1,2	< 230
Fitato	< 1,5	< 1,0	< 1,2·10 ⁻³	< 0,8
Cistina	> 0,08	>150		
pH*	< 5,5 > 6,0		< 5,5 > 6,0	

Tabla 1.2 Factores etiológicos y su relación con cada tipo de cálculo.

Tipo de cálculo	Alteraciones observadas con mayor frecuencia
Oxalato cálcico monohidrato papilar	-Déficit en la orina de inhibidores de la cristalización -Lesión del tejido de la papila renal -Posible hiperoxaluria (> a 25 mg/L)
Oxalato cálcico monohidrato de cavidad	-Déficit en la orina de inhibidores de la cristalización -pH urinario > 6,0 (cuando se detecta HAP) o pH < 5,5 (cuando se detecta AU) -Presencia de nucleantes heterogéneos (MO, CaP o AU) -Posible hiperoxaluria (> a 25 mg/L) -Existencia de cavidades con baja eficacia urodinámica
Oxalato cálcico dihidrato	-Hiper calciuria (> a 170 mg/L) -Déficit en la orina de inhibidores de la cristalización -pH urinario > 6,2 (cuando se detecta HAP) -Existencia de cavidades con baja eficacia urodinámica
Cálculos mixtos de oxalato cálcico dihidrato e hiroxiapatita	-Hiper calciuria (> a 170 mg/L) -pH urinario > 6,2 -Déficit en la orina de inhibidores de la cristalización -Presencia de cavidades con baja eficacia urodinámica -Lesión del tejido de la papila renal -Posible acidosis tubular renal
Hidroxiapatita	-pH urinario > 6,2 -Déficit en la orina de inhibidores de la cristalización -Hiper calciuria (> a 170 mg/L) -Posible acidosis tubular renal -Existencia de cavidades con baja eficacia urodinámica
Brushita	-pH urinario > 6,0 -Déficit en la orina de inhibidores de la cristalización -Hiper calciuria (> a 170 mg/L) -Existencia de cavidades con baja eficacia urodinámica -Posible acidosis tubular renal
Infecciosos de FAM	-Infección urinaria
Ácido úrico	-pH urinario < 5,5 -Hiperuricuria (> 500 mg/L) -Presencia de cavidades con baja eficacia urodinámica
Cálculos mixtos de oxalato cálcico y ácido úrico	-Déficit en la orina de inhibidores de la cristalización -pH urinario < 5,5 -Hiperuricuria (> 500 mg/L) -Existencia de cavidades con baja eficacia urodinámica
Cistina	-Cistinuria (> 150 mg/L) -pH urinario < 6,5 -Existencia de cavidades con baja eficacia urodinámica

3. Catéteres ureterales o doble J

3.1 Descripción general

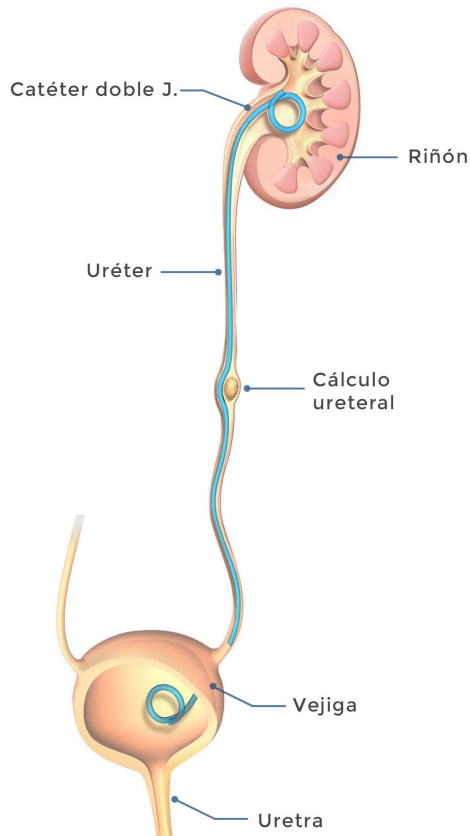


Figura 1.11 Diagrama de la colocación del catéter doble J en el sistema urinario.

La presencia de cálculos renales en las vías urinarias puede causar una obstrucción que dificulte o impida el flujo de la orina. Un catéter ureteral doble J (Figura 1.11) es un dispositivo médico que permite el restablecimiento del flujo normal de orina desde el riñón hasta la vejiga en presencia de una obstrucción. Esta obstrucción puede deberse no solo a los cálculos renales, sino también a problemas internos o externos que causen estenosis ureteral (como por ejemplo la presencia de edema o la existencia de un tumor). Estos dispositivos promueven dilatación del lumen y restauración el flujo normal[60]. El *loop* que se encuentra en cada uno de los extremos y que le confiere la denominación de “doble J” evita los desplazamientos del catéter de la vejiga (parte distal), por una parte, y del riñón (parte proximal), por otra. También evita que la punta del catéter choque directamente con la mucosa de la vejiga, disminuyendo así la incomodidad y la inflamación[61].

3.2 Materiales de fabricación y recubrimientos más comunes

En la Tabla 1.3 se encuentran las principales clases de materiales que se utilizan para la fabricación de los catéteres ureterales. Hay tres tipos principales: poliméricos, metálicos y biodegradables[61].

Tabla 1.3 Resumen de los materiales más comunes utilizados en la fabricación de los catéteres ureterales[60].

Material	Comentarios del fabricante o reportados en publicaciones científicas	Ejemplos de marcas comerciales	
Poliméricos	Silicona	Altamente biocompatible en comparación con otros materiales[62,63]	FLUORO-4™ (Bard®, USA)
	Poliuretano	Alto rendimiento de drenaje, pero alta erosión epitelial[64,65].	Bardex® (Bard®, USA)
	Silitek	Alta resistencia a la tracción, tasa elevada de incidencia de edemas[65]	(Medical Engineering©, Argentina)
	Percuflex	Drenaje de orina eficiente y resistencia a la tracción[64].	(Boston® Scientific, USA)
	C-Flex	Menor fricción superficial que permite una menor adhesión de partículas. Menor resistencia mecánica en comparación con el poliuretano[64,65]	(Cook© Medical, USA)
	Durómetro dual	Minimiza la irritación de la vejiga [62,66].	(Polaris™, USA)
Metálicos	Aleación MP35N	Alta resistencia a la tracción y a la corrosión[67].	Resonance® (Cook Medical, Bloomington, IN, USA)
	Níquel Titanio (Nitinol)	Suave y fuerte, no indicado para pacientes con estenosis funcional o formación de cálculos[67].	Memokath 051 ureteral stent (PNN© medical, Denmark)
	Acero inoxidable	Simplicidad de fabricación, la retirada puede ser compleja[62,67].	Wall stent (Boston® Scientific, USA)
Biodegradables	Reducción de procesos secundarios[68,69].	Uriprene® (Poly-Med Inc., USA)	

Los catéteres poliméricos se componen principalmente de termoplásticos, elastómeros termoestables y otros materiales patentados, que en su mayoría son a base de silicona. Los catéteres de durómetro incorporan un material que pasa de un extremo más duro en la parte proximal renal a otro más blando en la parte distal de la vejiga, con el objetivo de disminuir la irritación de la vejiga[62]. La razón para el uso de este tipo de materiales es que, en general, parecen ser de naturaleza más inerte que los metales u

otras sustancias. Sin embargo, demuestran ciertos límites en su capacidad para resistir fuerzas de compresión externas[70].

Tabla 1.4 Resumen de los recubrimientos más comunes de los catéteres ureterales[71].

Material	Comentarios del fabricante o reportados en publicaciones científicas
Heparina	Prevención de la formación del <i>biofilm</i> e incrustaciones[72–74].
Polivinilpirrolidona (PVP)	Proporciona una superficie no adhesiva debido a sus propiedades lubricantes y solubilidad en agua[71,75].
Antibiótico	Prevención del crecimiento de uropatógenos bacterianos, propiedades antimicrobianas, elución de fármacos[76]. Preocupación por el potencial de causar resistencia bacteriana.
Carbono (como el diamante)	Disminución de la formación del <i>biofilm</i> e incrustaciones[77]
Ácido hialurónico	Prevención del crecimiento y nucleación de sales, disminuyendo la asimilación superficial de proteínas[78].
Triclosán	Prevención del crecimiento bacteriano y de uropatógenos. Preocupación por el potencial de causar resistencia bacteriana[71,79–81].
Plata	Para prevenir la formación del <i>biofilm</i> ; sin embargo, el uso prolongado de estos recubrimientos puede causar argiria[82,83].
Gendine	Prevención de la formación del <i>biofilm</i> y de infecciones ureterales[84].
Quitosano	Prevención de la formación del <i>biofilm</i> [85].
Ácido salicílico	Su liberación a partir de la hidrolización del recubrimiento de acrilato de salícilo en un ambiente acuoso previene la formación del <i>biofilm</i> [86,87].
Hidrogel	Su alta hidrofiliidad proporciona una fina capa de agua que potencialmente previene la creación del <i>coating film</i> y posterior <i>biofilm</i> . Sin embargo, existen resultados variables con respecto al nivel de efectividad de este recubrimiento[88,89].

Así, para crear catéteres más resistentes se introdujeron los catéteres metálicos, los cuales ganaron popularidad debido a su resistencia a la deformación causada por estenosis extrínsecas o intrínsecas[67], donde se espera que las fuerzas de compresión sean altas[90]. Los catéteres biodegradables, conocidos también como catéteres bioabsorbibles, representan una tecnología más moderna que permite reducir la necesidad de procedimientos secundarios, como es la extracción del catéter. El tiempo que puede tardar el catéter en absorberse va a depender del tipo de material y de los posibles revestimientos superficiales[91] de los cuales esté formado.

La industria de los catéteres rápidamente se percató de que, en lugar de buscar el material para la composición ideal, los materiales y diseños ya establecidos podrían usarse como superficies para cubrirse con otras sustancias con las características que se deseaban alcanzar. El recubrimiento del catéter es la parte de su evolución con el desarrollo más significativo y las perspectivas de futuro más prometedoras. La Tabla 1.4 resume los recubrimientos que se usan comúnmente o que han sido objeto de investigación. Así, entre las ventajas más destacables encontramos una disminución de la fricción, lo que facilita la implantación del catéter; pueden potencialmente a reducir la formación del *biofilm* e incrustaciones; reducir la inflamación causada por la liberación de iones de los catéteres metálicos; así como también se pueden utilizar recubrimientos que permitan la liberación de fármacos[71]. Todos estos factores se asocian con una mayor vida útil del catéter y han mejorado la calidad de vida del paciente.

Hasta el momento, no existe ningún material en el mercado capaz de prevenir o reducir de manera clínicamente significativa la formación de *biofilms* en los catéteres ureterales[92]. Por otro lado, al igual que con los materiales, la falta de pruebas estandarizadas con modelos in vitro bien desarrollados es un desafío común en el proceso de mejora de los recubrimientos de catéteres para hacerlos más eficaces. Además, los altos costos de fabricación representan otra limitación, ya que dificultan la evaluación y selección de los recubrimientos más adecuados, así como su disponibilidad y viabilidad económica para su aplicación clínica. Así, aún no se ha fabricado el catéter ideal que combinaría una eficacia perfecta a largo plazo sin varios de los efectos adversos que limitan su valor como herramienta para el drenaje urinario a largo plazo. La infección, la incrustación o la migración del catéter, la reacción urotelial y la incomodidad del paciente son los problemas más comunes relacionados con la colocación de un catéter[93]. Se requiere un enfoque integral y colaborativo que involucre a investigadores, fabricantes y profesionales de la salud para superar estos desafíos y avanzar en el desarrollo de recubrimientos de catéteres más efectivos y accesibles.

BIBLIOGRAFÍA

1. Grases, F.; Costa-Bauzá, A. Phytate (IP6) Is a Powerful Agent for Preventing Calcifications in Biological Fluids: Usefulness in Renal Lithiasis Treatment. In *Proceedings of the Anticancer Research*; 1999; Vol. 19, pp. 3717–3722.
2. Balaji, K.C.; Menon, M. Mechanism of Stone Formation. *Urologic Clinics of North America* **1997**, *24*, 1–11, doi:10.1016/S0094-0143(05)70350-5.
3. Fleisch, H. Inhibitors and Promoters of Stone Formation. *Kidney Int* **1978**, *13*, 361–371, doi:10.1038/KI.1978.54.
4. Grases, F. Epidemiology of Renal Lithiasis and Associated Factors. *Med Clin (Barc)* **2017**, *149*, 397–398, doi:10.1016/J.MEDCLI.2017.04.003.
5. Ratkalkar, V.N.; Kleinman, J.G. Mechanisms of Stone Formation. *Clin Rev Bone Miner Metab* **2011**, *9*, 187–197, doi:10.1007/S12018-011-9104-8.
6. Izquierdo, J.F.; Cunill, F.; Esplugas Vidal, S.; Tejero, J. Teoría y Práctica de La Cristalización En Disolución. *Ingeniería química, ISSN 0210-2064, N.º. 235, 1988, págs. 255-265* **1988**, 255–265.
7. Cristalización En Disolución: Conceptos Básicos - Feliciano Grases Freixedas, A. Costa Bauzá, O. Söhnel - Google Libros Available online: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=73EtcO0j1i0C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Cristalizaci%C3%B3n+en+disoluci%C3%B3n:+Conceptos+b%C3%A1sicos.+Barcelona:+Revert%C3%A9+2000.&ots=vH6d5xpZva&sig=DVMVa320-0hVEMs2bnlnbbotpFQ#v=onepage&q=Cristalizaci%C3%B3n%20en%20disoluci%C3%B3n%3A%20Conceptos%20b%C3%A1sicos.%20Barcelona%3A%20Revert%C3%A9+2000.&f=false> (accessed on 15 June 2023).
8. Parks, J.H.; Coward, M.; Coe, F.L. Correspondence between Some Composition and Urine Supersaturation in Nephrolithiasis. *Kidney Int* **1997**, *51*, 894–900, doi:10.1038/KI.1997.126.
9. Finlayson, B. Physicochemical Aspects of Urolithiasis. *Kidney Int* **1978**, *13*, 344–360, doi:10.1038/KI.1978.53.
10. Grases, F.; Villacampa, A.I.; Söhnel, O.; Königsberger, E.; May, P.M. Phosphate Composition of Precipitates from Urine-like Liquors. *Crystal Research and Technology* **1997**, *32*, 707–715, doi:10.1002/CRAT.2170320515.
11. Wang, Z.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Deng, Q.; Liang, H. Recent Advances on the Mechanisms of Kidney Stone Formation (Review). *Int J Mol Med* **2021**, *48*, doi:10.3892/IJMM.2021.4982.
12. Robertson, W.G. Do “Inhibitors of Crystallisation” Play Any Role in the Prevention of Kidney Stones? A Critique. *Urolithiasis* **2017**, *45*, 43–56, doi:10.1007/S00240-016-0953-Y.
13. Grases, F.; Llobera, A. Experimental Model to Study Sedimentary Kidney Stones. *Micron* **1998**, *29*, 105–111, doi:10.1016/S0968-4328(98)00006-7.
14. Wiener, S. V.; Ho, S.P.; Stoller, M.L. Beginnings of Nephrolithiasis: Insights into the Past, Present and Future of Randall’s Plaque Formation Research. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **2018**, *27*, 236–242, doi:10.1097/MNH.0000000000000414.
15. Moe, O.W.; Abate, N.; Sakhaee, K. Pathophysiology of Uric Acid Nephrolithiasis. *Endocrinol Metab Clin North Am* **2002**, *31*, 895–914, doi:10.1016/S0889-8529(02)00032-4.

16. Grases, F.; Conte, A. Urolithiasis, Inhibitors and Promoters. *Urol Res* **1992**, *20*, 86–88, doi:10.1007/BF00294344.
17. Ebrahimpour, A.; Perez, L.; Nancollas, G.H. Induced Crystal Growth of Calcium Oxalate Monohydrate at Hydroxyapatite Surfaces. The Influence of Human Serum Albumin, Citrate, and Magnesium. *Langmuir* **1991**, *7*, 577–583, doi:10.1021/LA00051A028.
18. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Gomila, I.; Ramis, M.; García-Raja, A.; Prieto, R.M. Urinary PH and Renal Lithiasis. *Urol Res* **2012**, *40*, 41–46, doi:10.1007/S00240-011-0389-3.
19. Dent, C.E.; Senior, B. STUDIES ON THE TREATMENT OF CYSTINURIA. *Br J Urol* **1955**, *27*, 317–332, doi:10.1111/J.1464-410X.1955.TB03486.X.
20. Finlayson, B.; Reid, F. The Expectation of Free and Fixed Particles in Urinary Stone Disease. *Invest Urol* **1978**.
21. Kok, D.J.; Khan, S.R. Calcium Oxalate Nephrolithiasis, a Free or Fixed Particle Disease. *Kidney Int* **1994**, *46*, 847–854, doi:10.1038/KI.1994.341.
22. Kavanagh, J.P. Physicochemical Aspects of Uro-Crystallization and Stone Formation. *Urinary Tract Stone Disease* **2011**, 17–30, doi:10.1007/978-1-84800-362-0_3.
23. Olszta, M.J.; Odom, D.J.; Douglas, E.P.; Gower, L.B. A New Paradigm for Biomineral Formation: Mineralization via an Amorphous Liquid-Phase Precursor. *Connect Tissue Res* **2003**, *44*, 326–334, doi:10.1080/03008200390181852.
24. Lieske, J.C.; Hammes, M.S.; Toback, F.G. Role of Calcium Oxalate Monohydrate Crystal Interactions with Renal Epithelial Cells in the Pathogenesis of Nephrolithiasis: A Review. *Scanning Microsc* **1996**, *10*.
25. Evan, A.P.; Lingeman, J.E.; Coe, F.L.; Parks, J.H.; Bledsoe, S.B.; Shao, Y.; Sommer, A.J.; Paterson, R.F.; Kuo, R.L.; Grynepas, M. Randall's Plaque of Patients with Nephrolithiasis Begins in Basement Membranes of Thin Loops of Henle. *Journal of Clinical Investigation* **2003**, *111*, 607–616, doi:10.1172/JCI17038.
26. Garside, J. Industrial Crystallization from Solution. *Chem Eng Sci* **1985**, *40*, 3–26, doi:10.1016/0009-2509(85)85043-0.
27. Smith, L.H. Solutions and Solute. *Endocrinol Metab Clin North Am* **1990**, *19*, 767–772, doi:10.1016/S0889-8529(18)30292-5.
28. Aggarwal, K.P.; Narula, S.; Kakkar, M.; Tandon, C. Nephrolithiasis: Molecular Mechanism of Renal Stone Formation and the Critical Role Played by Modulators. *Biomed Res Int* **2013**, *2013*, doi:10.1155/2013/292953.
29. Finlayson, B.; Khan, S.R.; Hackett, R.L. Mechanisms of Stone Formation--an Overview. *Scan Electron Microsc* **1984**, *1984*, 1419–1425.
30. Jones, A. Agglomeration during Crystallization and Precipitation from Solution. In *ICHEM-5th International Symposium on Agglomeration, Brighton*; 1989; pp. 131–144.
31. Millan, A.; Grases, F.; Söhnel, O.; Křivánková, I. Semi-Batch Precipitation of Calcium Oxalate Monohydrate. *Crystal Research and Technology* **1992**, *27*, 31–39, doi:10.1002/CRAT.2170270105.
32. Grases, F.; Millan, A.; Sohnel, O. Role of Agglomeration in Calcium Oxalate Monohydrate Urolith Development. *Nephron* **1992**, *61*, 145–150, doi:10.1159/000186862.

33. Söhnle, O.; Grases, F.; March, J.G. Experimental Technique Simulating Oxalocalcic Renal Stone Generation. *Urol Res* **1993**, *21*, 95–99, doi:10.1007/BF01788826.
34. Söhnle, O.; Grases, F. Fine Structure of Calcium Oxalate Monohydrate Renal Calculi. *Nephron* **1993**, *63*, 176–182, doi:10.1159/000187179.
35. GRASES, F.; MASÁROVÁ, L.; SÖHNLE, O.; COSTA-BAUZÁ, A. Agglomeration of Calcium Oxalate Monohydrate in Synthetic Urine. *Br J Urol* **1992**, *70*, 240–246, doi:10.1111/J.1464-410X.1992.TB15724.X.
36. Wiessner, J.H.; Hung, L.Y.; Mandel, N.S. Crystal Attachment to Injured Renal Collecting Duct Cells: Influence of Urine Proteins and PH. *Kidney Int* **2003**, *63*, 1313–1320, doi:10.1046/J.1523-1755.2003.00866.X.
37. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; García-Ferragut, L. Biopathological Crystallization: A General View about the Mechanisms of Renal Stone Formation. *Adv Colloid Interface Sci* **1998**, *74*, 169–194, doi:10.1016/S0001-8686(97)00041-9.
38. Khan, S.R.; Kok, D.J. Modulators of Urinary Stone Formation. *Frontiers in Bioscience* **2004**, *9*, 1450–1482, doi:10.2741/1347.
39. Ryall, R.L. The Possible Roles of Inhibitors, Promoters, and Macromolecules in the Formation of Calcium Kidney Stones. *Urinary Tract Stone Disease* **2011**, 31–60, doi:10.1007/978-1-84800-362-0_4.
40. Lieske, J.C.; Leonard, R.; Toback, F.G. Adhesion of Calcium Oxalate Monohydrate Crystals to Renal Epithelial Cells Is Inhibited by Specific Anions. *American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology* **1995**, *268*, doi:10.1152/AJPRENAL.1995.268.4.F604.
41. Kumar, S.; Sigmon, D.; Miller, T.; Carpenter, B.; Khan, S.; Malhotra, R.; Scheid, C.; Menon, M. A New Model of Nephrolithiasis Involving Tubular Dysfunction/Injury. *Journal of Urology* **1991**, *146*, 1384–1389, doi:10.1016/S0022-5347(17)38120-X.
42. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Gomila, I.; Conte, A. Origin and Types of Calcium Oxalate Monohydrate Papillary Renal Calculi. *Urology* **2010**, *76*, 1339–1345, doi:10.1016/J.UROLOGY.2010.02.022.
43. Hennis, H.L.; Hennigar, G.R.; Greene, W.B.; Hilton, C.W.; Spector, M. Intratubular Calcium Phosphate Deposition in Acute Analgesic Nephropathy in Rabbits. *American Journal of Pathology* **1982**, *106*, 356–363.
44. Rodgers, A.L. Physicochemical Mechanisms of Stone Formation. *Urolithiasis* **2017**, *45*, 27–32, doi:10.1007/S00240-016-0942-1.
45. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Prieto, R.M. Renal Lithiasis and Nutrition. *Nutr J* **2006**, *5*, doi:10.1186/1475-2891-5-23.
46. Vezzoli, G.; Soldati, L.; Gambaro, G. Update on Primary Hypercalciuria From a Genetic Perspective. *Journal of Urology* **2008**, *179*, 1676–1682, doi:10.1016/J.JURO.2008.01.011.
47. Türk, C.; Neisius, A.; Petrik, A.; Seitz, C.; Skolarikos, A.; Thomas, K. EAU Guidelines on Urolithiasis. **2023**, 1–87.
48. Lee, Y.H.; Huang, W.C.; Tsai, J.Y.; Lu, C.M.; Chen, W.C.; Lee, M.H.; Hsu, H.S.; Huang, J.K.; Chang, L.S. Epidemiological Studies on the Prevalence of Upper Urinary Calculi in Taiwan. *Urol Int* **2002**, *68*, 172–177, doi:10.1159/000048445.
49. Trinchieri, A. Epidemiology of Urolithiasis: An Update. **2008**, *5*, 101–106.

50. Arias Vega, R.; Pérula de Torres, L.A.; Jiménez García, C.; Carrasco Valiente, J.; Requena Tapia, M.J.; Cano Castiñeira, R.; Silva Ayçaguer, L.C. Comorbidity and Socio-Demographic Factors Associated with Renal Lithiasis in Persons Aged 40 to 65: A Cross-Sectional Study. *Medicina Clínica (English Edition)* **2017**, *149*, 383–390, doi:10.1016/J.MEDCLE.2017.09.017.
51. Sorokin, I.; Mamoulakis, C.; Miyazawa, K.; Rodgers, A.; Talati, J.; Lotan, Y. Epidemiology of Stone Disease across the World. *World J Urol* **2017**, *35*, 1301–1320, doi:10.1007/S00345-017-2008-6.
52. Romero, V.; Akpınar, H.; Assimos, D.G. Kidney Stones: A Global Picture of Prevalence, Incidence, and Associated Risk Factors. *Rev Urol* **2010**, *12*, e86, doi:10.3909/riu0459.
53. Grases, F.; Conte, A.; March, J.G.; Genestar, C.; Costa-Bauzá, A.; Martin, M.; Vallescar, R. Epidemiology of Urinary Stone Disease in the Balearic Islands Community. *Int Urol Nephrol* **1994**, *26*, 145–150, doi:10.1007/BF02768277.
54. Leusmann, D.B.; Niggemann, H.; Roth, S.; von Ahlen, H. Recurrence Rates and Severity of Urinary Calculi. *Scand J Urol Nephrol* **1995**, *29*, 279–283, doi:10.3109/00365599509180576.
55. Ljunghall, S.; Danielson, B.G. A Prospective Study of Renal Stone Recurrences. *Br J Urol* **1984**, *56*, 122–124, doi:10.1111/J.1464-410X.1984.TB05346.X.
56. Ureteral Stents Market Size | Industry Report, 2020-2027 Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/ureteral-stents-market> (accessed on 27 July 2023).
57. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Prieto, R.M. ¿Se Puede Realmente Prevenir La Litiasis Renal? Nuevas Tendencias y Herramientas Terapéuticas. *Arch Esp Urol* **2017**.
58. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Ramis, M.; Montesinos, V.; Conte, A. Simple Classification of Renal Calculi Closely Related to Their Micromorphology and Etiology. *Clinica Chimica Acta* **2002**, *322*, 29–36, doi:10.1016/S0009-8981(02)00063-3.
59. Grases, F.; Costa, A.; Prieto, R.M. *Cálculos Renales: Tipos y Prevención*; Ediciones UIB.; 2018;
60. Mosayyebi, A.; Vijayakumar, A.; Yue, Q.Y.; Bres-Niewada, E.; Manes, C.; Carugo, D.; Somani, B.K. Engineering Solutions to Ureteral Stents: Material, Coating and Design. *Cent European J Urol* **2017**, *70*, 270–274, doi:10.5173/ceju.2017.1520.
61. Finney, R.P. Experience with New Double J Ureteral Catheter Stent. *Journal of Urology* **1978**, *120*, 678–681, doi:10.1016/S0022-5347(17)57326-7.
62. al-Aown, A.; Kyriazis, I.; Kallidonis, P.; Kraniotis, P.; Rigopoulos, C.; Karnabatidis, D.; Petsas, T.; Liatsikos, E. Ureteral Stents: New Ideas, New Designs. *Ther Adv Urol* **2010**, *2*, 85–92, doi:10.1177/1756287210370699.
63. Hofmann, R.; Hartung, R. Ureteral Stents - Materials and New Forms. *World J Urol* **1989**, *7*, 154–157, doi:10.1007/BF01637374.
64. Mardis, H.K.; Kroeger, R.M.; Morton, J.J.; Donovan, J.M. Comparative Evaluation of Materials Used for Internal Ureteral Stents. *J Endourol* **1993**, *7*, 105–115, doi:10.1089/END.1993.7.105.
65. Marx, M.; Bettmann, M.A.; Bridge, S.; Brodsky, G.; Boxt, L.M.; Richie, J.P. The Effects of Various Indwelling Ureteral Catheter Materials on the Normal Canine

- Ureter. *Journal of Urology* **1988**, *139*, 180–185, doi:10.1016/S0022-5347(17)42349-4.
66. Park, H.K.; Paick, S.H.; Kim, H.G.; Lho, Y.S.; Bae, S. The Impact of Ureteral Stent Type on Patient Symptoms as Determined by the Ureteral Stent Symptom Questionnaire: A Prospective, Randomized, Controlled Study. *J Endourol* **2015**, *29*, 367–371, doi:10.1089/END.2014.0294.
 67. Kulkarni, R. Metallic Stents in the Management of Ureteric Strictures. *Indian Journal of Urology* **2014**, *30*, 65–72, doi:10.4103/0970-1591.124210.
 68. Lingeman, J.E.; Preminger, G.M.; Berger, Y.; Denstedt, J.D.; Goldstone, L.; Segura, J.W.; Auge, B.K.; Watterson, J.D.; Kuo, R.L. Use of a Temporary Ureteral Drainage Stent after Uncomplicated Ureteroscopy: Results from a Phase II Clinical Trial. *Journal of Urology* **2003**, *169*, 1682–1688, doi:10.1097/01.JU.0000055600.18515.A1.
 69. Chew, B.H.; Paterson, R.F.; Clinkscales, K.W.; Levine, B.S.; Shalaby, S.W.; Lange, D. In Vivo Evaluation of the Third Generation Biodegradable Stent: A Novel Approach to Avoiding the Forgotten Stent Syndrome. *Journal of Urology* **2013**, *189*, 719–725, doi:10.1016/J.JURO.2012.08.202.
 70. Christman, M.S.; L'Esperance, J.O.; Choe, C.H.; Stroup, S.P.; Auge, B.K. Analysis of Ureteral Stent Compression Force and Its Role in Malignant Obstruction. *Journal of Urology* **2009**, *181*, 392–396, doi:10.1016/J.JURO.2008.08.125.
 71. Lo, J.; Lange, D.; Chew, B.H. Ureteral Stents and Foley Catheters-Associated Urinary Tract Infections: The Role of Coatings and Materials in Infection Prevention. *Antibiotics* **2014**, *3*, 87–97, doi:10.3390/ANTIBIOTICS3010087.
 72. Riedl, C.R.; Witkowski, M.; Plas, E.; Pflueger, H. Heparin Coating Reduces Encrustation of Ureteral Stents: A Preliminary Report. *Int J Antimicrob Agents* **2002**, *19*, 507–510, doi:10.1016/S0924-8579(02)00097-3.
 73. Tenke, P.; Riedl, C.R.; Jones, G.L.; Williams, G.J.; Stickler, D.; Nagy, E. Bacterial Biofilm Formation on Urologic Devices and Heparin Coating as Preventive Strategy. *Int J Antimicrob Agents* **2004**, *23*, 67–74, doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2003.12.007.
 74. Cauda, F.; Cauda, V.; Fiori, C.; Onida, B.; Garrone, E. Heparin Coating on Ureteral Double J Stents Prevents Encrustations: An in Vivo Case Study. *J Endourol* **2008**, *22*, 465–472, doi:10.1089/END.2007.0218.
 75. Tunney, M.M.; Gorman, S.P. Evaluation of a Poly(Vinyl Pyrrolidone)-Coated Biomaterial for Urological Use. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4601–4608, doi:10.1016/S0142-9612(02)00206-5.
 76. Minardi, D.; Cirioni, O.; Ghiselli, R.; Silvestri, C.; Mocchegiani, F.; Gabrielli, E.; D'Anzeo, G.; Conti, A.; Orlando, F.; Rimini, M.; et al. Efficacy of Tigecycline and Rifampin Alone and in Combination against *Enterococcus Faecalis* Biofilm Infection in a Rat Model of Ureteral Stent. *Journal of Surgical Research* **2012**, *176*, 1–6, doi:10.1016/J.JSS.2011.05.002.
 77. Laube, N.; Kleinen, L.; Bradenahl, J.; Meissner, A. Diamond-Like Carbon Coatings on Ureteral Stents-A New Strategy for Decreasing the Formation of Crystalline Bacterial Biofilms? *Journal of Urology* **2007**, *177*, 1923–1927, doi:10.1016/J.JURO.2007.01.016.

78. Choong, S.K.S.; Wood, S.; Whitfield, H.N. A Model to Quantify Encrustation on Ureteric Stents, Urethral Catheters and Polyzmers Intended for Urological Use. *BJU Int* **2000**, *86*, 414–421, doi:10.1046/J.1464-410X.2000.00861.X.
79. Cadieux, P.A.; Chew, B.H.; Nott, L.; Seney, S.; Elwood, C.N.; Wignall, G.R.; Goneau, L.W.; Denstedt, J.D. Use of Triclosan-Eluting Ureteral Stents in Patients with Long-Term Stents. *J Endourol* **2009**, *23*, 1187–1194, doi:10.1089/END.2008.0437.
80. Chew, B.H.; Cadieux, P.A.; Reid, G.; Denstedt, J.D. In-Vitro Activity of Triclosan-Eluting Ureteral Stents against Common Bacterial Uropathogens. *J Endourol* **2006**, *20*, 949–958, doi:10.1089/END.2006.20.949.
81. Cadieux, P.A.; Chew, B.H.; Knudsen, B.E.; DeJong, K.; Rowe, E.; Reid, G.; Denstedt, J.D. Triclosan Loaded Ureteral Stents Decrease Proteus Mirabilis 296 Infection in a Rabbit Urinary Tract Infection Model. *Journal of Urology* **2006**, *175*, 2331–2335, doi:10.1016/S0022-5347(06)00252-7.
82. Dave, R.N.; Joshi, H.M.; Venugopalan, V.P. Novel Biocatalytic Polymer-Based Antimicrobial Coatings as Potential Ureteral Biomaterial: Preparation and in Vitro Performance Evaluation. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**, *55*, 845–853, doi:10.1128/AAC.00477-10.
83. Høiby, N.; Ciofu, O.; Johansen, H.K.; Song, Z.J.; Moser, C.; Jensen, P.Ø.; Molin, S.; Givskov, M.; Tolker-Nielsen, T.; Bjarnsholt, T. The Clinical Impact of Bacterial Biofilms. *Int J Oral Sci* **2011**, *3*, 55–65, doi:10.4248/IJOS11026.
84. Hachem, R.; Reitzel, R.; Borne, A.; Jiang, Y.; Tinkey, P.; Uthamanthil, R.; Chandra, J.; Ghannoum, M.; Raad, I. Novel Antiseptic Urinary Catheters for Prevention of Urinary Tract Infections: Correlation of in Vivo and in Vitro Test Results. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, *53*, 5145–5149, doi:10.1128/AAC.00718-09.
85. Peng, Z.X.; Wang, L.; Du, L.; Guo, S.R.; Wang, X.Q.; Tang, T.T. Adjustment of the Antibacterial Activity and Biocompatibility of Hydroxypropyltrimethyl Ammonium Chloride Chitosan by Varying the Degree of Substitution of Quaternary Ammonium. *Carbohydr Polym* **2010**, *81*, 275–283, doi:10.1016/J.CARBPOL.2010.02.008.
86. Nowatzki, P.J.; Koepsel, R.R.; Stoodley, P.; Min, K.; Harper, A.; Murata, H.; Donfack, J.; Hortelano, E.R.; Ehrlich, G.D.; Russell, A.J. Salicylic Acid-Releasing Polyurethane Acrylate Polymers as Anti-Biofilm Urological Catheter Coatings. *Acta Biomater* **2012**, *8*, 1869–1880, doi:10.1016/J.ACTBIO.2012.01.032.
87. Price, C.T.D.; Lee, I.R.; Gustafson, J.E. The Effects of Salicylate on Bacteria. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **2000**, *32*, 1029–1043, doi:10.1016/S1357-2725(00)00042-X.
88. Noimark, S.; Dunnill, C.W.; Wilson, M.; Parkin, I.P. The Role of Surfaces in Catheter-Associated Infections. *Chem Soc Rev* **2009**, *38*, 3435–3448, doi:10.1039/B908260C.
89. Desgrandchamps, F.; Moulinier, F.; Daudon, M.; Teillac, P.; Duc, A.L.E. An in Vitro Comparison of Urease-Induced Encrustation of JJ Stents in Human Urine. *Br J Urol* **1997**, *79*, 24–27, doi:10.1046/J.1464-410X.1997.02775.X.
90. Pedro, R.N.; Hendlin, K.; Kriedberg, C.; Monga, M. Wire-Based Ureteral Stents: Impact on Tensile Strength and Compression. *Urology* **2007**, *70*, 1057–1059, doi:10.1016/J.UROLOGY.2007.08.007.

91. Barros, A.A.; Oliveira, C.; Lima, E.; Duarte, A.R.C.; Reis, R.L. Gelatin-Based Biodegradable Ureteral Stents with Enhanced Mechanical Properties. *Appl Mater Today* **2016**, *5*, 9–18, doi:10.1016/J.APMT.2016.07.006.
92. Zumstein, V.; Betschart, P.; Albrich, W.C.; Buhmann, M.T.; Ren, Q.; Schmid, H.P.; Abt, D. Biofilm Formation on Ureteral Stents - Incidence, Clinical Impact and Prevention. *Swiss Med Wkly* **2017**, *147*, doi:10.4414/SMW.2017.14408.
93. Dyer, R.B.; Chen, M.Y.; Zagoria, R.J.; Regan, J.D.; Hood, C.G.; Kavanagh, P. V. Complications of Ureteral Stent Placement. *Radiographics* **2002**, *22*, 1005–1022, doi:10.1148/RADIOGRAPHICS.22.5.G02SE081005.

***Capítulo 2. Estudio del efecto de
distintos compuestos mediante
cinéticas de cristalización***

Objetivos

OBJETIVOS

Los objetivos específicos del presente capítulo se centraron en la búsqueda y selección de compuestos con relevante efecto inhibitor mediante cinéticas de cristalización, con el objetivo de ser estudiado posteriormente su efecto en la formación de depósitos sobre secciones de catéteres doble J. Así, los objetivos del presente capítulo se desglosan de la siguiente manera:

- Estudiar los efectos del fitato, así como las mezclas de sus productos de hidrólisis y compararlos con los efectos de los InsP individuales obtenidos comercialmente en la cristalización en disolución del OxCa, BRU y HAP.
- Estudiar los efectos de distintos bifosfonatos y del citrato en la cristalización en disolución del OxCa, BRU y HAP.
- Estudiar los efectos de la teobromina, sus metabolitos y otras xantinas en la cristalización del AU.
- Probar si existen efectos sinérgicos entre la teobromina y las xantinas que produzcan un mayor efecto inhibitor.
- La determinación de las xantinas en muestras urinarias de voluntarios sanos y pacientes litiásicos para relacionar su concentración con el riesgo de cristalización del AU en dichas orinas.

Introducción

1. Inhibidores de la litiasis cálcica

Como se ha comentado más de talladamente en la introducción general, uno de los principales factores que afectan al proceso de cristalización patológica son los inhibidores de la cristalización. Los principales compuestos que han demostrado presentar capacidad inhibidora de la cristalización cálcica son los polifosfatos (el pirofosfato, los bifosfonatos y el fitato) así como también el citrato.

En la década de los 60 se encontró el primer inhibidor biológico, el pirofosfato, el cual a concentraciones muy bajas es capaz de inhibir la precipitación de oxalato cálcico en orina[1–3]. Posteriormente al descubrimiento del pirofosfato se describieron otras moléculas con capacidad inhibidora presentes de manera natural en la orina. Estas se dividieron en dos grupos, las primeras de bajo peso molecular como el magnesio o el citrato [4–7] y las segundas con elevado peso molecular, como son los glicosaminoglicanos y la glicoproteína de Tamm-Horsfall. El efecto de este tipo de compuestos de elevado peso molecular como las proteínas aún no está del todo dilucidado, ya que en la literatura se pueden encontrar trabajos contradictorios (unos describiendo efectos inhibidores, pero otros mostrando propiedades claramente promotoras de la cristalización[8]). A pesar de este hecho, parece clara su acción como sustancias antiadherentes (lubricantes) de partículas sólidas sobre el urotelio[9,10].

No fue hasta los años 80 que se estableció la aplicación práctica de los estudios con sustancias inhibidoras, momento en el que se empezó a utilizar el citrato en el tratamiento médico de la urolitiasis[11–15].

Estudios posteriores demostraron que el fitato, una sustancia de peso molecular relativamente bajo presente de manera natural en nuestro organismo (sangre, orina y fluidos intersticiales e intracelulares)[16,17], presenta una gran capacidad inhibidora sobre la litiasis cálcica, siendo su efecto más importante que el del pirofosfato y citrato [18–22].

1.1 Fitato

1.1.1 Características generales

El fitato (InsP6) fue descubierto por primera vez el año 1855 por Hartig en diversas semillas de plantas[23], y años más tarde Pfeffer observó que se trataba concretamente de la fitina (la forma de sal cálcico-magnésica)[24]. No fue hasta a principios del siglo XX que Anderson[25] estableció su fórmula química, llamada myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisdihidrogenofosfato o ácido fítico (InsP6) (Figura 2.1).

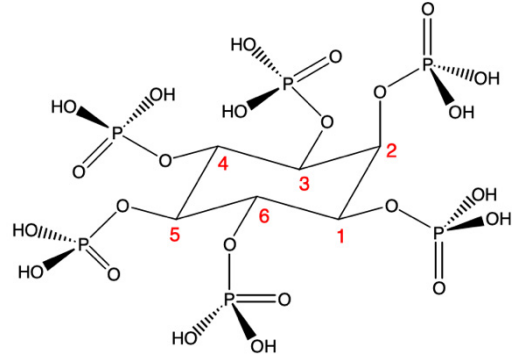


Figura 2.1 Estructura del ácido fítico.

El fitato se encuentra en elevadas cantidades en las semillas que consumimos durante nuestra alimentación (concretamente en la zona del germen y en las cubiertas) como las legumbres, cereales y frutos secos. Su presencia en los fluidos fisiológicos (sangre, orina, fluidos intersticiales e intracelulares) y tejidos de mamíferos dependen de su aporte exógeno[16,17,26–28].

1.1.2 Efecto antinutriente y dieta mediterránea

El fitato en su momento fue considerado un antinutriente, ya que los primeros estudios con animales descubrieron que la administración de altas dosis de fitato de sodio a perros conducía al desarrollo de raquitismo[29]. Así mismo, en otros estudios mostraron que el fitato presentaba capacidad de inhibir la absorción de diferentes elementos y minerales esenciales a lo largo de su trayectoria en el tracto gastrointestinal[30–33]. Es importante destacar que en estos estudios se utilizaban grandes cantidades de fitato de sodio y que este efecto es debido a la presencia de los seis grupos fosfato en su estructura molecular, que hace que sea una molécula policargada y, por lo tanto, que presente una gran afinidad por los cationes polivalentes.

Esta propiedad le confiere la habilidad para formar especies insolubles a nivel intestinal, reducir la absorción y disminuir la biodisponibilidad de estos elementos (calcio, hierro, zinc, magnesio y manganeso) pudiendo causar en el organismo su deficiencia[34,35].

Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, el fitato se encuentra de manera natural en los vegetales principalmente en forma de sal de calcio y magnesio (fitina), la cual ya lleva incorporado el calcio. Por tanto, el efecto de consumir una cantidad moderada de fitato cuando se administra en forma de esta sal y con una dieta equilibrada no afecta significativamente a la absorción de calcio (que en realidad está incorporado en la fitina) u otros oligoelementos, como el cobre y el zinc[36–38], puesto que existen un gran número de componentes en la dieta cuya aportación contrarresta los efectos inhibidores del fitato en su absorción[39–41]. En cambio, sí que puede causar una importante disminución en los niveles fisiológicos de estos elementos juntamente con su gran consumo y bajo una dieta desequilibrada.

De hecho, la dieta mediterránea, caracterizada por ser rica en legumbres y frutos secos, implica dosis de fitina (fitato cálcico-magnésico) de aproximadamente 1 g/día[42], las cuales dan lugar a una excreción de fitato urinario que presenta numerosos efectos beneficiosos para la salud. Así, se han demostrado importantes propiedades como antioxidante[43], capacidad de evitar el desarrollo de cálculos renales[44] y calcificaciones vasculares[45–49], de prevenir la osteoporosis[50,51], algunos tipos de cáncer[52,53] y de minimizar la formación de productos de glicación en pacientes diabéticos[54,55].

1.1.3 Fuentes de fitato, absorción, excreción y toxicidad

Las principales fuentes de fitato (en forma de fitina), así como de otros inositoles fosfatos de menor grado de fosforilación, son los cereales, legumbres y frutos secos[56]. Además, también se encuentra en productos integrales no procesados (Tabla 2.1).

La variabilidad en los niveles de fitato o ácido fítico observados en la Tabla 2.1 se atribuye no solo a la diversidad botánica de los alimentos representados, sino también

a la influencia de factores climáticos durante su desarrollo y a los distintos estados de madurez de las semillas.

Tabla 2.1 Contenido de ácido fítico/fitato en los distintos tipos de alimentos[36].

	Ácido fítico/fitato (g/100g)		Ácido fítico/fitato (g/100g)
Cereales		Legumbres	
Maíz	0,72-2,22	Lentejas	0,27 - 1,51
Trigo	0,39-1,35	Garbanzos	0,28 - 1,60
Arroz	0,06-1,08	Habas	0,51 - 1,77
Semillas		Frutos secos	
Sésamo	1,44 - 5,36	Cacahuetes	0,17-4,47
Soja	1,00 - 2,22	Almendras	0,35 - 9,42
Tofu	0,1-2,90	Nueces	0,20 - 6,69

Los niveles de fitato en el organismo se encuentran directamente relacionados con su aporte exógeno a través de la dieta ya que el organismo no puede sintetizarlo de manera endógena a partir del inositol para mantener niveles normales. Además, solo aproximadamente entre el 1% y el 2% del fitato se absorbe cuando se administra por vía oral, una proporción similar a la que se observa en el caso de los bisfosfonatos. Por lo tanto, debido a su baja absorción, la concentración de fitato en los fluidos corporales de los mamíferos, como la orina, la sangre y el líquido intersticial, es muy reducida[28,38].

Estudios realizados en ratas mostraron que su excreción urinaria es dosis-dependiente hasta unos valores de consumo de 20,9 mg por kg de peso corporal y por día, a partir de la cual se alcanzó el valor máximo urinario (2,25 mg/L, que corresponde al 2% de la cantidad ingerida). Dosis mayores de fitato no originaron aumentos en su excreción urinaria. Además, los valores urinarios de fitato sufrieron una reducción hasta niveles indetectables 22 días después de su eliminación de la dieta[57].

Además de su ingesta oral, su aplicación tópica en forma de crema o gel en ratas también resultó en una concentración de fitato tanto en los tejidos como en los fluidos biológicos suficiente para reducir significativamente la calcinosis cutis[58–60]. Mediante esta vía además se observaron excreciones de fitato diez veces mayores que las obtenidas en la ingesta oral, ya que mediante la aplicación tópica se evita pasar por el tracto gastrointestinal, donde el fitato puede formar especies insolubles que son

eliminadas[59]. En estos estudios también se observó una relación entre la concentración excretada y la concentración de fitato utilizada en crema o gel, existiendo también un máximo de absorción tanto para la sal de sodio como para la fitina por encima del cual no se excreta más fitato a través de la orina.

Los resultados en estudios con humanos se correlacionan con los realizados en ratas, de manera que los niveles de fitato en la orina humana pueden ir de 0,5 a 6 mg/L de fitato, siendo las concentraciones en enfermos litíasicos menores que las encontradas en individuos sanos[61,62]. En cuanto a su eliminación de la dieta, produce una reducción de los niveles urinarios del 50% después de 36 horas[63], mientras que después de dos semanas con una dieta pobre en fitato se produce una disminución del 90% del fitato urinario y del 74% del fitato plasmático[28]. Estos valores de concentración plasmática de fitato se encontraron proporcionalmente relacionados con los de su excreción urinaria, demostrando que el fitato en orina es un buen marcador de sus niveles en el organismo. Por otra parte, al retomar una dieta normal con un aporte exógeno de fitato de 1-1.4 g/día restableció la concentración basal de fitato tanto en orina como en plasma después de 16 días. En humanos, igual que con los animales de experimentación, existe una cantidad ingerida óptima de fitato a partir de la cual no se absorbe más y no aumenta su excreción urinaria[28]. Finalmente, estudios de toxicidad aguda realizados con ácido fítico y fitato sódico y administrados por vía oral a ratones y ratas, mostraron una DL50 (dosis letal media) de alrededor a 1000 mg/kg y 500 mg/kg[64,65].

1.1.4 El fitato como inhibidor de la cristalización cálcica

La capacidad del fitato de inhibir la cristalización del OxCa en las etapas nucleación heterogénea y crecimiento se demostró mediante el uso de sistemas que reproducían las condiciones de calcificaciones patológicas del urotelio[10,20,66] y de sistemas in vitro que simulaban las condiciones de formación de los cálculos de oxalato cálcico en el riñón[67,68]. Este efecto sobre las primeras etapas de formación de los cálculos de OxCa es relevante teniendo en cuenta que debido a las condiciones de sobresaturación de la orina su nucleación homogénea es fisiológicamente poco probable[69]. Por otro lado, la realización estudios cinéticos mediante turbidimetría

mostraron que el fitato también presenta efectos inhibitorios de la nucleación tanto homogénea como heterogénea del CaP[22,67]; así como también presentó efectos sinérgicos con el magnesio en la inhibición de la cristalización del oxalato cálcico, pero no con el citrato[70]. Además, el fitato lleva a cabo sus acciones inhibitorias a concentraciones similares a la encontradas normalmente en orina.

Los estudios realizados en ratas con calcificación inducida mediante etilenglicol administrado por vía oral (a través del agua)[71], como con vitamina D por vía tópica (a través de un gel[44]) indicaron que el fitato mediante las dos vías disminuyó la calcificación en la papila renal. Por otro lado, la administración de una dieta alimentaria con un 1% de fitato previno de la formación de depósitos cálcicos en la unión corticomedular en ratas hembra[72].

En cuanto a humanos, como ya se ha comentado anteriormente, los valores de concentración urinaria de fitato resultó ser significativamente inferior en enfermos litíasicos que en individuos sanos, mientras que la ingesta exógena de fitato disminuyó notablemente la capacidad de la orina para formar cristales de sales cálcicas (oxalato y fosfato) sin alterar ningún otro parámetro urinario[73]. El consumo de 120 mg de fitato por día aumentó en un 50-100% la capacidad de inhibición de la orina producida en las horas siguientes a su toma[74]. Finalmente, un estudio epidemiológico llevado a cabo durante de 8 años y con una muestra de 96 245 mujeres confirmó que una dieta rica en fitato se relaciona con una menor incidencia de litiasis renal[75].

Como ya se ha comentado anteriormente, el efecto del fitato en la inhibición de la litiasis cálcica es mayor que la del citrato. Además, a diferencia de este, el fitato no produce cambios en el pH urinario. La gran capacidad inhibidora del fitato se debe a la elevada afinidad por el calcio de los seis grupos fosfato presentes en su estructura. De este modo, las moléculas de fitato se adsorben sobre la superficie de núcleos y/o cristales cálcicos impidiendo su posterior crecimiento y/o agregación.

1.1.5 Fitato (InsP6) y los inositoles fosfato (InsP)

Desde el descubrimiento de la molécula del fitato hasta la identificación de los beneficios expuestos anteriormente transcurrieron aproximadamente 150 años.

Algunas de las razones de este largo retraso pueden ser que el fitato tiene un bajo peso molecular, se presenta en bajas concentraciones en medios biológicos, es difícil de identificar y cuantificar, y que la desfosforilación puede generar una cantidad significativa de derivados (InsP) que también podrían presentar importantes funciones biológicas.

De hecho, en la década de los 70 se publicaron dos trabajos donde se mostró, por un lado, que el fitato parcialmente hidrolizado actuaba de inhibidor de la formación de la HAP *in vitro*[76]; mientras que, por otro lado, mezclas de los hidrolizados del fitato presentaron potentes efectos inhibidores de la calcificación *in vitro* del cartílago de rata, de manera que su inyección parenteral previno la calcificación aórtica en ratas tratadas con dosis altas de vitamina D[77].

La dificultad de identificar y cuantificar InsP6 y sus productos desfosforilados en medios biológicos es una de las razones principales por las que se ha tardado tanto en identificar sus efectos beneficiosos. Los métodos analíticos más comunes para cuantificar InsP6 se basan en mediciones no específicas del fosfato inorgánico (PPi) total o en la formación de complejos con los grupos fosfato[62,78–81]. Además, en algunos casos, estos procedimientos requieren de un proceso previo de separación. Debido a que estos métodos no son específicos, pueden sobrestimar la cantidad de InsP6 cuando hay otros InsP presentes en una muestra. Sin embargo, estos métodos pueden resultar muy útiles cuando es suficiente una estimación global no específica del *pool* de InsP.

Actualmente, el acoplamiento de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con la espectrometría de masas (MS) en sus variantes más actuales parece proporcionar mejores resultados[82,83]. Entre las limitaciones de este método se encuentran la falta de estándares disponibles para muchos de los isómeros InsP. Finalmente, en un estudio publicado recientemente se describe un método de separación por electroforesis capilar (CE) acoplado a espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS), que permite la identificación y cuantificación de los isómeros utilizando compuestos de referencia marcados con isótopos estables[84].

Dos estudios recientes en ratas donde se administró fitato por vía tópica[85] y mediante su ingesta oral[86], mostraron que contenían una abundante cantidad InsP6 y otros InsP en la orina (InsP5, InsP4, InsP3, InsP2), de manera muy variable entre los animales y que después de la privación dietética de InsP6, InsP2 fue la única especie de InsP detectada en la orina.

Por lo tanto, los efectos tanto del InsP6 y como de los productos que resultan de su desfosforilación (InsP5, InsP4, InsP3 e InsP2) en cuanto a la inhibición del desarrollo de calcificaciones patológicas están asociados con la aparición de mezclas de diferentes InsP en sangre y orina[87].

1.2 Los bifosfonatos

El pirofosfato (Figura 2.2 A) fue uno de los primeros inhibidores descritos de la cristalización de sales de calcio en organismos vivos. Debido a su hidrólisis en el sistema digestivo que no permite su administración oral, se sintetizaron compuestos análogos llamados bifosfonatos (Figura 2.2 B) que no son hidrolizados por el sistema digestivo cuando se administran oralmente y se absorben en dosis bajas[88].

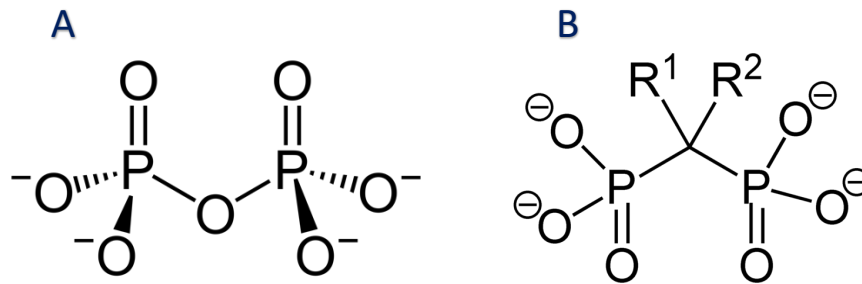



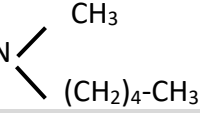
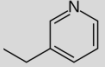
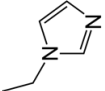
Figura 2.2 Estructura de A) pirofosfato B) genérica de los bifosfonatos.

Los bifosfonatos han demostrado también ejercer como inhibidores efectivos de la cristalización cálcica, aunque actualmente son más conocidos por su prevención de la osteoporosis[89]. Aunque fueron sintetizados por primera vez en 1800, sus aplicaciones médicas no empezaron hasta 1960[90].

La estructura de los bisfosfonatos presenta dos grupos fosfonato unidos a un carbono central y dos cadenas adicionales, R1 y R2, que permiten numerosas

substituciones. De esta manera posibilita la formación de distintos análogos con diferentes propiedades farmacológicas (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Estructura de los bifosfonatos.

Bifosfonato	R1	R2
Etidronato	-OH	-CH ₃
Clodronato	-Cl	-Cl
Tiludronato	-H	-S-  -Cl
Pamidronato	-OH	-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂
Neridronato	-OH	-(CH ₂) ₅ -NH ₂
Olpadronato	-OH	-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂
Alendronato	-OH	-(CH ₂) ₃ -NH ₂
Ibandronato	-OH	-CH ₂ -CH ₂ N 
Risedronato	-OH	
Zoledronato	-OH	

Así, la habilidad de los bisfosfonatos para unirse a los cristales de CaP y evitar su crecimiento se ve potenciada cuando el sustituyente R1 es un grupo hidroxilo en lugar de un halógeno o un hidrógeno, como ocurre en el clodronato y el tiludronato, respectivamente[90]. En lo que respecta al sustituyente R2, la incorporación de compuestos nitrogenados intensifica su acción. De este modo, los bisfosfonatos con una amina primaria, como el alendronato, el pamidronato y el neridronato, muestran mayor potencia que el etidronato (entre 10 y 1000 veces), aunque son menos potentes que aquellos que contienen una amina terciaria, como el ibandronato y el olpadronato[91,92]. No obstante, los bisfosfonatos con un mayor efecto son aquellos que incorporan un anillo heterocíclico con un átomo de nitrógeno, como el risedronato y el zoledronato. Estos han demostrado una acción aproximadamente 10,000 veces más fuerte que la del etidronato[93,94].

Mediante ensayos turbidimétricos se demostró que el etidronato es capaz de frenar la cristalización del CaP, tanto de la BRU como de la HAP[22]. Por otro lado, un reciente estudio prospectivo mostró que los bisfosfonatos pueden reducir el riesgo de cálculos renales en personas que tienen baja densidad ósea, ya que el su uso se asoció

con un menor riesgo de cálculos renales incidentes[95]. Por lo tanto, los bisfosfonatos pueden tener un papel importante en la reducción de la resorción ósea y, consecuentemente, en la reducción del riesgo general de cálculos renales y enfermedades óseas[96].

La absorción de los bisfosfonatos administrados por vía oral es menor al 5%, y de la fracción absorbida el 60% como máximo queda absorbida en los huesos, de manera que el resto es excretado sin ninguna alteración por la orina. Así, para la inhibición de la resorción ósea se necesitan concentraciones más bajas que para la inhibición de la calcificación[90].

1.3 El citrato

La actividad del citrato (Figura 2.3) en la inhibición de la cristalización ha sido estudiada y utilizada como tratamiento para prevenir la formación de cálculos renales desde décadas. Sus orígenes como tratamiento se remontan al 1826, cuando Sir Astley Cooper recomendaba la toma de citrato potásico para tratar cálculos renales que probablemente fueran de ácido úrico. La forma prescrita para su uso médico es de citrato potásico, observando que el riesgo de formación de cálculos renales aumenta cuando la excreción de citrato en la orina es menor 400 mg por día[97].

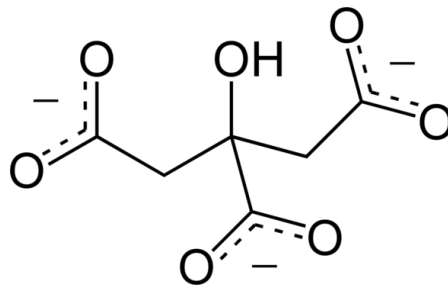


Figura 2.3 Estructura del citrato.

Su acción inhibitoria de la litiasis renal se produce por la combinación de los tres efectos que ocurren en el organismo.

En primer lugar, el citrato produce un aumento del pH urinario[98] debido a la formación del ion bicarbonato durante su metabolismo celular. La excreción del

bicarbonato produce un consumo de los protones presentes en el medio, provocando consecuentemente la basificación de la orina. El aumento del pH urinario al utilizar citrato potásico puede ser beneficioso para evitar la formación de cálculos de ácido úrico, ya que su solubilidad aumenta a valores de pH superiores a 5,5. No obstante, es esencial controlar este incremento de pH, ya que podría propiciar la formación de cálculos de CaP, ya que su cristalización se favorece en pHs superiores a 6,2.

Por otro lado, mediante su capacidad de formar complejos solubles con el calcio[99] también es capaz de inhibir la cristalización de sales cálcicas. Al disminuir la concentración de calcio libre en la orina por la formación de estos complejos en consecuencia se disminuye la sobresaturación de los compuestos insolubles de calcio, ya sean de oxalato o fosfato.

Finalmente, también presenta la capacidad de inhibir la nucleación homogénea del CaP[100], así como la nucleación heterogénea y el crecimiento del OxCa[19,70,101,102], aunque para llevar estas acciones a cabo requiere de elevadas concentraciones.

2. Inhibidores de la cristalización del ácido úrico

Uno de los factores más importantes en la cristalización del AU es el pH[103], ya que individuos con presencia de hiperuricosuria con un pH urinario normal no llegan a desarrollar cálculos de AU[104]. Debido a la falta de inhibidores de la cristalización hasta hace solo unos años, el tratamiento más seguido hasta la fecha para el evitar o prevenir la aparición de cálculos de AU es la alcalinización de la orina, la restricción del consumo de alimentos ricos en purinas, junto con la administración de alopurinol (un inhibidor de la xantina oxidasa) a aquellos individuos con hiperuricosuria[105].

La teobromina (TB) es una dimetilxantina que se encuentra en elevadas cantidades en el cacao[106]. El metabolismo de la teobromina en el cuerpo humano lleva a la excreción diferentes productos en la orina, principalmente 7-metilxantina (7MX, 36 %), 3-metilxantina (3MX, 21 %) y ácido 3,7-dimetilúrico (37DMUA, 1,3 %),

manteniéndose alrededor del 21% de la teobromina administrada inalterada[107](Figura 2.4).

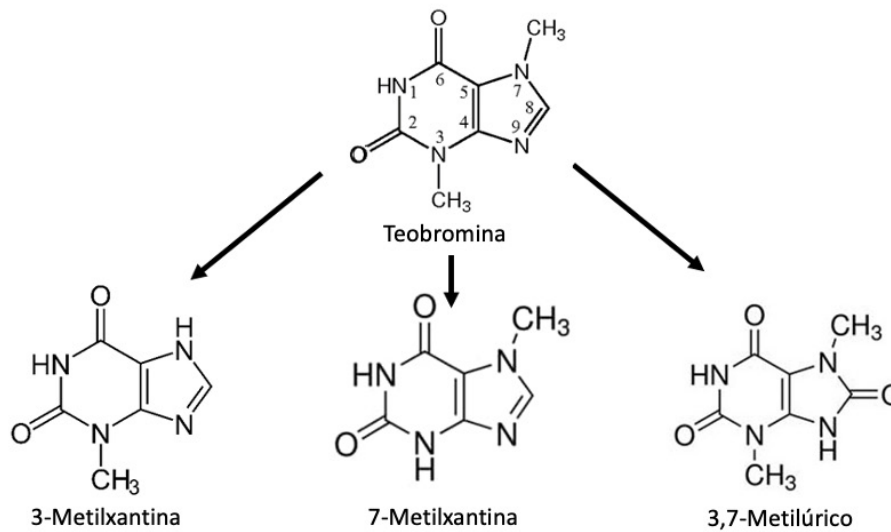


Figura 2.4 Estructura de la teobromina y de sus principales metabolitos.

Por otro lado, dosis orales de alrededor de 1000 mg (muy superiores a las ingestas normales) serían necesarias para observar efectos adversos[108]. Así, la mayor parte de la teobromina presente en el organismo proviene del consumo de chocolate u otros productos derivados del cacao. También del consumo de cafeína, ya que alrededor del 11% de la dosis oral de cafeína se excreta en forma de teobromina[109].

El consumo de teobromina se ha relacionado con múltiples beneficios para la salud, incluida la protección de la superficie del esmalte[110], así como la supresión de la tos[111]. Además, la teobromina es capaz de aumentar el colesterol HDL y disminuir las concentraciones de colesterol LDL en plasma, por lo que confiere protección cardiovascular y reduce el riesgo de enfermedad coronaria[112,113].

Recientes estudios han probado la capacidad de la teobromina de inhibir la cristalización del AU tanto in vitro como in vivo. Mediante ensayos turbidimétricos se probó el efecto de la teobromina a distintos pHs y distintas concentraciones, observando que el tiempo de inducción para la cristalización del AU fue mayor a mayores pHs y a mayores concentraciones de teobromina[114,115]. Por otro lado, la cafeína, teofilina y paraxantina no mostraron efectos a concentraciones de 40

mg/L[114]. Además, en un estudio de redisolución de cálculos de AU, la teobromina aumentó significativamente la disolución de este tipo de cálculos[116].

En un estudio in vivo con voluntarios sanos que tomaron distintos tipos de chocolates, y por ende distintas concentraciones de teobromina, se observó que los chocolates con mayores cantidades de teobromina producían una mayor concentración de esta en la orina, así como un aumento de su excreción. Las orinas con mayores cantidades de teobromina presentaron un menor riesgo de cristalización del AU[117]. Otro estudio in vivo con pacientes litiásicos tratados con citrato o con una combinación de citrato con teobromina, mostró que los dos tratamientos fueron capaces de disminuir el riesgo de cristalización del ácido úrico, mostrando una mayor tendencia al tratamiento con teobromina[118].

Finalmente, en cuanto a su mecanismo, la acción inhibidora de la teobromina en la cristalización del AU podría atribuirse a la similitud estructural entre estas dos moléculas[114]. Mediante modelos computarizados se ha establecido que la interacción de las moléculas de teobromina y AU es una interacción $\pi-\pi$, y que domina sobre las interacciones AU-AU, destruyendo los grupos de AU de orden superior. Sin embargo, no hay evidencia empírica disponible que confirme la incorporación de la teobromina en la red cristalina de AU[119].

Materiales y métodos

1. Estudios cinéticos

1.1 Preparación de los hidrolizados de InsP6

Se preparó una disolución madre de fitato (2 mM) a partir de la sal de sodio del ácido fítico (68388, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Alemania) y se ajustó a un pH de 2 usando HCl. Se dejaron reposar por duplicado alícuotas de 5 mL en un baño seco a T = 97 °C durante 6, 9, 16, 24, 48 o 72 horas para la hidrólisis. Las hidrolisis se llevaron a cabo en tubos de vidrio con rosca. Al finalizar el tiempo de hidrolizado, las alícuotas fueron transferidas a tubos de plástico de 15 mL y dejadas en nevera para parar el avance de la hidrólisis.

1.2 Cuantificación de InsP

1.2.1 Cuantificación de InsP mediante espectrometría de masas

Se prepararon diluciones 1/1000 de las muestras hidrolizadas y se inyectaron en un espectrómetro de masas de alta resolución (Q Exactive Orbitrap) equipado con una sonda de ionización por electropulverización calentada (HESI) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.), trabajando en un modo de ionización negativa. La temperatura del capilar de transferencia de iones se fijó en 320 °C, el voltaje de pulverización se fijó en 2,9 kV en modo negativo y el nivel de RF de la lente S fue de 50 AU. La inyección directa en el modo de adquisición de exploración completa en un rango de 150 a 700 m/z se realizó con una resolución de 140.000.

1.2.2 Cuantificación no específica de InsP mediante el método AIXO

La cuantificación inespecífica de InsP, antes y después del proceso de hidrólisis, se realizó mediante purificación con resina AG 1-X8 y mediante la formación de complejos de InsP con Al (III), en los que InsP desplaza al colorante naranja aluminio-xilenol, como se describió anteriormente[80]. Las diluciones realizadas para las muestras hidrolizadas se encuentran en la Tabla 2.3. Se realizó una extracción por alícuota y se pipetearon triplicados en placa.

Tabla 2.3 Diluciones para la determinación de:

Hidrolizado (h)	InsP	Iones fosfato
0	1/1000	-
6	1/1000	1/60
9	1/1000	1/60
16	1/1000	1/80
24	1/1000	1/200
48	1/500	1/500
72	1/250	1/500

También se llevó a cabo la extracción y cuantificación del Ins-1,2,3,5,6-P5, Ins-2,3,5,6-P4, Ins-1,4,5-P3 e Ins-2,4-P2, obtenidos comercialmente. La concentración inicial de las disoluciones fue de 145 μM , a partir de las cuales se hizo una dilución 1/50 en 50 mL totales para llevar a cabo dos extracciones para cada InsP. Para la cuantificación se realizaron patrones de cada InsP individual, de manera que los valores obtenidos se refirieron tanto al patrón del propio InsP como al patrón del InsP6. Las concentraciones de los patrones de los InsP individuales se encuentran reflejadas en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4 Concentración en μM de la recta patrón del Ins-1,2,3,5,6-P5, Ins-2,3,5,6-P4, Ins-1,4,5-P3 e Ins-2,4-P2 obtenidos comercialmente.

P1	1,8125
P2	3,625
P3	7,25
P4	14,5

1.2.3 Cuantificación del fosfato inorgánico

La cantidad de PPI que se liberó durante la hidrólisis del InsP6 se determinó usando molibdato de amonio y ácido ascórbico (un agente reductor), según el método de fosfomolibdato-ácido ascórbico[120]. La absorbancia del complejo azul de fosfomolibdo se midió a 880 nm. Se pipetearon triplicados en placa.

1.3 Sistema instrumental

La formación de los cristales y los efectos de los posibles inhibidores (InsP6, sus productos de hidrólisis, bifosfonatos, citrato y metilxantinas) sobre la cristalización del

OxCa, BRU, HAP y AU en orina artificial (OA) se evaluaron utilizando un sistema turbidimétrico-cinético (Figura 2.5).

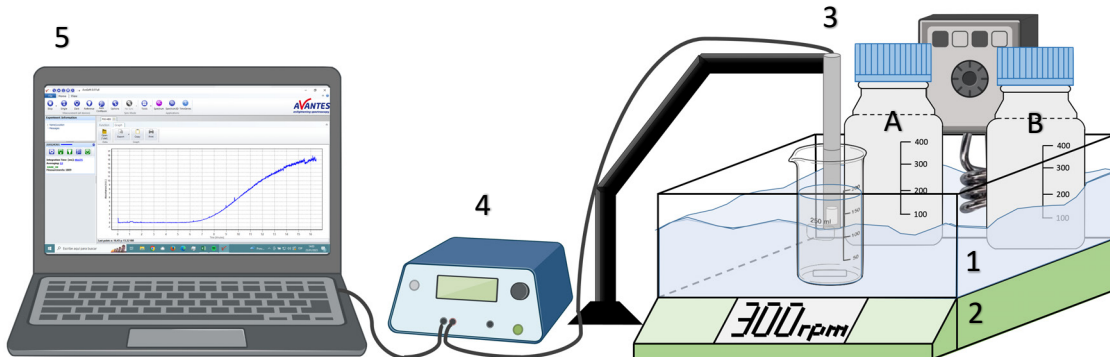


Figura 2.5 Diagrama del dispositivo turbidimétrico utilizado para evaluar la cristalización del OxCa, BRU, HAP y AU en disolución. Se compone de: 1) Baño a 37°C, situado sobre 2) un agitador magnético a 300 rpm, 3) la fibra óptica que mide las variaciones en la absorbancia, conectada a 4) fuente de luz y detector espectrofotométrico, que a su vez se encuentra conectado a 5) un ordenador con el programa AvaSoft (Avantes, Países Bajos), que permite registrar las curvas de cristalización. En el caso de las cinéticas cálcicas, las disoluciones A y B de la OA se mantienen en el baño para que no se enfríen.

El sistema turbidimétrico constaba de un espectrómetro equipado con una celda de medición de guía de luz de fibra óptica (AvaSpec-ULS2048CL-EVO, Avantes, Países Bajos). La cristalización se evaluó a temperatura constante (37 °C), con agitación magnética (300 rpm) y con un pHmetro Crison para controlar el pH en durante todo el proceso (Figura 2.5).

1.4 Reactivos y disoluciones

1.4.1 Cinéticas de cristalización cálcica

En los experimentos cinéticos de oxalato y fosfato cálcico (BRU y HAP) la disolución de OA se obtuvo al mezclar volúmenes iguales de disolución A y disolución B, que fueron previamente sonicadas, filtradas con filtros de 0,45 mm de poro y ajustadas a un pH de 6 para el OxCa, a un pH de 6,5 para la BRU y a pH 7 para la HAP. En la Tabla 2.5 se resumen las concentraciones finales de pH, fósforo, calcio y oxalato utilizadas para cada tipo de cinética.

Tabla 2.5 Resumen de las condiciones de las distintas cristalizaciones cálcicas.

	pH	ppm P	ppm Ca	ppm Ox
OxCa	6	482	200	50
BRU	6,5	800	170	-
HAP	7	482	120	-

El tiempo para la inducción (t_i) de la cristalización del OxCa, de la BRU y de la HAP, que se correlaciona con la inhibición de la cristalización, se definió como el punto aquel en el que la recta de la pendiente corta con el eje x (Figura 2.6). El incremento del tiempo de inducción (Δt_i) se obtuvo de restar el valor del t_i del experimento control (sin aditivos) al valor del t_i del experimento donde se probó el compuesto a evaluar.

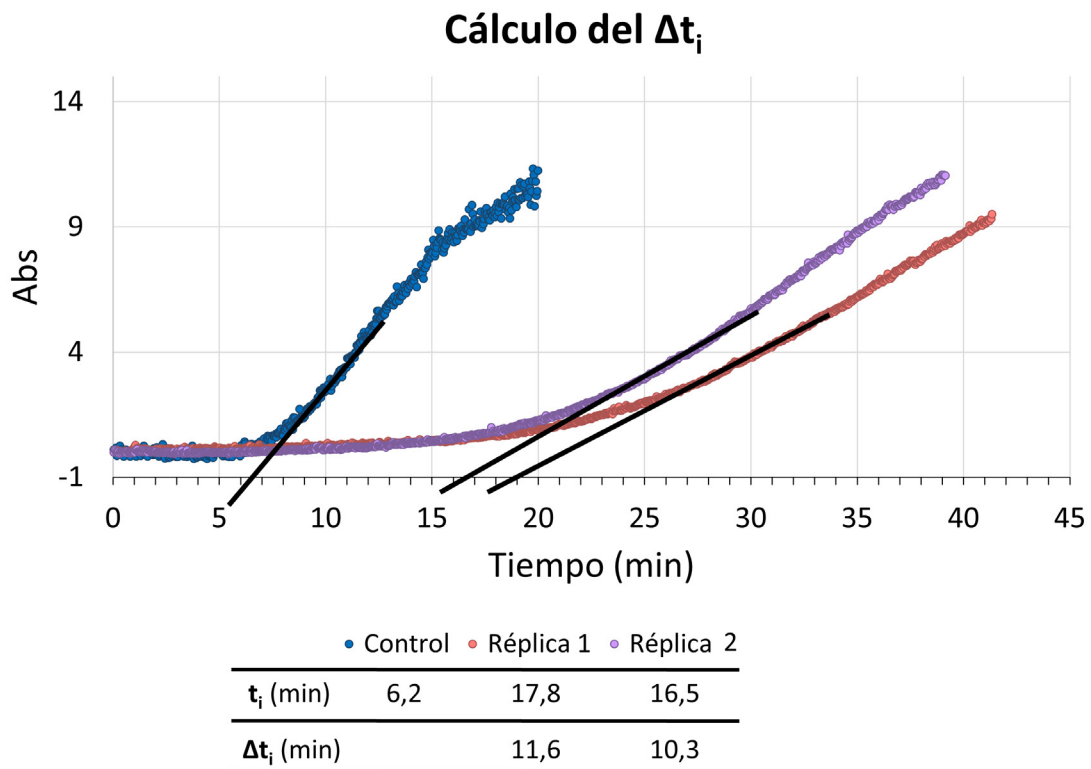


Figura 2.6 Ejemplo de cálculo del Δt_i a partir de los t_i del experimento control (sin aditivos) y del t_i del experimento con aditivos. Las líneas negras representan las pendientes de la zona recta de la cinética. Al cortar con el eje x permiten determinar el t_i para esa cinética de cristalización. El Δt_i se obtuvo de restar el valor del t_i del experimento control (sin aditivos) al t_i del experimento donde se probó el compuesto a evaluar.

1.4.1.1 Cinéticas de cristalización del oxalato cálcico

Para la cristalización del OxCa, se transfirieron 200 mL de OA (100 mL de A+100 mL de B, Tabla 2.6) a un vaso de precipitados alto y se agregaron 0,2 mL de solución madre de fitato o mezcla hidrolizada. Cualquier otro compuesto evaluado también se añadió la cantidad correspondiente a la concentración deseada a los 200 mL de OA. Se dejó reposar la mezcla en el baño a 37 °C durante un minuto y seguidamente se le agregaron 2 mL de una solución madre de oxalato de sodio (5 g/L) para dar inicio a la inducción de la cristalización de OxCa.

Tabla 2.6 Composición de la OA para los estudios cinéticos de OxCa.

Disolución A			Disolución B		
Na ₂ SO ₄ · 10H ₂ O	6,23 g/L	19,34 mM	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	2,41 g/L	15,45 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,46 g/L	5,92 mM	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	5,6 g/L	15,64 mM
NH ₄ Cl	4,64 g/L	86,75 mM	NaCl	13,05 g/L	223,31 mM
KCl	12,13 g/L	162,69 mM			
Ca	0,4 g/L	10 mM			

1.4.1.2 Cinéticas de cristalización de fosfato cálcico

Para la cristalización de la BRU (Tabla 2.7) y de la HAP (Tabla 2.8), se transfirieron 100 mL de disolución A a un vaso de precipitados alto y se agregaron 0,2 mL de solución madre de fitato o mezcla hidrolizada. Cualquier otro compuesto evaluado también se añadió la cantidad correspondiente a la concentración deseada a los 100 mL de disolución A. Se dejó reposar la disolución en el baño a 37 °C durante dos minutos y seguidamente se le agregaron 100 mL de disolución B para dar inicio a la inducción de la cristalización de la BRU o de la HAP.

Tabla 2.7 Composición de la OA para los estudios cinéticos de la BRU.

Disolución A			Disolución B		
Na ₂ SO ₄ · 10H ₂ O	6,23 g/L	19,34 mM	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	4,056 g/L	26 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,46 g/L	5,92 mM	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	9,308 g/L	26 mM
NH ₄ Cl	4,64 g/L	86,75 mM	NaCl	13,05 g/L	223,31 mM
KCl	12,13 g/L	162,69 mM			
CaCl ₂	0,34g/L	8,5 mM			

Tabla 2.8 Composición de la OA para los estudios cinéticos de la HAP.

Disolución A			Disolución B		
Na ₂ SO ₄ · 10H ₂ O	6,23 g/L	19,34 mM	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	2,41 g/L	15,45 mM
NH ₄ Cl	4,64 g/L	86,75 mM	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	5,6 g/L	15,64 mM
KCl	12,13 g/L	162,69 mM	NaCl	13,05 g/L	223,31 mM
CaCl ₂	0,24g/L	6 mM			

1.4.2 Cinéticas de cristalización del ácido úrico

Para los experimentos de cristalización en disolución del ácido úrico evaluados mediante turbidimetría, la OA se preparó doble concentrada (OADC), ya que se necesitaron grandes volúmenes de disolución de los compuestos a testar (aditivos) debido a su poca solubilidad en agua. La composición de la OA es la que se muestra en la Tabla 2.9, sin la adición de calcio y oxalato para prevenir la cristalización de sales cálcicas. El pH de la OA se ajustó a 5,4 mediante la adición de HCl. Las disoluciones de los aditivos se prepararon con una concentración de 2 mM y también se filtraron.

Tabla 2.9 Composición de la OA para los ensayos de cristalización del ácido úrico.

Compuesto	g/L	mM
Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	6,23	19,34
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,46	5,93
NH ₄ Cl	4,64	86,75
KCl	12,13	162,6
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	2,41	15,45
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	5,6	15,64
NaCl	13,05	223,08

Para la realización del experimento basal se utilizó un volumen total de 200 mL, utilizando un vaso de precipitados alto, compuesto por:

- 80 mL de OADC + 80 mL de H₂O + 40 mL AU 2g/L

Según la concentración final deseada de los aditivos, las composiciones de la OA fueron las siguientes:

- **0,05 mM:** 80 mL de OADC + 75 mL de H₂O + 5 mL aditivo 2 mM + 40 mL AU 2g/L

- **0,10 mM:** 80 mL de OADC + 70 mL de H₂O + 10 mL aditivo 2 mM + 40 mL AU 2g/L
- **0,20 mM:** 80 mL de OADC + 60 mL de H₂O + 20 mL aditivo 2 mM + 40 mL AU 2g/L
- **0,40 mM:** 80 mL de OADC + 40 mL de H₂O + 40 mL aditivo 2 mM + 40 mL AU 2g/L
- **0,60 mM:** 80 mL de OADC + 20 mL de H₂O + 60 mL aditivo 2 mM + 40 mL AU 2g/L

Una vez colocada la muestra en el baño a 37 °C con agitación a 300 rpm, se dejó mezclar durante 15 minutos. Para iniciar el experimento se ajustó el pH a 4,65 mediante adición de 1,7 a 1,9 mL de HCl 0,5 M, para así inducir la sobresaturación del AU. El tiempo de inducción se definió como el punto aquel en el que la recta de la pendiente corta con el eje x (Figura 2.14). La concentración final de AU para cada experimento fue de 400 ppm.

2. Determinación de metilxantinas: participantes, intervención nutricional y muestras de orinas

2.1 Voluntarios sanos

Las muestras de orina de voluntarios se recolectaron de veinte adultos sanos (11 hombres y 9 mujeres, edad media: 37 años, rango de edad: 22 a 65 años) de Mallorca, España. Ninguno de los participantes tenía enfermedades crónicas o estaba recibiendo tratamientos farmacológicos, y ninguno era alérgico a la teobromina o al cacao/chocolate (Tabla 2.10)[117].

Tabla 2.10 Criterios de selección para los voluntarios sanos.

Criterios de inclusión	<ul style="list-style-type: none"> • mayor de edad • conformidad en participar y colaborar en el estudio
Criterios de exclusión	<ul style="list-style-type: none"> • alérgicos al cacao/chocolate o a la teobromina • embarazo, periodo de lactación (mujeres) • tratamiento farmacológico • enfermedades crónicas (diabetes, insuficiencia renal, insuficiencia cardiaca, hiperuricemia...)

Todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito. El protocolo de intervención nutricional (IB 3475/17 PI) fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación local de las Islas Baleares, España.

Se solicitó a los participantes que seleccionaran la dieta específica que deseaban seguir durante las 12 horas previas a la recolección de cada orina, con el objetivo de reducir al máximo la influencia de la dieta en la composición urinaria. La única restricción era que la dieta no podía incluir ningún producto con cacao, café o cafeína.

El primer día, cada voluntario siguió su dieta seleccionada, y se recolectó una muestra de orina de 12 horas durante la noche (comenzando a las 8:00 p.m. y terminando con la primera orina de la mañana a las 8:00 a.m.). Después de 7 días con una dieta sin restricciones (semana de blanqueo), cada voluntario repitió la misma dieta con 20 g de chocolate con leche y chocolate en polvo durante el desayuno y otros 20 g durante la cena. Se recogieron muestras de orina de 12 horas durante la noche después del consumo de cada producto de cacao. Estos productos derivados del cacao eran todos de la misma fuente comercial.

2.2 Voluntarios litiásicos

Las muestras de orinas de los pacientes litiásicos fueron obtenidas a partir de un estudio cruzado, aleatorizado, doble ciego, donde se reclutaron a 54 pacientes voluntarios (43 hombres y 11 mujeres, edad media: 60 años, rango de edad: 43 a 75 años) del Servicio de Urología del Hospital de Manacor (Islas Baleares, España) descritas en el estudio realizado por Hernández *et al.* [118,121].

2.3 Parámetros urinarios

Los principales parámetros urinarios relacionados con la litogénesis del ácido úrico determinados en las orinas de voluntarios sanos y voluntarios litiásicos fueron el pH, AU, teobromina, 3,7-dimetilúrico, 7-metilxantina y 3-metilxantina. Así, se midió el pH de las orinas con un pHmetro Crison y la concentración de AU se determinó con el método de la uricasa (SPINREACT, Ref. 1001010). La TB y sus metabolitos también se cuantificaron mediante cromatografía líquida de rendimiento ultra-alto y espectrometría de masas de alta resolución (UPLC/HRMS), como se describió anteriormente [122].

El pH urinario y la concentración de AU se usaron para determinar la sobresaturación (SS) de cada muestra. La SS se calculó como se publicó anteriormente[118], utilizando las siguientes fórmulas para la solubilidad (S) y SS del ácido úrico al pH de la muestra:

$$S = \frac{K_{sp}}{K_{a1}} \left[1 + \frac{K_{a1}}{10^{-pH} \gamma_{HU^-}} \right] \quad SS = \frac{c(H_2U)}{S}$$

siendo $c(H_2U)$ la concentración molar de AU en la muestra, y S la solubilidad de AU en moles por litro al pH de cada muestra.

La solubilidad de AU ($S = [H_2U] + [HU^-]$) es la concentración máxima de AU que se puede disolver en una disolución a un pH específico. A 37 °C, el producto de solubilidad del AU es $K_{sp} = 2,25 \times 10^{-9} \text{ mol}^2\text{L}^{-2}$ y la primera constante de disociación del AU es $K_{a1} = 4,2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ [123]. El valor del coeficiente de actividad de iones monovalentes de HU^- (γ_{HU^-}) a la fuerza iónica característica de la orina es cercano a 0,75[124]. Se utilizó el producto de solubilidad del AU dihidrato porque, aunque es más soluble que la fase anhidra, se forma primero por ser la fase cinéticamente favorecida.

2.4 Test de riesgo de cristalización del ácido úrico simplificado (RCAU-S)

La prueba de cristalización de AU simplificada (RCAU-S) se basa en el desarrollo de cristales de AU en placas de cultivo de poliestireno no tratadas (Corning, NY, EE. UU.) en las que se añaden 5 mL de orina y se deja reposar durante 24 horas a temperatura ambiente.

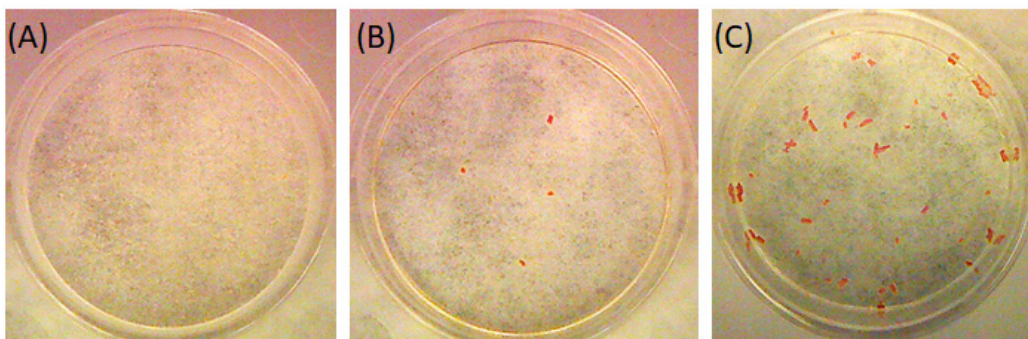


Figura 2.7 Resultados de la prueba de cristalización de AU después de la incubación de 5 mL de diferentes muestras de orina durante 24 horas. (A) Sin cristales de AU (resultado negativo); (B) y (C) Cristales de UA con el típico color naranja (resultados positivos).

Pasado este tiempo se retira la orina cuidadosamente por aspiración con una pipeta. La prueba se considera positiva cuando se han formado cristales de AU en la placa y negativa cuando la placa no contiene cristales (Figura 2.7)[125].

3. Estudio cristalográfico

Las características morfológicas y estructurales de los cristales formados en disolución se examinaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, Hitachi S-3400N) junto con el microanálisis dispersivo de energía RX (Bruker AXS XFlash Detector 4010) mediante la recogida de una alícuota de la disolución al terminar el experimento. Posteriormente, se depositaron en un porta muestras con cinta adhesiva para evitar su desplazamiento. Todas las muestras se lavaron con agua Mili-Q para eliminar los residuos de OA y evitar la formación de cristales de NaCl y KCl. Después de lavarlas, se dejaron secar durante un día a temperatura ambiente y se observaron en el SEM sin ninguna otra preparación.

4. Análisis estadístico

Se utilizaron gráficos de normalidad para evaluar las distribuciones de datos. Los datos se presentaron como medias y errores estándar de las medias (SEM). Los efectos de los compuestos en la cristalización del OxCa, BRU, HAP y AU se compararon usando una ANOVA de un factor con la prueba post hoc de Bonferroni para la comparación de más de dos grupos, y la T-student para la comparación entre dos grupos independientes. Para las variables no paramétricas independientes se utilizó la prueba de Mann Whitney para la comparación de grupos. Un p-valor de dos colas inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS versión 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

Resultados

1. Estudios cinéticos de cristalización cálcica

1.1 Determinación semicuantitativa de los InsP mediante espectrometría de masas

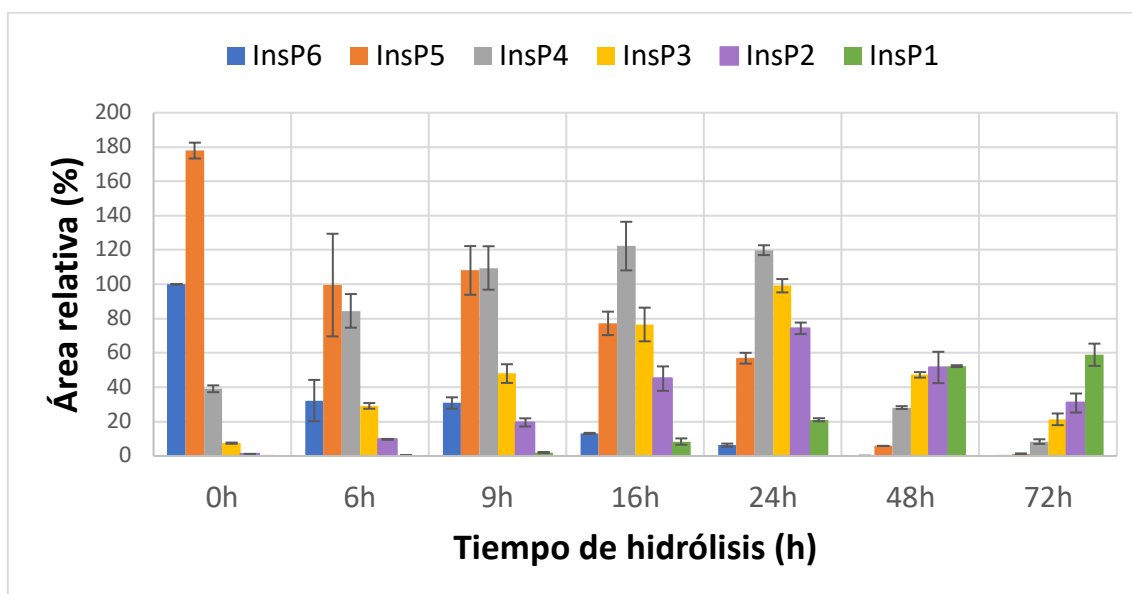


Figura 2.8 Señal del espectrómetro de masas de los seis InsP después de diferentes tiempos de hidrólisis (de 0 a 72 horas) en porcentaje respecto a la señal de InsP6 a las 0 horas de hidrólisis (100%). El nivel absoluto de InsP6 a las 0 horas de hidrólisis era de 2 μ M, el cual fue indetectable a las 48 y 72 horas de hidrólisis.

En la Figura 2.8 se muestran los niveles relativos de los distintos InsP en porcentaje respecto a la señal de InsP6 a las 0 horas de hidrólisis para los distintos tiempos de hidrolizado. Las mediciones del espectrómetro de masas de la disolución de fitato (InsP6) recién preparada antes de la hidrólisis (0 horas en la Figura 2.8) indicaron que se detectó principalmente como InsP5, siendo la señal correspondiente a InsP6 la mitad de la de InsP5. La hidrólisis del InsP6 durante diferentes tiempos en medio ácido (pH 2) provocó cambios en los niveles de los seis InsP. Así, a las 6 horas de hidrólisis, el nivel de InsP6 se redujo a alrededor de un tercio de su valor inicial. El InsP5 e InsP4 representaron mayores porcentajes del total, y hubo mayores niveles de InsP3 e InsP2. A las 9 horas de hidrólisis, la concentración de los niveles de InsP4, InsP3 e InsP2 fueron ligeramente superiores. A las 16 horas de hidrólisis, el nivel de InsP6 era mucho más bajo siendo la especie predominante el InsP4. A las 24 horas de hidrólisis los niveles de InsP4 se mantuvieron, decreciendo los del InsP6 e InsP5, y aumentando mucho los del InsP3, InsP2 e InsP1. A las 48 horas de hidrólisis se produce una gran disminución de los niveles de InsP5, InsP4, aumentando los del InsP1. A las 72 h, la especie predominante

fue InsP1, seguida de InsP2, InsP3 e InsP4. InsP6 fue indetectable desde las 48 horas de hidrólisis.

1.2 Determinación de los InsP individuales mediante el método colorimétrico AIXO

La extracción y posterior cuantificación de las muestras de InsP obtenidos comercialmente con una concentración conocida permitieron evaluar si el método colorimétrico era capaz también de detectar InsP de menor grado de fosforilación, así como su eficacia.

Tabla 2.11 Resultados de absorbancia y concentración de cada InsP obtenido mediante la recta patrón del InsP6.

Muestra	Abs 550 nm	Conc. (μM)	Media	SEM
InsP5 (1)	0,879	7,799	7,745	0,069
	0,893	7,608		
	0,877	7,827		
InsP5 (2)	0,879	7,799	7,777	0,045
	0,876	7,841		
	0,887	7,690		
InsP4 (1)	0,880	7,786	7,818	0,039
	0,881	7,772		
	0,872	7,896		
InsP4 (2)	0,859	8,078	8,130	0,033
	0,851	8,191		
	0,856	8,120		
InsP3 (1)	1,423	1,977	2,005	0,015
	1,417	2,028		
	1,419	2,011		
InsP3 (2)	1,412	2,070	1,971	0,050
	1,429	1,926		
	1,430	1,917		
InsP2 (1)	1,675	0,006	0,158	0,088
	1,657	0,137		
	1,665	0,078		
	1,620	0,410		
InsP2 (2)	1,614	0,454	0,218	0,103
	1,658	0,129		
	1,666	0,071		
	1,684	<0,000		

Las concentraciones de Ins-1,2,3,5,6-P5, Ins-2,3,5,6-P4, Ins-1,4,5-P3 e Ins-2,4-P2 obtenidas usando el InsP6 como patrón se recogen en la Tabla 2.11. Para el Ins-1,2,3,5,6-

P5 e Ins-2,3,5,6-P4 observamos una concentración menor de la esperada. El grado de recuperación del método ronda el 70 % [80], por lo que teniendo en cuenta que la concentración inicial era de 2,9 μM y que mediante la extracción la muestra se reconcentra cinco veces (14,5 μM), la concentración esperada es de 10,15 μM . Todas las muestras referidas al patrón del InsP6 mostraron valores inferiores, siendo los del Ins-1,4,5-P3 e Ins-2,4-P2 entre 5 y 50 veces menores (respectivamente) que la concentración esperada.

Tabla 2.12 Resultados de absorbancia y concentración de cada InsP obtenidos mediante la recta patrón de cada InsP individual.

Muestra	Abs. 550 nm	Conc. (μM)	Media	SEM
InsP5 (1)	0,801	9,573	9,540	0,019
	0,805	9,507		
	0,803	9,540		
InsP5 (2)	0,879	7,799	7,777	0,045
	0,876	7,841		
	0,887	7,690		
InsP4 (1)	0,749	9,994	10,041	0,026
	0,746	10,047		
	0,744	10,083		
InsP4 (2)	0,743	10,101	10,101	0,021
	0,745	10,065		
	0,741	10,137		
InsP3 (1)	1,258	5,355	5,583	0,119
	1,244	5,636		
	1,238	5,758		
InsP3 (2)	1,292	4,684	4,974	0,242
	1,287	4,782		
	1,253	5,455		
InsP2 (1)	1,495	0,026	0,805	0,492
	1,512	<0,000		
	1,557	<0,000		
	1,511	<0,000		
	1,423	1,583		
InsP2 (2)	1,457	0,838	2,096	0,460
	1,360	3,012		
	1,385	2,437		
	1,512	<0,000		
	1,519	<0,000		
	1,647	<0,000		

En cambio, cuando se refirieren las absorbancias de cada InsP individual a su propia recta patrón (Anexo 1) se obtuvieron las concentraciones recogidas en la Tabla 2.12. Se observó que para el Ins-1,2,3,5,6-P5 e Ins-2,3,5,6-P4 al obtener las concentraciones mediante sus rectas patrón sí que se obtuvieron concentraciones más cercanas al valor esperado. Por otro lado, aunque las concentraciones de Ins-1,4,5-P3 e Ins-2,4-P2 fueron mayores, aun distaban de la concentración esperada.

1.3 Determinación de InsP y de fosfato inorgánico de las muestras de InsP6 hidrolizadas a distintos tiempos (0 a 72 horas) utilizadas para las cinéticas de cristalización

Para cada uno de los estudios cinéticos (OxCa, BRU y HAP) se preparó una disolución madre de fitato (2 mM) a partir de la cual se obtuvieron los hidrolizados de 6, 9, 16, 24, 48 o 72 horas. Una vez terminados los estudios, se unificaron los valores de InsP y PPI de las distintas alícuotas obtenidas en los distintos procesos de hidrólisis (Figura 2.9)

El nivel de InsP total de las alícuotas sometidas a diferentes tiempos de hidrólisis utilizadas en las cinéticas cálcicas se muestran en la Figura 2.9 A. En la muestra no hidrolizada de InsP6 a una concentración de 2 mM, donde el nivel de InsP6 total era el mayor (Figura 2.8), se detectó un nivel de InsP de 1,39 mM (cuyos valores se corresponden al InsP6). Para estas muestras la concentración de PPI fue nula (Figura 2.9 B). La muestra hidrolizada de 6 horas contuvo un nivel de InsP de 1,19 mM y un nivel de fosfato libre de 1,06 mM. Las muestras hidrolizadas de 48 y 72 horas presentaron detección de InsP aunque a muy bajas concentraciones (0,32 y 0,06 mM respectivamente) a pesar de la ausencia de InsP6 y de la baja cantidad de InsP5 en las mezclas hidrolizadas (Figura 2.8). Así, a medida que va aumentando el tiempo de hidrólisis, se observa como disminuye el nivel de InsP y aumenta el nivel de iones de fosfato en las muestras utilizadas para el estudio cinético de la BRU.

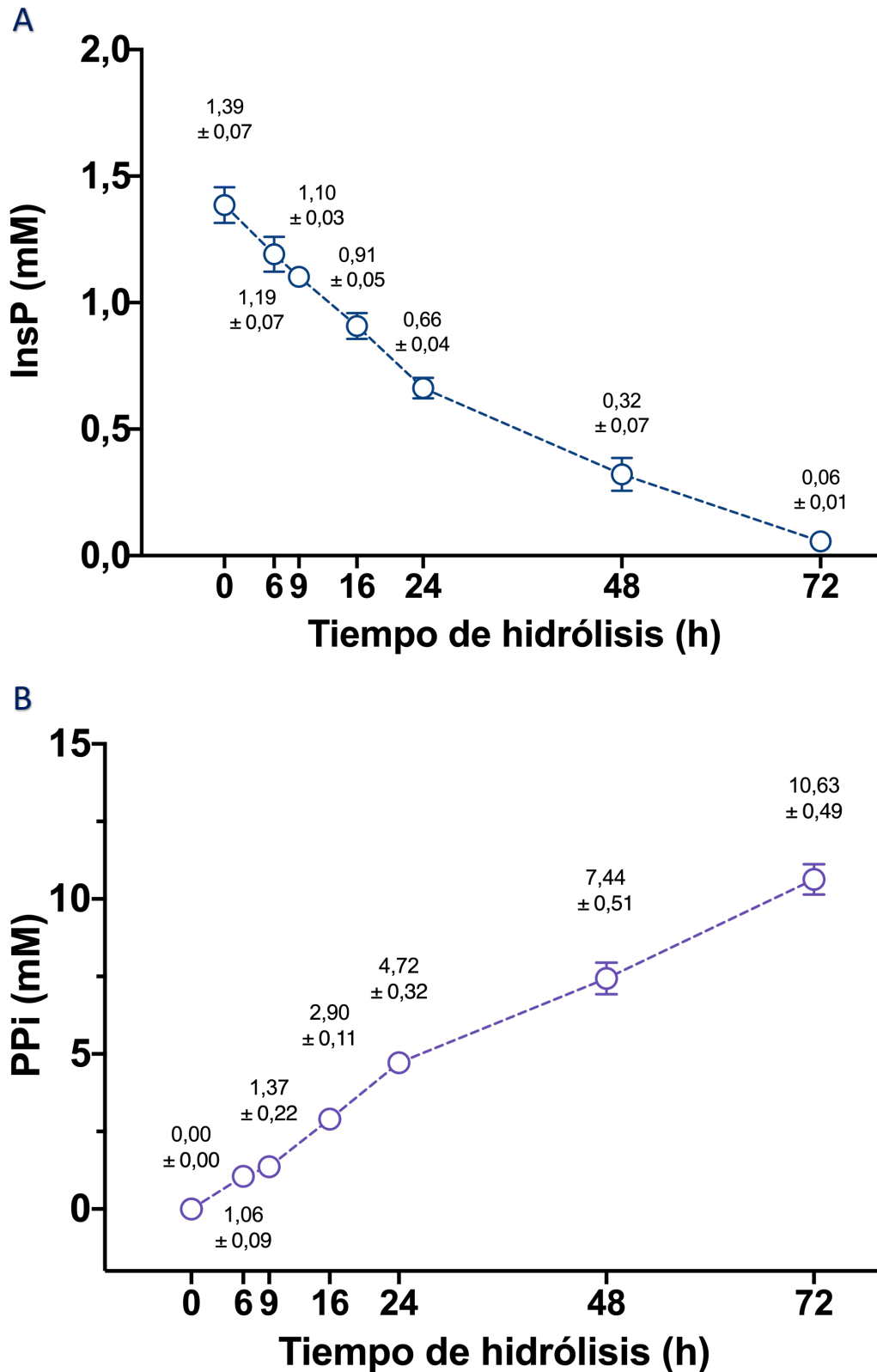


Figura 2.9 Media de la concentración \pm SEM de A) InsP y B) PPi de la mezcla de hidrolizados obtenida en cada uno de los tiempos de hidrólisis (de 0 a 72 horas) e utilizados en los estudios cinéticos del OxCa, BRU y HAP.

1.4 Cinéticas de cristalización del oxalato cálcico

En la Figura 2.10 se observan los efectos de los diferentes compuestos estudiados en la cristalización del OxCa. Para una concentración de 2 μM de InsP6 y sus hidrolizados (Figura 2.10 A, marcadores azules), la máxima capacidad de inhibición se dio en ausencia de hidrólisis y, por lo tanto, cuando está el InsP6 puro (Δt_i de 19 minutos), mientras que a medida que aumentó el tiempo de hidrólisis su actividad inhibidora disminuyó.

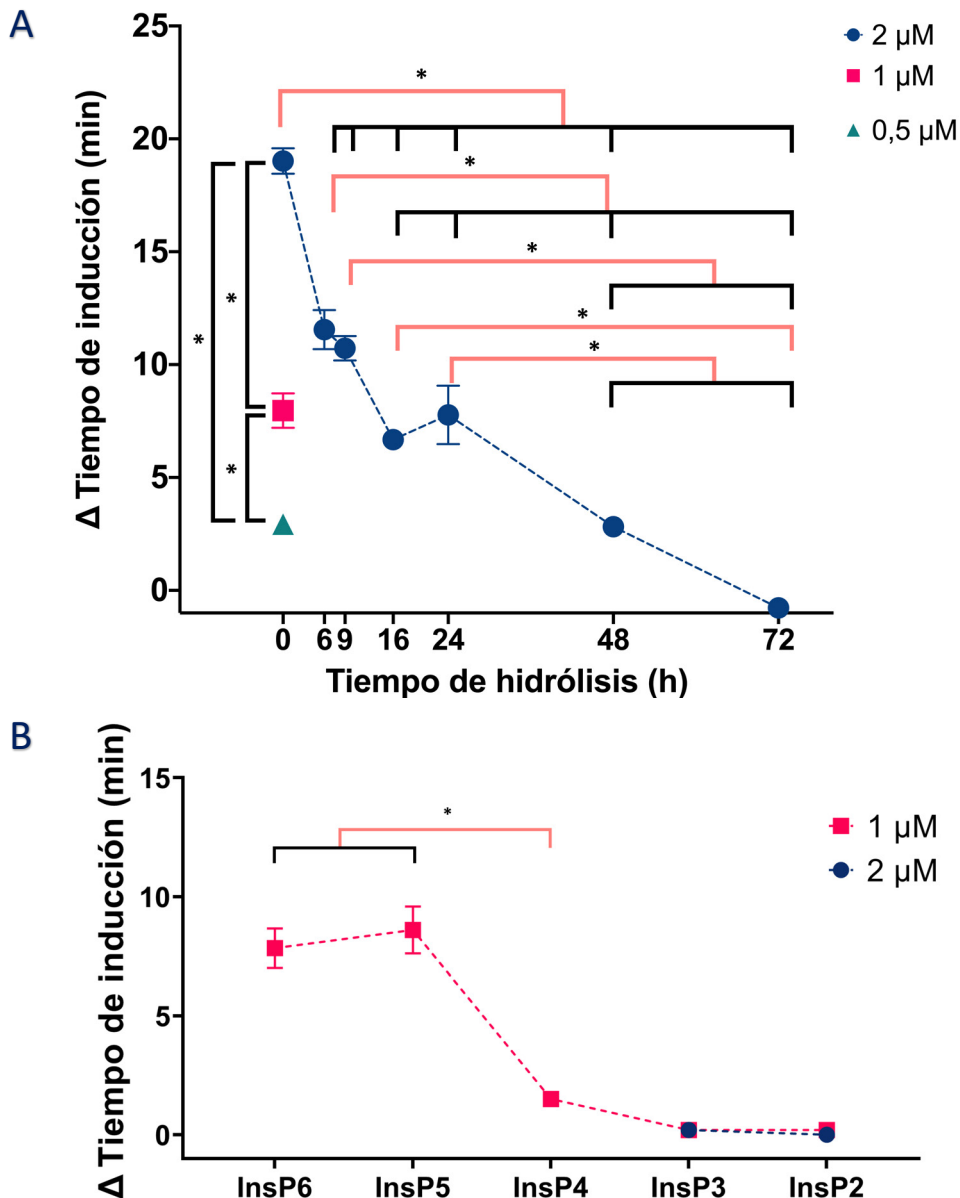


Figura 2.10 Incremento del tiempo de inducción de la cristalización del OxCa por parte de A) InsP6 a distintas concentraciones y sus hidrolizados (de 6 a 72 horas), B) del InsP6, Ins-1,2,3,5,6-P5, Ins-2,3,5,6-P4, Ins-1,4,5-P3 e Ins-2,4-P2 a las concentraciones indicadas. * Diferencias significativas con un p-valor<0,05 mediante ANOVA de un factor con prueba posthoc de Bonferroni.

Aun así, la mezcla de hidrolizados encontrados después de 6 (Δt_i de 14 minutos), 9 (Δt_i de 11 minutos), 16 (Δt_i de 7 minutos) y 24 (Δt_i de 8 minutos) horas de hidrólisis también presentaron un efecto inhibitor claro. Además, el efecto del hidrolizado a 16 y 24 horas fue similar al del InsP6 sin hidrolizar a una concentración de 1 μM (Figura 2.10 A, marcador rosa, Δt_i de 8 minutos).

Finalmente, la mezcla de hidrolizados después de 48 horas de hidrólisis (Δt_i de 3 minutos) presentó una actividad similar al InsP6 sin hidrolizar a una concentración de 0,5 μM (marcador verde, Δt_i de 3 minutos), mientras que a las 72 horas de hidrólisis la capacidad inhibitor de la mezcla es nula y significativamente menor que los hidrolizados de 0 a 24 horas. En cuanto al InsP6 sin hidrolizar (0 horas), se observó que a medida que aumentaba su concentración en disolución (de 0,5 μM a 1 y 2 μM), aumentó significativamente su capacidad de inhibición de la cristalización del OxCa.

Por otro lado, si se compara la actividad de los InsP individuales obtenidos comercialmente (Figura 2.10 B) se observa que el Ins-1,2,3,5,6-P5 presentó una capacidad de inhibición equivalente a la del InsP6, mientras que la del Ins-2,3,5,6-P4 fue significativamente menor. Finalmente, el Ins-1,4,5-P3 e Ins-2,4-P2 no presentaron capacidad inhibitor de la cristalización del OxCa ni al doble de la concentración de los demás InsP.

Tabla 2.13 Efecto de los distintos bisfosfonatos y del citrato en el tiempo necesario para inducir la cristalización de CaOx.

	Δt_i (min)
Alendronato (2 μM)	1
Pamidronato (2 μM)	1
Ibandronato (2 μM)	1
Etidronato (2 μM)	0,6
Citrato (250 ppm)	1,8

Por otro lado, el Alendronato, Pamidronato, Ibandronato, Etidronato (2 μM) y Citrato (250 ppm) tampoco presentaron efectos relevantes en la cristalización del OxCa (Tabla 2.13).

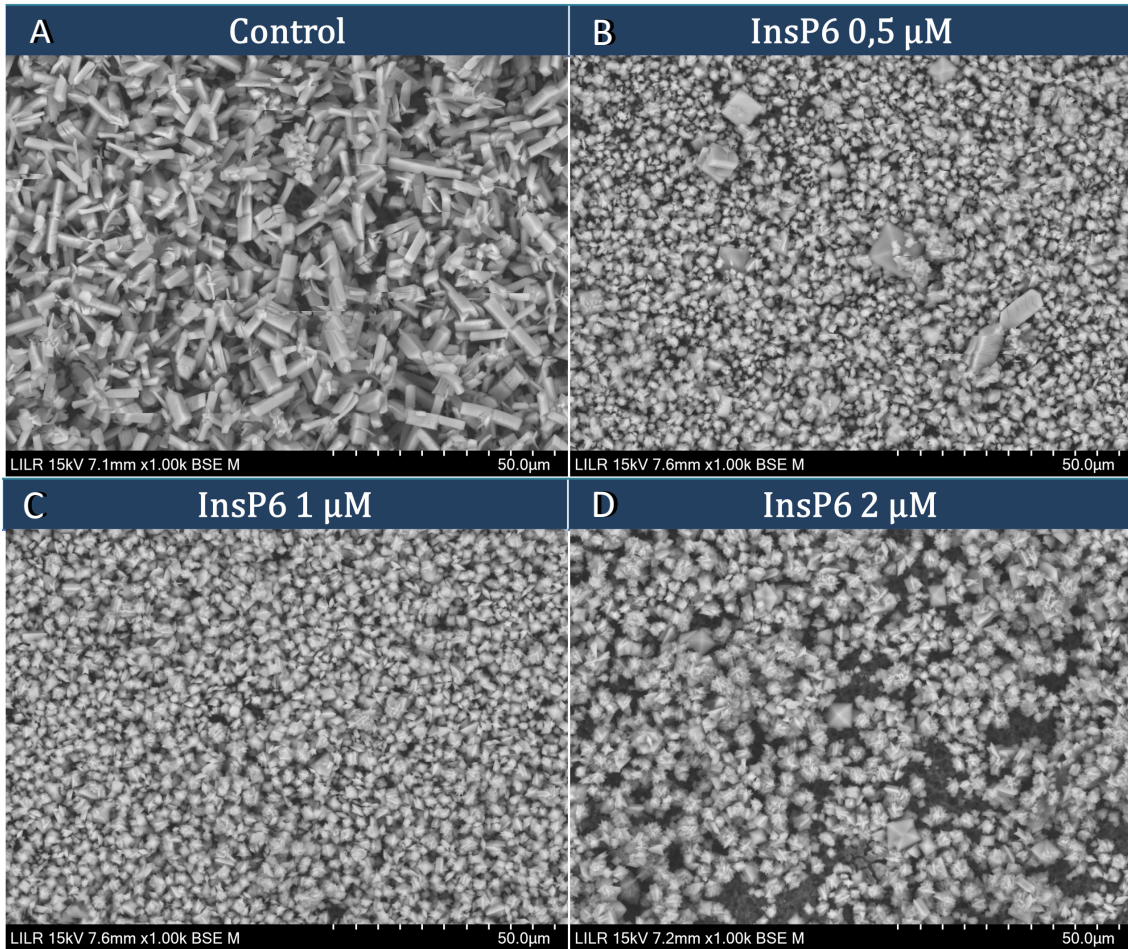


Figura 2.11 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cristales de OxCa obtenidos después de cada cinética testando el InsP6 sin hidrolizar (0 horas) a distintas concentraciones: A) 0 (Sin adiciones), B) 0,5 μM , C) 1 μM y D) 2 μM .

Los efectos del InsP6 a distintas concentraciones en la morfología de los cristales OxCa obtenidos después de cada cinética se muestran en la Figura 2.11. En ausencia de aditivos (control, Figura 2.11 A) la tipología predominante fue de COT con COM minoritario. Por otro lado, en presencia de InsP6 a una concentración de 0,5 μM (Figura 2.11 B), el cual presentó un efecto inhibitor reducido (Figura 2.10 A), aparecieron cristales de COD, aunque aún se pudieron observar algunos cristales de COT. En presencia de InsP6 a concentraciones de 1 μM y 2 μM (Figura 2.11 C y D respectivamente) el COT desapareció totalmente y solo se formó COD juntamente con COM.

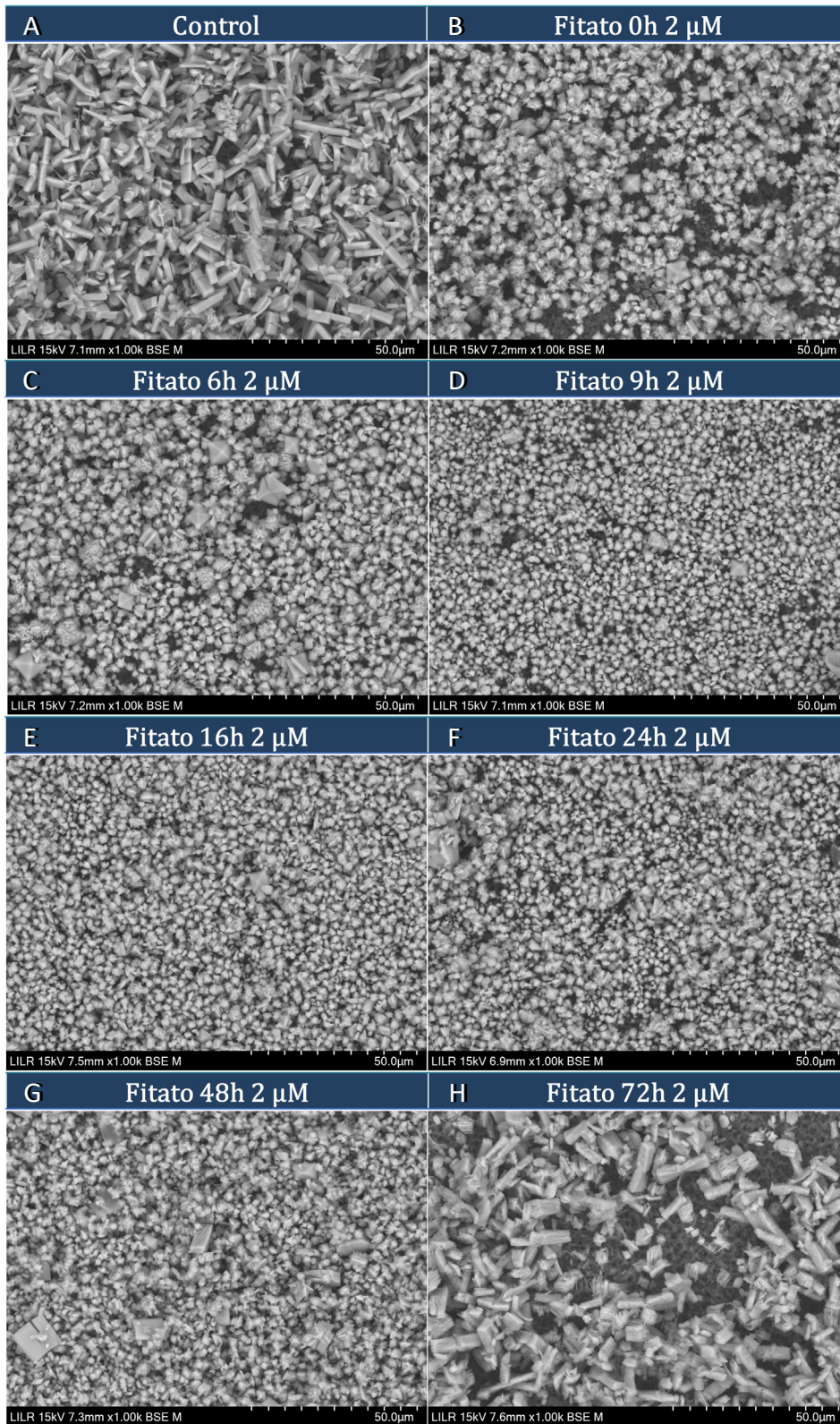


Figura 2.12 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cristales de OxCa obtenidos después de cada cinética testando el InsP6 hidrolizado a diferentes tiempos (de 0 a 72 horas). A) Control (sin adiciones), B) InsP6 sin hidrolizar (0h), C) InsP6 hidrolizado durante 6 horas, D) InsP6 hidrolizado durante 9 horas, E) InsP6 hidrolizado durante 16 horas, F) InsP6 hidrolizado durante 24 horas, G) InsP6 hidrolizado durante 48 horas y H) InsP6 hidrolizado durante 72 horas.

En cuanto al efecto de la presencia del InsP6 sin hidrolizar e hidrolizado a una concentración 2 μM en la morfología y estructura cristalina, se observó que en el control (sin adiciones, Figura 2.12 A) predominó la presencia de cristales de COT y COM.

En cambio, en presencia de InsP6 sin hidrolizar e hidrolizado de 6 hasta 24 horas (Figura 2.12, B-F), dejó de formarse cristales de COT y en su lugar se formaron cristales de COD juntamente con COM. En presencia del InsP6 hidrolizado durante 48 horas (Figura 2.12 G) volvió a cristalizar el COT, aunque aún se pudiera observar presencia de cristales de COD, como pasó con el InsP6 sin hidrolizar a una concentración de 0,5 μM (Figura 2.11 B). Finalmente, en presencia de InsP6 hidrolizado durante 72 horas (Figura 2.12 H) se vuelve a observar la misma morfología cristalina encontrada en el control: COT y COM.

En la Figura 2.13 se recogen las imágenes de los cristales de OxCa obtenidos en presencia de los distintos InsP de manera individual en disolución. Como se había observado anteriormente, en el control (sin adiciones, Figura 2.13 A) solo aparece COT y COM, mientras que en presencia de InsP6 e Ins-1,2,3,5,6-P5 a una concentración 1 μM (Figura 2.13 B y C) se forman cristales de COD, coincidiendo que son los dos que tuvieron el mayor efecto en la inhibición de la cristalización del OxCa (Figura 2.10 B).

Aun así, resulta extraño encontrar presencia de COT en las alícuotas obtenidas después de testar el Ins-1,2,3,5,6-P5, ya que ejerció un nivel de inhibición parecido al InsP6 (Figura 2.10 B) y al de los hidrolizados de 16 y 24 horas (Figura 2.10 A), los cuales solo presentaron cristales COD y COM en sus alícuotas (Figura 2.12 E y F).

Finalmente, los InsP que no ejercieron efecto inhibitor en la cristalización del OxCa (Ins-2,3,5,6-P4, Ins-1,4,5-P3 e Ins-2,4-P2) en ninguna de las concentraciones estudiadas (Figura 2.10 B) solo presentaban cristales de COT y COM, igual que el control (Figura 2.13 D-H).

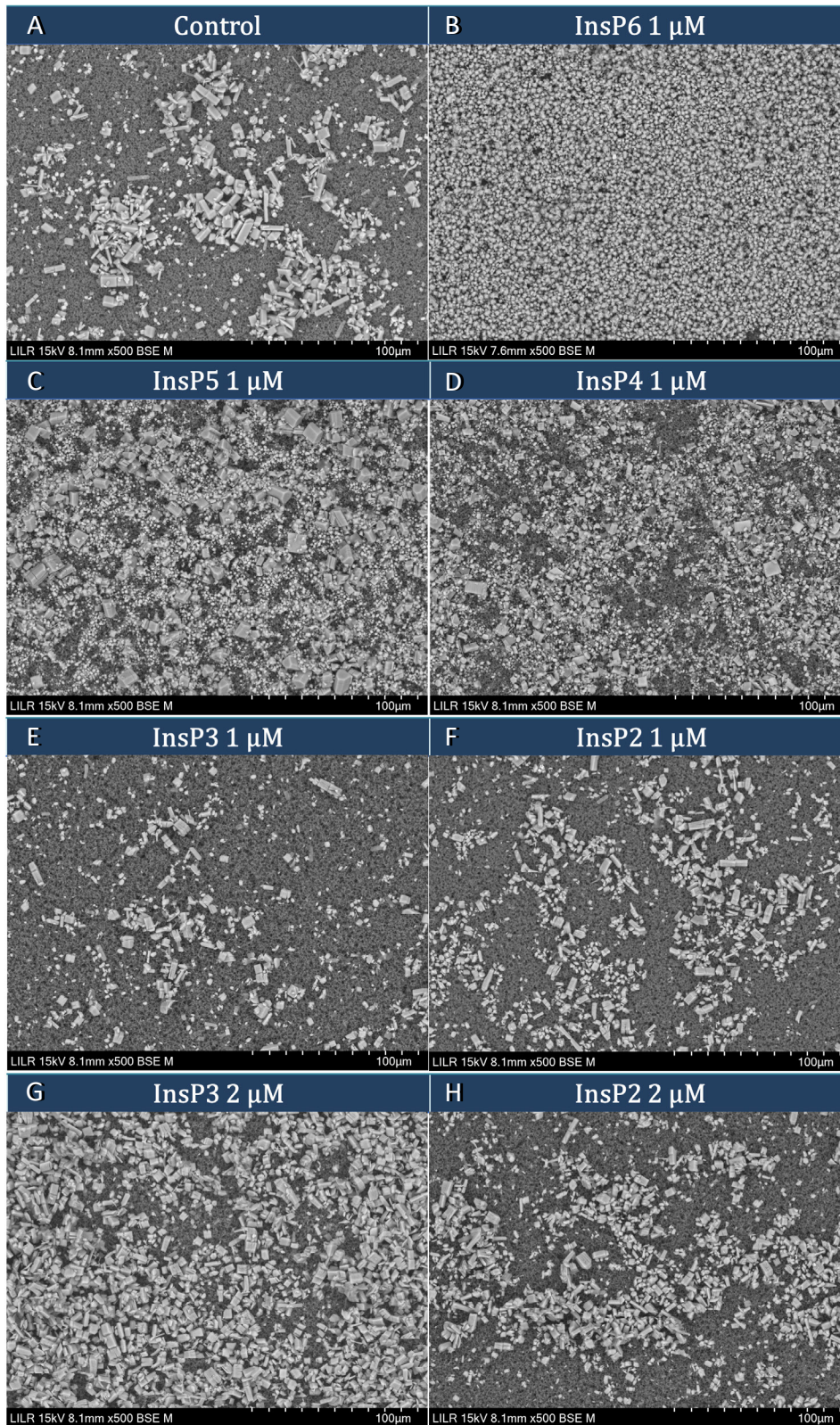


Figura 2.13 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cristales de OxCa obtenidos después de cada cinética testando los distintos InsP individuales. A) Control (sin adiciones), B) InsP6 a una concentración de 1 µM, C) Ins-1,2,3,5,6-P5 a una concentración de 1 µM, D) Ins-2,3,5,6-P4 a una concentración de 1 µM, E) Ins-1,4,5-P3 a una concentración de 1 µM, F) Ins-2,4-P2 a una concentración de 1 µM, G) Ins-1,4,5-P3 a una concentración de 2 µM y H) Ins-2,4-P2 a una concentración de 2 µM.

En presencia de alendronato (Figura 2.14 B), pamidronato (Figura 2.14 C), etidronato (Figura 2.14 D), ibandronato (Figura 2.14 E) y de citrato (Figura 2.14 F), los cuales no mostraron un efecto inhibitor relevante en la cristalización del OxCa (Tabla 2.13), los cristales obtenidos después de las turbidimetrías fueron en su totalidad de COT y COM. Por lo tanto, no se produjo una modificación en la morfología cristalina en comparación al experimento control (Figura 2.14 A).

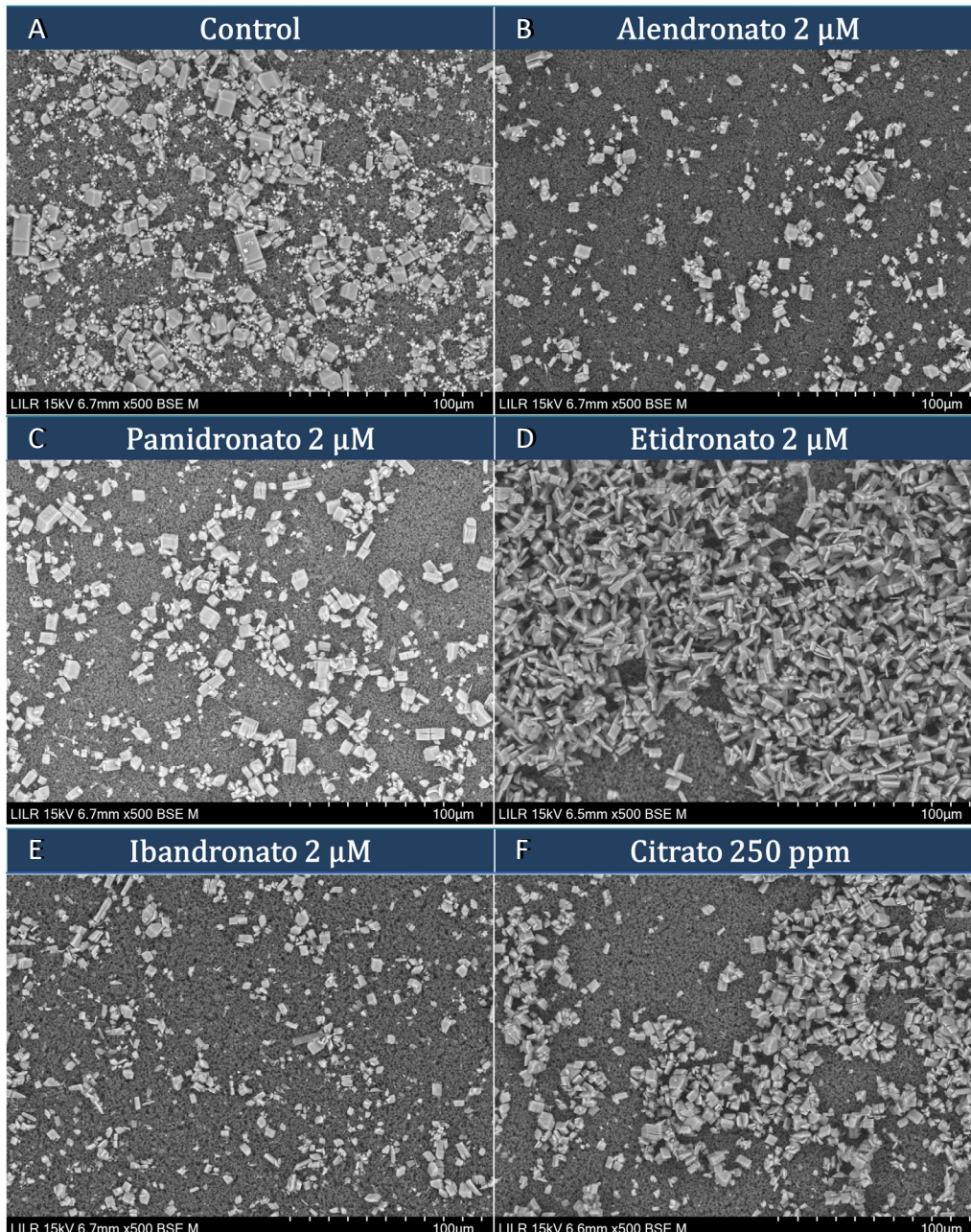


Figura 2.14 Imágenes de microscopia electrónica de barrido de los cristales de OxCa obtenidos después de cada cinética A) Control (sin adiciones), B) Alendronato a una concentración de 2 μM , C) Pamidronato a una concentración de 2 μM , D) Etidronato a una concentración de 2 μM , E) Ibandronato a una concentración de 2 μM y F) Citrato a una concentración de 250 ppm.

1.5 Cinéticas de cristalización de la brushita

En el estudio de la cristalización cinética de la BRU en disolución se observó que para el InsP6 sin hidrolizar (0 horas) una mayor concentración se tradujo en un aumento significativo del incremento del tiempo de inducción, siendo Δt_i de 0,40, 1,57, y 4,74 minutos para una concentración de InsP6 de 0,5, 1 y 2 μM respectivamente (Figura 2.15 A).

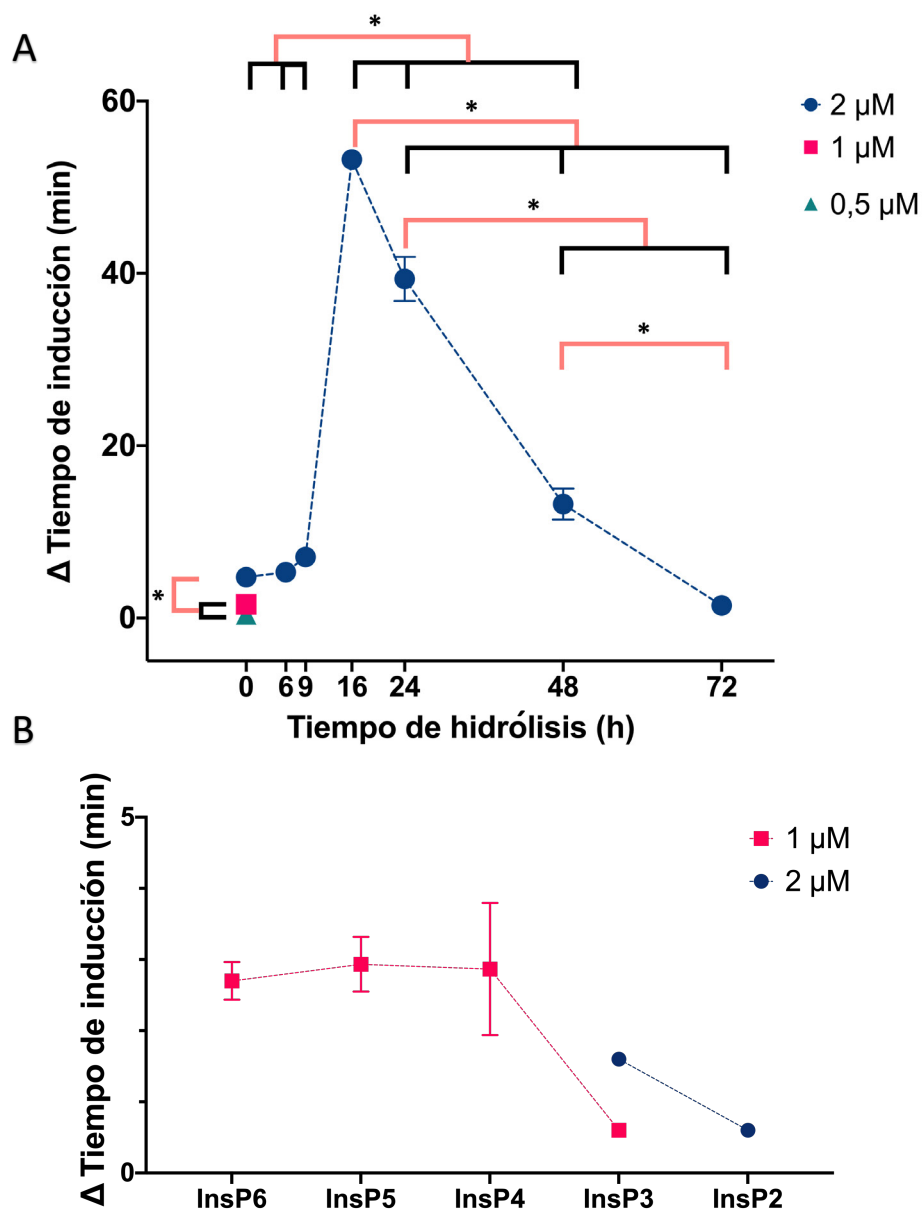


Figura 2.15 Incremento del tiempo de inducción de la cristalización de la BRU A) por parte del InsP6 a distintas concentraciones y sus hidrolizados (de 6 a 72 horas) B) por parte del InsP6, Ins-1,2,3,5,6-P5, Ins-2,3,5,6-P4, Ins-1,4,5-P3 e Ins-2,4-P2 a las concentraciones indicadas. * Diferencias significativas con un p -valor $< 0,05$ mediante ANOVA de un factor con prueba posthoc de Bonferroni.

Aun así, esta capacidad de inhibición por parte del InsP6 resultó bastante reducida, ya que a una concentración 2 μM no superó los cinco minutos de incremento del tiempo de inducción de la cristalización de la BRU.

En cuanto a los efectos del InsP6 hidrolizado a distintos tiempos (de 0 a 72 horas) (Figura 2.15 A) se observó que los hidrolizados a 6 y 9 horas ejercieron el mismo efecto que el InsP6 sin hidrolizar (0 horas) (Δt_i de entre 5-7 minutos). En cambio, al aumentar el tiempo de hidrólisis a 16 horas el incremento del tiempo de inducción aumentó significativamente, retrasando la cristalización hasta 53 minutos, siendo este valor de incremento del tiempo de inducción para la cristalización de la BRU el más elevado de todos los hidrolizados. Los hidrolizados a tiempos posteriores (24, 48 y 72 horas), presentaron menores efectos inhibitorios a medida que aumentó el tiempo de hidrólisis de la muestra de insP6. El hidrolizado de 24 horas fue el segundo en presentar los mayores efectos inhibitorios en la cristalización de la BRU, aumentando el tiempo de inducción hasta casi 40 minutos. Aunque el hidrolizado de 48 horas también presentó un efecto relevante (Δt_i de 13 minutos), al llegar a las 72 horas de hidrólisis la actividad inhibidora cae, teniendo los mismos efectos que el InsP6 sin hidrolizar (0 horas) a una concentración de 1 μM (Δt_i de 1,5 minutos).

También se evaluaron los efectos de los InsP de manera individual (Figura 2.15 B). El Ins-2,3,5,6-P4 e Ins-1,2,3,5,6-P5 incrementaron el tiempo de inducción de la cristalización de la BRU al mismo nivel que el InsP6 para una concentración de 1 μM (Media Δt_i de 2,9, 2,9 y 2,7 minutos respectivamente). A esta misma concentración el Ins-1,4,5-P3 no mostró efectos (Δt_i de 0,6 minutos), mientras que a una concentración de 2 μM incrementó un poco su efecto (Media Δt_i de 1,6). El Ins-2,4-P2 al doble de concentración, 2 μM , tampoco mostró efectos significativos (Δt_i de 0,6 minutos).

Los cristales obtenidos después de probar el insP6 sin hidrolizar (0 horas) a una concentración de 0,5, 1 y 2 μM (Figura 2.16 B, C y D, respectivamente) fueron en su totalidad BRU, sin producirse cambios en la morfología u organización en comparación al control (sin adiciones, Figura 2.16 A). Todos los cristales exhibieron una forma plana con una morfología de tipo cuchilla y una organización aparentemente homogénea.

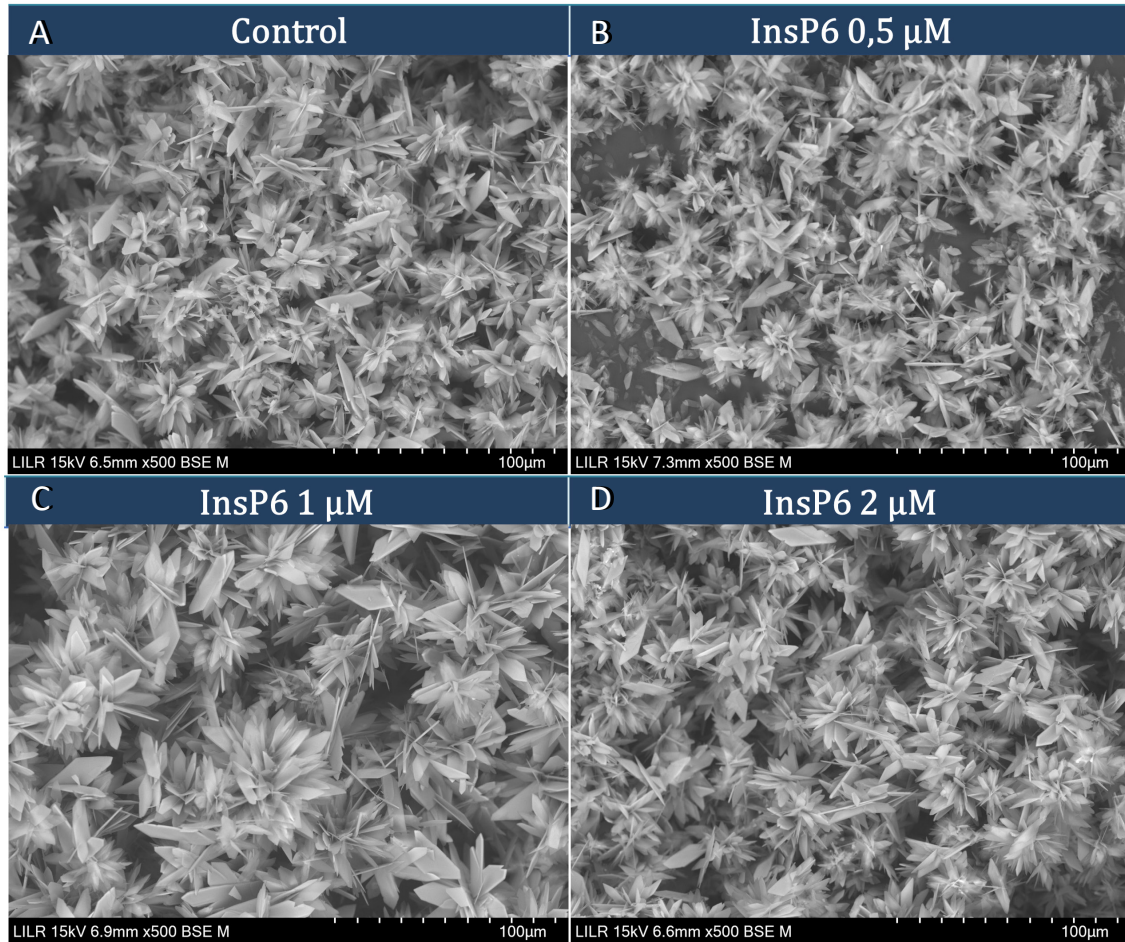


Figura 2.16 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cristales de BRU obtenidos después de cada cinética testando el InsP6 sin hidrolizar (0 horas) a distintas concentraciones: A) Control (Sin adiciones), B) 0,5 μM , C) 1 μM y D) 2 μM .

Los cristales obtenidos después de llevar a cabo las cinéticas de cristalización, en las cuales se evaluaron los efectos de las muestras de InsP6 hidrolizado a distintos tiempos (de 0 a 72 horas) eran en su totalidad de BRU (Figura 2.17). Estos cristales tenían una estructura plana con forma de cuchilla, con algunos bordes dentados. Aunque muchos de ellos tenían núcleos comunes, se observó un mayor nivel de organización y estructuración en los obtenidos después de testar las alícuotas de 16 y 24 horas (Figura 2.17 E y F). La característica más particular de estos cristales y que los distingue a simple vista de los cristales de las demás alícuotas es su organización bien delimitada en forma de flor.

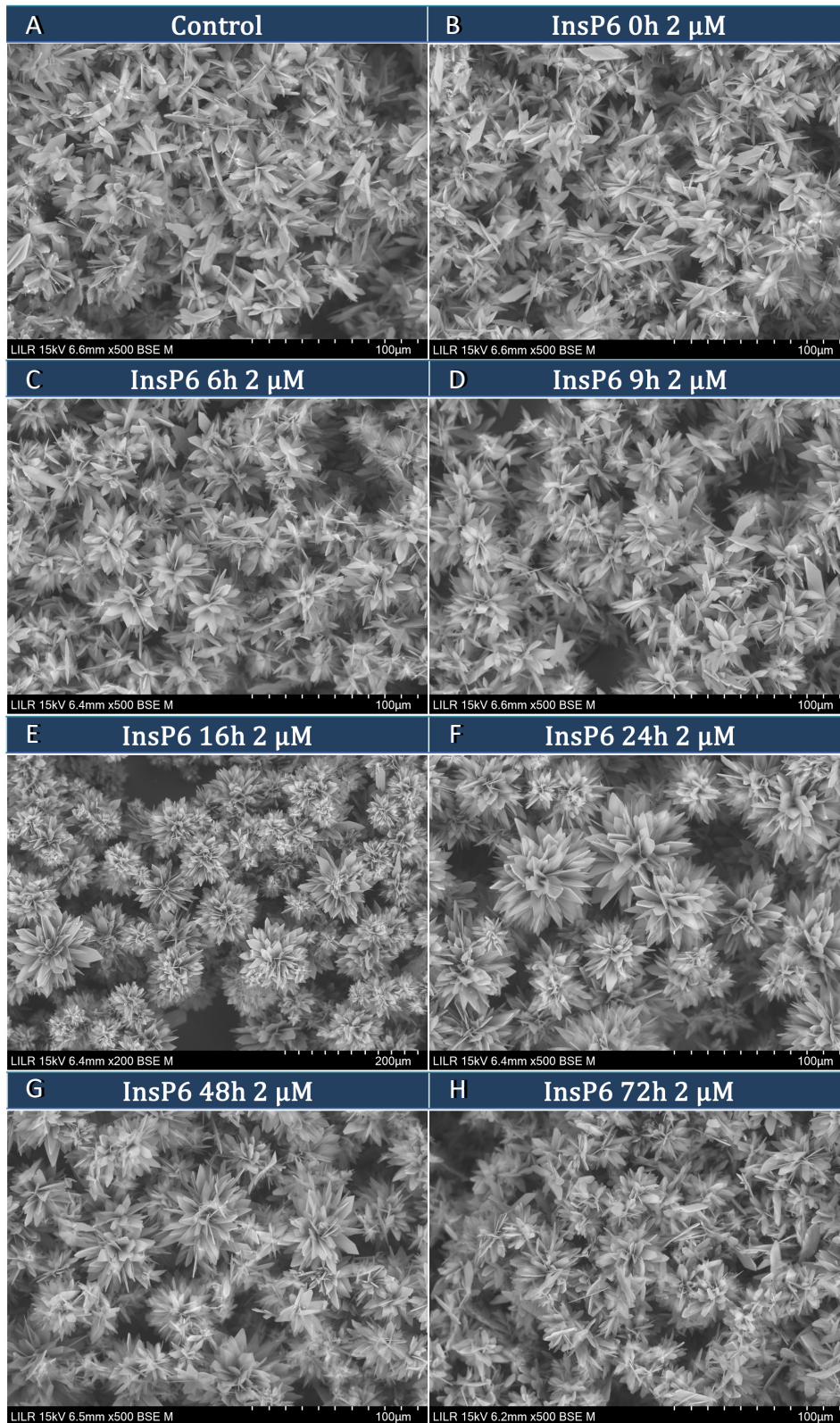


Figura 2.17 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cristales de BRU obtenidos después de cada cinética testando el InsP6 hidrolizado a diferentes tiempos (de 0 a 72 horas). A) Control (sin adiciones), B) InsP6 sin hidrolizar (0h,) C) InsP6 hidrolizado durante 6 horas, D) InsP6 hidrolizado durante 9 horas, E) InsP6 hidrolizado durante 16 horas, F) InsP6 hidrolizado durante 24 horas, G) InsP6 hidrolizado durante 48 horas y H) InsP6 hidrolizado durante 72 horas.

Los cristales obtenidos después de evaluar el efecto del hidrolizado de 48 horas (Figura 2.17 G) también presentaron una estructura y organización más definida en comparación a los cristales obtenidos de los experimentos en presencia de los hidrolizados restantes (0, 6, 9 y 72 horas; Figura 2.17 A, C, D y H respectivamente). Los cristales de estos últimos, aunque muchos compartieron núcleo, tuvieron una organización más caótica y parecida a la de los cristales obtenidos del experimento control (sin adiciones, Figura 2.17 A). Este fenómeno coincidió con el hecho de que estas muestras presentaron una menor capacidad de inhibición de la cristalización de la BRU (Figura 2.15 A).

Los cristales de BRU obtenidos después de evaluar los InsP individuales (Figura 2.18), no mostraron diferencias morfológicas ni organizativas, ni entre ellos ni en comparación al control (Figura 2.18 A). Esto incluye los cristales obtenidos tras estudiar el InsP6 (Figura 2.17 B), Ins-1,2,3,5,6-P5, Ins-2,3,5,6-P4 e Ins-1,4,5-P3 a una concentración de 1 μ M (Figura 2.18 B, C y D, respectivamente), así como el Ins-1,4,5-P3 e Ins-2,4-P2 a una concentración de 2 μ M (Figura 2.18 E y F, respectivamente). Todos los cristales presentaban una morfología plana en forma de cuchilla, formando núcleos cristalinos poco organizados.

Los efectos de los bifosfonatos y el citrato en el tiempo de inducción de la cristalización de la BRU se representan en la Figura 2.19. El alendronato y pamidronato a una concentración 2 μ M presentaron una capacidad de inhibir la cristalización de la BRU importante (Media Δt_i de 17,5 y 13,4 minutos respectivamente), y que fue significativamente mayor en comparación a la reducida inhibición que presentaron el ibandronato y fitato (Media Δt_i de 5,3 y 4,7 minutos respectivamente, Figura 2.19). Por otro lado, el etidronato presentó efectos intermedios (Media Δt_i de 8,5 minutos). Finalmente, el citrato a una concentración de 250 ppm aumentó significativamente el tiempo de inducción de la BRU al mismo nivel que el alendronato (Media Δt_i de 17,4 minutos).

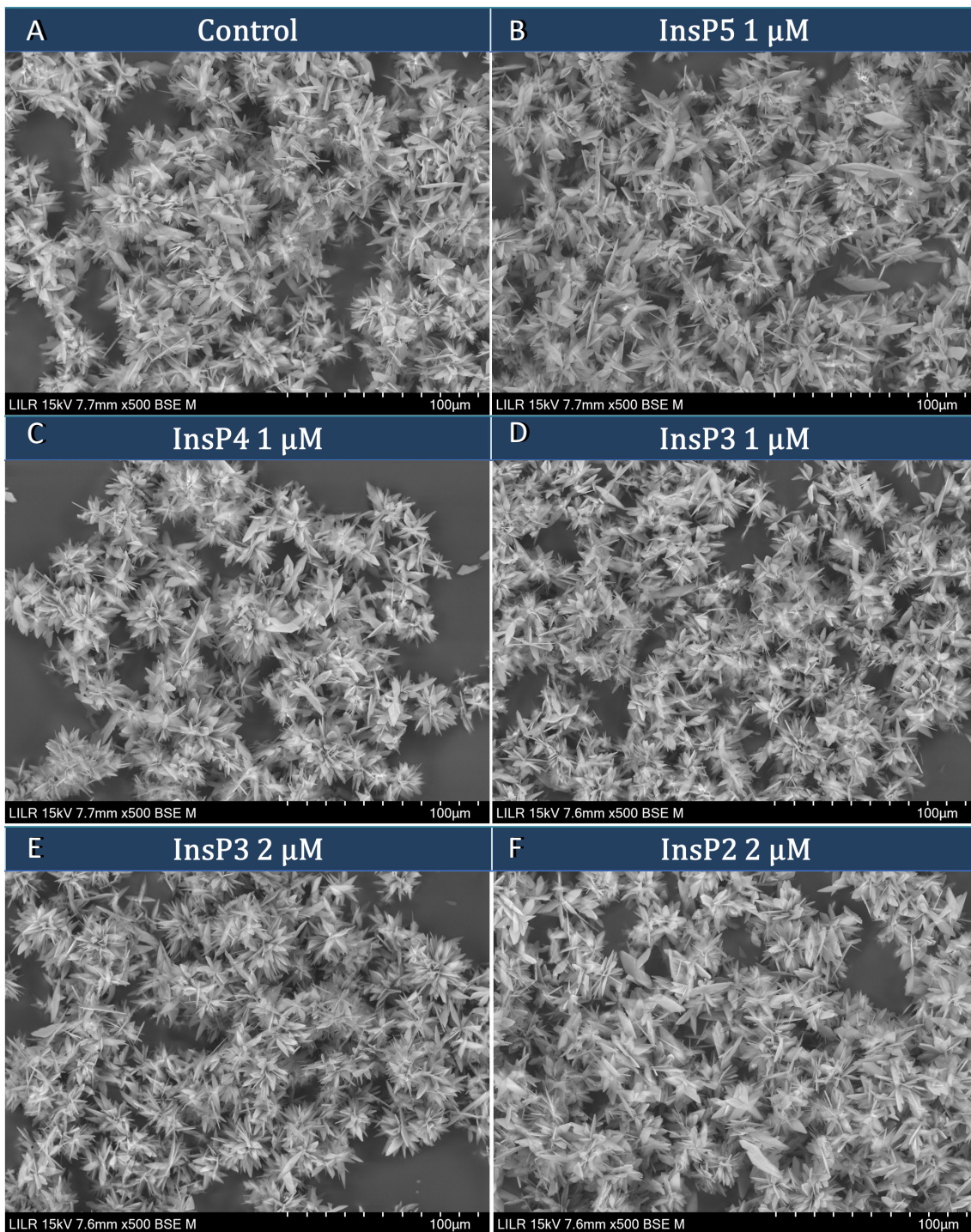


Figura 2.18 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cristales de BRU obtenidos después de cada cinética testando los distintos InsP individuales. A) Control (sin adiciones), B) Ins-1,2,3,5,6-P5 a una concentración de 1 μM, C) Ins-2,3,5,6-P4 a una concentración de 1 μM, D) Ins-1,4,5-P3 a una concentración de 1 μM, E) Ins-1,4,5-P3 a una concentración de 2 μM y F) Ins-2,4-P2 a una concentración de 2 μM.

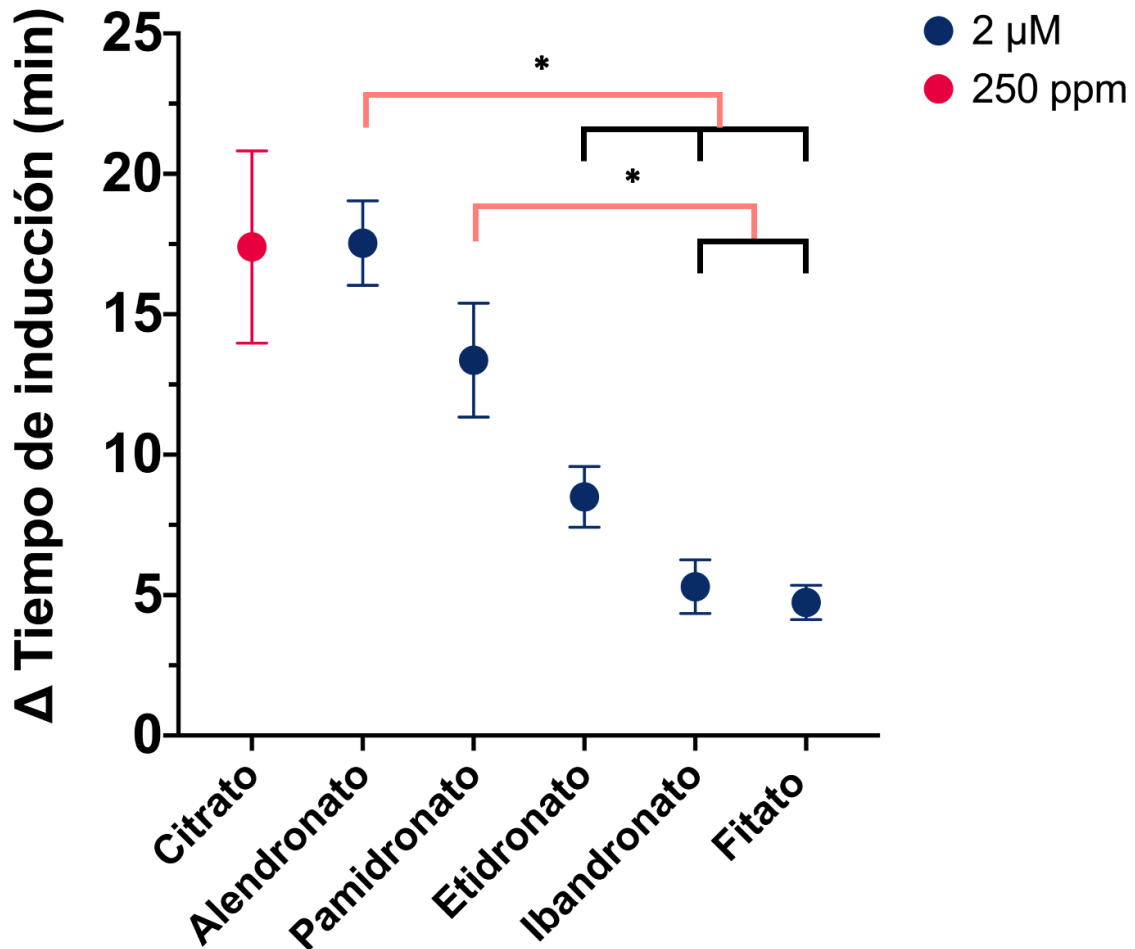


Figura 2.19 Incremento del tiempo de inducción de la cristalización de la BRU por parte de los diferentes bifosfonatos y el citrato a las concentraciones indicadas. * Diferencias significativas con un p-valor < 0,05 mediante ANOVA de un factor con prueba posthoc de Bonferroni.

En cuanto a la morfología de los cristales obtenidos de los experimentos en presencia de bifosfonatos y citrato (Figura 2.20), no se apreciaron efectos evidentes entre los distintos bifosfonatos usados (Figura 2.20 B, C, D y E), y el control (sin adiciones, Figura 2.20 A). Todos presentaron una organización similar con cristales de BRU pequeños, planos y en forma de cuchilla. En el caso del citrato (Figura 2.20 F), el cual produjo también un incremento en el tiempo de inducción de la cristalización de la BRU importante (Δt_i de 17,4 minutos, Figura 2.19) sí se observaron diferencias en la morfología de los cristales de BRU. En lugar de ser planos, estos cristales eran delgados, gruesos y alargados, algunos con terminaciones puntiagudas y otras más planas.

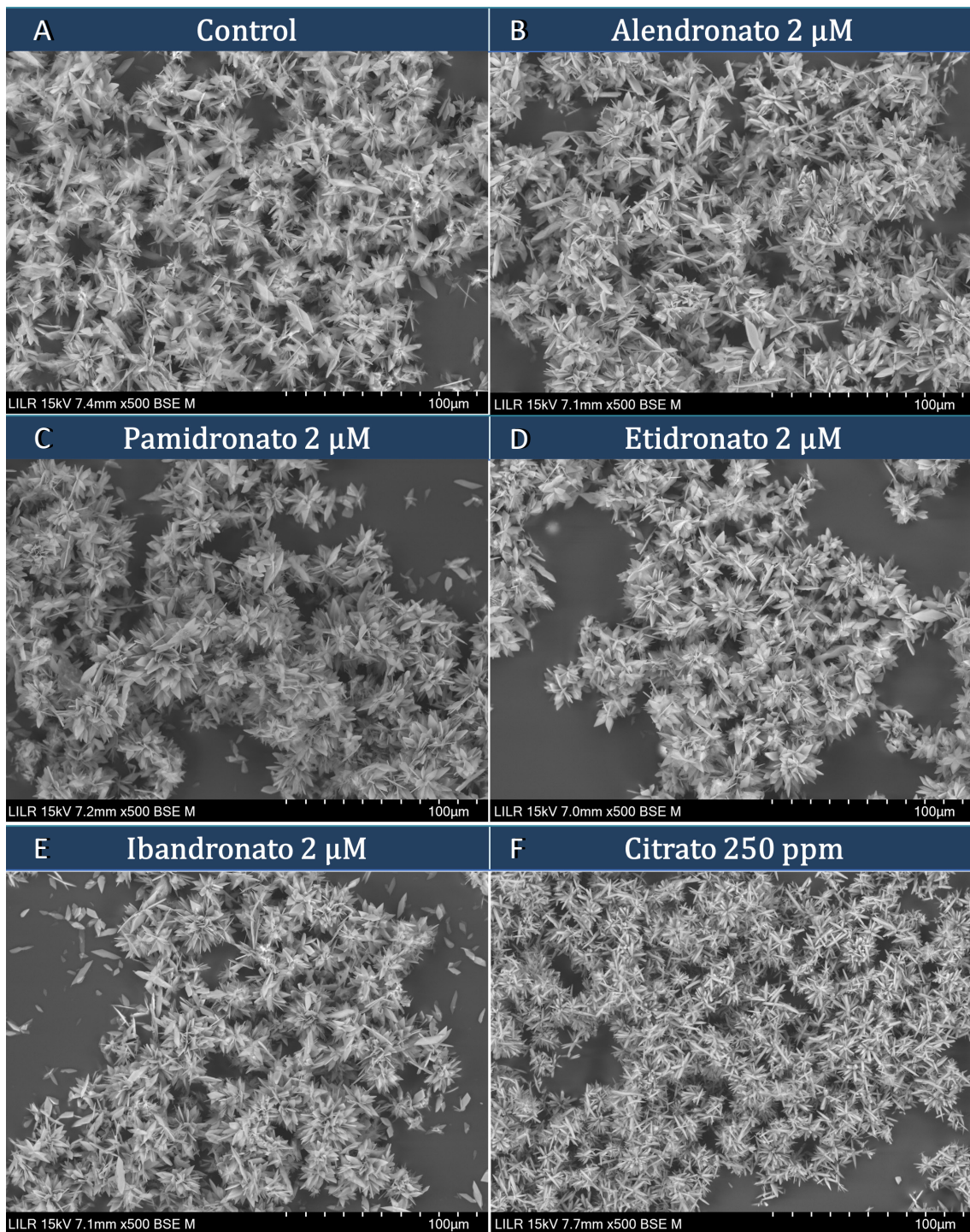


Figura 2.20 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cristales de BRU obtenidos después de cada cinética A) Control (sin adiciones), B) Alendronato a una concentración de 2 μM , C) Pamidronato a una concentración de 2 μM , D) Etidronato a una concentración de 2 μM , E) Ibandronato a una concentración de 2 μM y F) Citrato a una concentración de 250 ppm.

1.6 Cristalización de la hidroxiapatita

1.6.1 Optimización de las cinéticas de cristalización fosfocálcica

A continuación, se describen las diversas condiciones evaluadas, junto con los resultados obtenidos tanto de las curvas de las cinéticas de cristalización como de las imágenes de microscopía electrónica de las muestras recolectadas después de cada cinética durante el proceso de optimización de la cristalización cinética de la HAP.

Al estar buscando unas condiciones donde cristalizara solamente HAP, la OA utilizada para los siguientes experimentos no contuvo ni magnesio ni oxalato. Las disoluciones de A y B utilizadas se encuentran descritas en la Tabla 2.14. Del calcio se añadió la cantidad necesaria para obtener la concentración deseada a partir de una disolución madre 1 M. Para aquellos experimentos donde solo se probó una concentración de calcio, este se añadió en la disolución A. En los experimentos donde se probaron distintas concentraciones de calcio, este se añadió directamente a los 200 mL de OA finales, momento en el cual se indujo la cristalización y se inició el experimento.

Tabla 2.14 Composición de la OA para la cristalización cinética fosfocálcica.

Disolución A								
Na ₂ SO ₄ · 10H ₂ O	6,23 g/L		19,34 mM					
NH ₄ Cl	4,64 g/L		86,75 mM					
KCl	12,13 g/L		162,69 mM					
Disolución B								
	482 ppm P		800 ppm P		990 ppm P		1053 ppm P	
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	2,4 g/L	15,45 mM	4,06 g/L	26 mM	4,98 g/L	32 mM	5,46 g/L	35 mM
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	5,6 g/L	15,64 mM	9,31 g/L	26 mM	11,44 g/L	32 mM	12,52 g/L	35 mM
NaCl	13,05 g/L		223,31 mM					

El objetivo de la optimización fue lograr la cristalización única de la HAP en las condiciones más favorables para la actuación de posibles inhibidores de su cristalización, es decir, donde su sobresaturación pudiera ser más baja y que continuase sin cristalizar BRU. Con el propósito de lograr este objetivo, se realizaron ajustes en las concentraciones de fósforo, calcio y el valor de pH, con la finalidad de identificar condiciones que propiciaran únicamente la cristalización de la HAP.

1.6.1.1 Condiciones de cristalización: 482 ppm P, 170 ppm Ca y distintos pHs

Para este propósito, se inició el proceso con una concentración inicial de 482 ppm de fósforo y 170 ppm de calcio, valores idénticos a los empleados en el estudio de formación de depósitos sobre secciones de tygon (Capítulo 3). A partir de esta base, se procedió a ajustar el pH, comenzando en 6,65 y progresando sucesivamente a 6,70 y finalmente a 6,75.

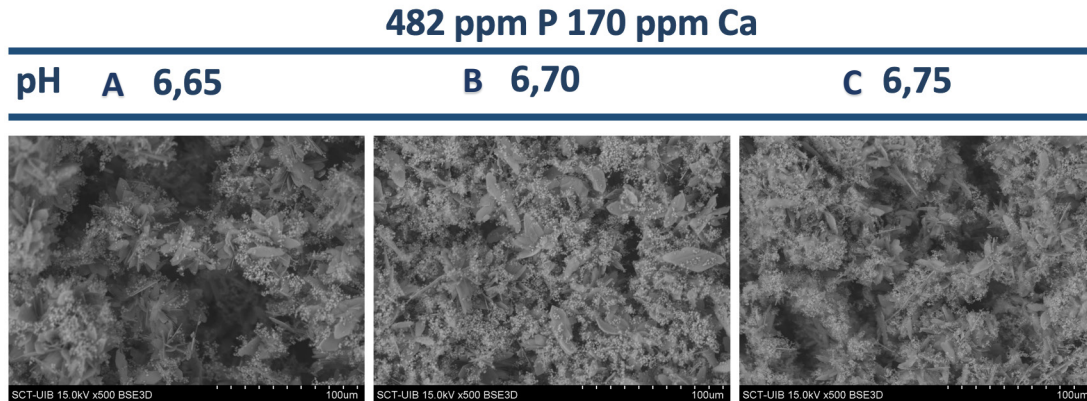


Figura 2.21 Imágenes de microscopia electrónica de barrido de los cristales obtenidos después de cada cinética a pH A) 6,65, B) 6,70 y C) 6,75, para una concentración de 482 ppm de fósforo y 170 ppm de calcio. En los distintos pH se observó una gran cantidad de cristales tanto de BRU como de HAP.

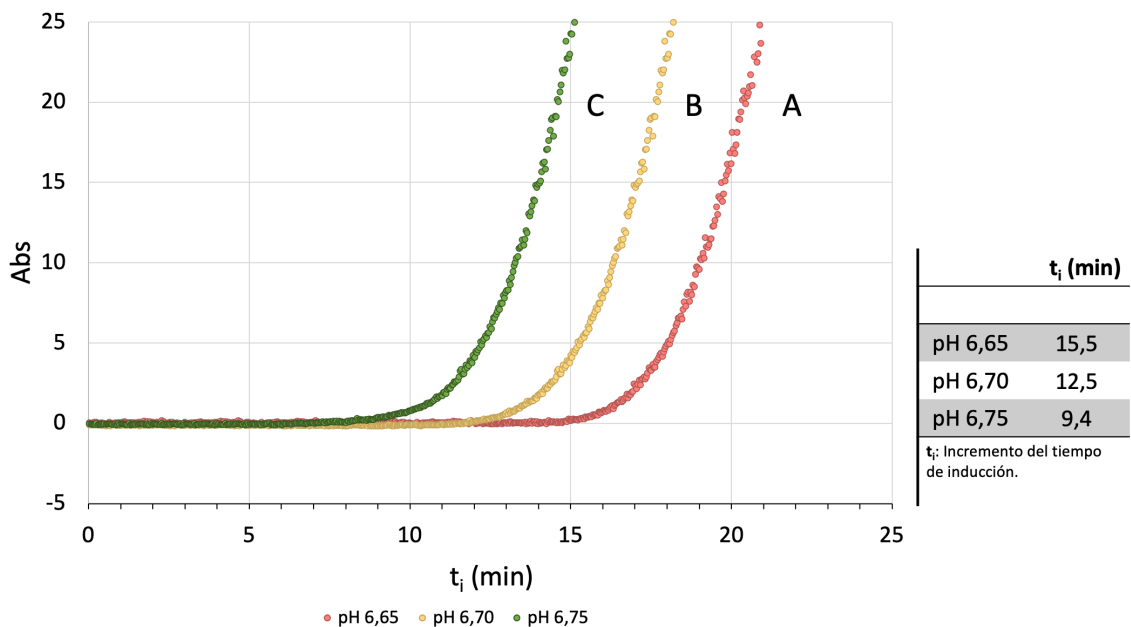


Figura 2.22 Curvas de las cinéticas de la cristalización de CaP para una concentración de 482 ppm de fósforo y 170 ppm de calcio a distintos pHs: A)6,65, B)6,70 y C) 6,75.

Las imágenes de microscopia electrónica de los cristales recogidos después de cada cinética mostraron que tanto a pH 6,65 (Figura 2.21 A), como 6,70 (Figura 2.21 B) y 6,75 (Figura 2.21 C) se formó una mezcla de abundante de cristales de HAP y BRU. Por otro lado, a medida que aumentó del pH, menor fue el tiempo de inducción de la cristalización fosfocálcica, siendo de 15,5 minutos para un pH de 6,65 (Figura 2.22 A), 12,5 minutos para un pH de 6,70 (Figura 2.22 B) y 9,4 minutos para una pH 6,75 (Figura 2.22 C).

1.6.1.2 Condiciones de cristalización: 800 ppm P, 170 ppm Ca y pH 6,5

Al observar una mezcla de BRU y HAP en las condiciones anteriores (Figura 2.21), se aumentó la concentración del fósforo de la muestra hasta 800 ppm, manteniendo la cantidad de calcio (170 ppm) y un pH de 6,5. En estas condiciones, las imágenes de microscopia electrónica de barrido mostraron una gran cantidad de BRU con HAP minoritario (Figura 2.23). En la Figura 2.24 se muestra el t_i para cuatro réplicas en estas condiciones, siendo la media de 5,18 minutos.

800 ppm P 170 ppm Ca pH 6,5



Figura 2.23 Imagen de microscopia electrónica de barrido de los cristales obtenidos después de la cinética a pH 6,5, para una concentración de 800 ppm de fósforo y 170 ppm de calcio. Se observó una gran cantidad de BRU con HAP minoritario.

Al ser la media del t_i de las réplicas del control aproximadamente 5 minutos, y al aparecer HAP minoritario juntamente con BRU, se utilizaron estas condiciones experimentales para llevar a cabo el estudio de la cinético de la BRU, añadiendo magnesio en la OA para evitar esta formación minoritaria de HAP.

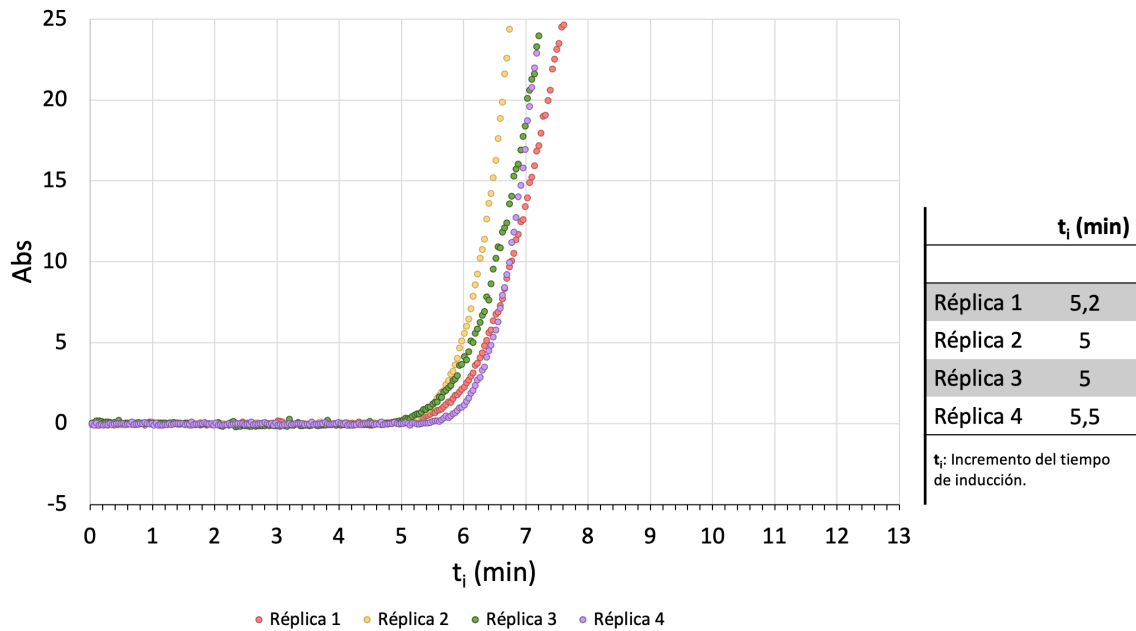


Figura 2.24 Réplicas de la cinética de la cristalización de CaP para una concentración de 800 ppm de fósforo y 170 ppm de calcio a pH 6,5.

1.6.1.3 Condiciones de cristalización: 1053 ppm P, pH 6,7 y distintas concentraciones de Ca

Al observar que para una menor concentración de P (482 ppm) y a un pH 6,7-6,75 se formó una gran cantidad de BRU y HAP (Figura 2.21 B y C, respectivamente), y al ver que aumentando la concentración hasta 800 ppm de P pero con un pH de 6,5 se encontró mayoritariamente BRU (Figura 2.23), se incrementó la concentración de P hasta 1053 ppm a un pH 6,7, estudiando el efecto de distintas concentraciones de calcio.

Las imágenes de microscopia electrónica mostraron que para una concentración de 80 y 100 ppm de calcio en estas condiciones se formaron solamente cristales de BRU (Figura 2.25 A y B, respectivamente). En cambio, a una concentración de 120 y 150 ppm de calcio de vuelve a producir una mezcla con grandes cantidades de BRU y HAP (Figura 2.25 C y D, respectivamente). Finalmente, para una concentración de calcio de 170 ppm se produjo una mezcla con abundante HAP y BRU minoritario.

Por lo tanto, a medida que aumentó la concentración de calcio, desde 80 hasta 170 ppm, mayor fue la cantidad de HAP observada y menor la cantidad de BRU (Figura 2.25).

1053 ppm P pH 6,7

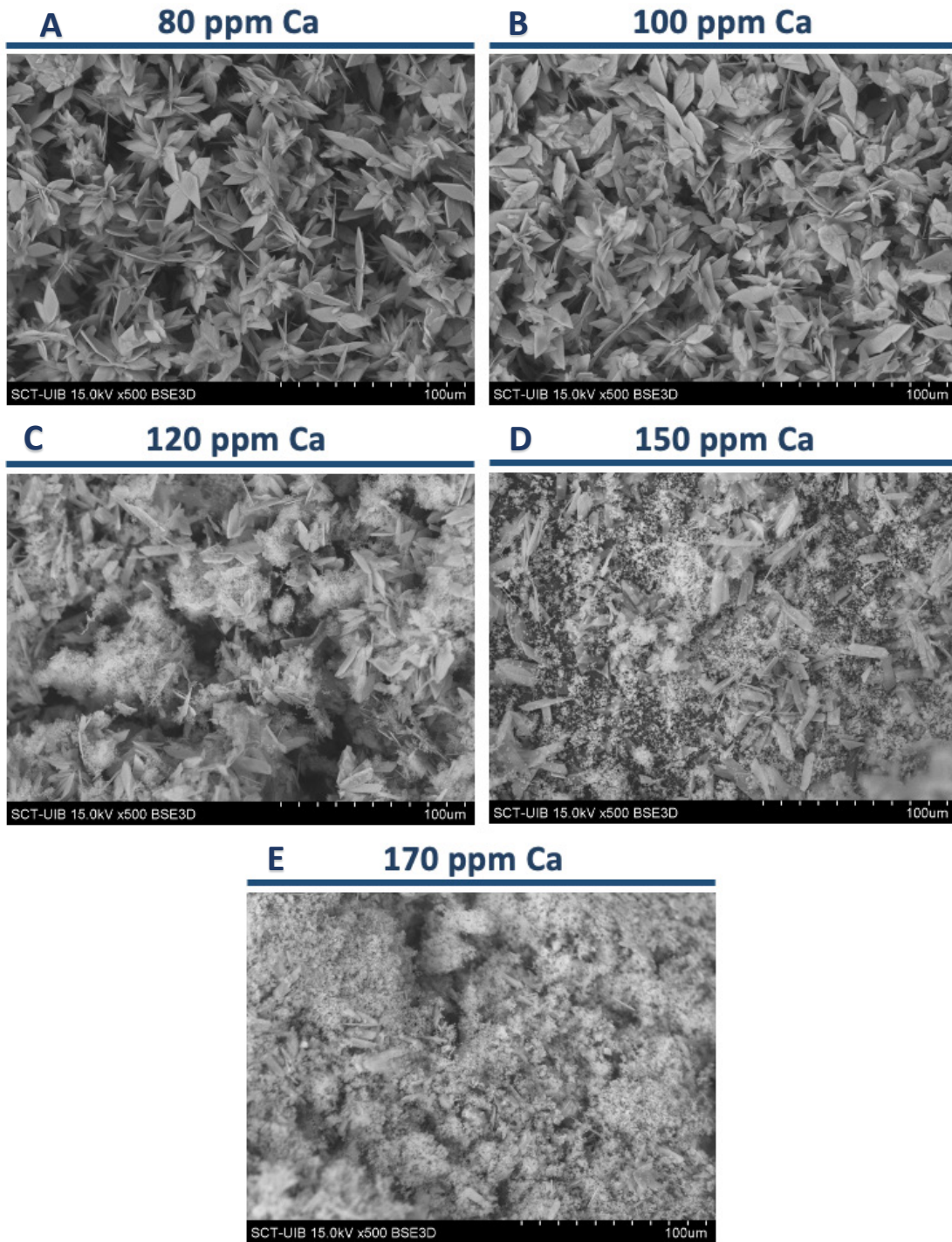


Figura 2.25 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cristales obtenidos después de cada cinética a una concentración de 1053 ppm de fósforo a un pH 6,7, para distintas concentraciones de calcio de A) 80 ppm, B) 100 ppm, C) 120 ppm, D) 150 ppm y E) 170 ppm.

Por otro lado, se observó que, a mayor concentración de calcio, menor fue el t_i , siendo de 1,8 minutos a una concentración de 170 ppm (Figura 2.26 A), 2,6 minutos para 150 ppm (Figura 2.26 B), 5,6 minutos para 120 ppm (Figura 2.26 C), 9,7 minutos para 100 ppm (Figura 2.26 D), y 20,4 minutos para 80 ppm (Figura 2.26 E).

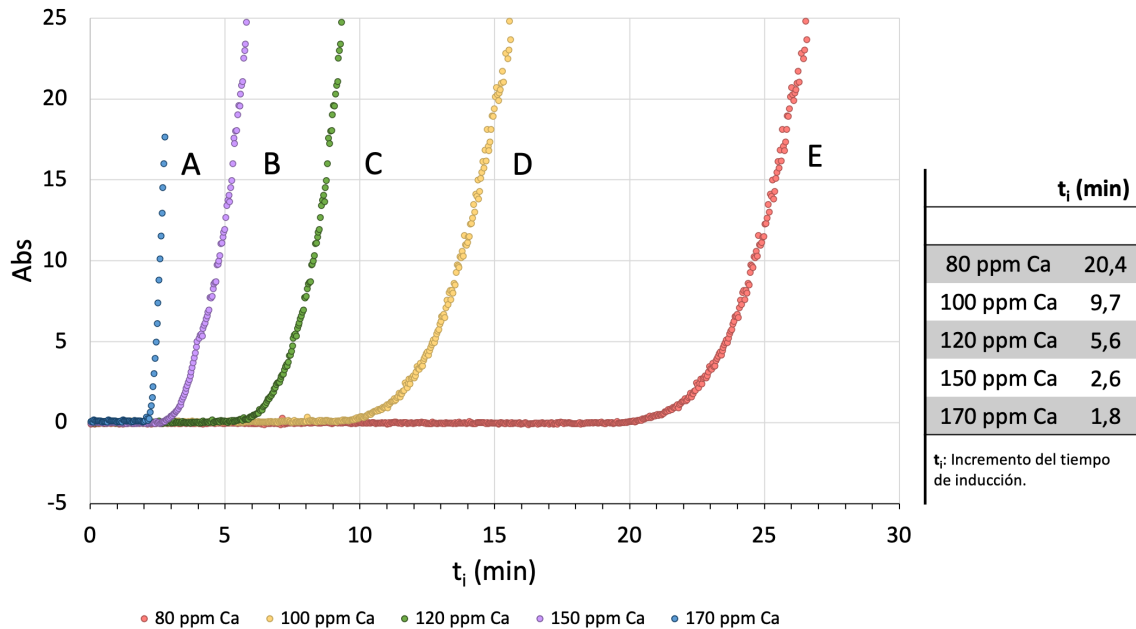


Figura 2.26 Curvas de las cinéticas de cristalización de CaP para una concentración de 1053 ppm de fósforo y un pH de 6,7 y distintas concentraciones de calcio: A) 80 ppm, B) 100 ppm, C) 120 ppm, D) 150 ppm y E) 170 ppm.

1.6.1.4 Condiciones de cristalización: 1053 ppm P, pH 7 y distintas concentraciones de Ca

Al continuar apareciendo BRU en todas las alícuotas obtenidas de las cinéticas para una concentración de 1053 ppm de fósforo a pH 6,7 con distintas concentraciones de calcio, se decidió aumentar el pH hasta 7. En estas condiciones, se evaluaron las concentraciones de calcio más bajas, desde 60 ppm, pasando por 80, 100 y hasta 120 ppm.

Así, a un pH de 7 y con una concentración de P de 1053 ppm, todos los cristales obtenidos de las alícuotas de las cinéticas para distintas concentraciones de calcio evaluadas fueron en su totalidad una masa de HAP (Figura 2.27). Por otro lado, mediante el estudio cinético se volvió a observar que a mayor concentración de calcio menor fue el t_i obtenido, siendo de 2,2 minutos para 100 ppm (Figura 2.28 A), 5 minutos para 80 ppm (Figura 2.28 B) y 40,6 minutos para 60 ppm de calcio (Figura 2.28 C).

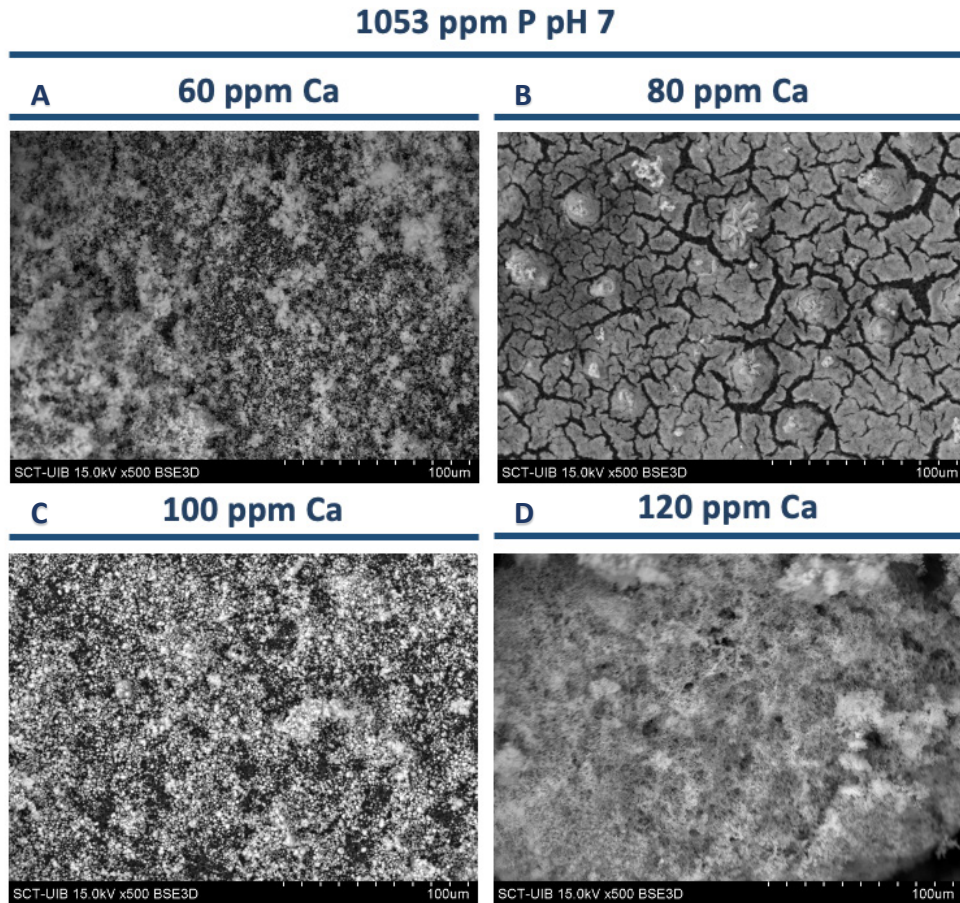


Figura 2.27 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cristales obtenidos después de cada cinética a una concentración de 1053 ppm de fósforo a un pH 7, para distintas concentraciones de calcio de A) 60 ppm, B) 80 ppm, C) 100 ppm y D) 120 ppm. En todas la alícuotas para distintas concentraciones de calcio se observa solamente HAP.

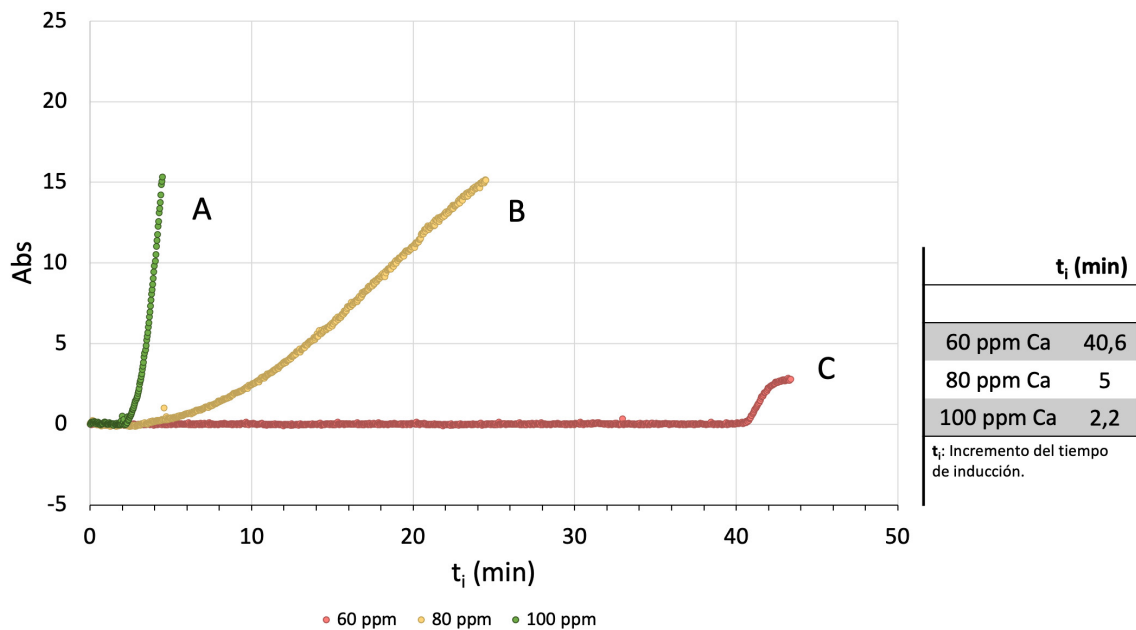


Figura 2.28 Cinéticas de la cristalización de CaP para una concentración de 1053 ppm de fósforo y un pH de 7 y distintas concentraciones de calcio: A) 100 ppm, B) 80 ppm y C) 60 ppm.

1.6.1.5 Condiciones de cristalización: 1053 ppm P, pH 6,9 y distintas concentraciones de Ca

Al observar que a pH 7 y con bajas concentraciones de calcio ya se formó únicamente HAP (Figura 2.27), se repitió el experimento disminuyendo el pH hasta 6,90. Para este experimento se estudiaron las concentraciones de 100 y 80 ppm de calcio, que obtuvieron un t_i aceptable para un experimento control a pH 7 (Figura 2.28 A y B respectivamente).

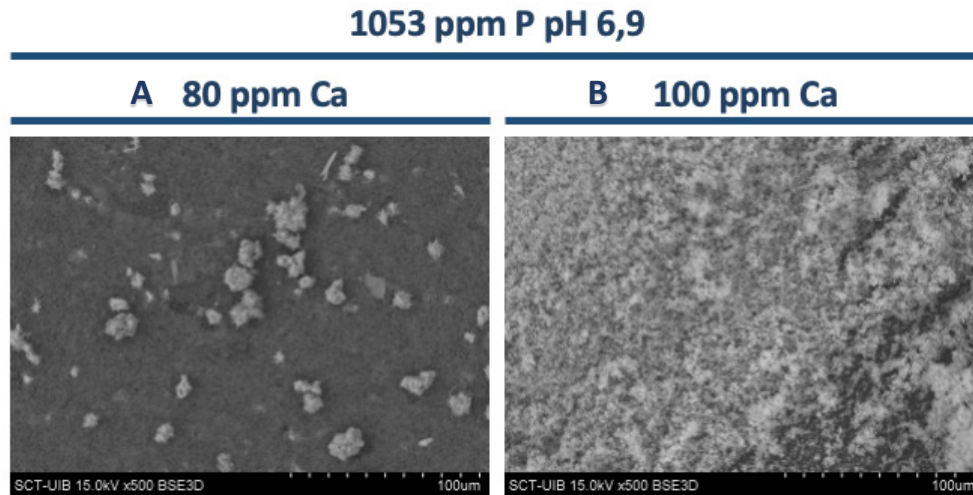


Figura 2.29 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cristales obtenidos después de cada cinética a una concentración de 1053 ppm de fósforo a un pH 6,9, para distintas concentraciones de calcio de A) 80 ppm y B) 100 ppm. En todas la alícuotas para distintas concentraciones de calcio se observa solamente HAP.

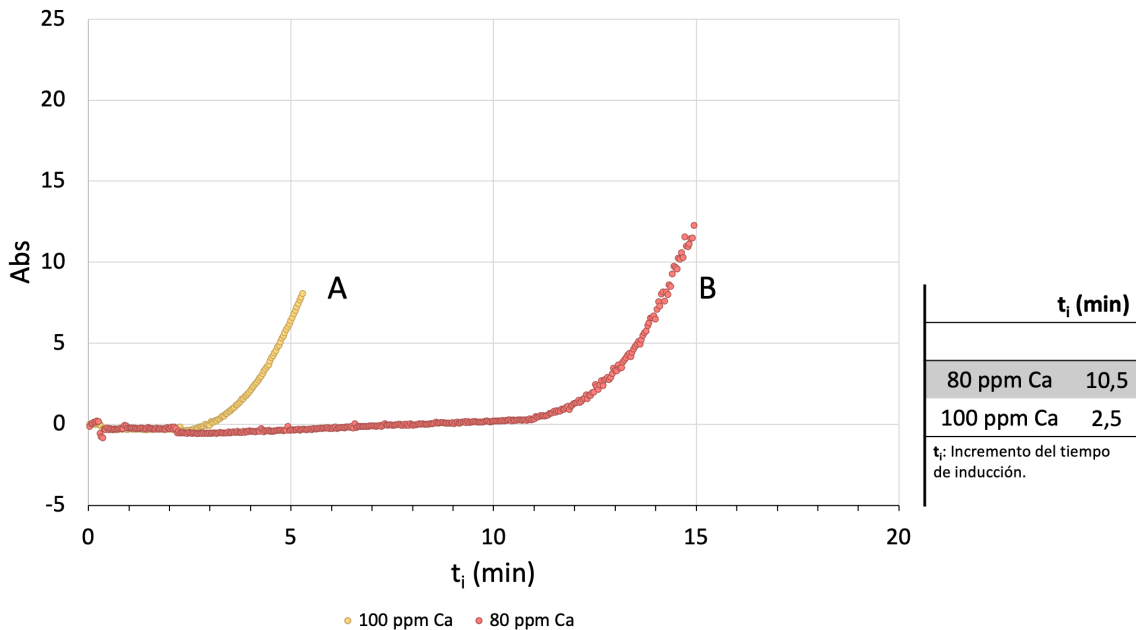


Figura 2.30 Cinéticas de la cristalización de CaP para una concentración de 1053 ppm de fósforo y un pH de 6,9 y distintas concentraciones de calcio: A) 100 ppm y B) 80 ppm.

Tanto para 80 ppm de calcio (Figura 2.29 A) como para 100 ppm (Figura 2.29 B) se obtuvieron cristales de HAP, aunque la cinética con 80 ppm de calcio se paró antes de haber una cantidad considerable de cristales en disolución, por lo cual se observan fases iniciales de HAP más cristalino. Por otro lado, para el experimento a 100 ppm de calcio (Figura 2.30 A) el t_i fue menor que el experimento que se realizó con 80 ppm de calcio (Figura 2.30 B).

1.6.1.6 Condiciones de cristalización: 990 ppm P, pH 7 y distintas concentraciones de Ca

Posteriormente, se disminuyó la concentración de fósforo, hasta 990 ppm y se realizaron los experimentos a pH 7 para intentar obtener un t_i intermedio de los observados en las condiciones anteriores (Figura 2.30).

También se estudiaron los efectos de 80 y 100 ppm de calcio, observando que el único tipo cristalino formado era HAP para las dos concentraciones (Figura 2.31 A y B respectivamente). El t_i obtenido para 100 ppm de calcio fue parecido al obtenido con 1053 ppm de fósforo a pH 6,9 para la misma concentración de calcio (2,1 vs 2,5 minutos, Figuras 2.32 A y 2.30 A respectivamente). En cambio, el t_i obtenido para 80 ppm de calcio fue un poco menor (7,8 vs 10,5 minutos, Figuras 2.32 B y 2.30 B respectivamente).

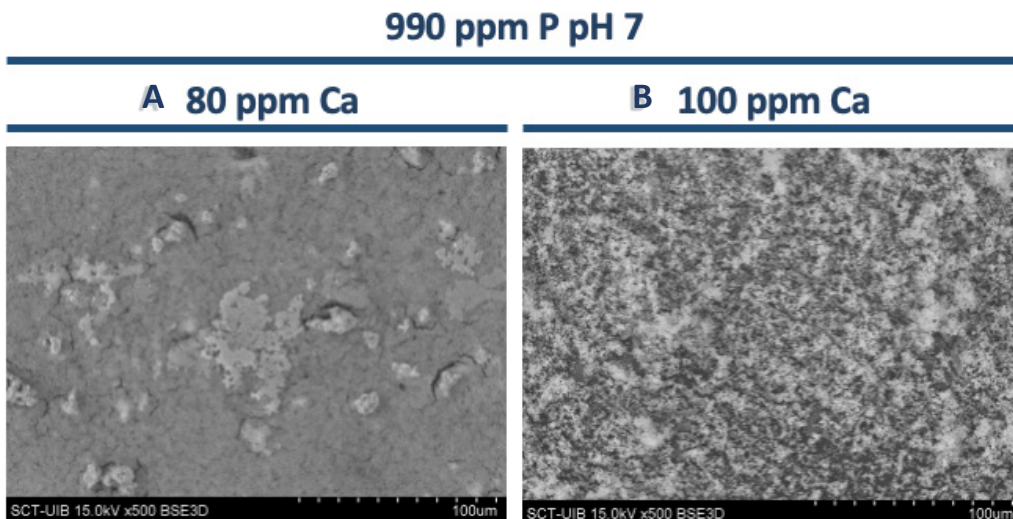


Figura 2.31 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cristales obtenidos después de cada cinética a una concentración de 990 ppm de fósforo a un pH 7, para distintas concentraciones de calcio de A) 80 ppm y B) 100 ppm. En todas la alícuotas para distintas concentraciones de calcio se observa solamente HAP.

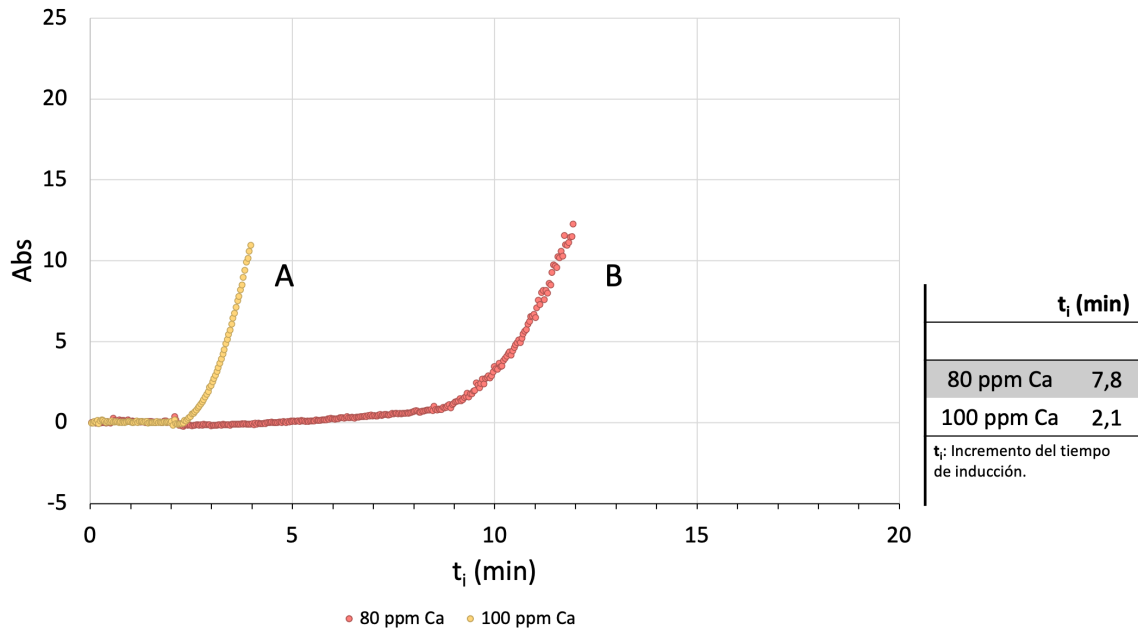


Figura 2.32 Cinéticas de la cristalización de CaP para una concentración de 1053 ppm de fósforo y un pH de 6,9 y distintas concentraciones de calcio: A) 100 ppm y B) 80 ppm.

1.6.1.7 Condiciones de cristalización: 482 ppm P, 120 ppm Ca y pH 7

Finalmente, tras observar que la formación íntegra de HAP requería de un pH mínimo de 6,9-7, incluso al aumentar la concentración de fósforo y disminuir la de calcio, se tomó la decisión de restablecer la concentración de fósforo a su valor inicial de 482 ppm. Así, se ajustó a un pH de 7 y se dispuso de una concentración de calcio de 120 ppm, la mínima utilizada para el estudio de formación de depósitos sobre secciones tygon (capítulo 3).

Los cristales obtenidos en estas condiciones fueron es su totalidad esferulitos de HAP (Figura 2.33), mientras que la media del t_i de las réplicas del experimento control fue aproximadamente 3,3 minutos (Figura 2.34).

De esta manera se logra la cristalización exclusiva de la HAP en las condiciones donde su sobresaturación es la más baja de las testadas y sin que se produzca la formación BRU. Así este escenario es el óptimo para evaluar la actuación de posibles inhibidores de su cristalización.

482 ppm P 120 ppm Ca pH 7

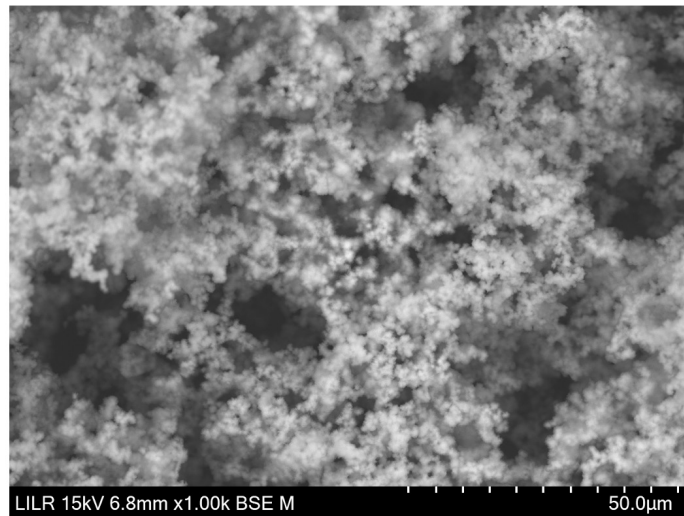


Figura 2.33 Imagen de microscopia electrónica de barrido de los cristales obtenidos después de la cinética a pH 7, para una concentración de 482 ppm de fósforo y 120 ppm de calcio. Se observó una gran masa compuesta de esferulitos de HAP.

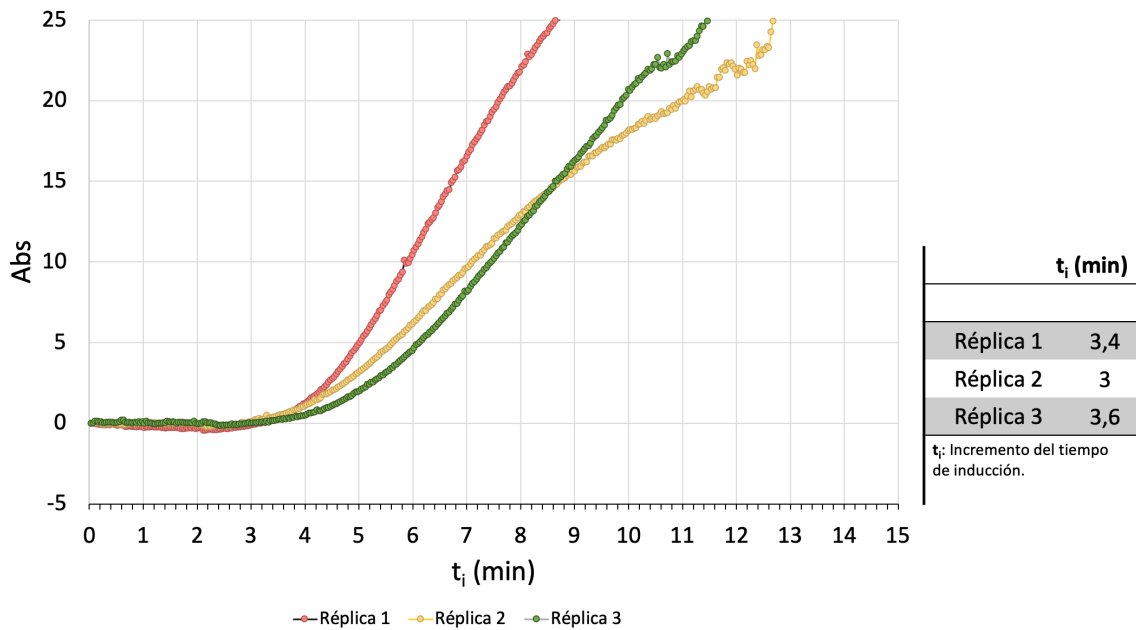


Figura 2.34 Réplicas de la cinética de la cristalización de CaP para una concentración de 800 ppm de fósforo y 120 ppm de calcio a pH 7.

Estas fueron las condiciones que se utilizaron para llevar a cabo el estudio cinético de la HAP, así como también el estudio de formación de depósitos de HAP sobre secciones tygon en flujo.

1.6.2 Cinéticas de cristalización de la hidroxiapatita

Una vez establecidas las condiciones experimentales para llevar a cabo las cinéticas de cristalización de la HAP, se pasó a evaluar los efectos del fitato, sus mezclas de hidrolizados, los bifosfonatos y el citrato.

El InsP6 y las mezclas de InsP resultado de los distintos tiempos de hidrólisis presentaron una capacidad reducida para incrementar el tiempo de inducción de la cristalización de la HAP (Figura 2.35) a una concentración de 2 μM . Los valores se encuentran especificados en la Tabla 2.15. Concretamente, el InsP6 puro (tiempo de hidrólisis de 0 horas), el hidrolizado de 6 horas, (el cual presentó mayor cantidad de InsP6, Figura 2.8), y el hidrolizado de 72 horas (el cual presentó una mayor cantidad de InsP bajos, Figura 2.8) son los que presentaron una capacidad nula de incremento del tiempo de inducción. A partir de las 6 horas, el efecto incrementó a medida que aumentó el tiempo de hidrólisis hasta llegar a las 24 horas, cuyo efecto fue equivalente al de 48 horas. Aun así, el efecto presentado fue reducido, siendo el hidrolizado de 24 horas el que presentó el mayor valor del tiempo de incremento de inducción de la cristalización de la HAP (Tabla 2.15).

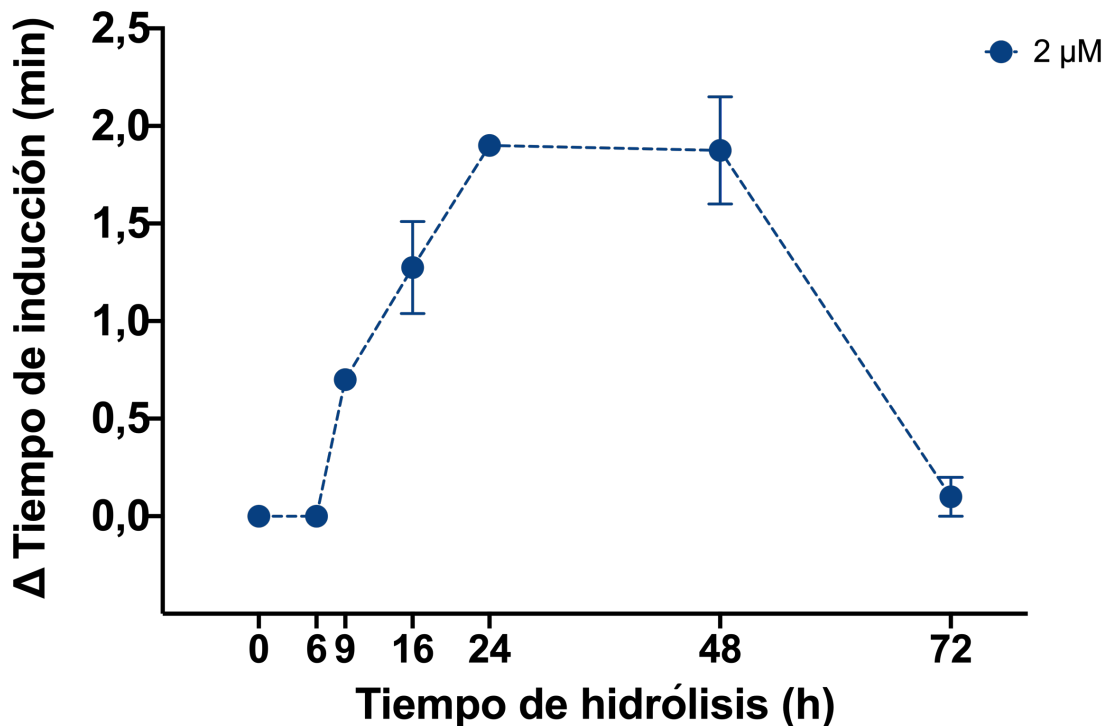
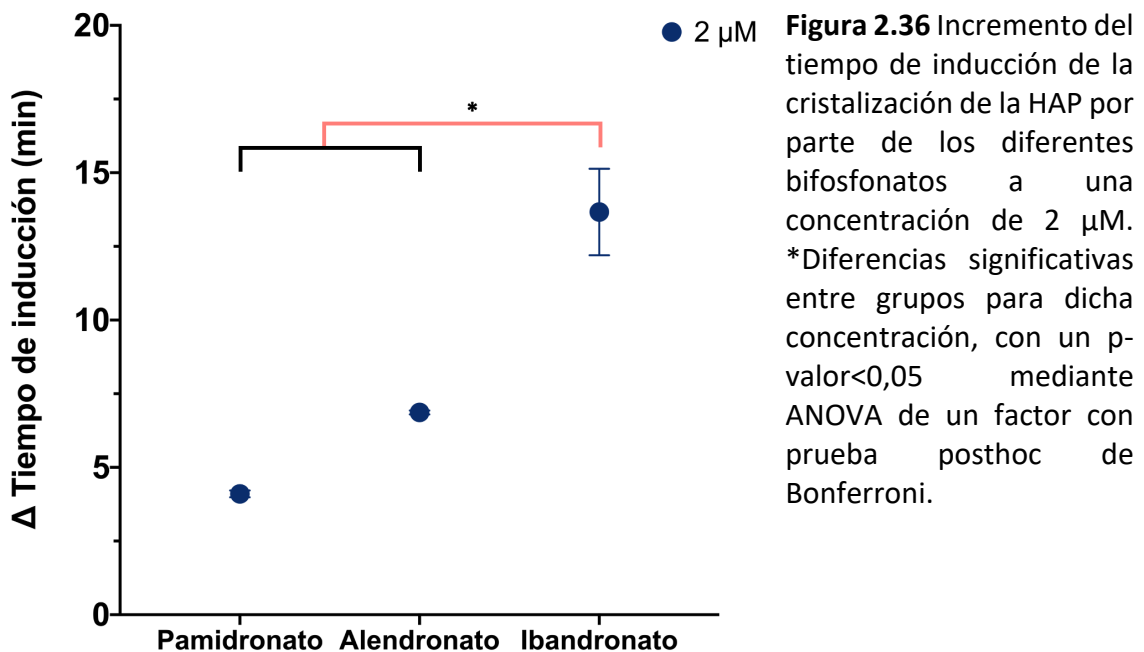


Figura 2.35 Incremento del tiempo de inducción de la cristalización de la HAP por parte del fitato y sus hidrolizados (de 0 a 72 horas) a una concentración de 2 μM .

Tabla 2.15 Efecto del fitato y sus hidrolizados (de 0 a 72 h) en el tiempo de inducción de la cristalización de la HAP.

Fitato hidrolizado (h)	Media Δt_i (min)
0	0,00
6	0,00
9	0,70
16	1,28
24	1,90
48	1,88
72	0,10

Por otro lado, sí que se observaron efectos en el incremento del tiempo de inducción de la cristalización de la HAP por parte del pamidronato, alendronato e ibandronato a una concentración de 2 μM (Figura 2.36). Este último presentó un efecto significativamente mayor (Media Δt_i de 13,7 minutos) en comparación al pamidronato y alendronato (Media Δt_i de 4,1 y 6,8 minutos respectivamente).



Los cristales de HAP recogidos y analizados después de terminar cada cinética mostraron la misma morfología y organización tanto en el control (sin adiciones, Figura 2.37 A) como en presencia del InsP6, sus hidrolizados (Figura 2.37 B-H) y en presencia de los bifosfonatos (Figura 2.38 A-C). Los cristales de HAP en forma de esferulito se organizaron mediante ramificaciones y la formación de agregados componiendo una capa densa, sin observar diferencias morfológicas ni estructurales entre los cristales obtenidos en las distintas condiciones.

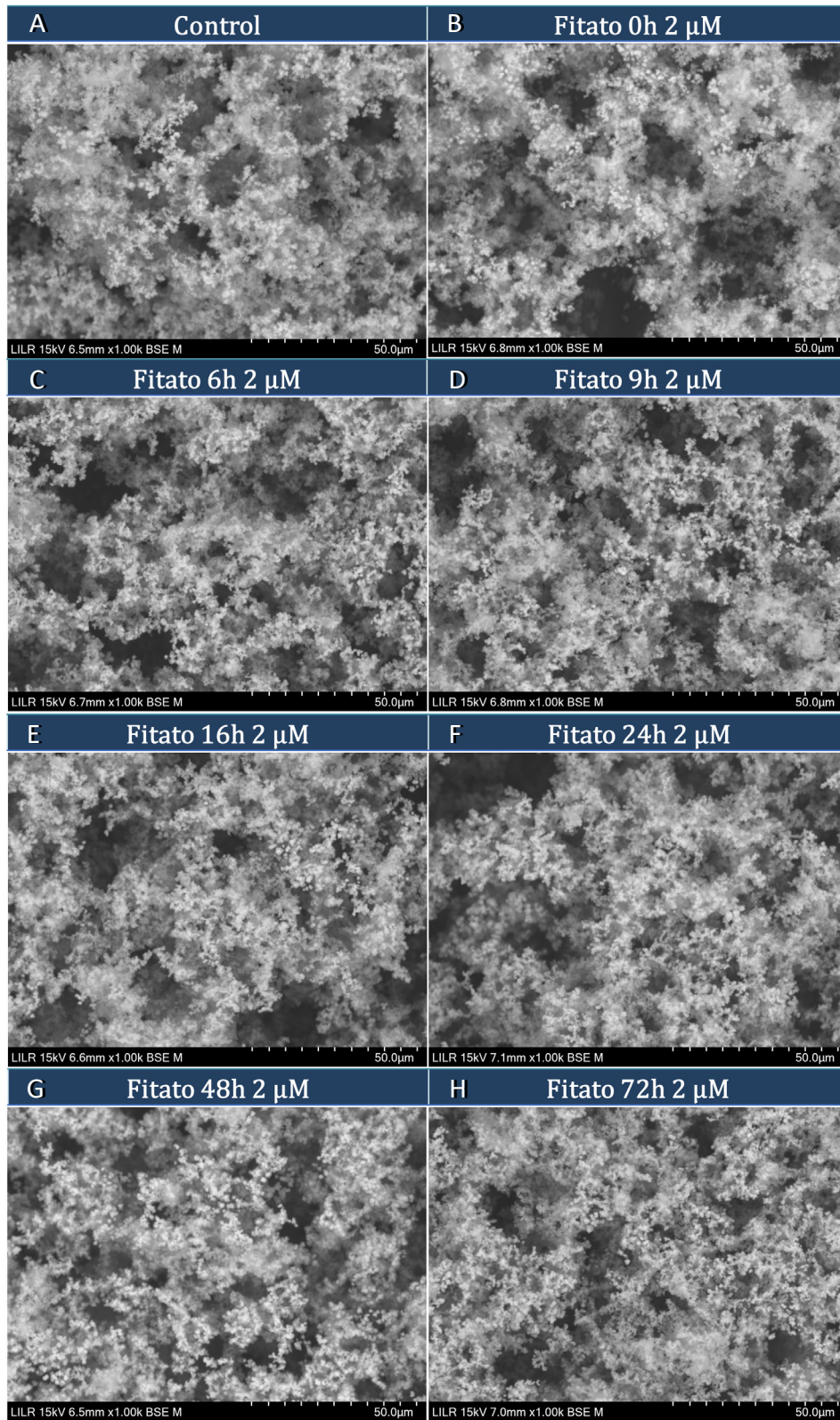


Figura 2.37 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cristales de HAP obtenidos después de cada cinética testando el InSp6 hidrolizado a diferentes tiempos (de 0 a 72 horas). A) Control (sin adiciones), B) InSp6 sin hidrolizar (0h), C) InSp6 hidrolizado durante 6 horas, D) InSp6 hidrolizado durante 9 horas, E) InSp6 hidrolizado durante 16 horas, F) InSp6 hidrolizado durante 24 horas, G) InSp6 hidrolizado durante 48 horas y H) InSp6 hidrolizado durante 72 horas.

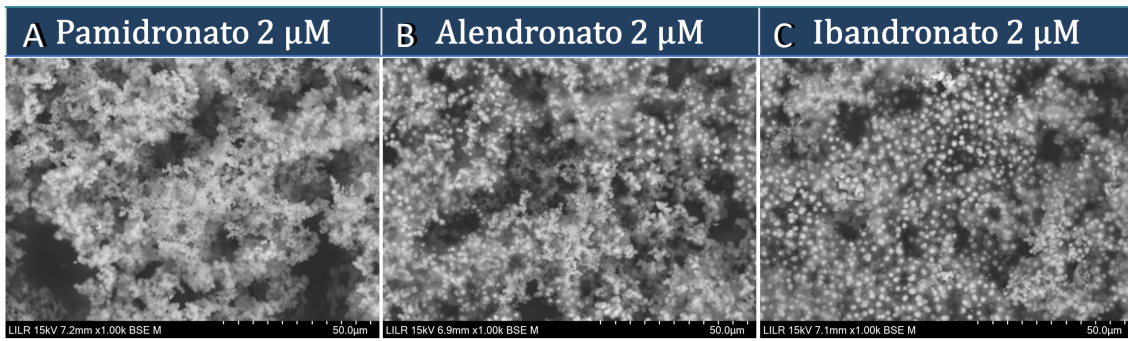


Figura 2.38 Imágenes de microscopia electrónica de barrido de los cristales de HAP obtenidos después de las cinéticas realizadas en presencia de A) pamidronato, B) alendronato y C) ibandronato a una concentración de 2 μM . Se pudo observar como en todas las alícuotas obtenidas se observaron solamente cristales de HAP.

2. Estudios cinéticos de cristalización del ácido úrico

2.1 Tiempos de mezclado para las cinéticas de cristalización del ácido úrico

Al dar inicio al estudio sobre la cristalización del ácido úrico en disolución mediante ensayos turbidiméticos-cinéticos, se empezaron a realizar los experimentos sin ningún tiempo de mezclado de la disolución de 200 mL que contenía la OADC, el AU y el compuesto a evaluar.

Al observar poco efecto inhibitor por parte de la teobromina, una metilxantina cuya capacidad inhibitor ya fue demostrada anteriormente en el laboratorio[114], se realizó una prueba con distintos tiempos de mezclado (0, 5, 15 y 30 min) de la disolución de OA de 200 mL con 0,2 mM de teobromina y una concentración de AU de 400 mg/L, antes de dar inicio al experimento.

La Figura 2.39 muestra la influencia de los tiempos de mezclado en las cinéticas de cristalización del AU, observando que el tiempo de inducción para la formación de cristales de AU aumentó a medida que aumentó el tiempo de mezclado hasta llegar a los 15 minutos. Tanto a los 30 minutos como a los 15 minutos de mezclado el t_i fue similar, por lo que se estableció un tiempo de mezclado de 15 minutos para cada experimento de cristalización del AU, previo a su inicio.

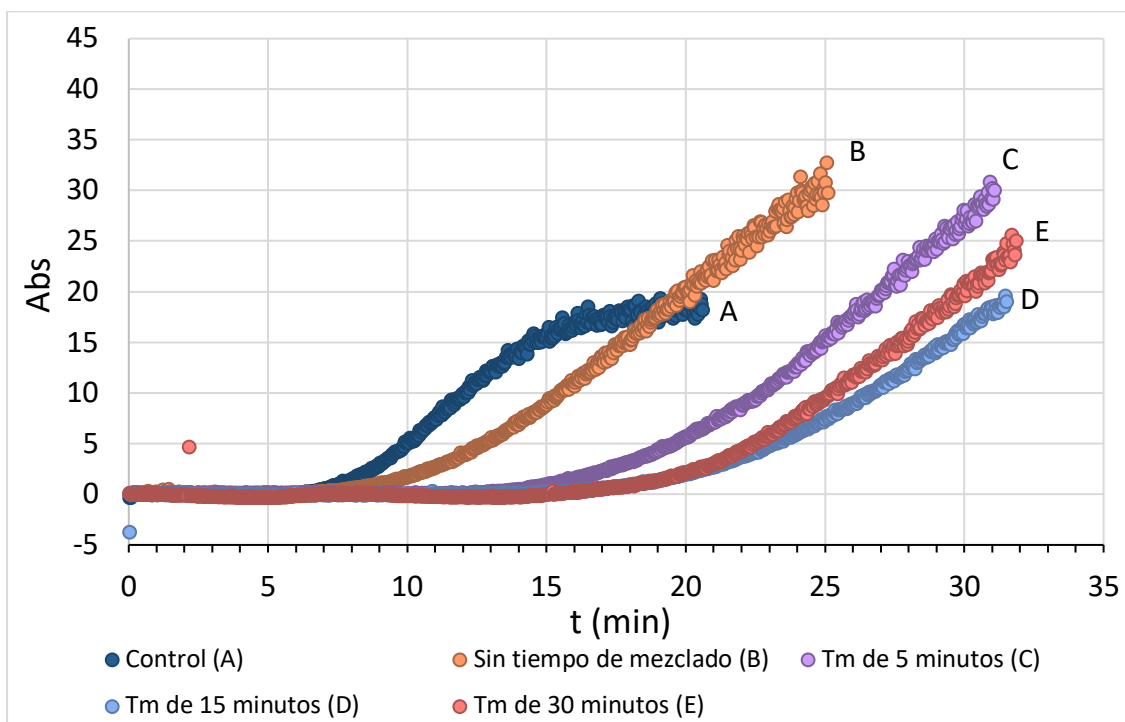


Figura 2.39 Cinéticas de la cristalización del ácido úrico en presencia de Teobromina 0,2 mM a diferentes tiempos de mezclado antes de inducir la sobresaturación del ácido úrico con HCl.

2.2 Efectos de las metilxantinas en las cinéticas de cristalización del ácido úrico

La teobromina, 3,7-dimetilúrico, 7-metilxantina y 3-metilxantina fueron los compuestos que presentaron efecto inhibitor de la cristalización del AU al alargar el t_i , es decir, el tiempo necesario para que se produzca su cristalización (Figura 2.40 A, B, C y D, respectivamente). De manera generalizada se observa que, a mayor concentración del compuesto, mayor efecto inhibitor.

En el caso de la teobromina, el efecto inhibitor se mantuvo al llegar a concentraciones de 0,4 mM (Figura 2.40 A). En cuanto a los efectos del 3,7-dimetilúrico, parece que no variaron mucho entre las distintas concentraciones (Figura 2.40 B), mientras que la actividad de la 7-metilxantina incrementó significativamente a medida que aumentó su concentración (Figura 2.40 C). Finalmente se observa que el efecto de la 3-metilxantina, aparte de ser escaso no aumentó significativamente, aunque aumentara su concentración (Figura 2.40 D).

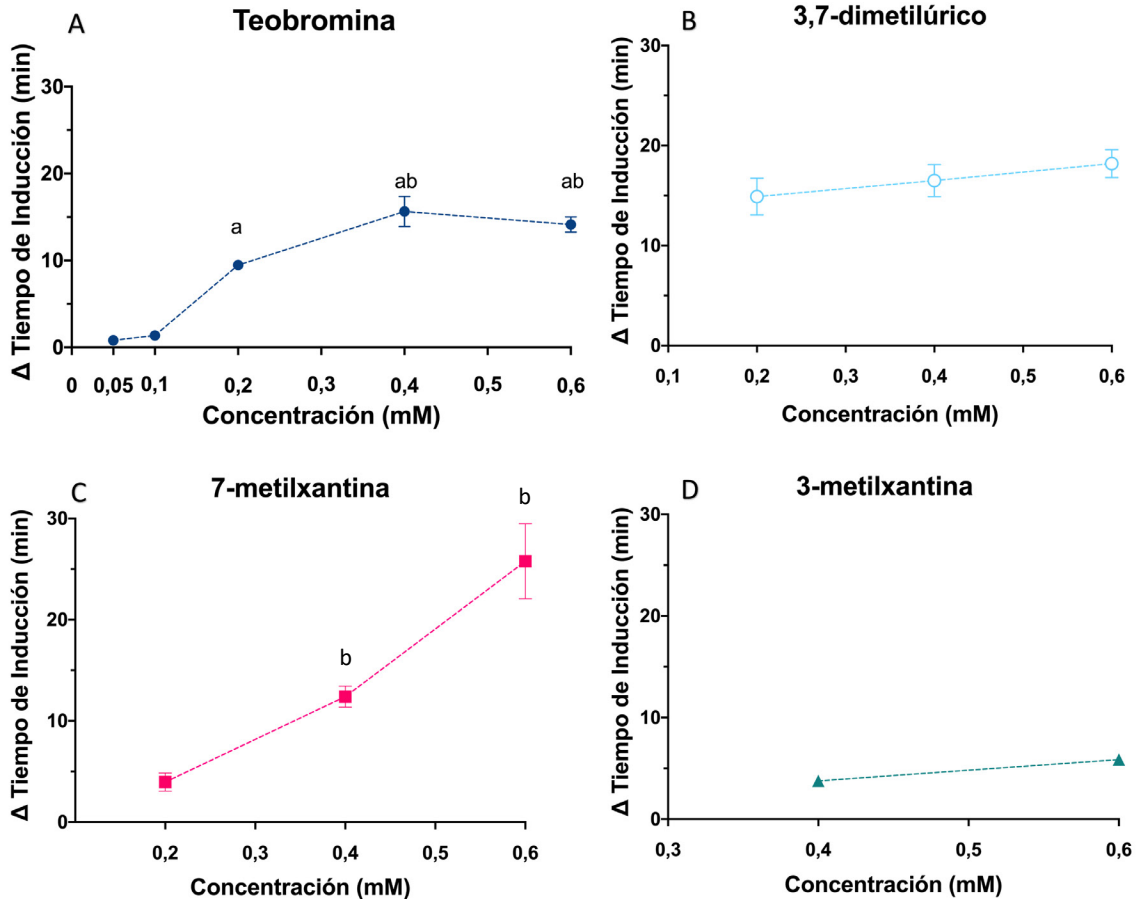


Figura 2.40 Efectos en el incremento del tiempo de inducción del AU entre distintas concentraciones para un mismo compuesto. A) Teobromina B) 3,7-dimetilúrico. No se observaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones. C) 7-metilxantina D) 3-metilxantina: No se observaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones. ^a Aumento significativo en comparación con la concentración de 0,05 y 0,1 mM; ^b Aumento significativo en comparación con la concentración de 0,2 mM. Diferencias significativas con un p-valor<0,05 mediante ANOVA de un factor con prueba posthoc de Bonferroni.

Al comparar los efectos de los distintos compuestos entre sí, se observó que el 3,7-dimetilúrico a una concentración de 0,4 y 0,6 mM produjo un efecto muy parecido al de la teobromina, mientras que la 7-metilxantina a mayores concentraciones (0,6 mM) presentó un efecto mayor que el de la teobromina y 3,7-dimetilúrico. Finalmente, la 3-metilxantina, dentro del grupo de xantinas que presentaron efecto inhibitor en la cristalización del AU, es la que presentó un efecto menor comparada con la de los demás compuestos (Figura 2.41). La 1-metilxantina, paraxantina, pentoxifilina, 7-hidroxietilteofilina y difilina no alteraron el tiempo de inducción de la cristalización del AU a una concentración de 0,6 mM.

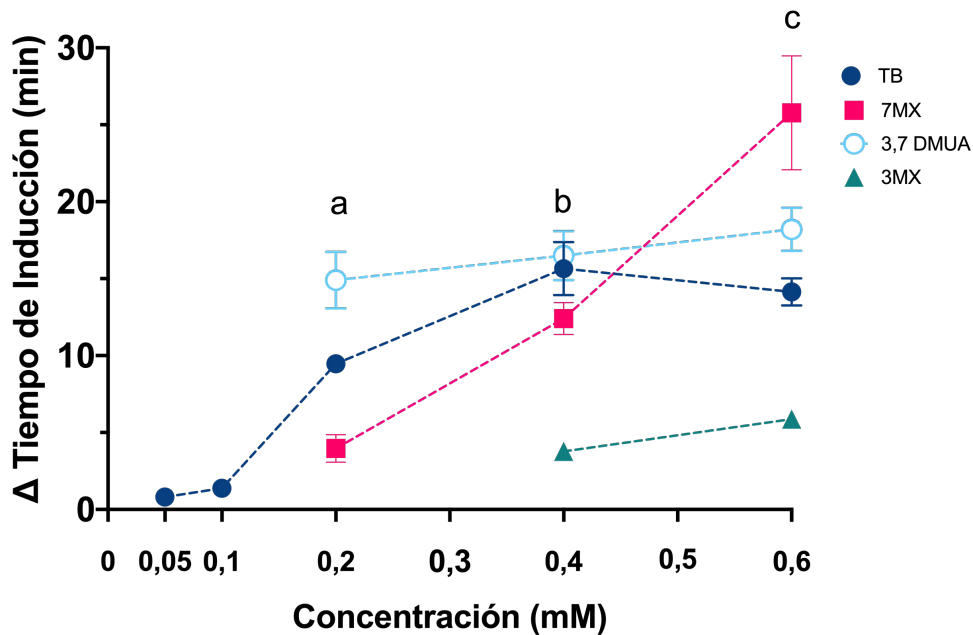


Figura 2.41 Comparación del incremento del tiempo de inducción para la cristalización del ácido úrico entre los compuestos estudiados a pH = 4,65. El tiempo de inducción se obtuvo a partir de las curvas de cristalización. Los resultados se expresan como media de las réplicas llevadas a cabo y SEM. ^a Diferencias estadísticas entre grupos, ^b Diferencias estadísticas entre TB, 7MX, 3,7MDUA y 3MX, ^c Diferencias estadísticas entre 7MX y los demás compuestos; 3,7DMUA, TB y los demás compuestos. Diferencias significativas con un p-valor < 0,05 mediante ANOVA de un factor con prueba posthoc de Bonferroni.

Aunque el 3,7-dimetilúrico presentó importantes efectos inhibidores no se evaluó en combinación con las demás metilxantinas debido a que su excreción es sólo del 1,3% de la dosis de teobromina [107]. Al ser la 7-metilxantina el otro compuesto potencialmente inhibidor, se decidió realizar mezclas de esta xantina con la teobromina. Para ello se probaron dos concentraciones de 7-metilxantina: a 0,2 mM y 0,4 mM, cada una de ellas combinadas con 0,1, 0,2 y 0,4 mM de teobromina (Figura 2.42). Estos efectos fueron comparados con los supuestos efectos aditivos teóricos que tendrían los dos compuestos, obtenidos a partir de la suma del incremento del tiempo de inducción para dichas concentraciones de los compuestos por separado. Así, se observó que los efectos inhibidores obtenidos combinando distintas concentraciones de teobromina con 7-metilxantina a una concentración de 0,4 mM fueron significativamente superiores a los efectos teóricos (Figura 2.42 A), mientras que la combinación de distintas concentraciones de teobromina con 7-metilxantina a una concentración de 0,2 mM solo presentó efectos aditivos, al coincidir los valores experimentales con los teóricos (Figura 2.42 B).

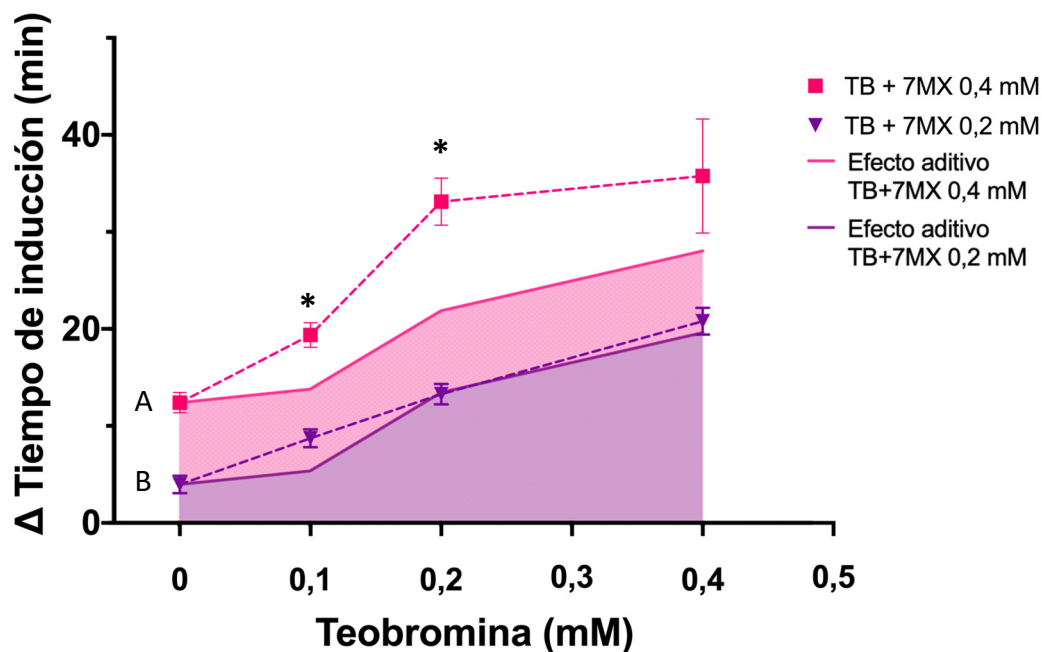


Figura 2.42 Comparación de los efectos en el incremento del tiempo de inducción entre los resultados experimentales versus los respectivos efectos aditivos teóricos en OA a pH 4,65 de A) TB + 7MX 0,4 mM y B) TB + 7MX 0,2 mM. * Diferencias significativas respecto al valor del efecto aditivo teórico con un p-valor < 0,05 mediante ANOVA de un factor con prueba posthoc de Bonferroni.

En las imágenes de microscopía electrónica de barrido se pudieron observar los cambios estructurales y morfológicos de los cristales de AU en presencia y ausencia de todos los compuestos estudiados (Figuras 2.43, 2.44 y 2.45). Primero de todo, los cristales obtenidos en los experimentos control presentaron una morfología rectangular (Figura 2.43 A, Figura 2.44 A), mientras que en presencia de los compuestos que presentaron un efecto inhibitorio nulo, como la pentoxifilina, hidroxietilteofilina y difilina (Figura 2.43 D, E, F respectivamente) esta morfología se vio apenas alterada. Por otro lado, en presencia de la 1-metilxantina y paraxantina (Figura 2.43 B y C, respectivamente), las dos xantinas que menor efecto ejercieron en el t_i del AU, los cristales ya presentaron un cambio morfológico evidente. Para la 1-metilxantina se observaron unos cristales de AU gruesos, en forma de estaca, debido a la inhibición del crecimiento en una de sus caras. En presencia de paraxantina este efecto fue mayor, por lo que los cristales presentaron una morfología en forma de aguja. Para la 3-metilxantina, que tuvo un efecto reducido en el t_i del AU pero mayor que la 1-metilxantina y paraxantina, los cristales de AU recolectados fueron más delgados a mayor concentración de la xantina (Figura 2.43 G y H).

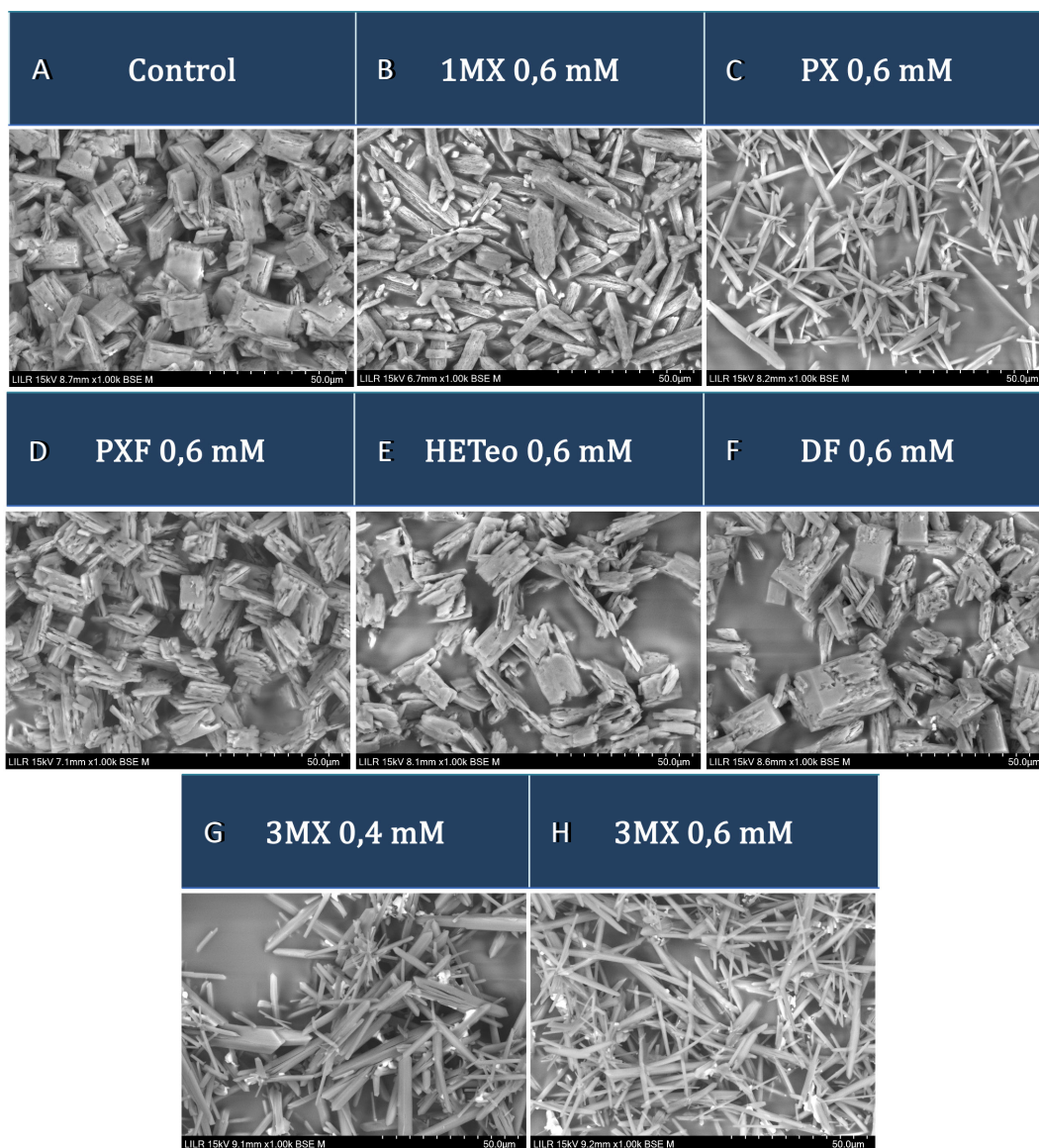


Figura 2.43 Imágenes de cristales de AU obtenidas por microscopía electrónica de barrido tras finalizar el ensayo cinético en presencia de los compuestos que presentaron un menor efecto inhibitor A) Control (sin adiciones), B) 1-metilxantina, C) Paraxantina, D) Pentoxifilina, E) Hidroxietilteofilina, F) Difilina, G y F) 3-metilxantina 0,4 mM y 0,6 mM respectivamente.

Esta morfología en forma de aguja se mantiene para los cristales de AU obtenidos al evaluar los compuestos que presentaron un efecto inhibitor relevante (Figura 2.44). Para la teobromina (Figura 2.44, B-F), a medida que aumentó su concentración en disolución mayor fue la inhibición de una de las caras de los cristales de AU, siendo estos más pequeños a mayores concentraciones (0,4 y 0,6 mM) y presentando forma de estaca en las concentraciones cuyo efecto fue menor (0,05 y 0,1 mM). En el caso de la 7-metilxantina (Figura 2.44 G-I), también se observó que un aumento de su concentración produjo una mayor inhibición de una de las caras de los cristales.

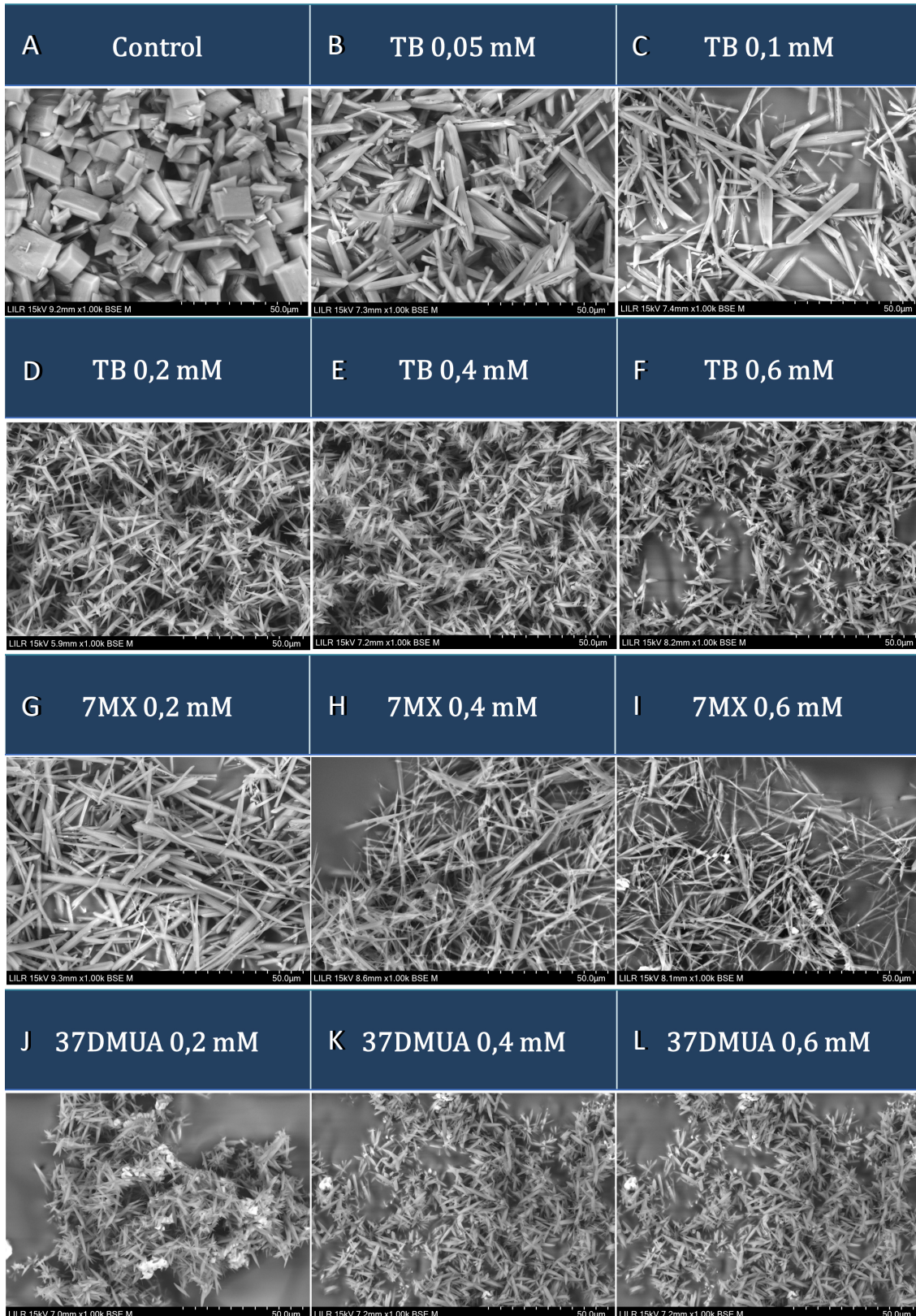


Figura 2.44 Imágenes de cristales de ácido úrico obtenidas por microscopía electrónica de barrido tras finalizar el ensayo cinético en ausencia (Control) y presencia de los compuestos que presentaron efecto inhibitor importante a las concentraciones indicadas A-F) Teobromina; G-I) 7-metilxantina y J-L) 3,7-dimetilúrico.

Finalmente, para el 3,7-dimetilúrico (Figura 2.44 J-L), se observaron pequeños cristales de AU en forma de aguja, los cuales no difirieron entre las distintas concentraciones estudiadas de este compuesto.

Para las combinaciones realizadas se observó que para una concentración fija de 7-metilxantina a una concentración de 0,2 mM, a medida que aumentó la concentración de teobromina los cristales de AU recolectados presentaron una mayor inhibición en una de sus caras, así como también fueron más pequeños (Figura 2.45 A-C). En cambio, para una concentración fija de 7-metilxantina de 0,4 mM, la presencia de teobromina a concentración cada vez mayor no produjo cambios tan evidentes en la morfología de los cristales de AU, ya que en presencia de 0,1 mM de teobromina (Figura 2.45 D) ya se observaron cristales muy pequeños, muy parecidos a los observamos en presencia de teobromina a mayor concentración (Figura 2.44 E y F).

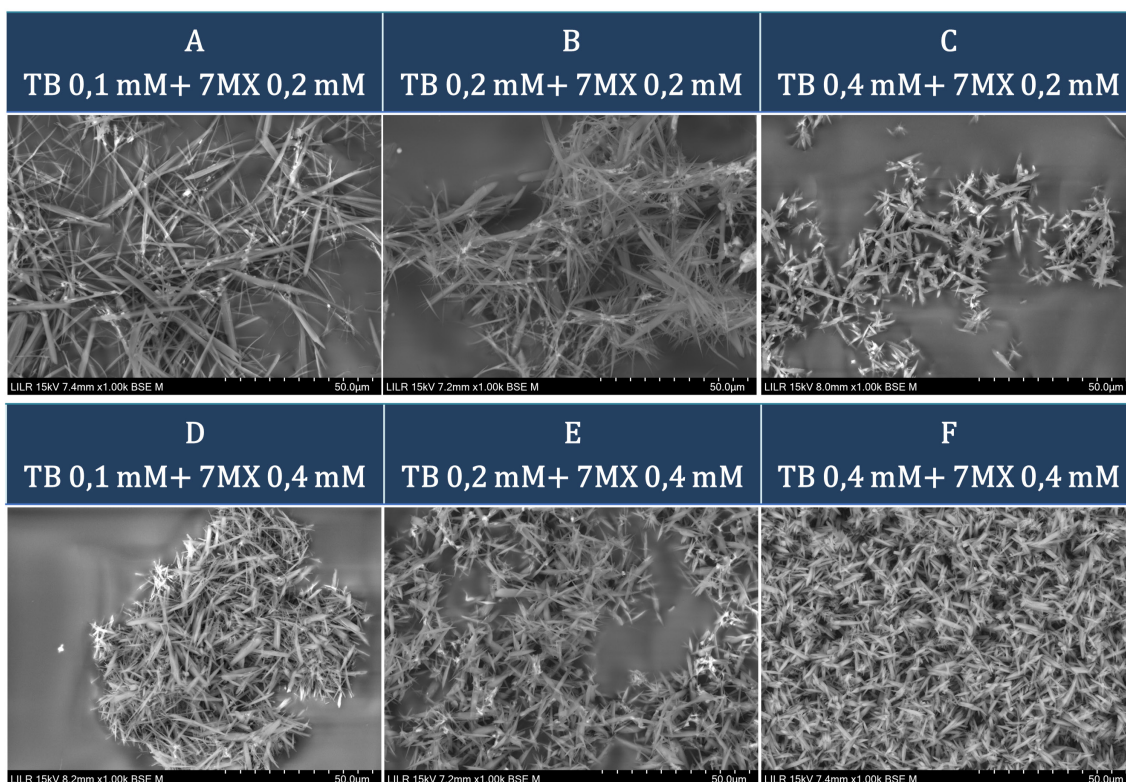


Figura 2.45 Imágenes de cristales de ácido úrico obtenidas por microscopía electrónica de barrido tras finalizar el ensayo cinético con mezclas de distintas concentraciones de teobromina y 7-metilxantina.

3. Estudio de la concentración y relación de metilxantinas en orinas de individuos sanos y litíasicos

La aplicación de la prueba RCAU-S a las 213 muestras totales de orina, pertenecientes a 20 individuos sanos y 54 pacientes litíasicos formadores de cálculos, resultó en 66 orinas positivas (con riesgo de cristalización) y 147 orinas negativas (sin riesgo de cristalización).

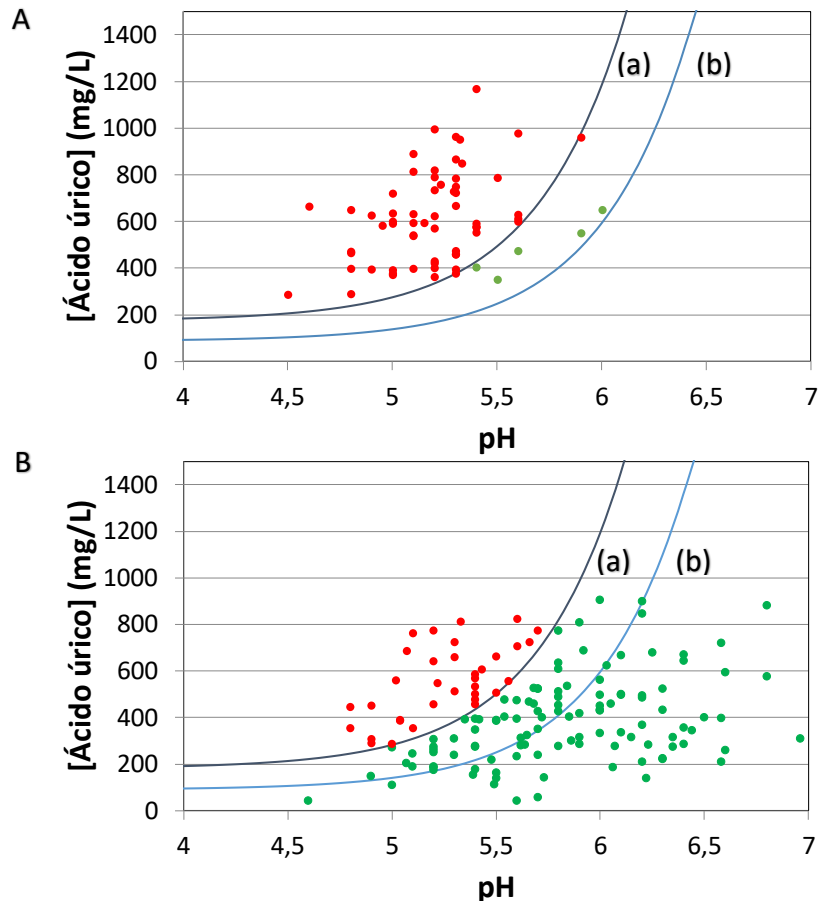


Figura 2.46 Valores de ácido úrico y pH urinarios para cada una de las muestras de orina, los cuales determinan el valor de SS del AU. En estas gráficas se encuentran representadas dos curvas, cada una de ellas correspondiendo a los pares de valores del pH urinario y la concentración de ácido úrico para una SS=2 (a) y una SS=1 (b). A) Valores correspondientes a las orinas con RCAU-S positivo y B) Valores correspondientes a las orinas con RCAU-S negativo.

La concentración frente al pH urinario de cada una de las muestras se puede observar en la Figura 2.46, donde las curvas de SS= 2 y SS =1 (saturación) se encuentran representadas (Figura 2.46, (a) y (b) respectivamente). El valor de sobresaturación establecido como límite al cual el AU alcanza la metaestabilidad es 2[126,127].

La mayoría de las muestras con un test RCAU-S positivo presentaron una SS del AU mayor a 2 (61 muestras de las 66 positivas, en rojo, Figura 2.46 A). Aun así, hubo cinco muestras que, aunque fueron una pequeña proporción, dieron positivo con una SS de AU menor a 2 (5 muestras de las 66 positivas, en verde, Figura 2.46 A). Por otro lado, la mayoría de las muestras con test RCAU-S negativo presentaron una SS del AU menor a 2 (113 muestras de las 147 negativas, en verde, Figura 2.46 B), mientras que las muestras restantes (34) fueron negativas para el test RCAU-S con una SS del AU mayor a 2 (34 muestras de las 147 negativas, en rojo, Figura 2.46 B).

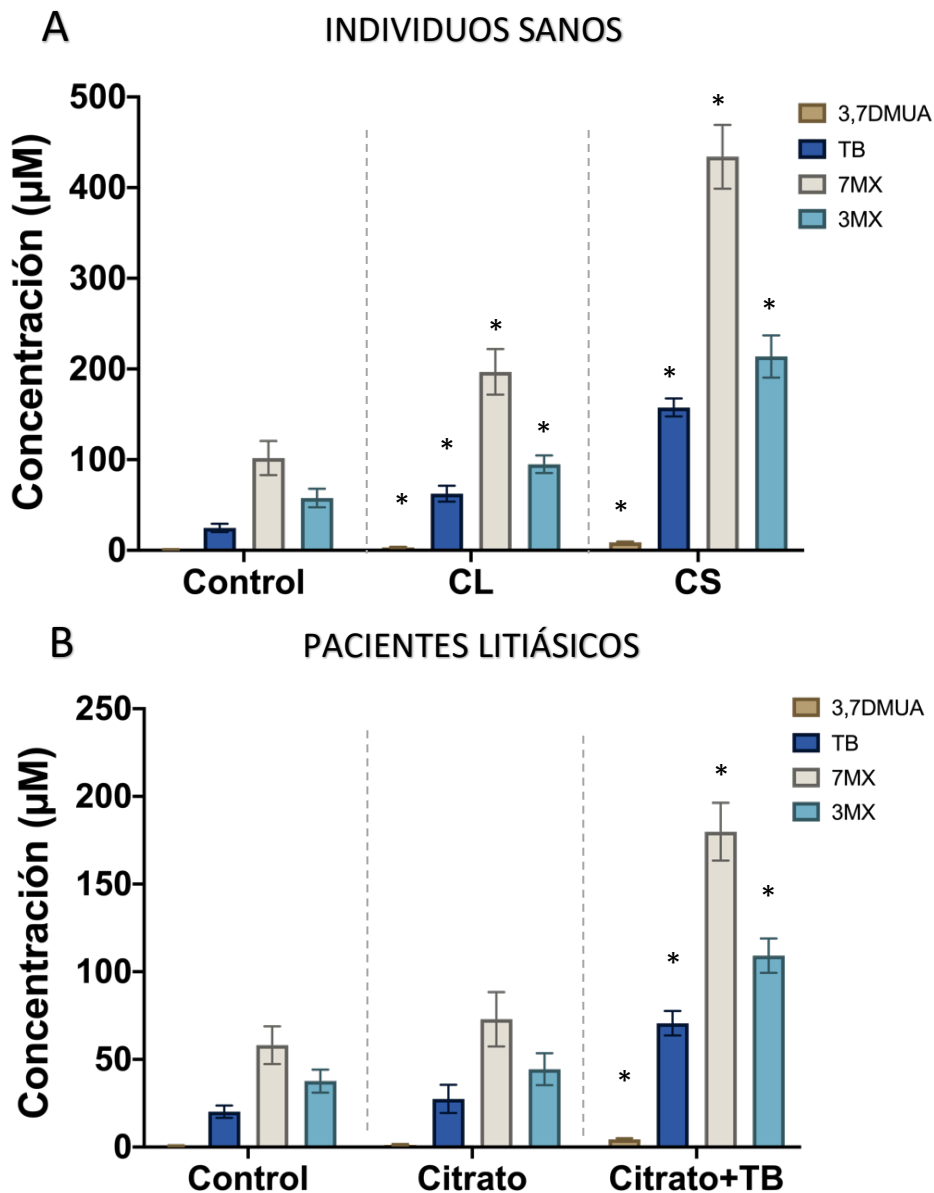


Figura 2.47 Concentración urinaria de la teobromina y sus metabolitos en los distintos grupos, en A) voluntarios sanos y B) pacientes litiásicos. * Diferencias significativas con el resto de los grupos, p-valor <0,01. Prueba de rangos de Wilcoxon para variables continuas no paramétricas relacionadas.

En cuanto a la concentración de metilxantinas en orinas, en individuos sanos se observó un aumento significativo en la concentración de estas tanto en la orina después de tomar 40 gramos de chocolate con leche, como en la orina después de tomar 40 gramos cacao soluble (Figura 2.47 A, Tabla 2.16). De la misma manera, en pacientes litiásicos se observó un aumento significativo de la concentración de las metilxantinas en la orina de 2 horas recogida después de una semana tomando el tratamiento con citrato + teobromina, mientras que la orina de 2 horas después de realizar el tratamiento con citrato presentó unas concentraciones similares a las de la orina de 2 horas basal (Figura 2.47 B, Tabla 2.16).

Tabla 2.16 Media \pm SEM de la concentración urinaria de la teobromina y sus metabolitos en los distintos grupos.

Individuos sanos	TB		37DMUA		7MX		3MX	
Control	0,025	$\pm 4,532$	0,001	$\pm 0,296$	0,102	$\pm 18,750$	0,058	$\pm 10,247$
CL	0,063	$\pm 8,824$	0,003	$\pm 0,541$	0,197	$\pm 25,182$	0,095	$\pm 9,700$
CS	0,158	$\pm 9,914$	0,009	$\pm 0,789$	0,434	$\pm 35,121$	0,214	$\pm 23,289$
Pacientes litiásicos	TB		37DMUA		7MX		3MX	
Control	0,020	$\pm 3,483$	0,001	$\pm 0,262$	0,058	$\pm 10,743$	0,038	$\pm 6,549$
Citrato	0,028	$\pm 8,049$	0,001	$\pm 0,412$	0,073	$\pm 15,507$	0,044	$\pm 9,130$
Citrato+ TB	0,071	$\pm 6,956$	0,004	$\pm 0,630$	0,180	$\pm 16,465$	0,109	$\pm 9,815$

Tanto la relación molar de la 7-metilxantina y 3-metilxantina respecto la teobromina, como la del 3,7-dimetilúrico con la teobromina se mantuvo estable dentro de los distintos grupos de individuos (sanos y litiásicos, Figura 2.48, A y B respectivamente). Si se escogen las intervenciones con mayor concentración de teobromina, y consecuentemente, mayor concentración de teobromina en orina (cacao soluble y citrato + teobromina) se observa que hubo 0,058 vs. 0,066 veces más de 3,7-dimetilúrico que teobromina; 2,85 vs. 2,79 veces más 7-metilxantina que teobromina y 1,37 vs. 1,79 veces más de 3-metilxantina que teobromina, respectivamente (Tabla 2.17).

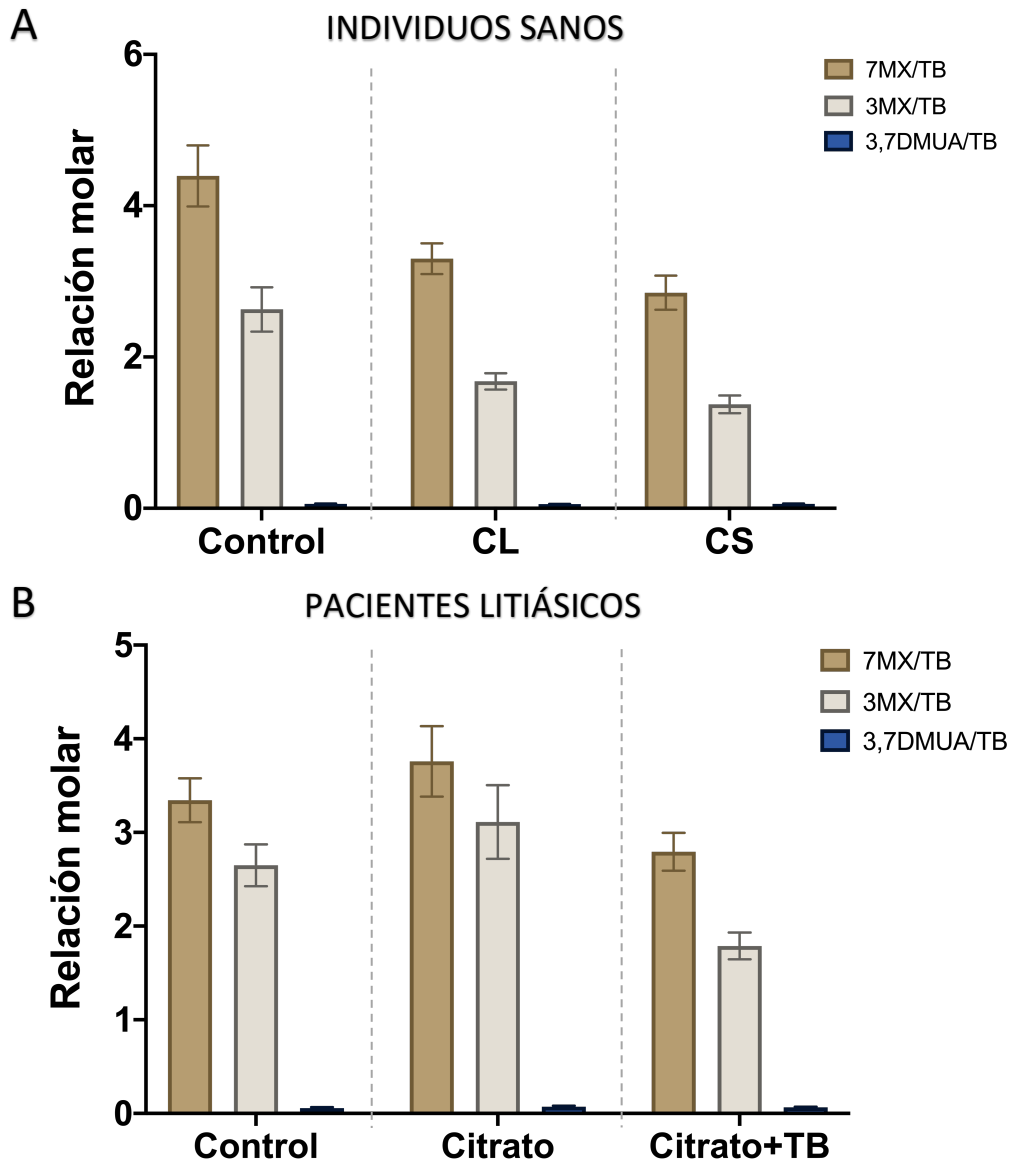


Figura 2.48 Relación molar de los distintos metabolitos respecto a la Teobromina en cada uno de los grupos, en voluntarios sanos (A) y pacientes litiásicos (B).

Tabla 2.17 Media ± SEM de la relación molar de los distintos compuestos respecto a la teobromina.

Voluntarios sanos	TB/37DMUA		7MX/TB		3MX/TB	
Control	0,058	±0,006	4,39	±0,40	2,62	±0,29
CL	0,056	±0,003	3,30	±0,20	1,68	±0,11
CS	0,058	±0,005	2,85	±0,23	1,37	±0,12
Pacientes litiásicos	TB/37DMUA		7MX/TB		3MX/TB	
Control	0,057	±0,010	3,34	±0,23	2,65	±0,22
Citrato	0,071	±0,012	3,76	±0,38	3,11	±0,39
Citrato+TB	0,066	±0,007	2,79	±0,20	1,79	±0,14

Cuando se clasifican los individuos sanos y litíasicos según su resultado en el test RCAU-S y el grado de sobresaturación de la orina se obtienen cuatro grupos: positivos en el test con una SS de AU mayor a 2, negativos en el test con una SS de AU mayor a 2, negativos en el test con una SS de AU menor a 2 y positivos en el test con una SS de AU menor a 2 (Figura 2.49).

Los individuos negativos en el test con una SS de AU mayor a 2 presentaron una concentración de metilxantinas significativamente mayor en comparación a los individuos positivos en el test con una SS de AU mayor a 2. Por otro lado, los individuos positivos en el test con una SS de AU menor a 2 presentaron una concentración de metilxantinas significativamente menor que los individuos negativos en el test con un SS de AU menor a 2 (Figura 2.49 y Tabla 2.18).

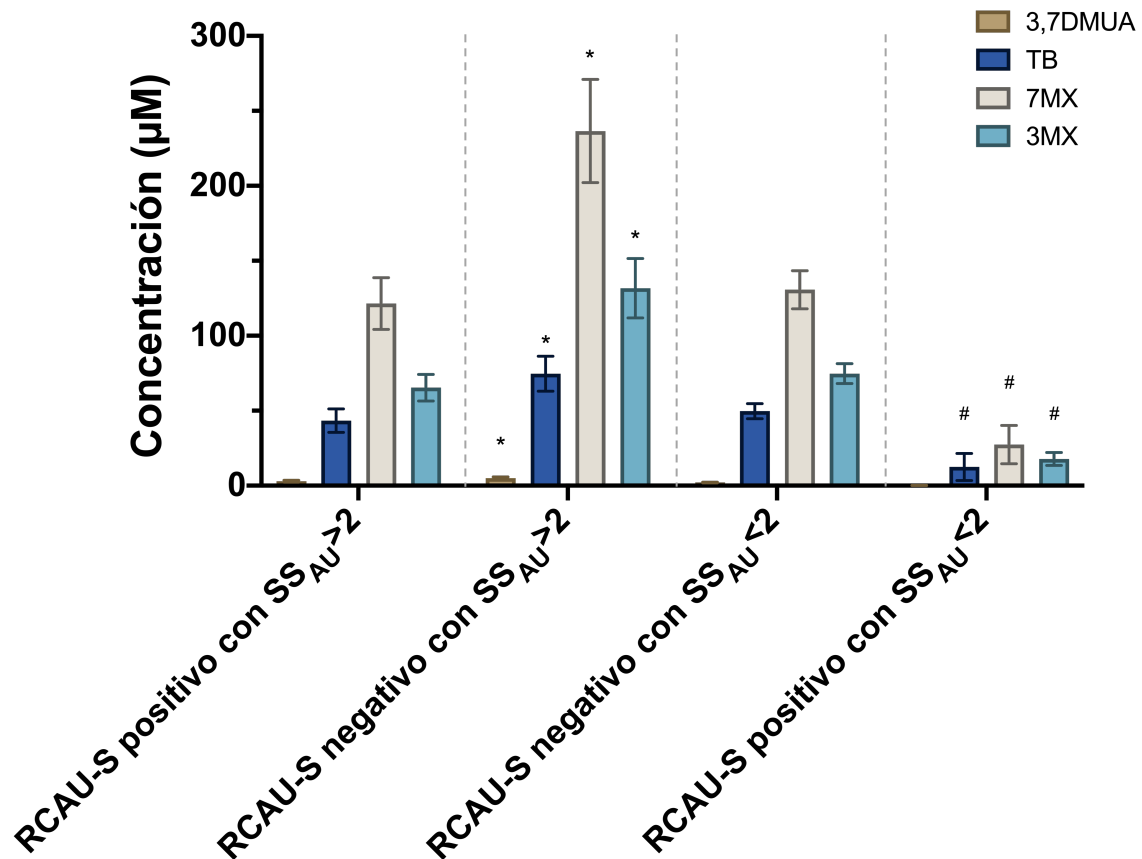


Figura 2.49 Concentración urinaria de teobromina y sus metabolitos en los distintos grupos. * Diferencias significativas con el grupo “RCAU-S positivo con SS_{AU}>2”, p-valor <0,005. # Diferencias significativas con el grupo “RCAU-S negativo con SS_{AU}<2”, p-valor <0,05. Prueba Mann-Whitney para variables continuas no paramétricas independientes.

Tabla 2.18 Media \pm SEM de la concentración urinaria en mM de la teobromina y sus metabolitos en los distintos grupos.

	TB		37DMUA		7MX		3MX	
Positivo con SS>2	0,043	$\pm 7,765$	0,003	$\pm 0,587$	0,122	$\pm 17,247$	0,065	$\pm 8,846$
Negativo con SS>2	0,074	$\pm 11,618$	0,005	$\pm 0,799$	0,237	$\pm 34,482$	0,132	$\pm 19,837$
Negativo con SS<2	0,050	$\pm 5,009$	0,002	$\pm 0,277$	0,131	$\pm 12,731$	0,075	$\pm 6,627$
Positivo con SS<2	0,012	$\pm 9,021$	0,0002	$\pm 0,113$	0,027	$\pm 12,721$	0,018	$\pm 4,290$

Discusión

1. Estudios cinéticos de cristalización cálcica

1.1 Hidrólisis del InsP6 y cuantificación

Aunque las fosfatasa alcalinas de las células de la mucosa humana aparentemente no degradan significativamente el fitato durante el tránsito intestinal, las fitasas de origen vegetal y fitasas microbianas que acompañan a algunos alimentos pueden degradar el fitato de la dieta. Obviamente, los alimentos ricos en fitato que han sido procesados pueden contener varios InsP debido a la degradación de InsP6[36]. Por lo tanto, la ingestión de InsP6 y su posterior degradación puede dar lugar a una diversidad de InsP en la sangre, los tejidos y la orina[85,86]. La variedad de estos diferentes InsP podría explicar por qué el consumo de InsP6 se asocia con diferentes beneficios para la salud comentados anteriormente.

El uso de la MS para la determinación de los distintos InsP en las muestras de InsP6 hidrolizadas durante distintos tiempos (de 0 a 72 horas) permite relacionar los productos de desfosforilación del fitato formando mezclas complejas con sus efectos en el tiempo de inducción del OxCa, BRU y HAP.

La señal del espectrómetro masas de los seis InsP después de someterse a distintos tiempos de hidrólisis (de 0 a 72 h) en porcentaje respecto a la señal de InsP6 a las 0 horas de hidrólisis (100%) se muestra en la Figura 2.8. Los niveles de los distintos InsP de las muestras hidrolizadas se han referenciado a la cantidad de InsP6 de la muestra sin hidrolizar ya que su separación por UHPLC no fue posible y porque en ese momento no se disponía de un patrón que contuviera cada uno de los InsP individuales. Por lo tanto, hay que tener en cuenta que los valores obtenidos de los distintos InsP en cada una de las mezclas de los distintos tiempos de hidrolizado son orientativos debido a la falta de un patrón específico de cada uno de los InsP de menor grado de fosforilación y a la diferente fragmentación y ionización que sufren las muestras. De esta manera, en la muestra de InsP6 puro (hidrolizado de 0h) toda la señal debería ser InsP6, pero también se detecta una gran cantidad incluso mayor de InP5 (así como otros InsP menores), que deben de provenir de la fragmentación del InsP6. Así, a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis es seguro que la cantidad de InsP6 de la muestra disminuye, dando lugar a mezclas de InsP con menor grado de fosforilación. En las

muestras de 48 y 72 horas de hidrólisis los niveles de InsP6 son indetectables y prevalecen los InsP con un grado de fosforilación muy bajo (InsP1, InsP2 y InsP3), mientras que a tiempos de hidrólisis más altos (6,9,16 y 24 horas de hidrolizado) deben prevalecer las mezclas con grandes cantidades de InsP5, InsP4 e InsP3.

Aunque el acoplamiento de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con la espectrometría de masas (MS) en estudios anteriores ha permitido obtener mejores resultados para la identificación del InsP6[82,83], nos encontramos con una falta de estándares disponibles para muchos de los isómeros InsP cuando se quiere llevar a cabo la cuantificación de InsP menores. Además, con los InsP comerciales disponibles tampoco fue posible su separación por UHPL, debido a la alta polaridad tan similar que tienen las muestras.

Las propiedades estructurales de los InsP hacen que sea difícil su identificación y cuantificación por separado. Es por eso por lo que los métodos analíticos más comunes se basan en mediciones no específicas del PPI total o en la formación de complejos con los grupos fosfato (con un proceso previo de separación)[79,80], como los observados en la presente tesis. Estos métodos pueden resultar muy útiles cuando es suficiente una estimación global no específica del *pool* de InsP, pero al tratarse de métodos no específicos, pueden sobrestimar la cantidad de InsP6 cuando hay otros InsP presentes en una muestra.

Gracias a la preparación de disoluciones puras de InsP5, InsP4, InsP3 e InsP2 obtenidos comercialmente, se ha podido observar que mediante el método de extracción y purificación con resina AG 1-X8 y la técnica de la cuantificación inespecífica de InsP con el método de naranja de xilenol-aluminio también se extraen y cuantifican InsP de fosforilación menor (Tablas 2.11 y 2.12). De esta manera se confirma que, aunque al referirse al patrón del InsP6 las concentraciones de InsP5, InsP4, InsP3 e InsP2 son menores a las esperadas, también se produce su cuantificación conjunta con el InsP6. Este método resulta ser también un método favorable para la extracción y cuantificación del InsP5 e InsP4, ya que cuando las absorbancias obtenidas se refieren a sus respectivos patrones la concentración obtenida de InsP5 e InsP4 es la esperada (Tabla 2.12). Si observamos las rectas patrón para el InsP5 e InsP4 (Anexo 1) se observa una buena recta

de regresión, confirmando que la presencia de 5 y 4 grupos fosfato en la molécula de myo-inositol son suficientes para producir un desplazamiento del complejo colorado xilenol-aluminio que dé lugar a una suficiente sensibilidad para su detección. En cambio, para el InsP3 e InsP2, sus rectas de calibrado ya no tienen una buena regresión, debido a la baja interacción entre estos InsP y el aluminio que produce una baja detección para estos dos InsP, aunque se refieran a su propia recta patrón.

La disminución que se produce en los niveles de InsP6 a medida que aumenta el proceso de hidrólisis observado en el espectrómetro de masas también se confirmó mediante la determinación de InsP e iones fosfato de todas las muestras hidrolizadas utilizadas en el estudio (Figura 2.9 A y B respectivamente). Así, a medida que disminuyó la cantidad de InsP6 observada mediante MS por el procedimiento de hidrólisis, la cantidad total de InsP también disminuyó y la concentración de iones de fosfato aumentó. Tras 24 horas de hidrólisis, los resultados mediante MS mostraron una baja concentración de InsP6, y, sin embargo, la cantidad total de InsP solo se redujo en aproximadamente un 50% (Media hidrolizado 0 horas = 1,39 mM; Media hidrolizado de 24 horas = 0,66 mM). Esto podría atribuirse, por un lado, a la ausencia de un calibrado específico para cada tipo de InsP, junto con la fragmentación del InsP6 durante la ionización de la muestra en el espectrómetro de masas, lo que podría resultar en señales subestimadas de la concentración real de InsP6 en la muestra. Por otro lado, la reducción detectada por el método AIXO podría estar subestimada, ya que, como se ha observado previamente, este método también es sensible y preciso en la detección de InsP5 e InsP4.

Solo después de 72 horas de hidrólisis, cuando el nivel de InsP total resultó ser muy reducido (siendo la señal del InsP1 la especie predominante mediante espectrometría de masas), el método AIXO indicó una concentración muy reducida de InsP total (Media hidrolizado de 72 horas = 0,06 mM, Figura 2.9 A), a la vez que que la concentración de iones fosfato fue máxima (Media hidrolizado de 72 horas = 10,63 mM, Figura 2.9 B).

1.2 Cinéticas de cristalización cálcica

1.2.1 Cinéticas de cristalización del oxalato cálcico

Para la cristalización del OxCa, se observó que la muestra sin hidrolizar y que, por lo tanto, presentaba solamente InsP6 teína la mayor capacidad para inhibir la cristalización de OxCa (Figura 2.10 A). Aun así, las mezclas con los hidrolizados InsP5, InsP4 e InsP3 también funcionaron como importantes inhibidores de la cristalización, ya que los hidrolizados de 6, 9, 16 y 24 horas también disminuyeron el tiempo de inducción de la cristalización del OxCa. Estos efectos se equipararon a los del InsP6 a una concentración de 1 μ M para los hidrolizados de 16 y 24 horas, siendo un poco mayores los de 6 y 9 horas. De esta manera se confirma que las mezclas de InsP inhiben la cristalización de OxCa, incluso cuando InsP6 no es tan abundante en estas mezclas. Este hecho también se confirma mediante la evaluación del efecto de los InsP de manera individual obtenidos comercialmente (Figura 2.10 B), observando que el 1,2,3,5,6-InsP5 presenta una capacidad de inhibición parecida al del InsP6.

En cambio, cuando las mezclas contuvieron mayoritariamente InsP de bajo grado de fosforilación (InsP1, InsP2 e incluso InsP3), como ocurre en las de 48 y 72 horas (Figura 2.8), la capacidad de inhibir la cristalización del OxCa se vio significativamente disminuida (Figura 2.10 A). Este hecho también se confirma mediante el uso individual del 1,4,5-InsP3, y 2,4-InsP2 obtenidos comercialmente (Figura 2.10 B), los cuales no presentaron efectos inhibidores ni a mayores concentraciones (2 μ M). Para la cristalización del OxCa, el InsP4 individual (2,3,5,6-InsP4 puro) no presentó una inhibición significativa (Figura 2.10 B), aunque se hubiera esperado más teniendo en cuenta los efectos de las mezclas de hidrolizados. Esto podría deberse a que el 2,3,5,6-InsP4 es un inhibidor más débil que los otros isómeros del InsP4 que están presentes en las mezclas de hidrolizado. Alternativamente, es posible que existan efectos sinérgicos en la mezcla de hidrolizados de InsP que aún se desconocen. Aunque el InsP5 e InsP4 obtenidos comercialmente solo se estudiaron a una concentración (1 μ M, Figura 2.10 B), observando que el InsP6 presentó mayores efectos cuanto mayor fue su concentración (Figura 2.10 A), es probable que mayores concentraciones de los InsP de fosforilación menor presenten también mayores efectos que los observados.

La inhibición ejercida por el fitato puede tener lugar tanto a nivel de nucleación (adsorción en la superficie del núcleo) como en el posterior crecimiento o agregación de los cristales, impidiendo así la cristalización[87,128]. Además, la adsorción de fitato a las caras de los cristales también puede inhibir la disolución de los cristales, lo que explica en parte por qué algunos agentes que previenen la calcificación patológica, como el fitato, también podrían inhibir la descalcificación ósea[51,129].

El análisis mediante microscopía electrónica de barrido para observar los diferentes tipos de cristales de OxCa que se formaron en la OA en presencia de los diferentes hidrolizados de InsP mostró que en ausencia de InsP6 o sus hidrolizados (experimento control, Figura 2.11 A, 2.12 A y 2.13 A), predominaron los cristales de COT con COM minoritario. El COT es la forma cinéticamente más favorable de oxalato de calcio[130]. Sin embargo, no es termodinámicamente estable y se transforma fácilmente en las formas más estables, como son el COM o el COD, siendo la primera la termodinámicamente más estable[131]. En cambio, en presencia de InsP6 y muestras sometidas a hidrólisis durante 6, 9, 16 o 24 horas, los cristales de COT desaparecen y se observa la formación de cristales COD, manteniéndose la presencia de cristales de COM. Esto indica que los inhibidores al retrasar la cristalización del OxCa también producen un cambio en la morfología de los cristales que se obtienen después de la cinética, pasando de la formación de la fase COT a la formación de fase COD y COM, lo que indica que se ha producido una inhibición significativa de la cristalización de todas estas muestras. Sin embargo, los cristales de COT reaparecieron en presencia de muestras que se hidrolizaron durante 48 y 72 horas (Figura 2.12 G y H), y en la muestra de InsP6 a una concentración de 0,5 μM (Figura 2.11 B). Estas muestras fueron las que presentaron incrementos en el tiempo de inducción más reducidos (insp6 0,5 μM y muestra hidrolizada de 48 horas) o nulos (muestra hidrolizada de 72 horas) (Figura 2.10 A). Por otro lado, aunque el 1,2,3,5,6-InsP5 a una concentración de 1 μM mostrara efectos inhibidores parecidos al del InsP6 a esta misma concentración (Figura 2.10 B), al analizar los cristales se continuaron encontrado COTs, por lo que esta concentración resulta suficiente para aumentar el tiempo de inducción del OxCa, pero no para llegar a producir el cambio de morfología hacia COD (Figura 2.13 C).

La presencia de bifosfonatos y citrato tampoco produjeron cambios en el tiempo de inducción del OxCa (Tabla 2.13), así como tampoco en la morfología de los cristales, que fueron mayoritariamente de COT con COM minoritario (Figura 2.14). El citrato, estudiado ya en ensayos turbidimétricos anteriores con las mismas concentraciones de calcio (200 mg/L) y de oxalato (50 mg/L), tampoco presentó efectos inhibidores a concentraciones parecidas, pero sí que su efecto fue aumentando a medida que aumentó su concentración hasta llegar a 800 mg/L, cuyo tiempo de inducción fue de 15 minutos[70]. Aunque a una concentración de 600 mg/L pareció presentar efectos inhibidores, la morfología de los cristales continuó siendo COT[70]. Los bifosfonatos usados (alendronato, pamidronato, ibandronato y etidronato), no tuvieron efectos en la cristalización del OxCa, ni en el tiempo de inducción ni a nivel morfológico, por lo que sus efectos observados sobre la disminución del riesgo de litiasis renal en pacientes con osteoporosis se pueden atribuir a su capacidad de evitar la resorción ósea[95,132,133].

Este cambio de fase producido por los inhibidores de la cristalización puede deberse a que el COT tiene una capacidad de adsorción para estas sustancias mayor que la del COD. Esto es debido a que el COT contiene más sitios por unidad de área donde es posible la adsorción. Debido a que el COD contiene menos sitios de adsorción, la probabilidad de que una molécula inhibidora encuentre esos sitios debe incrementarse aumentando la concentración de inhibidor, por lo que la formación de núcleos críticos cristalinos de COD solo se producirá en presencia de unas elevadas cantidades de inhibidor[134].

Tanto los resultados obtenidos sobre el tiempo de inducción con las distintas muestras hidrolizadas (de 0 a 72 horas) a una concentración de InsP6 inicial de 2 μ M, como los efectos en el tipo de cristal de OxCa obtenido según la inhibición ejercida se corresponden con el estudio previo realizado con el InsP6 a una concentración de 1,2 μ M (Anexo 4, Artículo 1).

1.2.2 Cinéticas de cristalización de la brushita

Para el estudio cinético de la BRU, al contrario que en la cristalización del OxCa, la muestra sin hidrolizar y que, por lo tanto, contenía solamente Inp6 no presentó los

mayores efectos inhibidores (Figura 2.15 A). De hecho, a una concentración de 2 μM , la máxima evaluada, apenas consiguió retrasar el tiempo de inducción de la BRU aproximadamente cinco minutos. Las muestras hidrolizadas que presentaron mayores efectos en la inhibición fueron las de 16 y 24 horas, llegando a incrementar el tiempo de inducción hasta 53 y 40 minutos respectivamente (Figura 2.15 A). A partir de estos tiempos de hidrolisis, la capacidad de inhibir la cristalización de la BRU decayó para las muestras de 48 y 72 horas, aunque el incremento del tiempo de inducción de la muestra hidrolizada 48 horas es importante. Por lo tanto, en este caso se confirma que las mezclas de InsP6, InsP5, InsP4 e InsP3 funcionan como importantes potentes inhibidores de la cristalización, incluso más que el InsP6 solo, cuyos efectos son reducidos. Este hecho se confirma mediante el uso de los InsP de manera individual obtenidos comercialmente (Figura 2.15 B), observando que el 1,2,3,5,6-InsP5 y el 2,3,5,6-InsP4 presentaron una capacidad de inhibición parecida al del InsP6. Por otro lado, se observa que el 1,4,5-InsP3 a mayores concentraciones (2 μM) podría presentar un efecto importante, mientras que el 2,4-InsP2 presentó un efecto reducido a la mayor concentración estudiada (2 μM). Esto explicaría porque cuando las mezclas contienen mayoritariamente InsP de bajo grado de fosforilación (InsP1, InsP2 e incluso InsP3), como ocurre en las de 48 y 72 horas, la capacidad de inhibir la cristalización de la BRU se ve fuertemente disminuida (Figura 2.15 A y B).

Para los bifosfonatos a una concentración 2 μM , el alendronato y pamidronato presentaron una mayor capacidad de inhibición de la BRU que el fitato, mientras que el ibandronato presentó un efecto parecido (Figura 2.19), siendo en ambos casos los valores obtenidos en el incremento del tiempo de inducción equivalentes. El etidronato produjo una inhibición intermedia entre el ibandronato y pamidronato. En cuanto al efecto del citrato, a una concentración de 250 ppm mostró una inhibición importante en la cristalización de la BRU (Figura 2.19 marcador rosa).

En el análisis mediante el microscopio electrónico de barrido se observa que la morfología y tipología de cristal obtenida después de cada cinética es siempre la misma: BRU con una morfología plana de cuchilla. Aunque no se aprecien cambios morfológicos muy destacables entre los cristales de BRU obtenidos después de evaluar los efectos de los InsP y bifosfonatos, sí que se ha observado un cambio en la organización de estos

crisales, observando una gran tendencia a presentar una organización mayor de los cristales de BRU en núcleos cristalinos independientes, en forma de flor, con cristales de BRU más puntiagudos, como los observados en los obtenidos después de testar los hidrolizados de 16 y 24 horas (Figura 2.17 E y F), los cuales presentaron los mayores efectos inhibidores en la cristalización de la BRU.

Por otro lado, el citrato, aparte de llevar a cabo una inhibición importante de la cristalización de la BRU, también produjo un cambio en su morfología, dando lugar a cristales alargados y delgados con terminación puntiaguda (Figura 2.20 F). Eso se debería a la afinidad presentada por el citrato por la cara (010) de la BRU (Figura 2.50), lo que daría lugar a cristales con morfología de aguja como las observadas[135,136].

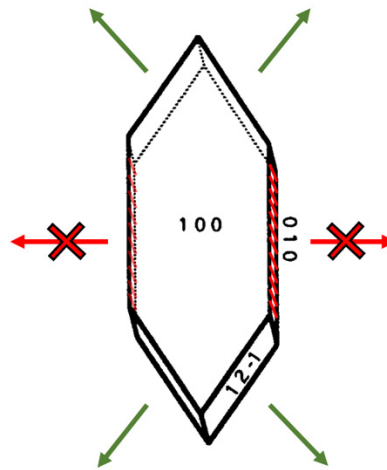


Figura 2.50 Morfología cristalina hexagonal. La unión de un inhibidor en la cara (010) favorece el crecimiento del cristal a través de las direcciones representadas con flechas verdes.

1.2.3 Cinéticas de cristalización de la hidroxapatita

Finalmente, se observa que tanto el InsP6 como sus hidrolizados no presentaron efectos inhibidores detectables sobre la cristalización de HAP (Figura 2.35). Ensayos turbidimétricos anteriores donde se estudió la cristalización de la HAP ya mostraron que el InsP6 no modificó el tiempo de inducción, pero que el pirofosfato sí tuvo un gran efecto[22]. En cambio, los bifosfonatos sí presentaron una cierta capacidad de inhibir la cristalización de la HAP en disolución (Figura 2.36), siendo el más efectivo el ibandronato, presentando los mayores incrementos en el tiempo de inducción.

Resulta curioso el hecho de que los InsP no mostraran ninguna capacidad de inhibición cuando en la bibliografía pueden encontrarse múltiples estudios con animales de experimentación y humanos que han demostrado que la ingesta de InsP6 reduce significativamente la calcificación formada por HAP[137,138]. Una explicación sería que el mecanismo responsable de la formación de depósitos de HAP es completamente diferente del mecanismo responsable de la formación de cristales de OxCa y BRU. En particular, la formación de un cristal HAP comienza con la formación de grupos reducidos de iones de calcio y fosfato. Estos grupos se agrupan en unidades más grandes (nanopartículas) que forman depósitos de HAP en presencia de sustratos o matrices apropiados[139,140]. En el organismo, las calciproteínas, complejos coloidales de CaP y la proteína fetuina-A, parecen desempeñar un papel importante en el desarrollo de calcificaciones cardiovasculares[141]. Por lo general, se cree que las calciproteínas almacenan el CaP, facilitando su transporte a los sitios de eliminación y, por lo tanto, disminuyendo el riesgo de deposición ectópica[142,143]. Inicialmente estos complejos pueden fusionarse para formar partículas con el mineral contenido en una fase amorfa desordenada (CPP-1), antes de transformarse en partículas más grandes, densas e insolubles con fases cristalinas como la HAP (CPP-2). Así, según el tipo y cantidad, estas partículas se han relacionado con la inducción de la inflamación[144], daño endotelial[145,146] y mineralización ectópica[147,148].

El pirofosfato (un análogo de los bisfosfonatos) dificulta la nucleación y cristalización del CaP amorfo e inhibe el crecimiento y la maduración de los cristales de HAP[3,149]. Por lo tanto, el pirofosfato y los polifosfatos podrían afectar la evolución de las partículas de calciproteína in vivo, ya que pueden prevenir o inhibir la calcificación. Así, debido a que la formación de cristales de HAP in vivo depende en gran medida de la presencia de otros compuestos, es probable que los efectos observados de los distintos InsP evaluados in vitro sean muy diferentes de los in vivo.

De esta manera, los estudios comprendidos en este capítulo ampliaron los hallazgos previos (anexo 4 artículo 1) al examinar el efecto de InsP6, sus hidrolizados y los InsP individuales obtenidos comercialmente en la cristalización del OxCa, Bru y HAP. Estos resultados indicaron que los InsP con un grado de fosforilación más bajo (InsP3 e InsP2) ejercieron poco efecto en la cristalización del OxCA. Sin embargo, debe tenerse

en cuenta que el grado de inhibición de los InsP también depende de su concentración, por lo que estos InsP más bajos podrían jugar un papel in vivo más importante de lo observado in vitro.

Por lo tanto, la inhibición de la cristalización del OxCa, BRU y HAP in vivo después del consumo de InsP6 es probablemente atribuible al InsP6 y a los InsP con menor grado de fosforilación. Así, es muy importante considerar que los productos resultantes de la desfosforilación del InsP6 también son potentes inhibidores de la cristalización cálcica.

2. Metilxantinas: efectos en las cinéticas de cristalización del ácido úrico y concentración en orinas de individuos sanos y litíasicos

2.1 Cinéticas de cristalización del ácido úrico

El claro efecto del tiempo de mezclado antes de la inducción de la sobresaturación de AU sobre los efectos inhibidores de la teobromina (Figura 2.39) sugiere que esta capacidad de inhibición se relaciona con una interacción entre la teobromina y el AU en la interfase cristalina y en disolución. De hecho, en un estudio previo de las interacciones moleculares entre la teobromina y el AU en disolución se encontró que estas moléculas tenían una interacción π - π [119]. Estas dominarían sobre las interacciones AU-AU, disminuyendo la sobresaturación de AU y, por lo tanto, retrasarían la formación de los cristales de AU. Así, los resultados demostraron un retraso en t_i de la cristalización del AU cuando el tiempo de mezclado de la disolución de OA conteniendo teobromina y AU fue de 15 min o más (Figura 2.39).

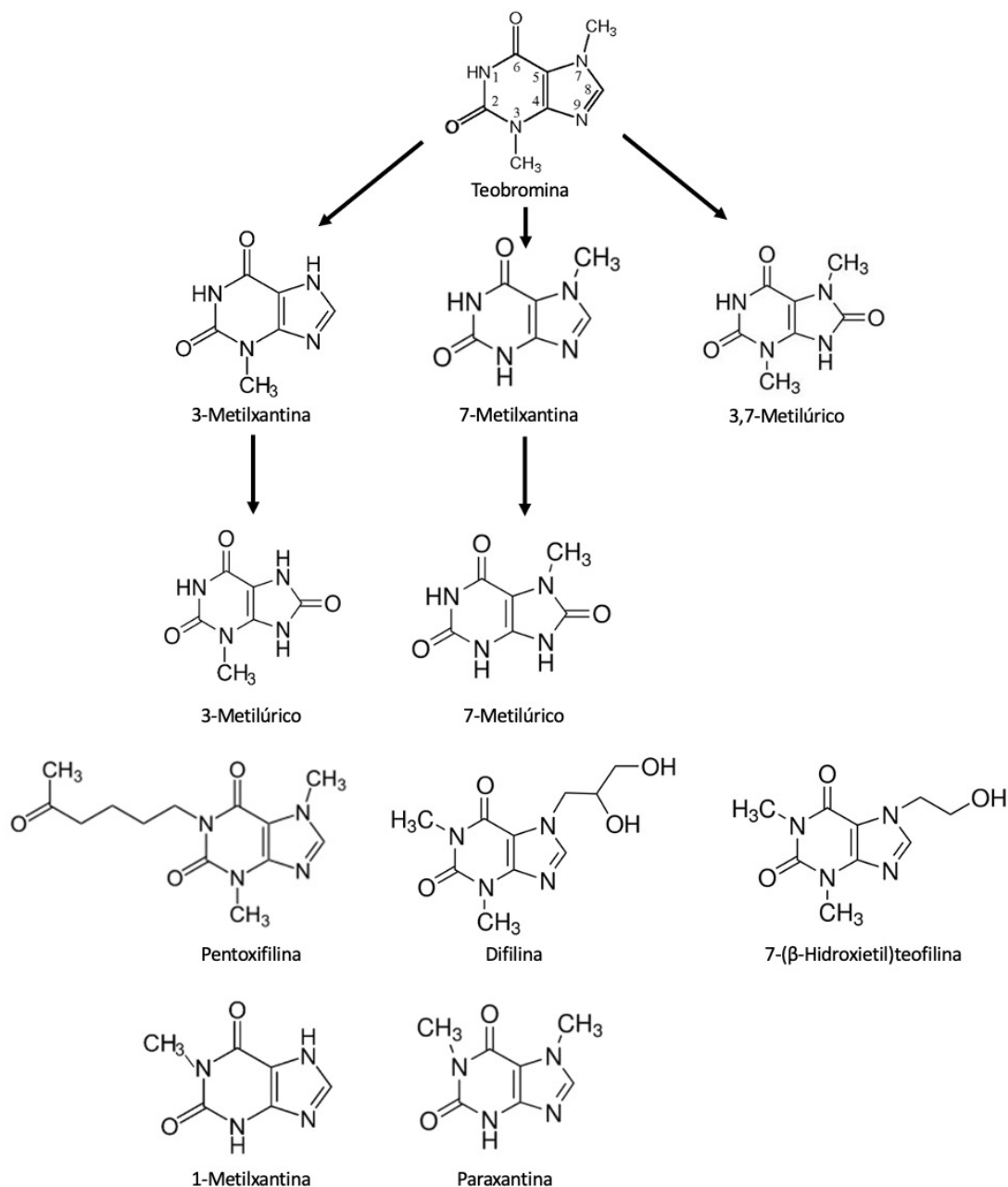


Figura 2.51 Estructuras químicas de la teobromina, metabolitos de la teobromina y metilxantinas relacionadas: pentoxifilina (3,7-dimetil-1-(5-oxohexil)xantina), difilina (7-(2,3-dihidroxipropil)teofilina), 7-(β-hidroxietil)teofilina (1,3-dimetil-7-(2-hidroxietil)xantina), 1-metilxantina y Paraxantina. Nótese la presencia o ausencia de diferentes sustituyentes en la posición 1 y la presencia o ausencia de un grupo metilo en la posición 7 en las diferentes moléculas.

En la Figura 2.51 se muestran todas las metilxantinas estudiadas en la presente tesis. Los efectos de las diferentes metilxantinas mostraron que la teobromina, la 7-metilxantina, el 3,7-dimetilúrico y la 3-metilxantina inhibieron la cristalización del AU (Figuras 2.40 y 2.41). Sin embargo, ninguno de los derivados de xantina probados con

sustituyentes en la posición 1 (1-metilxantina, pentoxifilina, 7-(β -hidroxiethyl)teofilina y difilina) presentaron efectos inhibidores de la cristalización del AU en las condiciones estudiadas. Este hecho concuerda con resultados obtenidos en estudios anteriores, donde se mostró que la cafeína, la paraxantina y la teofilina, cada una de las cuales contiene un grupo metilo en la posición 1, no inhibieron la cristalización del AU[114]. Además, al comparar los efectos entre las xantinas que presentaron efectos inhibidores (teobromina, la 7-metilxantina, el ácido 3,7-dimetilúrico y la 3-metilxantina, Figura 2.41) se observó que los compuestos con la mayor capacidad de inhibir la cristalización de AU tenían un grupo metilo en la posición 7. Por lo tanto, para las xantinas, las posiciones de los diferentes grupos sustituyentes parecen afectar la capacidad de inhibir la cristalización del AU.

Dos análisis clínicos prospectivos donde se evaluaron los factores dietéticos relacionados con el riesgo de formación de cálculos renales encontraron que el consumo de cafeína estaba inversamente asociado con este riesgo[150,151], aunque la cafeína en sí misma no inhiba la cristalización de AU. Esto puede deberse a que la ingesta de cafeína por parte de los humanos conduce a la excreción urinaria de metilxantinas, dimetilxantinas y dimetil/metilúrico[152], de manera que la concentración total de estos metabolitos debe ser suficiente para inhibir la cristalización del AU, según los resultados presentados en la presente tesis.

El consumo de teobromina, la cual se encuentra en abundantes cantidades en el cacao[106], se excreta en la orina principalmente como 7-metilxantina (36 %), 3-metilxantina (21 %) y 3,7-dimetilúrico (1,3 %), manteniéndose alrededor del 21% de la teobromina administrada inalterada[107]. Por esta razón, probamos los efectos de la combinación de teobromina con 7-metilxantina (Figura 2.42). Los resultados mostraron que el efecto inhibitorio total fue mayor o igual a la suma de los efectos de cada compuesto individual, evidenciando la presencia de efectos sinérgicos a concentraciones más altas. Así, la cristalización del AU en orina se ve afectada por la concentración global de teobromina y varios de sus metabolitos, especialmente la 7-metilxantina (demostrado en la presente tesis) y probablemente del ácido 3,7-dimetilúrico (que presentó efectos inhibidores tan importantes como la teobromina y la 7-metilxantina), los cuales también provienen del metabolismo de la cafeína.

En el análisis mediante el microscopio electrónico de barrido se observa que, en ausencia de metilxantinas, la morfología de los cristales de AU obtenidos después de la cinética control es rectangular (Figura 2.43 A y 2.44 A). Esta morfología se mantiene después del uso de metilxantinas que tuvieron un efecto nulo en la cristalización del AU (pentoxifilina, hidroxietilteofilina y difilina, Figura 2.43 D, E, F respectivamente). Por otro lado, en presencia de 1-metilxantina, paraxantina y 3-metilxantina, cuyo efecto inhibitorio fue muy reducido, se observa una modificación de la morfología de los cristales, los cuales se vuelven más delgados. Esto se debe a la inhibición del crecimiento en una de las caras del cristal (210) (Figura 2.52).

En presencia de teobromina (Figura 2.44 B-F), los cristales obtenidos se vuelven más delgados y cortos a medida que aumenta su concentración y, por lo tanto, su efecto inhibitorio en la cristalización del AU. Este efecto ya se había observado en estudios anteriores[114]. Lo mismo ocurre en presencia del 3,7-dimetilúrico, cuyos cristales son delgados y cortos en las tres concentraciones probadas; y en la 7 metilxantina, que a mayor concentración más delgados son los cristales obtenidos. Por lo tanto, la morfología de los cristales y su modificación se relacionan con la capacidad de inhibición de la metilxantina estudiada.

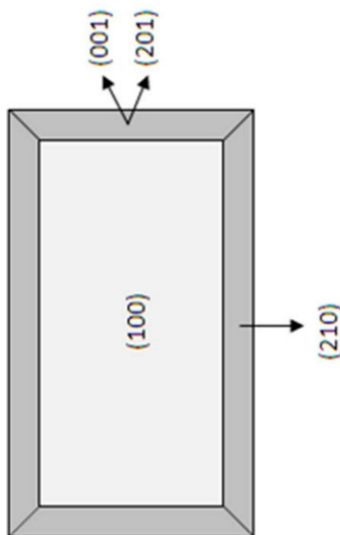


Figura 2.52 Morfología de un cristal de ácido úrico anhidro con sus planos cristalográficos. Esta morfología es la misma que se puede observar en el microscopio electrónico de barrido cuando se forman cristales de ácido úrico in vitro en ausencia de compuestos (Figura 2.43 A y 2.44 A). Debido a la morfología de los cristales de ácido úrico formados en presencia de teobromina en OA (Figuras 2.44 B-F), podemos concluir que la cara mayormente inhibida es (210), lo que da como resultado cristales de ácido úrico más delgados y largos. A mayores concentraciones de las metilxantinas no solo se encuentran cristales más delgados, sino también más cortos, por lo que también podría haber cierta inhibición del crecimiento de la cara (001) y (201).

2.2. Metilxantinas en orinas de individuos sanos y litiásicos

La solubilidad del AU obviamente depende del pH (Figura 2.46). Por lo tanto, la solubilidad es inferior a 110 mg/L para un pH urinario inferior a 5,0, inferior a 250 mg/L a pH 5,5 y superior a 600 mg/L para un pH superior a 6,0 (Figura 2.46 (b)). En consecuencia, la sobresaturación de AU en la orina es una función del pH urinario y de la concentración de AU, siendo el primera el factor más decisivo[127].

La formación de cristales solo es posible en una disolución sobresaturada ($SS > 1$), aunque existe un rango de valores de sobresaturación en los que un medio es metaestable, en el que los cristales ya formados pueden crecer, pero no se forman nuevos cristales. Para valores de sobresaturación por encima del límite superior de la zona metaestable, el medio se vuelve inestable y la cristalización es espontánea. Para el AU en orina, este límite corresponde a un nivel de SS superior a 2[126], aunque ciertos factores pueden modificar la cinética del proceso aumentando el rango metaestable.

Los resultados del test del riesgo de cristalización del AU simplificado (RCAU-S) de las muestras de orina de dos estudios distintos (voluntarios sanos[113] y pacientes litiásicos[118]), se relacionaron con sus correspondientes valores de sobresaturación del AU (Figura 2.46 A para RCAU-S positivo, y Figura 2.46 B para RCAU-S negativo).

En estos resultados se encontraron que 34 de las 147 muestras sin riesgo de cristalización de AU (Figura 2.46 B) tuvieron valores de sobresaturación superiores a 2, por lo que se trata de muestras que deberían haber cristalizado, pero que no lo hicieron. Los inhibidores de la cristalización retardan o impiden uno o más pasos del proceso de cristalización, y la presencia de estos inhibidores aumenta la resistencia a la cristalización cuando la SS está por encima del límite metaestable. Este fenómeno parece ser más común en estas muestras, lo que indica que muchas de estas muestras de orina contenían sustancias que impidieron la cristalización del AU.

Así lo demostró el análisis de la concentración de teobromina, 3,7-dimetilúrico, 7-metilxantina y 3-metilxantina, donde se observó que en las muestras de orina en las que no se produjo cristalización de AU cuando la sobresaturación superior a 2 contenían cantidades de estos metabolitos significativamente mayores que las orinas con RCAU-S

positivo y sobresaturación mayor a 2. La media de concentración de teobromina para este grupo fue de 0,074 mM (Tabla 2.18). La concentración de 0,1 mM de teobromina fue la concentración más baja que presentó inhibición de la cristalización para una sobresaturación de AU de 3,55 (pH 4,65; AU= 400 mg/L). Por lo tanto, la presencia conjunta de teobromina y sus metabolitos probablemente sean responsables de prevenir la cristalización de AU en condiciones de SS mayores a 2. Estos resultados muestran que, con una ingesta baja de teobromina, se pueden alcanzar valores de inhibición de la cristalización superiores a los esperados, debido a la presencia de los metabolitos de la teobromina. Sin embargo, debemos considerar que algunas muestras con SS por encima de 2 tenían concentraciones bajas de teobromina y, consecuentemente, de sus metabolitos, y aun así no formaron cristales de AU. Esto sugiere la existencia de otros inhibidores no identificados hasta ahora que también estarían presentes en las muestras de orina.

Aunque no fuera una situación frecuente, cinco de sesenta y seis muestras fueron positivas en RCAU-S con valores de SS menores a 2. Si comparamos los niveles de metilxantinas de estas muestras con las que obtuvieron un resultado del RCAU-S negativo con una SS menor a 2, observamos que contienen una cantidad de metilxantinas significativamente menor, lo que explicaría porque aun con sobresaturaciones bajas, estas orinas llegan a cristalizar después de 24 horas (Figura 2.49). Por otro lado, la presencia de nucleantes heterogéneos reducen el valor de sobresaturación requerido para la nucleación de nuevos cristales. La presencia de tales factores en la orina también podría explicar por qué algunas de nuestras muestras desarrollaron cristales de AU incluso cuando la SS fue inferior a 2.

Conclusiones

1. Estudios cinéticos de cristalización cálcica

- Los productos de hidrólisis del InsP6 ejercen un efecto inhibitor en la cristalización del OxCa y de la BRU. Por lo tanto, aunque el InsP6 se hidroliza enzimáticamente después de su consumo, sus productos de hidrólisis también inhiben la cristalización. Esto puede explicar los efectos positivos del consumo de fitato sobre las calcificaciones patológicas.
- Si bien la cuantificación del nivel total de InsP puede ser valiosa, es esencial elaborar métodos analíticos sensibles y específicos capaces de cuantificar cada uno de los productos de la hidrólisis del InsP6 por separado.
- En el caso de la cristalización del OxCa, las mezclas de hidrolizados presentan efectos inhibidores menores que el InsP6 individual. Aun así, se observa que el InsP5 obtenido comercialmente presenta efectos equivalentes al InsP6. En el caso de la cristalización de la BRU, algunas de las mezclas de hidrolizados (como por ejemplo las de 16 y 24 horas de hidrólisis) presentan efectos inhibidores mucho mayores que el InsP6 individual. Además, el InsP5 y InsP4 obtenidos comercialmente presentan efectos equivalentes al InsP6. Este conjunto de hallazgos demuestra que la mezcla de los distintos InsP, así como sus distintos isómeros podrían ejercer efectos inhibidores muy importantes tanto en la cristalización oxocálcica como en la de la BRU.
- El efecto inhibitor del fitato y sus hidrolizados se relaciona con un cambio morfológico de los cristales de OxCa obtenidos, produciendo un cese en la formación de cristales COT (cinéticamente más favorecidos), por la formación de cristales COD y COM (termodinámicamente más favorecidos).
- El efecto inhibitor del fitato y sus productos de hidrólisis no se asocia con cambios morfológicos en los cristales de BRU obtenidos. No obstante, se observa una tendencia a obtener núcleos de cristalización de BRU más ordenados e individuales, con una disposición similar a la de una flor y cristales más puntiagudos.
- Los bifosfonatos estudiados (alendronato, pamidronato, etidronato e ibandronato) mediante las cinéticas de cristalización no presentan capacidad de inhibir la cristalización del OxCa. En cambio, sí que inhiben la cristalización de la

BRU, también relacionándose con una mayor organización estructural de los núcleos cristalinos. Por otro lado, el citrato a 250 ppm no inhibe la cristalización del OxCa, mientras que sí inhibe la de la BRU, dando lugar a cristales con una morfología distinta, más finos y alargados.

- El fitato y sus hidrolizados no inhiben la cristalización de la HAP, como ya se había observado en estudios anteriores. Por lo tanto, para sus efectos observados in vivo jugaría un papel importante el entorno celular y posiblemente distintas biomoléculas, como las calciproteínas. Los bifosfonatos (pamidronato, alendronato e ibandronato) sí presentan capacidad de inhibición de la HAP, siendo este último el más eficaz.

2. Metilxantinas: efectos en las cinéticas de cristalización del ácido úrico y concentración en orinas de individuos sanos y litiasicos

- La teobromina inhibe la cristalización del AU de manera concentración-dependiente hasta 0,4 mM.
- La 7-metilxantina y el 3,7-dimetilúrico presentan efectos inhibidores tan potentes como la teobromina. Por otro lado, la 3-metilxantina presenta efectos inhibidores reducidos en comparación con las metilxantinas nombradas anteriormente.
- La 1-metilxantina, paraxantina (1,7-dimetilxantina), cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teofilina (1,3-dimetilxantina), pentoxifilina (3,7-dimetil-1-(5-oxohexil)xantina), difilina (7-(2,3-dihidroxipropil)teofilina) y 7-(β -hidroxietil)teofilina (1,3-dimetil-7-(2-hidroxietil)xantina) prácticamente no presentaron efectos inhibidores de la cristalización del AU.
- El potencial efecto inhibidor de las metilxantinas se relaciona con su estructura, ya que las que carecen de un sustituyente en la posición 1, pero con un sustituyente en la posición 7 son las que presentan mayores efectos inhibidores. Así, el 7-metilúrico (no estudiado en la presente tesis) podría también presentar grandes efectos inhibidores de la cristalización del AU.
- La teobromina juntamente con la 7-metilxantina presenta efectos sinérgicos a mayores concentraciones, por lo que la presencia de distintas mezclas de

metilxantinas en la orina explicaría porque personas con concentraciones bajas de teobromina no desarrollan cristales de AU.

- Un mayor consumo de teobromina se traduce en una mayor concentración de teobromina urinaria, así como también de 7-metilxantina, 3,7-dimetilúrico y 3-metilxantina.
- Los individuos con parámetros clínicos que favorecen la cristalización del AU y que no desarrollaron cristales en el test RCAU-S presentaron orinas con una concentración significativamente mayor de teobromina y sus metabolitos. Por otro lado, individuos sin parámetros clínicos que favorezcan la cristalización del AU y que presentaron cristales en el test RCAU-S tuvieron orinas con una concentración significativamente menor de teobromina y sus metabolitos. Por lo tanto, la teobromina y sus metabolitos tienen la capacidad de reducir el riesgo de litiasis úrica, así como una disminución de sus niveles puede ser un factor de riesgo para la cristalización del AU.

Bibliografía

1. Fleisch, H.; Bisaz, S. The Inhibitory Effect of Pyrophosphate on Calcium Oxalate Precipitation and Its Relation to Urolithiasis. *Experientia* **1964**, *20*, 276–277, doi:10.1007/BF02151805.
2. FLEISCH, H.; BISAZ, S. Isolation from Urine of Pyrophosphate, a Calcification Inhibitor. *Am J Physiol* **1962**, *203*, 671–675, doi:10.1152/AJPLEGACY.1962.203.4.671.
3. Fleisch, H.; Bisaz, S. Mechanism of Calcification: Inhibitory Role of Pyrophosphate. *Nature* **1962**, *195*, 911, doi:10.1038/195911A0.
4. Li, M.K.; Blacklock, N.J.; Garside, J. Effects of Magnesium on Calcium Oxalate Crystallization. *Journal of Urology* **1985**, *133*, 122–125, doi:10.1016/S0022-5347(17)48819-7.
5. Meyer, J.L. The Relative Importance of Calcium Phosphate Urinary Inhibitors. *Urolithiasis and Related Clinical Research* **1985**, 811–814, doi:10.1007/978-1-4684-7272-1_175.
6. Ryall, R.L.; Harnett, R.M.; Marshall, V.R. The Effect of Urine, Pyrophosphate, Citrate, Magnesium and Glycosaminoglycans on the Growth and Aggregation of Calcium Oxalate Crystals in Vitro. *Clinica Chimica Acta* **1981**, *112*, 349–356, doi:10.1016/0009-8981(81)90458-7.
7. Pak, C.Y.C. Citrate and Renal Calculi. *Miner Electrolyte Metab* **1987**, *13*.
8. Ryall, R.L. Urinary Inhibitors of Calcium Oxalate Crystallization and Their Potential Role in Stone Formation. *World J Urol* **1997**, *15*, 155–164, doi:10.1007/BF02201852.
9. See, W.A.; Williams, R.D. Urothelial Injury and Clotting Cascade Activation: Common Denominators in Particulate Adherence to Urothelial Surfaces. *Journal of Urology* **1992**, *147*, 541–548, doi:10.1016/S0022-5347(17)37302-0.
10. Grases, F.; García-Ferragut, L.; Costa-Bauzá, A. Study of the Early Stages of Renal Stone Formation: Experimental Model Using Urothelium of Pig Urinary Bladder. *Urol Res* **1996**, *24*, 305–311, doi:10.1007/BF00304781.
11. Barcelo, P.; Wuhl, O.; Servitge, E.; Rousaud, A.; Pak, C.Y.C. Randomized Double-Blind Study of Potassium Citrate in Idiopathic Hypocitraturic Calcium Nephrolithiasis. *Journal of Urology* **1993**, *150*, 1761–1764, doi:10.1016/S0022-5347(17)35888-3.
12. Nicar, M.J.; Hsu, M.C.; Fetner, C. Urinary Response to Oral Potassium Citrate Therapy for Urolithiasis in a Private Practice Setting. *Clin Ther* **1986**, *8*.
13. Pak, C.Y.C.; Fuller, C.; Sakhaee, K.; Preminger, G.M.; Britton, F. Long-Term Treatment of Calcium Nephrolithiasis with Potassium Citrate. *Journal of Urology* **1985**, *134*, 11–19, doi:10.1016/S0022-5347(17)46962-X.
14. Pak, C.Y.C.; Sakhaee, K.; Fuller, C. Successful Management of Uric Acid Nephrolithiasis with Potassium Citrate. *Kidney Int* **1986**, *30*, 422–428, doi:10.1038/KI.1986.201.
15. Pak, C.Y.C.; Adams, B. V. Potassium Citrate Therapy of Nephrolithiasis. *Renal Stone Disease* **1987**, 201–224, doi:10.1007/978-1-4613-2069-2_8.
16. Perelló, J.; Grases, F. Phytate Levels in Biological Fluids of Mammals. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2014**, *960*, 255–257, doi:10.1016/J.JCHROMB.2013.12.016.

17. Grases, F.; Llobera, A. Determination of Phytic Acid in Urine by ICP Atomic Emission Spectrometry. *Anal Lett* **1996**, *29*, 1193–1199, doi:10.1080/00032719608001468.
18. Grases, F.; March, P. A Study about Some Phosphate Derivatives as Inhibitors of Calcium Oxalate Crystal Growth. *J Cryst Growth* **1989**, *96*, 993–995, doi:10.1016/0022-0248(89)90663-5.
19. Grases, F.; Costa-Bauza, A. Potentiometric Study of the Nucleation of Calcium Oxalate in Presence of Several Additives. *Clinical Chemistry and Enzymology Communications* **1991**, *3*.
20. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Kroupa, M. Studies on Calcium Oxalate Monohydrate Crystallization: Influence of Inhibitors. *Urol Res* **1994**, *22*, 39–43, doi:10.1007/BF00431547.
21. Grases, F.; Llobera, A. Experimental Model to Study Sedimentary Kidney Stones. *Micron* **1998**, *29*, 105–111, doi:10.1016/S0968-4328(98)00006-7.
22. Grases, F.; Ramis, M.; Costa-Bauzá, A. Effects of Phytate and Pyrophosphate on Brushite and Hydroxyapatite Crystallization: Comparison with the Action of Other Polyphosphates. *Urol Res* **2000**, *28*, 136–140, doi:10.1007/S002400050152.
23. Hartig T Über Das Klebermehl. *Bot Zeitung* **1855**, *13*, 881–882.
24. Pfeffer W Untersuchungen Über Die Proteinkörner Und Die Bedeutung Des Asparagins Beim Keimen Der Samen. *Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik* **1872**, *8*.
25. Anderson, R.J. A CONTRIBUTION TO THE CHEMISTRY OF PHYTIN. *Journal of Biological Chemistry* **1914**, *17*, 171–190, doi:10.1016/S0021-9258(18)88416-2.
26. Bunce, C.M.; French, P.J.; Allen, P.; Mountford, J.C.; Moor, B.; Greaves, M.F.; Michell, R.H.; Brown, G. Comparison of the Levels of Inositol Metabolites in Transformed Haemopoietic Cells and Their Normal Counterparts. *Biochemical Journal* **1993**, *289*, 667–673, doi:10.1042/BJ2890667.
27. French, P.J.; Bunce, C.M.; Stephens, L.R.; Lord, J.M.; McConnell, F.M.; Brown Creba, G.J.A.; Michell, R.H. Changes in the Levels of Inositol Lipids and Phosphates during the Differentiation of HL60 Promyelocytic Cells towards Neutrophils or Monocytes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **1991**, *245*, 193–201, doi:10.1098/RSPB.1991.0109.
28. Grases, F.; Simonet, B.M.; Vucenik, I.; Prieto, R.M.; Costa-Bauzá, A.; March, J.G.; Shamsuddin, A.M. Absorption and Excretion of Orally Administered Inositol Hexaphosphate (IP6 or Phytate) in Humans. *BioFactors* **2001**, *15*, 53–61, doi:10.1002/BIOF.5520150105.
29. Mellanby, E. The Rickets-producing and Anti-calcifying Action of Phytate. *J Physiol* **1949**, *109*, 488–533, doi:10.1113/JPHYSIOL.1949.SP004411.
30. Pallauf, J.; Pippig, S.; Most, E.; Rimbach, G. Supplemental Sodium Phytate and Microbial Phytase Influence Iron Availability in Growing Rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **1999**, *13*, 134–140, doi:10.1016/S0946-672X(99)80003-0.
31. Hurrell, R.F.; Juillerat, M.A.; Reddy, M.B.; Lynch, S.R.; Dassenko, S.A.; Cook, J.D. Soy Protein, Phytate, and Iron Absorption in Humans. *American Journal of Clinical Nutrition* **1992**, *56*, 573–578, doi:10.1093/AJCN/56.3.573.

32. Forbes, R.M.; Parker, H.M.; Erdman, J.W. Effects of Dietary Phytate, Calcium and Magnesium Levels on Zinc Bioavailability to Rats. *Journal of Nutrition* **1984**, *114*, 1421–1425, doi:10.1093/JN/114.8.1421.
33. Davies, N.T.; Reid, H. An Evaluation of the Phytate, Zinc, Copper, Iron and Manganese Contents of, and Zn Availability from, Soya-Based Textured-Vegetable-Protein Meat-Substitutes or Meat-Extenders. *British Journal of Nutrition* **1979**, *41*, 579–589, doi:10.1079/BJN19790073.
34. Evans, W.J.; Martin, C.J. Interactions of Mg(II), Co(II), Ni(II), and Zn(II) with Phytic Acid. VIII. A Calorimetric Study. *J Inorg Biochem* **1988**, *32*, 259–268, doi:10.1016/0162-0134(88)85005-0.
35. Martin, C.J.; Evans, W.J. Phytic Acid-Zinc Ion Interactions: A Calorimetric and Titrimetric Study. *J Inorg Biochem* **1986**, *26*, 169–183, doi:10.1016/0162-0134(86)80039-3.
36. Schlemmer, U.; Frølich, W.; Prieto, R.M.; Grases, F. Phytate in Foods and Significance for Humans: Food Sources, Intake, Processing, Bioavailability, Protective Role and Analysis. *Mol Nutr Food Res* **2009**, *53*, S330–S375, doi:10.1002/MNFR.200900099.
37. Grases, F.; Simonet, B.M.; Perelló, J.; Costa-Bauzá, A.; Prieto, R.M. Effect of Phytate on Element Bioavailability in the Second Generation of Rats. *J Trace Elem Med Biol* **2004**, *17*, 229–234, doi:10.1016/S0946-672X(04)80023-3.
38. Grases, F.; Simonet, B.M.; Prieto, R.M.; March, J.G. Phytate Levels in Diverse Rat Tissues: Influence of Dietary Phytate. *Br J Nutr* **2001**, *86*, 225–231, doi:10.1079/BJN2001389.
39. Coudray, C.; Bellanger, J.; Castiglia-Delavaud, C.; Rémésy, C.; Vermorel, M.; Rayssiguier, Y. Effect of Soluble or Partly Soluble Dietary Fibres Supplementation on Absorption and Balance of Calcium, Magnesium, Iron and Zinc in Healthy Young Men. *Eur J Clin Nutr* **1997**, *51*, 375–380, doi:10.1038/SJ.EJCN.1600417.
40. Sandstrom, B.; Almgren, A.; Kivisto, B.; Cederblad, A. Effect of Protein Level and Protein Source on Zinc Absorption in Humans. *Journal of Nutrition* **1989**, *119*, 48–53, doi:10.1093/JN/119.1.48.
41. Gillooly, M.; Bothwell, T.H.; Torrance, J.D.; MacPhail, A.P.; Derman, D.P.; Bezwoda, W.R.; Mills, W.; Charlton, R.W.; Mayet, F. The Effects of Organic Acids, Phytates and Polyphenols on the Absorption of Iron from Vegetables. *British Journal of Nutrition* **1983**, *49*, 331–342, doi:10.1079/BJN19830042.
42. Prieto, R.M.; Fiol, M.; Perello, J.; Estruch, R.; Ros, E.; Sanchis, P.; Grases, F. Effects of Mediterranean Diets with Low and High Proportions of Phytate-Rich Foods on the Urinary Phytate Excretion. *Eur J Nutr* **2010**, *49*, 321–326, doi:10.1007/S00394-009-0087-X.
43. Graf, E.; Empson, K.L.; Eaton, J.W. Phytic Acid. A Natural Antioxidant. *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, 11647–11650, doi:10.1016/S0021-9258(18)60858-0.
44. Grases, F.; Isern, B.; Sanchis, P.; Perelló, J.; Torres, J.J.; Costa-Bauzá, A. Phytate Acts as an Inhibitor in Formation of Renal Calculi. *Frontiers in Bioscience* **2007**, *12*, 2580–2587.
45. Raggi, P.; Bellasi, A.; Bushinsky, D.; Bover, J.; Rodriguez, M.; Ketteler, M.; Sinha, S.; Salcedo, C.; Gillotti, K.; Padgett, C.; et al. Slowing Progression of

- Cardiovascular Calcification With SNF472 in Patients on Hemodialysis. *Circulation* **2020**, 728–739, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044195.
46. Perelló, J.; Gómez, M.; Ferrer, M.D.; Rodríguez, N.Y.; Salcedo, C.; Buades, J.M.; Pérez, M.M.; Torregrosa, J. V.; Martín, E.; Maduell, F. SNF472, a Novel Inhibitor of Vascular Calcification, Could Be Administered during Hemodialysis to Attain Potentially Therapeutic Phytate Levels. *J Nephrol* **2018**, *31*, 287–296, doi:10.1007/S40620-018-0471-9/FIGURES/5.
 47. Correspondence, C.; Salcedo, L.; Sanifit, P.; Bit, E.; Europa, P.; Perelló, J.; Joubert, P.H.; Ferrer, M.D.; Canals, A.Z.; Sinha, S.; et al. First-Time-in-Human Randomized Clinical Trial in Healthy Volunteers and Haemodialysis Patients with SNF472, a Novel Inhibitor of Vascular Calcification. *Br J Clin Pharmacol* **2018**, *84*, 2867–2876, doi:10.1111/BCP.13752.
 48. Perelló J.; Salcedo C.; Ketteler M.; Tur F.; Tur E.; Isern B.; Joubert P.; Ferrer M. Intravenous SNF472 Inhibits Vitamin D Induced Cardiovascular Calcification in Rats (Poster). *ASN Kidney Week: Atlanta, GA, US* **2014**.
 49. Perelló J.; Salcedo C.; Neven E.; Behets G.J.; Joubert P.H.; D’Haese, P.C.; Ferrer, M.D. SNF472 Inhibits Cardiovascular Calcification in Uremic Rats (Poster). *ASN Kidney Week: San Diego, US* **2015**.
 50. López-González, Á.A.; Grases, F.; Monroy, N.; Marí, B.; Vicente-Herrero, M.T.; Tur, F.; Perelló, J. Protective Effect of Myo-Inositol Hexaphosphate (Phytate) on Bone Mass Loss in Postmenopausal Women. *Eur J Nutr* **2013**, *52*, 717–726, doi:10.1007/S00394-012-0377-6.
 51. Sanchis, P.; López-González, Á.A.; Costa-Bauzá, A.; Busquets-Cortés, C.; Riutord, P.; Calvo, P.; Grases, F. Understanding the Protective Effect of Phytate in Bone Decalcification Related-Diseases. *Nutrients* **2021**, *13*, doi:10.3390/nu13082859.
 52. Shamsuddin, A.M. Inositol Phosphates Have Novel Anticancer Function. *Journal of Nutrition* **1995**, *125*, doi:10.1093/JN/125.3_SUPPL.725S.
 53. Vucenik, I.; Shamsuddin, A.M. Protection against Cancer by Dietary IP6 and Inositol. *Nutr Cancer* **2006**, *55*, 109–125, doi:10.1207/S15327914NC5502_1.
 54. Lee, S.H.; Park, H.J.; Chun, H.K.; Cho, S.Y.; Cho, S.M.; Lillehoj, H.S. Dietary Phytic Acid Lowers the Blood Glucose Level in Diabetic KK Mice. *Nutrition Research* **2006**, *26*, 474–479, doi:10.1016/J.NUTRES.2006.06.017.
 55. Sanchis, P.; Rivera, R.; Berga, F.; Fortuny, R.; Adrover, M.; Costa-Bauza, A.; Grases, F.; Masmiquel, L. Phytate Decreases Formation of Advanced Glycation End-Products in Patients with Type II Diabetes: Randomized Crossover Trial. *Sci Rep* **2018**, *8*, doi:10.1038/S41598-018-27853-9.
 56. Dorsch, J.A.; Cook, A.; Young, K.A.; Anderson, J.M.; Bauman, A.T.; Volkmann, C.J.; Murthy, P.P.N.; Raboy, V. Seed Phosphorus and Inositol Phosphate Phenotype of Barley Low Phytic Acid Genotypes. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 691–706, doi:10.1016/S0031-9422(02)00610-6.
 57. Grases, F.; Simonet, B.M.; March, J.G.; Prieto, R.M. Inositol Hexakisphosphate in Urine: The Relationship between Oral Intake and Urinary Excretion. *BJU Int* **2000**, *85*, 138–142, doi:10.1046/J.1464-410X.2000.00324.X.
 58. Grases, F.; Perelló, J.; Isern, B.; Prieto, R.M. Study of a Myo-Inositol Hexaphosphate-Based Cream to Prevent Dystrophic Calcinosis Cutis. *British Journal of Dermatology* **2005**, *152*, 1022–1025, doi:10.1111/J.1365-2133.2005.06382.X.

59. Grases, F.; Isern, B.; Perelló, J.; Sanchis, P.; Prieto, R.M. Absorption of Myo-Inositol Hexakisphosphate (InsP6) through the Skin: Study of the Matrix Effects. Mechanism of Phytate Topical Absorption. *Front Biosci* **2005**, *10*, 799–802, doi:10.2741/1573.
60. Grases, F.; Perelló, J.; Isern, B.; Prieto, R.M. Study of the Absorption of Myo-Inositol Hexakisphosphate (InsP6) through the Skin. *Biol Pharm Bull* **2005**, *28*, 764–767, doi:10.1248/BPB.28.764.
61. March, J.G.; Simonet, B.M.; Grases, F.; Salvador, A. Indirect Determination of Phytic Acid in Urine. *Anal Chim Acta* **1998**, *367*, 63–68, doi:10.1016/S0003-2670(98)00164-0.
62. Berga, F.; Rodriguez, A.; Costa-Bauzá, A.; Grases, F. Novel Colorimetric Determination of Phytate in Urine. *Anal Lett* **2016**, *49*, 307–318, doi:10.1080/00032719.2015.1060599.
63. Grases, F.; March, J.G.; Prieto, R.M.; Simonet, B.M.; Costa-Bauzá, A.; García-Raja, A.; Conte, A. Urinary Phytate in Calcium Oxalate Stone Formers and Healthy People: Dietary Effects on Phytate Excretion. *Scand J Urol Nephrol* **2000**, *34*, 162–164, doi:10.1080/003655900750016526.
64. Ichikawa, H.; Ohishi, S.; Takahashi, O.; Kobayashi, H.; Yuwaza, K.; Hosokawa, N. Studies on Acute Oral Toxicities of Phytic Acid and Sodium Phytate in Rat. *Tokyo Toritsu Eisei Kenkyu Nenpo* **1987**, *38*, 371–376.
65. Fujitani, T.; Yoneyama, M.; Kabashima, J.; Hosokawa, N.; Ichikawa, H. Acute Toxicity of Phytic Acid and Sodium Phytate to Mice. *Tokyo Toritsu Eisei Kenkyu Nenpo* **1987**, *38*, 368–370.
66. Grases, F. Development of Calcium Oxalate Crystals on Urothelium: Effect of Free Radicals. *Nephron* **1998**, *78*, 296–301, doi:10.1159/000044939.
67. Grases, F.; Garcia-Ferragut, L.; Costa-Bauza, A.; March, J.G. Study of the Effects of Different Substances on the Early Stages of Papillary Stone Formation? *Nephron* **1996**, *73*, 561–568, doi:10.1159/000189141.
68. GRASES, F.; COSTA-BAUZA, A.; MARCH, J.G. Artificial Simulation of the Early Stages of Renal Stone Formation. *Br J Urol* **1994**, *74*, 298–301, doi:10.1111/J.1464-410X.1994.TB16614.X.
69. Finlayson, B. Physicochemical Aspects of Urolithiasis. *Kidney Int* **1978**, *13*, 344–360, doi:10.1038/KI.1978.53.
70. Grases, F.; Rodriguez, A.; Costa-Bauza, A. Efficacy of Mixtures of Magnesium, Citrate and Phytate as Calcium Oxalate Crystallization Inhibitors in Urine. *Journal of Urology* **2015**, *194*, doi:10.1016/j.juro.2015.03.099.
71. Grases, F.; Garcia-Gonzalez, R.; Torres, J.J.; Llobera, A. Effects of Phytic Acid on Renal Stone Formation in Rats. *Scand J Urol Nephrol* **1998**, *32*, 261–265, doi:10.1080/003655998750015412.
72. Grases, F.; Prieto, R.M.; Simonet, B.M.; March, J.G. Phytate Prevents Tissue Calcifications in Female Rats. *BioFactors* **2000**, *11*, 171–177, doi:10.1002/BIOF.5520110303.
73. Conte, A.; Pizá, P.; García-Raja, A.; Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Prieto, R.M. Urinary Lithogen Risk Test: Usefulness in the Evaluation of Renal Lithiasis Treatment Using Crystallization Inhibitors (Citrate and Phytate). *Arch Esp Urol* **1999**, *52*, 305–310.

74. Grases, F.; García-Ferragut, L.; Costa-Bauzá, A. A New Procedure to Evaluate the Inhibitory Capacity of Calcium Oxalate Crystallization in Whole Urine. *Int Urol Nephrol* **1995**, *27*, 653–661, doi:10.1007/BF02552128.
75. Curhan, G.C.; Willett, W.C.; Knight, E.L.; Stampfer, M.J. Dietary Factors and the Risk of Incident Kidney Stones in Younger Women: Nurses' Health Study II. *Arch Intern Med* **2004**, *164*, 885–891, doi:10.1001/ARCHINTE.164.8.885.
76. Thomas, W.C.; Tilden, M.T. Inhibition of Mineralization by Hydrolysates of Phytic Acid. *Johns Hopkins Medical Journal* **1972**, *131*, 133–142.
77. Van den Berg, C.J.; Hill, L.F.; Stanbury, S.W. Inositol Phosphates and Phytic Acid as Inhibitors of Biological Calcification in the Rat. *Clin Sci* **1972**, *43*, 377–383, doi:10.1042/CS0430377.
78. Grases, F.; Perelló, J.; Isern, B.; Prieto, R.M. Determination of Myo-Inositol Hexakisphosphate (Phytate) in Urine by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry. *Anal Chim Acta* **2004**, *510*, 41–43, doi:10.1016/J.ACA.2003.12.061.
79. Costa-Bauza, A.; Grases, F.; Gomila, I.; Rodríguez, A.; Prieto, R.M.; Tur, F. A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Phytate in Urine. *Urol Res* **2012**, *40*, 663–669, doi:10.1007/S00240-012-0473-3.
80. Costa-Bauza, A.; Grases, F.; Fakier, S.; Rodríguez, A. A Novel Metal-Dye System for Urinary Phytate Detection at Micro-Molar Levels in Rats. *Analytical Methods* **2013**, *5*, 3016–3022, doi:10.1039/C3AY26563C.
81. Muñoz, J.A.; Valiente, M. Determination of Phytic Acid in Urine by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2003**, *75*, 6374–6378, doi:10.1021/AC0345805.
82. Tur, F.; Tur, E.; Lenthéric, I.; Mendoza, P.; Encabo, M.; Isern, B.; Grases, F.; Maraschiello, C.; Perelló, J. Validation of an LC-MS Bioanalytical Method for Quantification of Phytate Levels in Rat, Dog and Human Plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2013**, *928*, 146–154, doi:10.1016/J.JCHROMB.2013.03.023.
83. Duong, Q.H.; Clark, K.D.; Lapsley, K.G.; Pegg, R.B. Quantification of Inositol Phosphates in Almond Meal and Almond Brown Skins by HPLC/ESI/MS. *Food Chem* **2017**, *229*, 84–92, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2017.02.031.
84. Qiu, D.; Wilson, M.S.; Eisenbeis, V.B.; Harmel, R.K.; Riemer, E.; Haas, T.M.; Wittwer, C.; Jork, N.; Gu, C.; Shears, S.B.; et al. Analysis of Inositol Phosphate Metabolism by Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Nat Commun* **2020**, *11*, doi:10.1038/s41467-020-19928-x.
85. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Berga, F.; Rodríguez, A.; Gomila, R.M.; Martorell, G.; Martínez-Cignoni, M.R. Evaluation of Inositol Phosphates in Urine after Topical Administration of Myo-Inositol Hexaphosphate to Female Wistar Rats. *Life Sci* **2018**, doi:10.1016/j.lfs.2017.11.023.
86. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Berga, F.; Gomila, R.M.; Martorell, G.; Martínez-Cignoni, M.R. Intake of Myo-Inositol Hexaphosphate and Urinary Excretion of Inositol Phosphates in Wistar Rats: Gavage vs. Oral Administration with Sugar. *PLoS One* **2019**, *14*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0223959.
87. Grases, F.; Costa-Bauza, A. Key Aspects of Myo-Inositol Hexaphosphate (Phytate) and Pathological Calcifications. *Molecules* **2019**, *24*, doi:10.3390/MOLECULES24244434.

88. Russell, R.G.G.; Mühlbauer, R.C.; Bisaz, S.; Williams, D.A.; Fleisch, H. The Influence of Pyrophosphate, Condensed Phosphates, Phosphonates and Other Phosphate Compounds on the Dissolution of Hydroxyapatite in Vitro and on Bone Resorption Induced by Parathyroid Hormone in Tissue Culture and in Thyroparathyroidectomised Rats. *Calcif Tissue Res* **1970**, *6*, 183–196, doi:10.1007/BF02196199.
89. Fleisch, H.; Russell, R.G.G. A Review of the Physiological and Pharmacological Effects of Pyrophosphate and Diphosphonates on Bones and Teeth. *J Dent Res* **1972**, *51*, 323–332, doi:10.1177/00220345720510021701.
90. Russell, R.G.G. Bisphosphonates: From Bench to Bedside. *Ann N Y Acad Sci* **2006**, *1068*, 367–401, doi:10.1196/ANNALS.1346.041.
91. Papapoulos, S.E.; Hoekman, K.; Löwik, C.W.G.M.; Vermeij, P.; Bijvoet, O.L.M. Application of an in Vitro Model and a Clinical Protocol in the Assessment of the Potency of a New Bisphosphonate. *Journal of Bone and Mineral Research* **1989**, *4*, 775–781, doi:10.1002/JBMR.5650040518.
92. Mühlbauer, R.C.; Bauss, F.; Schenk, R.; Janner, M.; Bosies, E.; Strein, K.; Fleisch, H. BM 21.0955, a Potent New Bisphosphonate to Inhibit Bone Resorption. *Journal of Bone and Mineral Research* **1991**, *6*, 1003–1011, doi:10.1002/JBMR.5650060915.
93. Goa, K.L.; Balfour, J.A. Risedronate. *Drugs Aging* **1998**, *13*, 83–91, doi:10.2165/00002512-199813010-00008.
94. Green, J.R.; Müller, K.; Jaeggi, K.A. Preclinical Pharmacology of CGP 42'446, a New, Potent, Heterocyclic Bisphosphonate Compound. *J Bone Miner Res* **1994**, *9*, 745–751, doi:10.1002/JBMR.5650090521.
95. Prochaska, M.; Taylor, E.; Vaidya, A.; Curhan, G. Low Bone Density and Bisphosphonate Use and the Risk of Kidney Stones. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **2017**, *12*, 1284–1290, doi:10.2215/CJN.01420217.
96. Prochaska, M. Bisphosphonates and Management of Kidney Stones and Bone Disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **2021**, *30*, 184–189, doi:10.1097/MNH.0000000000000682.
97. Coe, F.L.; Worcester, E.M.; Evan, A.P. Idiopathic Hypercalciuria and Formation of Calcium Renal Stones. *Nat Rev Nephrol* **2016**, *12*.
98. Preminger, G.M.; Sakhaee, K.; Pak, C.Y.C. Alkali Action on the Urinary Crystallization of Calcium Salts: Contrasting Responses to Sodium Citrate and Potassium Citrate. *J Urol* **1988**, *139*, doi:10.1016/S0022-5347(17)42374-3.
99. Caudarella, R.; Vescini, F. Urinary Citrate and Renal Stone Disease: The Preventive Role of Alkali Citrate Treatment. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia* **2009**, *81*.
100. Costa-Bauzá, A.; Barceló, C.; Perelló, J.; Grases, F. Synergism between the Brushite and Hydroxyapatite Urinary Crystallization Inhibitors. *Int Urol Nephrol* **2002**, *34*, 447–451, doi:10.1023/A:1025671019653.
101. Grases, F.; Costa-Bauza, A.; March, J.G.; Sohnel, O. Artificial Simulation of Renal Stone Formation: Influence of Some Urinary Components. *Nephron* **1993**, *65*, 77–81, doi:10.1159/000187445.
102. Grases, F.; Gil, J.J.; Conte, A. Urolithiasis Inhibitors and Calculus Nucleation. *Urol Res* **1989**, *17*, 163–166, doi:10.1007/BF00256244.

103. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Gomila, I.; Ramis, M.; García-Raja, A.; Prieto, R.M. Urinary PH and Renal Lithiasis. *Urol Res* **2012**, *40*, 41–46, doi:10.1007/s00240-011-0389-3.
104. Rodgers, A.L. Urinary Saturation: Casual or Causal Risk Factor in Urolithiasis? *BJU Int* **2014**, *114*, 104–110, doi:10.1111/BJU.12481.
105. Kenny, J.E.S.; Goldfarb, D.S. Update on the Pathophysiology and Management of Uric Acid Renal Stones. *Curr Rheumatol Rep* **2010**, *12*, 125–129, doi:10.1007/S11926-010-0089-Y.
106. Craig, W.; T. NGUYEN, T. *Caffeine and Theobromine Levels in Cocoa and Carob Products*; 2006; Vol. 49;.
107. Rodopoulos, N.; Höjvall, L.; Norman, A. Elimination of Theobromine Metabolites in Healthy Adults. *Scand J Clin Lab Invest* **1996**, doi:10.3109/00365519609090590.
108. Tang-Liu, D.; Williams, R.; Riegelman, S. Disposition of Caffeine and Its Metabolites in Man. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1983**, *224*, 180–185.
109. Baggott, M.J.; Childs, E.; Hart, A.B.; De Bruin, E.; Palmer, A.A.; Wilkinson, J.E.; De Wit, H. Psychopharmacology of Theobromine in Healthy Volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* **2013**, *228*, 109–118, doi:10.1007/S00213-013-3021-0.
110. Kargul, B.; Özcan, M.; Peker, S.; Nakamoto, T.; Simmons, W.B.; Falster, A.U. Evaluation of Human Enamel Surfaces Treated with Theobromine: A Pilot Study. *Oral Health Prev Dent* **2012**, *10*, 275–282, doi:10.3290/J.OHPD.A28524.
111. Halfdanarson, T.R.; Jatoi, A. Chocolate as a Cough Suppressant: Rationale and Justification for an Upcoming Clinical Trial. *Support Cancer Ther* **2007**, *4*, 119–122, doi:10.3816/SCT.2007.N.006.
112. Khan, N.; Monagas, M.; Andres-Lacueva, C.; Casas, R.; Urpí-Sardà, M.; Lamuela-Raventós, R.M.; Estruch, R. Regular Consumption of Cocoa Powder with Milk Increases HDL Cholesterol and Reduces Oxidized LDL Levels in Subjects at High-Risk of Cardiovascular Disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **2012**, *22*, 1046–1053, doi:10.1016/J.NUMECD.2011.02.001.
113. Neufingerl, N.; Zebregs, Y.E.M.P.; Schuring, E.A.H.; Trautwein, E.A. Effect of Cocoa and Theobromine Consumption on Serum HDL-Cholesterol Concentrations: A Randomized Controlled Trial. *American Journal of Clinical Nutrition* **2013**, *97*, 1201–1209, doi:10.3945/AJCN.112.047373.
114. Grases, F.; Rodriguez, A.; Costa-Bauza, A. Theobromine Inhibits Uric Acid Crystallization. A Potential Application in the Treatment of Uric Acid Nephrolithiasis. *PLoS One* **2014**, doi:10.1371/journal.pone.0111184.
115. Pradhane, A.P.; Methekar, R.N.; Agrawal, S.G. Batch Crystallization of Uric Acid: Modeling, Simulation, and the Impact of 3,7 – Dimethylxanthine. *Crystal Research and Technology* **2022**, *57*, doi:10.1002/CRAT.202200125.
116. Julià, F.; Costa-Bauza, A.; Berga, F.; Grases, F. Effect of Theobromine on Dissolution of Uric Acid Kidney Stones. *World J Urol* **2022**, *40*, 2105–2111, doi:10.1007/S00345-022-04059-3.
117. Costa-Bauza, A.; Grases, F.; Calvó, P.; Rodriguez, A.; Prieto, R. Effect of Consumption of Cocoa-Derived Products on Uric Acid Crystallization in Urine of Healthy Volunteers. *Nutrients* **2018**, *10*, 1516, doi:10.3390/nu10101516.

118. Hernandez, Y.; Costa-Bauza, A.; Calvó, P.; Benejam, J.; Sanchis, P.; Grases, F. Comparison of Two Dietary Supplements for Treatment of Uric Acid Renal Lithiasis: Citrate vs. Citrate + Theobromine. *Nutrients* **2020**, *12*, 1–8, doi:10.3390/nu12072012.
119. Chattaraj, K.G.; Paul, S. Inclusion of Theobromine Modifies Uric Acid Aggregation with Possible Changes in Melamine-Uric Acid Clusters Responsible for Kidney Stones. *Journal of Physical Chemistry B* **2019**, *123*, 10483–10504, doi:10.1021/ACS.JPCB.9B08487.
120. Murphy, J.; Riley, J.P. A Modified Single Solution Method for the Determination of Phosphate in Natural Waters. *Anal Chim Acta* **1962**, *27*, 31–36, doi:10.1016/S0003-2670(00)88444-5.
121. Hernández Martínez, Y.E. ESTUDIO CLÍNICO DE UN NUEVO TRATAMIENTO DE LA LITIASIS ÚRICA CON TEOBROMINA Y UN BASIFICANTE URINARIO., Universidad de las Islas Baleares, 2021.
122. Rodriguez, A.; Gomila, R.M.; Martorell, G.; Costa-Bauza, A.; Grases, F. Quantification of Xanthine- and Uric Acid-Related Compounds in Urine Using a “Dilute-and-Shoot” Technique Coupling Ultra-High-Performance Liquid Chromatography and High-Resolution Orbitrap Mass Spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2017**, *1067*, 53–60, doi:10.1016/j.jchromb.2017.09.047.
123. Grases, F.; Villacampa, A.I.; Costa-Bauzá, A.; Söhnel, O. URIC ACID CALCULI. *Scanning Microsc* **1999**, *13*, 223–234.
124. Coe, F.L.; Strauss, A.L.; Tembe, V.; Le Dun, S. Uric Acid Saturation in Calcium Nephrolithiasis. *Kidney Int* **1980**, *17*, 662–668, doi:10.1038/KI.1980.205.
125. Calvó, P.; Costa-Bauzá, A.; Grases, F.; Hernandez, Y.; Sanchis, P. Validation of a Novel Diagnostic Test for Assessing the Risk of Urinary Uric Acid Crystallization. *Clinica Chimica Acta* **2021**, *519*, 187–192, doi:10.1016/J.CCA.2021.05.001.
126. Lifshitz, D.A.; Shalhav, A.L.; Lingeman, J.E.; Evan, A.P. Metabolic Evaluation of Stone Diseasepatients: A Practical Approach. *J Endourol* **1999**, *13*, 669–678, doi:10.1089/END.1999.13.669.
127. Wiederkehr, M.R.; Moe, O.W. Uric Acid Nephrolithiasis: A Systemic Metabolic Disorder. *Clin Rev Bone Miner Metab* **2011**, *9*, 207–217, doi:10.1007/S12018-011-9106-6.
128. Fuster, J.; Cortés, P.; ... J.B.-N. (English; 2017, undefined Plant Phosphates, Phytate and Pathological Calcifications in Chronic Kidney Disease. *Elsevier*.
129. Sanchis, P.; Prieto, R.M.; Konieczna, J.; Grases, F.; Abete, I.; Salas-Salvadó, J.; Martín, V.; Ruiz-Canela, M.; Babio, N.; García-Gavilán, J.F.; et al. Estimated Phytate Intake Is Associated with Bone Mineral Density in Mediterranean Postmenopausal Women. *Nutrients* **2023**, *15*, 1791, doi:10.3390/NU15071791/S1.
130. Gardner, G.L. Nucleation and Crystal Growth of Calcium Oxalate Trihydrate. *J Cryst Growth* **1975**, *30*, 158–168, doi:https://doi.org/10.1016/0022-0248(75)90085-8.
131. Grases, F.; Millan, A.; Conte, A. Production of Calcium Oxalate Monohydrate, Dihydrate or Trihydrate - A Comparative Study. *Urol Res* **1990**, *18*, doi:10.1007/BF00294575.

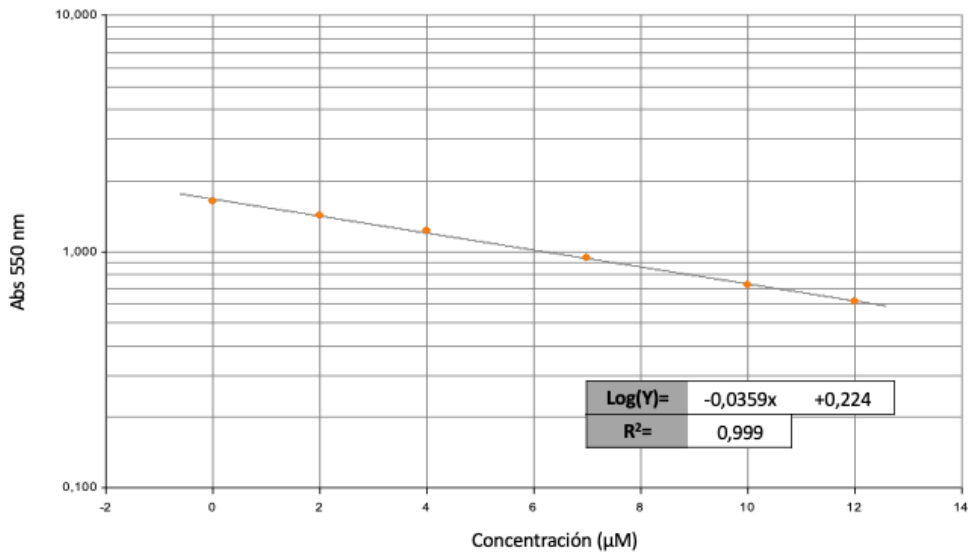
132. Bushinsky, D.A.; Neumann, K.J.; Asplin, J.; Krieger, N.S. Alendronate Decreases Urine Calcium and Supersaturation in Genetic Hypercalciuric Rats. *Kidney Int* **1999**, *55*, 234–243, doi:10.1046/J.1523-1755.1999.00247.X.
133. Okada, A.; Matsumoto, T.; Ohshima, H.; Isomura, T.; Koga, T.; Yasui, T.; Kohri, K.; LeBlanc, A.; Spector, E.; Jones, J.; et al. Bisphosphonate Use May Reduce the Risk of Urolithiasis in Astronauts on Long-Term Spaceflights. *JBMR Plus* **2022**, *6*, doi:10.1002/JBM4.10550.
134. Cody, A.M.; Cody, R.D. Calcium Oxalate Trihydrate Phase Control by Structurally-Specific Carboxylic Acids. *J Cryst Growth* **1994**, *135*, 235–245, doi:10.1016/0022-0248(94)90746-3.
135. Qin, L.; Wang, L.; Putnis, C. V.; Putnis, A. Halide-Dependent Dissolution of Dicalcium Phosphate Dihydrate and Its Modulation by an Organic Ligand. *Cryst Growth Des* **2017**, *17*, doi:10.1021/acs.cgd.7b00488.
136. Farmanesh, S.; Ramamoorthy, S.; Chung, J.; Asplin, J.R.; Karande, P.; Rimer, J.D. Specificity of Growth Inhibitors and Their Cooperative Effects in Calcium Oxalate Monohydrate Crystallization. *J Am Chem Soc* **2014**, *136*, doi:10.1021/ja410623q.
137. Grases, F.; Perelló, J.; Prieto, R.M.; Simonet, B.M.; Torres, J.J. Dietary Myo-Inositol Hexaphosphate Prevents Dystrophic Calcifications in Soft Tissues: A Pilot Study in Wistar Rats. *Life Sci* **2004**, *75*, 11–19, doi:10.1016/J.LFS.2003.11.030.
138. Grases, F.; Sanchis, P.; Perello, J.; Isern, B.; Prieto, R.M.; Fernandez-Palomeque, C.; Fiol, M.; Bonnin, O.; Torres, J.J. Phytate (Myo-Inositol Hexakisphosphate) Inhibits Cardiovascular Calcifications in Rats. *Frontiers in Bioscience* **2006**, *11*, 136–142, doi:10.2741/1786.
139. Rhee, S.H.; Lee, J. Do; Tanaka, J. Nucleation of Hydroxyapatite Crystal through Chemical Interaction with Collagen. *Journal of the American Ceramic Society* **2000**, *83*, 2890–2892, doi:10.1111/J.1151-2916.2000.TB01656.X.
140. Grases, F.; Zelenková, M.; Söhnel, O. Structure and Formation Mechanism of Calcium Phosphate Concretions Formed in Simulated Body Fluid. *Urolithiasis* **2014**, *42*, 9–16, doi:10.1007/S00240-013-0611-6.
141. Bostom, A.; Pasch, A.; Madsen, T.; Roberts, M.B.; Franceschini, N.; Steubl, D.; Garimella, P.S.; Ix, J.H.; Tuttle, K.R.; Ivanova, A.; et al. Serum Calcification Propensity and Fetuin-A: Biomarkers of Cardiovascular Disease in Kidney Transplant Recipients. *Am J Nephrol* **2018**, *48*, 21–31, doi:10.1159/000491025.
142. Smith, E.R.; Pan, F.F.M.; Hewitson, T.D.; Toussaint, N.D.; Holt, S.G. Effect of Sevelamer on Calciprotein Particles in Hemodialysis Patients: The Sevelamer Versus Calcium to Reduce Fetuin-A-Containing Calciprotein Particles in Dialysis (SCaRF) Randomized Controlled Trial. *Kidney Int Rep* **2020**, *5*, 1432–1447, doi:10.1016/J.EKIR.2020.06.014.
143. Heiss, A.; Eckert, T.; Aretz, A.; Richtering, W.; Van Dorp, W.; Schäfer, C.; Jahnen-Dechent, W. Hierarchical Role of Fetuin-A and Acidic Serum Proteins in the Formation and Stabilization of Calcium Phosphate Particles. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 14815–14825, doi:10.1074/JBC.M709938200.
144. Köppert, S.; Büscher, A.; Babler, A.; Ghallab, A.; Buhl, E.M.; Latz, E.; Hengstler, J.G.; Smith, E.R.; Jahnen-Dechent, W. Cellular Clearance and Biological Activity of Calciprotein Particles Depend on Their Maturation State and Crystallinity. *Front Immunol* **2018**, *9*, doi:10.3389/FIMMU.2018.01991.

145. Shishkova, D.; Velikanova, E.; Sinitsky, M.; Kutikhin, A.; Tsepokina, A.; Gruzdeva, O.; Bogdanov, L. Calcium Phosphate Bions Cause Intimal Hyperplasia in Intact Aortas of Normolipidemic Rats through Endothelial Injury. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/IJMS20225728.
146. Kutikhin, A.G.; Velikanova, E.A.; Mukhamadiyarov, R.A.; Glushkova, T. V.; Borisov, V. V.; Matveeva, V.G.; Antonova, L. V.; Filip'ev, D.E.; Golovkin, A.S.; Shishkova, D.K.; et al. Apoptosis-Mediated Endothelial Toxicity but Not Direct Calcification or Functional Changes in Anti-Calcification Proteins Defines Pathogenic Effects of Calcium Phosphate Bions. *Sci Rep* **2016**, *6*, doi:10.1038/SREP27255.
147. Cai, M.M.X.; Smith, E.R.; Tan, S.J.; Hewitson, T.D.; Holt, S.G. The Role of Secondary Calciprotein Particles in the Mineralisation Paradox of Chronic Kidney Disease. *Calcif Tissue Int* **2017**, *101*, 570–580, doi:10.1007/S00223-017-0313-0.
148. Aghagolzadeh, P.; Bachtler, M.; Bijarnia, R.; Jackson, C.; Smith, E.R.; Odermatt, A.; Radpour, R.; Pasch, A. Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells Is Induced by Secondary Calciprotein Particles and Enhanced by Tumor Necrosis Factor- α . *Atherosclerosis* **2016**, *251*, 404–414, doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2016.05.044.
149. Bäck, M.; Aranyi, T.; Cancela, M.L.; Carracedo, M.; Conceição, N.; Leftheriotis, G.; Macrae, V.; Martin, L.; Nitschke, Y.; Pasch, A.; et al. Endogenous Calcification Inhibitors in the Prevention of Vascular Calcification: A Consensus Statement From the COST Action EuroSoftCalcNet. *Front Cardiovasc Med* **2019**, *5*, doi:10.3389/FCVM.2018.00196.
150. Ferraro, P.M.; Taylor, E.N.; Gambaro, G.; Curhan, G.C. Caffeine Intake and the Risk of Kidney Stones. *American Journal of Clinical Nutrition* **2014**, *100*, 1596–1603, doi:10.3945/AJCN.114.089987.
151. Chewcharat, A.; Thongprayoon, C.; Vaughan, L.E.; Mehta, R.A.; Schulte, P.J.; O'Connor, H.M.; Lieske, J.C.; Taylor, E.N.; Rule, A.D. Dietary Risk Factors for Incident and Recurrent Symptomatic Kidney Stones. *Mayo Clin Proc* **2022**, *97*, 1437–1448, doi:10.1016/J.MAYOCP.2022.04.016.
152. Rybak, M.E.; Sternberg, M.R.; Pao, C.I.; Ahluwalia, N.; Pfeiffer, C.M. Urine Excretion of Caffeine and Select Caffeine Metabolites Is Common in the US Population and Associated with Caffeine Intake. *Journal of Nutrition* **2015**, *145*, 766–774, doi:10.3945/JN.114.205476.

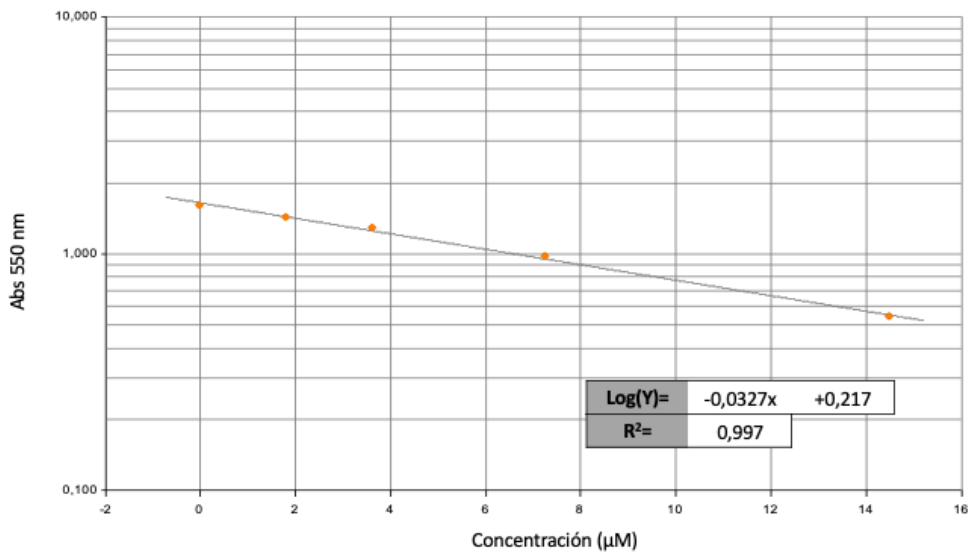
Anexos

***Anexo 1. Rectas patrón de los InsP
mediante el método ALXO***

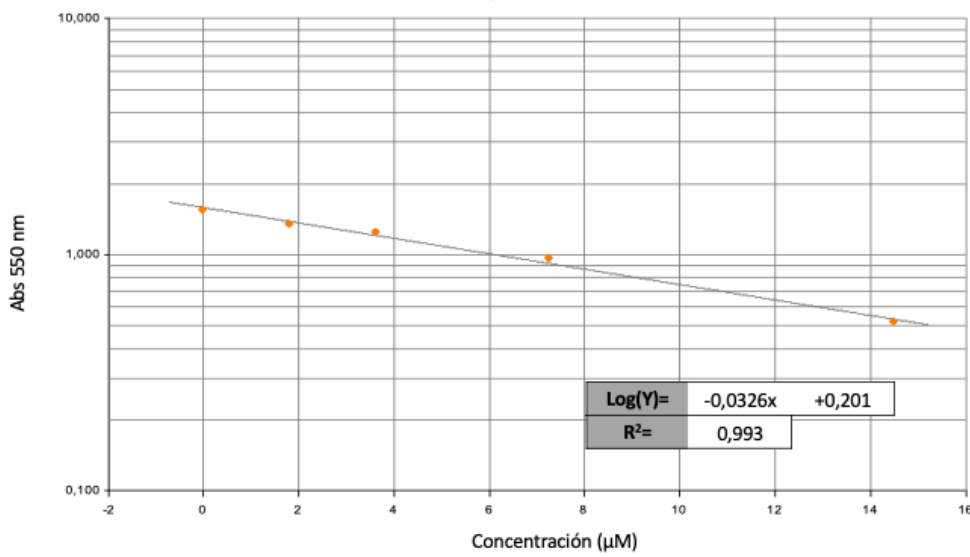
Recta patrón del InsP6



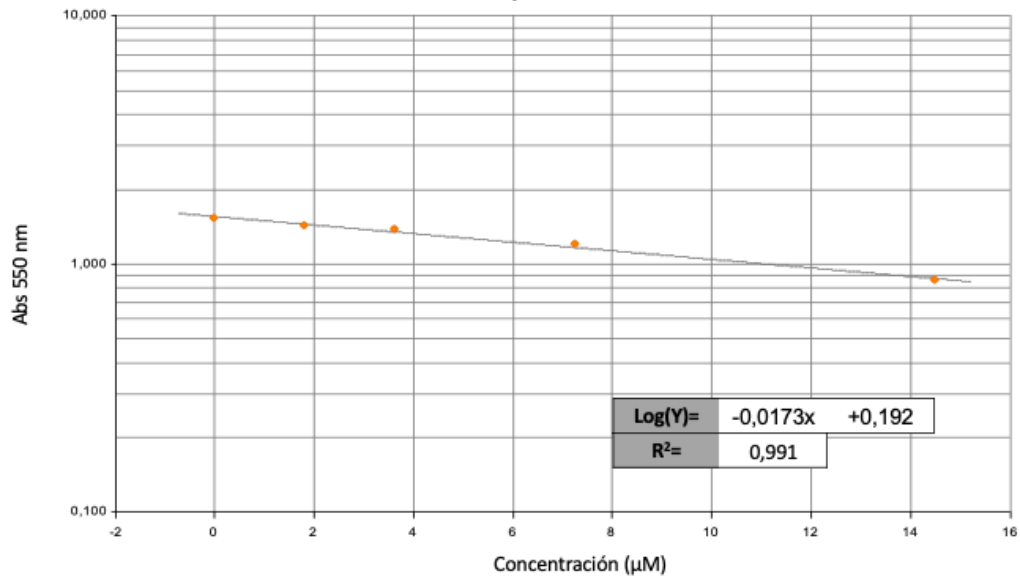
Recta patrón del InsP5



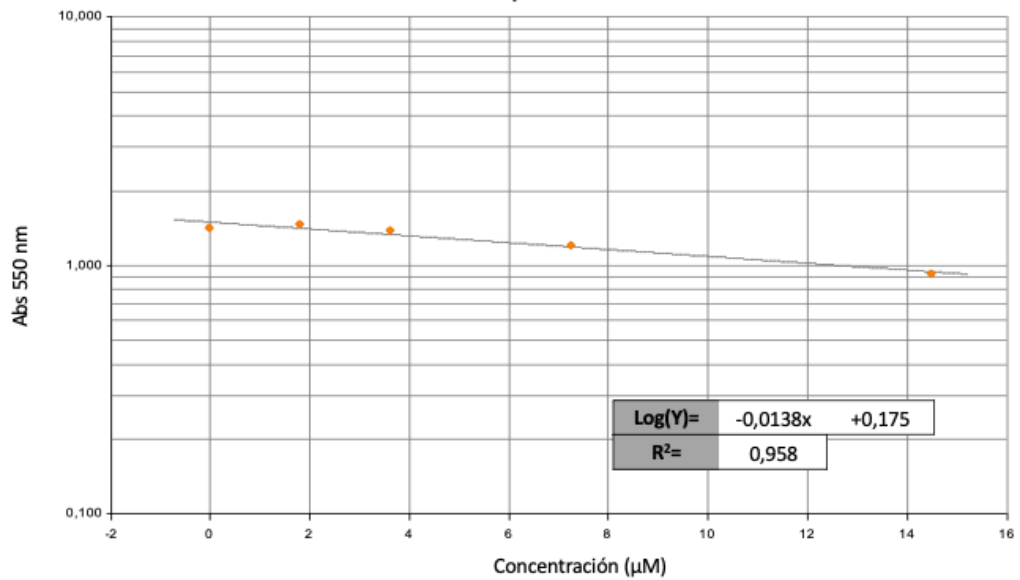
Recta patrón del InsP4



Recta patrón del InsP3



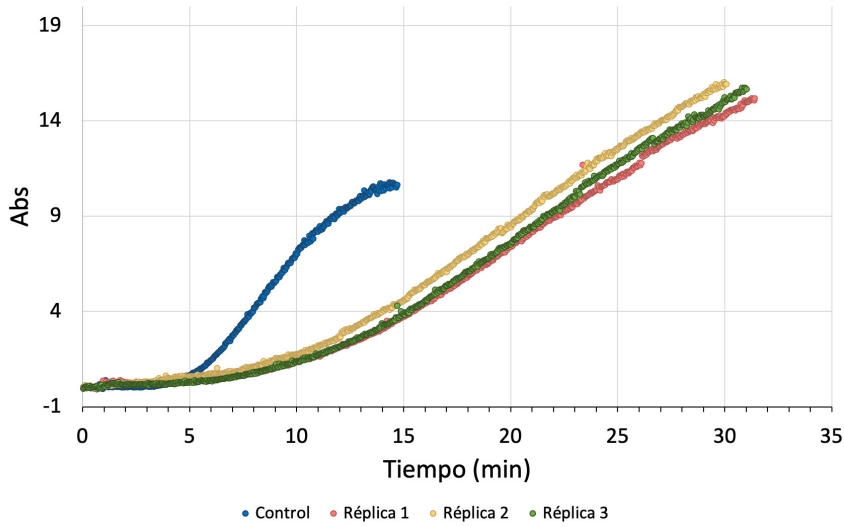
Recta patrón del InsP2



Anexo 2. Gráficos de las cinéticas de cristalización

1. Cinéticas de cristalización del oxalato cálcico

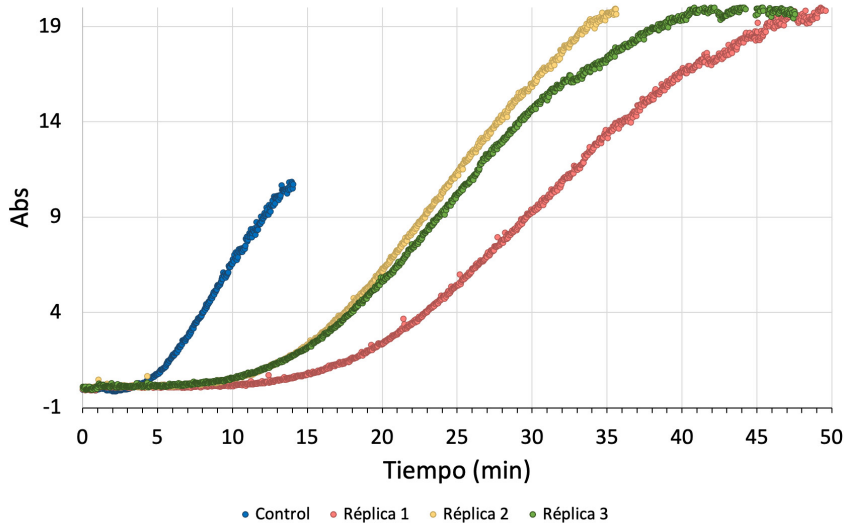
InsP6 sin hidrolizar (0,5 µM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	3,3
Réplica 2	2,2
Réplica 3	3,3

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

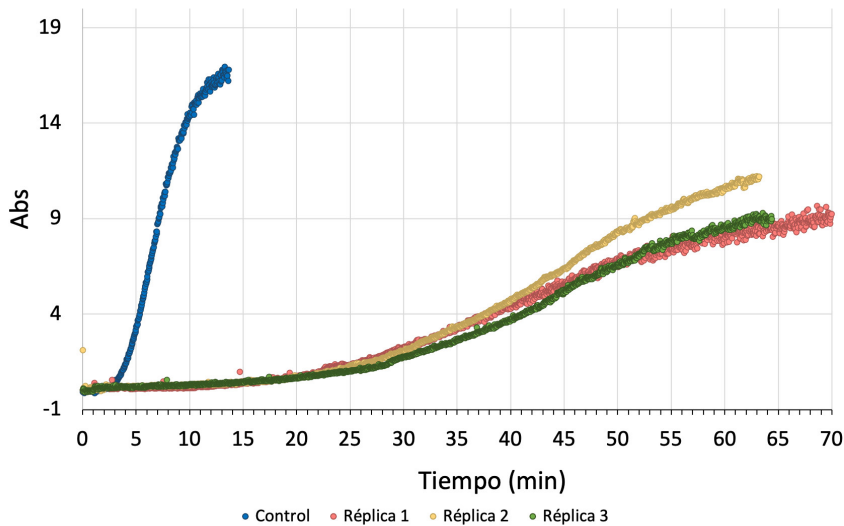
InsP6 sin hidrolizar (1 µM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	9,5
Réplica 2	7,2
Réplica 3	7,2

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

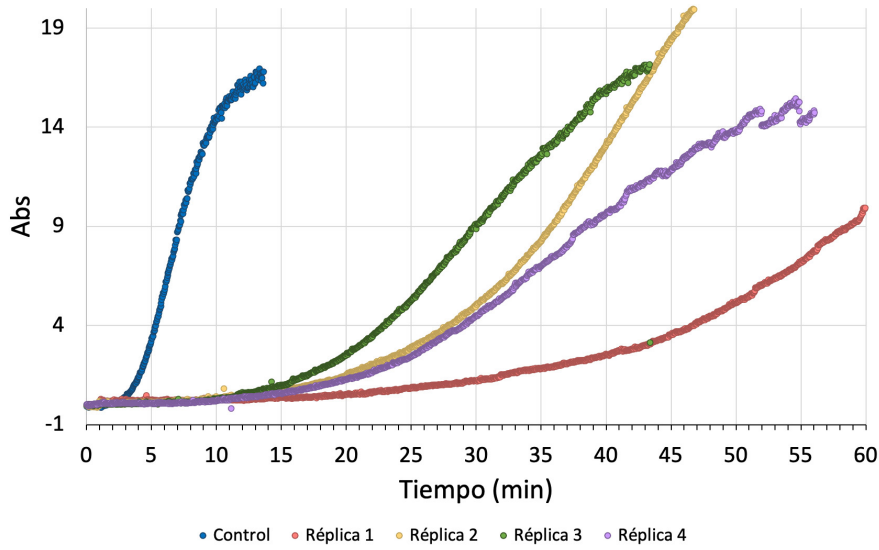
InsP6 sin hidrolizar (2 µM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	18,45
Réplica 2	18,45
Réplica 3	20,15

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

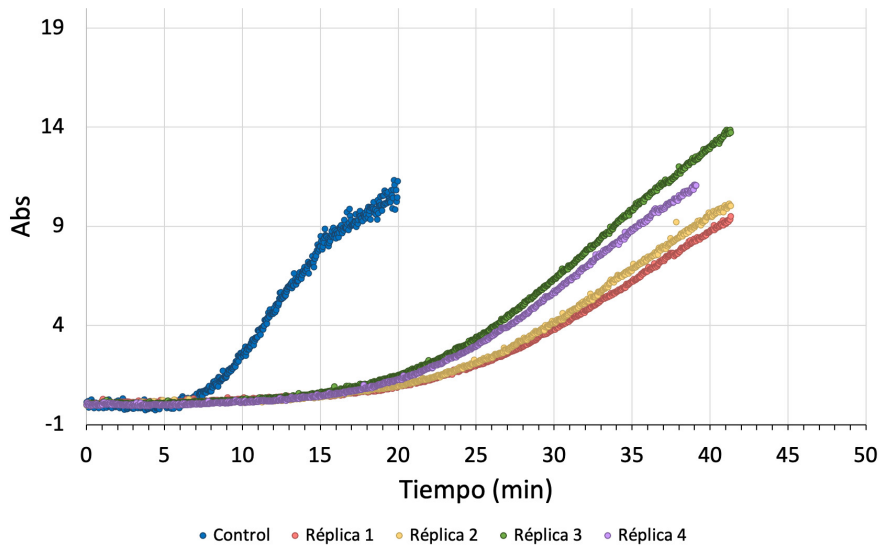
InsP6 hidrolizado 6 horas (2 μM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	19,25
Réplica 2	11,55
Réplica 3	10,05
Réplica 4	13,05

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

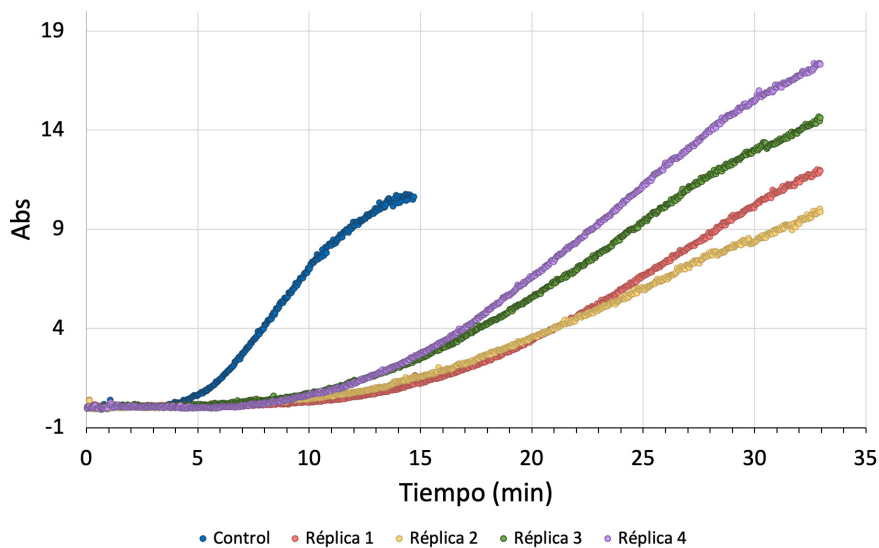
InsP6 hidrolizado 9 horas (2 μM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	11,6
Réplica 2	11,6
Réplica 3	9,4
Réplica 4	10,3

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

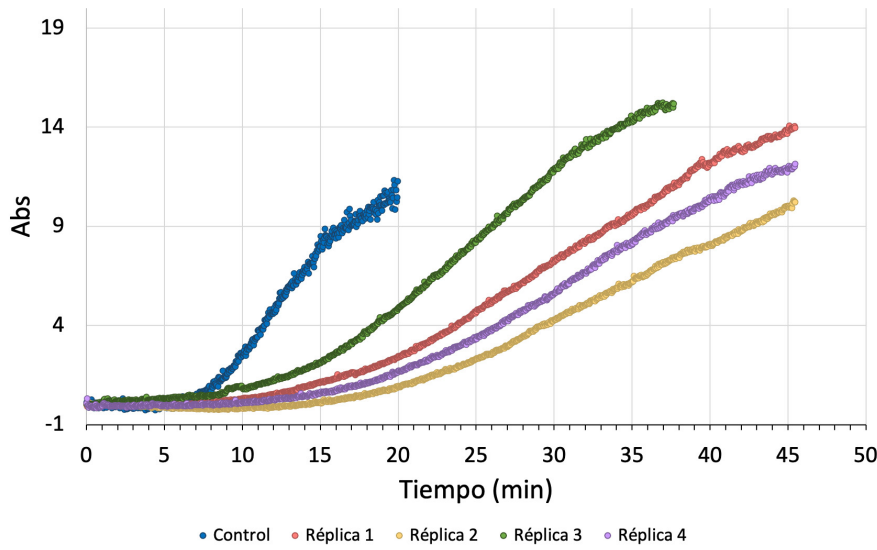
InsP6 hidrolizado 16 horas (2 μM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	7,5
Réplica 2	7,2
Réplica 3	6
Réplica 4	6

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

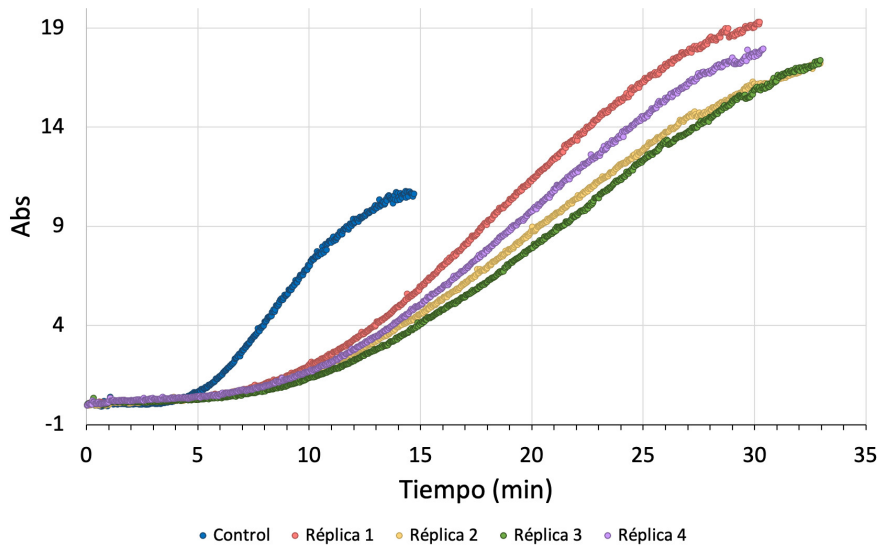
InsP6 hidrolizado 24 horas (2 μ M)



Δt_i (min)	
Réplica 1	6,7
Réplica 2	10,8
Réplica 3	4,8
Réplica 4	8,8

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

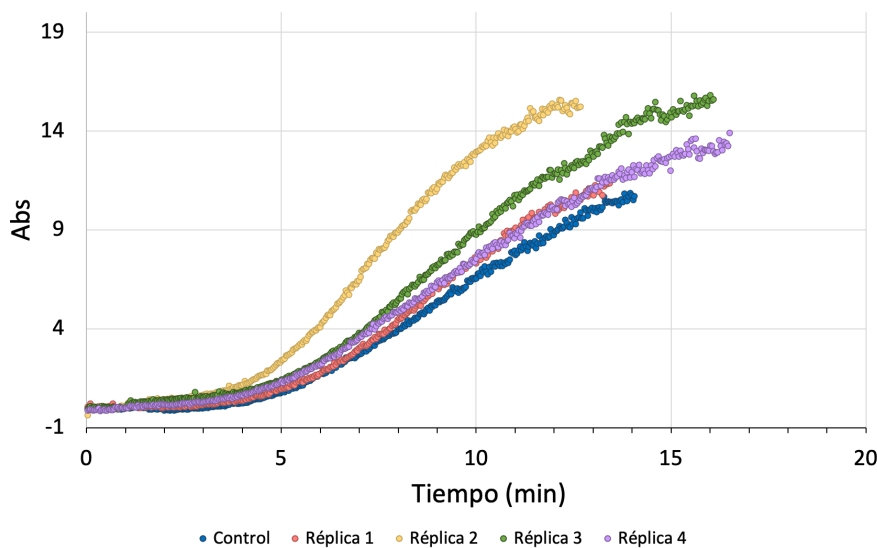
InsP6 hidrolizado 48 horas (2 μ M)



Δt_i (min)	
Réplica 1	2,2
Réplica 2	2,7
Réplica 3	3,7
Réplica 4	2,7

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

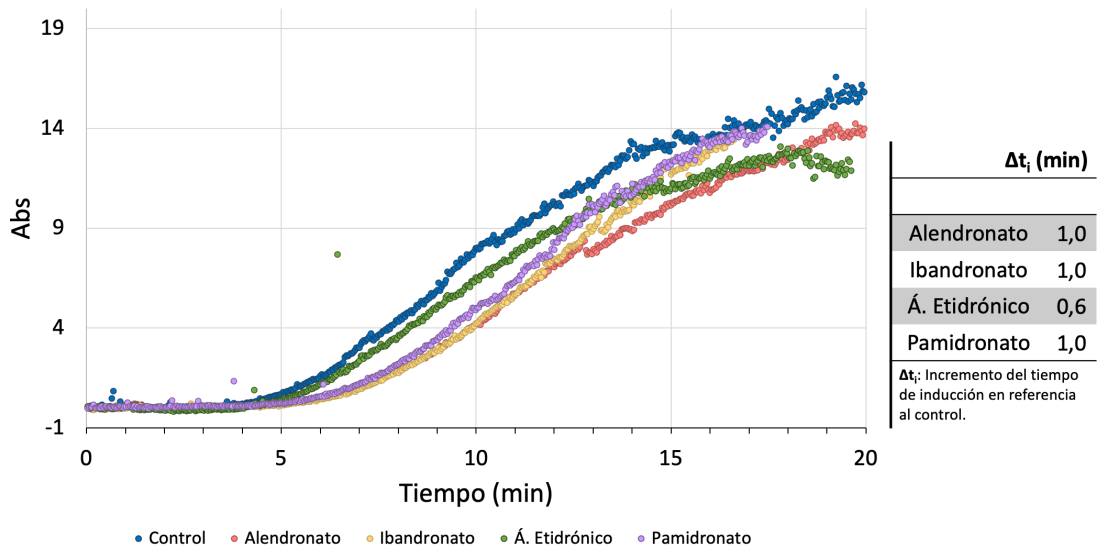
InsP6 hidrolizado 72 horas (2 μ M)



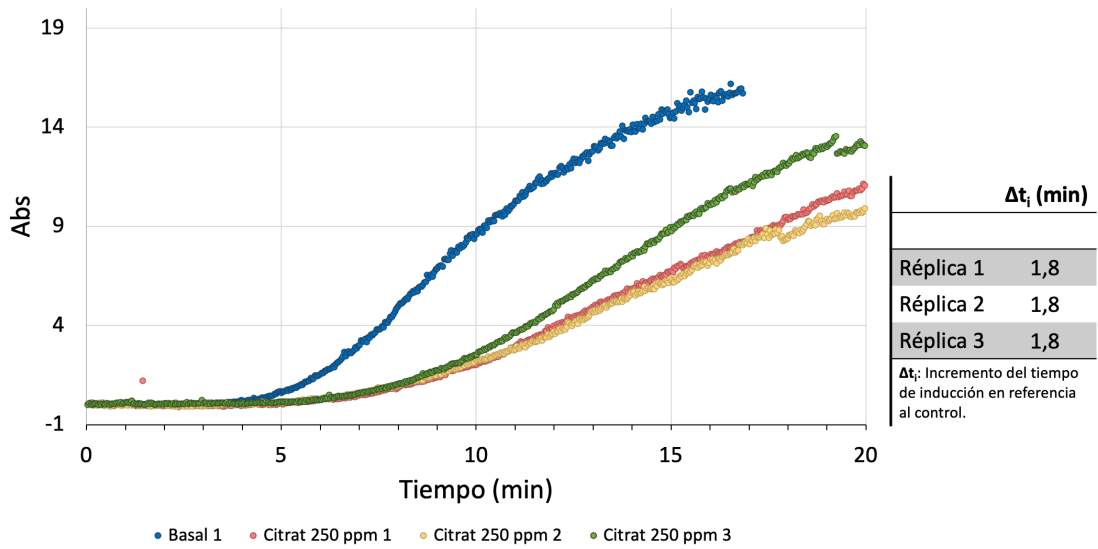
Δt_i (min)	
Réplica 1	0
Réplica 2	-0,5
Réplica 3	-1,1
Réplica 4	-0,5

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

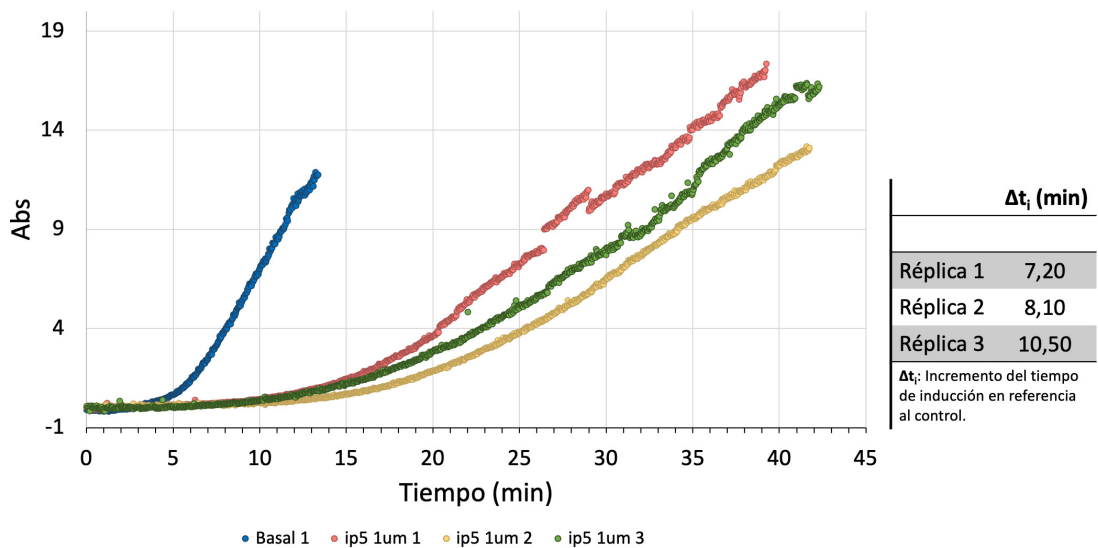
Bifosfonatos (2 μM)



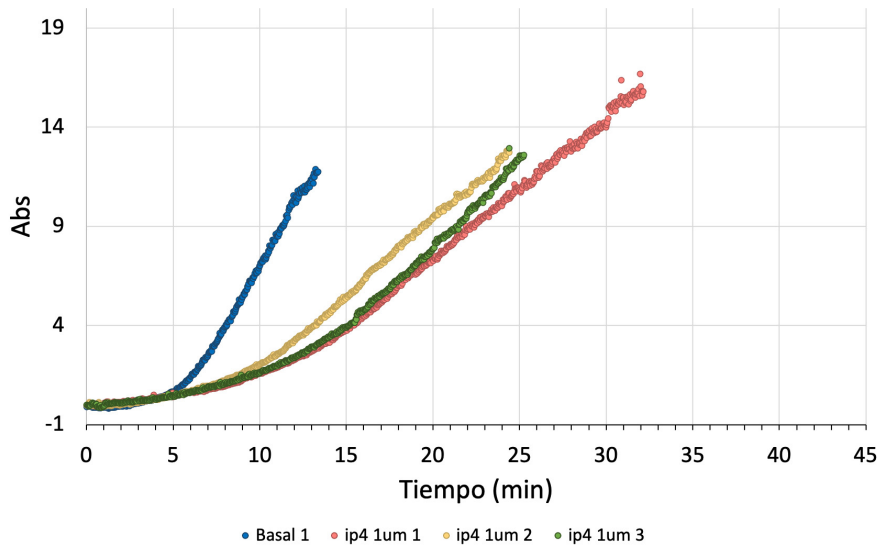
Citrato (250 ppm)



Ins-1,2,3,5,6-P5 (1 μM)



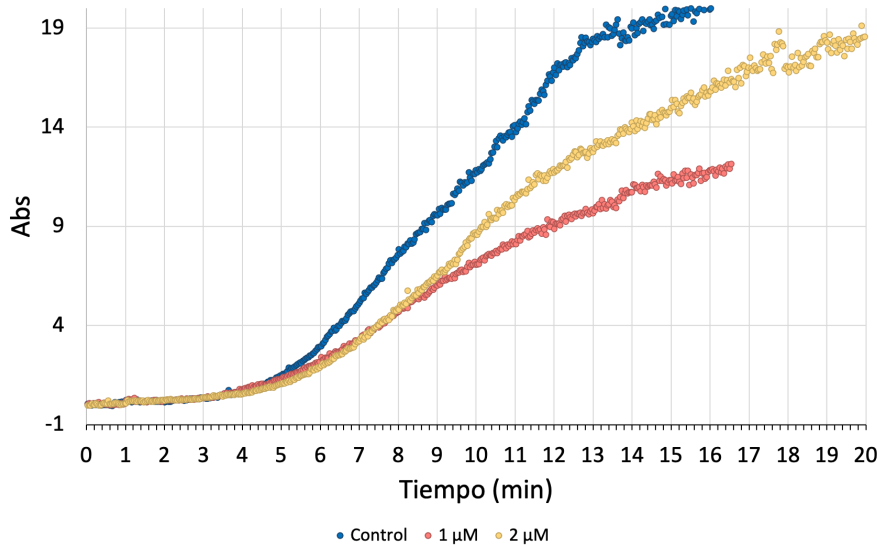
Ins-2,3,5,6 -P4 (1 μ M)



Δt_i (min)	
Réplica 1	1,80
Réplica 2	0,90
Réplica 3	1,80

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

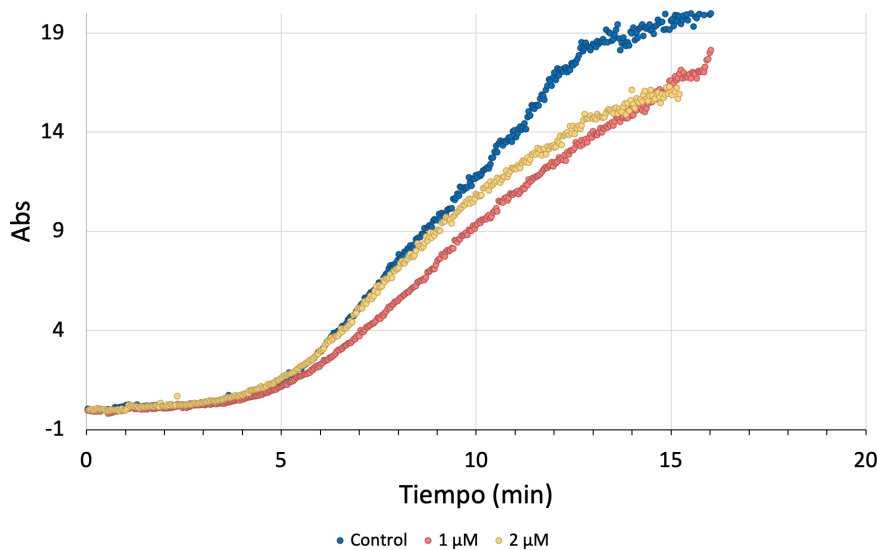
Ins-1,4,5-P3 a distintas concentraciones



Δt_i (min)	
1 μ M	0,2
2 μ M	0,2

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

Ins-2,4-P2 a distintas concentraciones

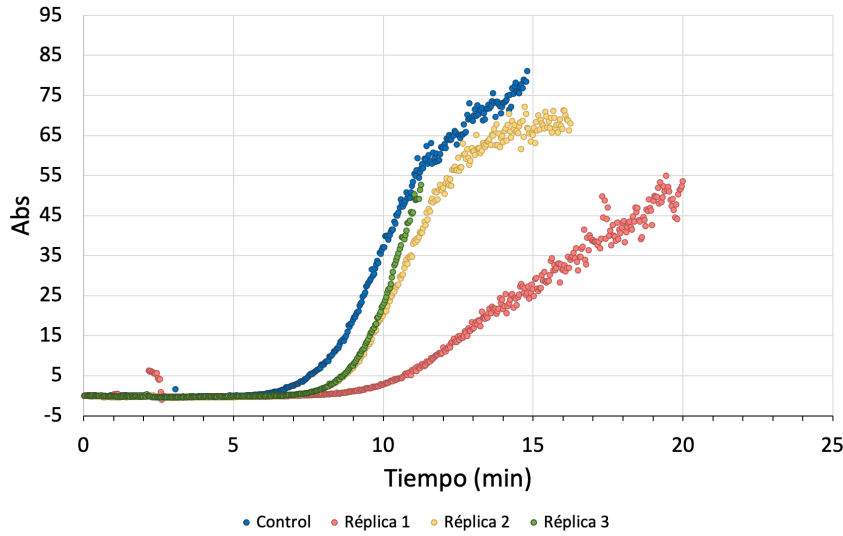


Δt_i (min)	
1 μ M	0,2
2 μ M	0

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

2. Cinéticas de cristalización de la brushita

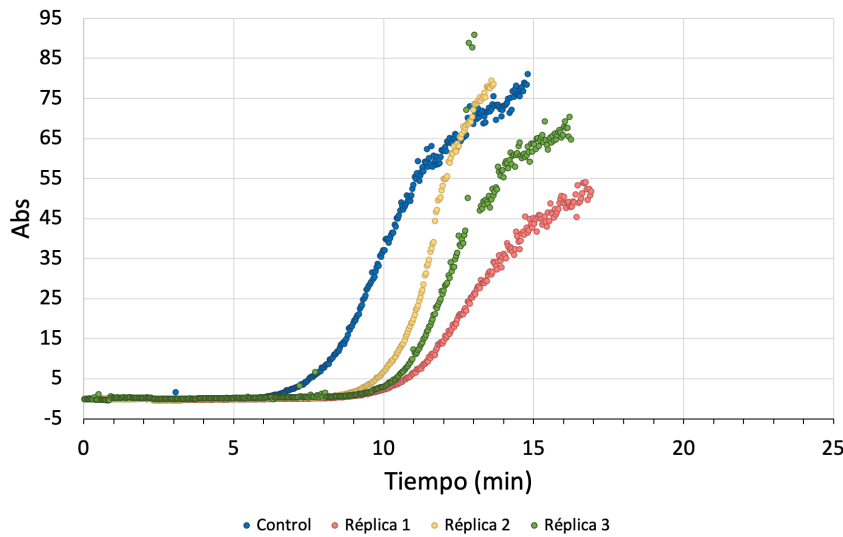
Insp6 sin hidrolizar (0,5 μM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	1,07
Réplica 2	0,07
Réplica 3	0,07

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

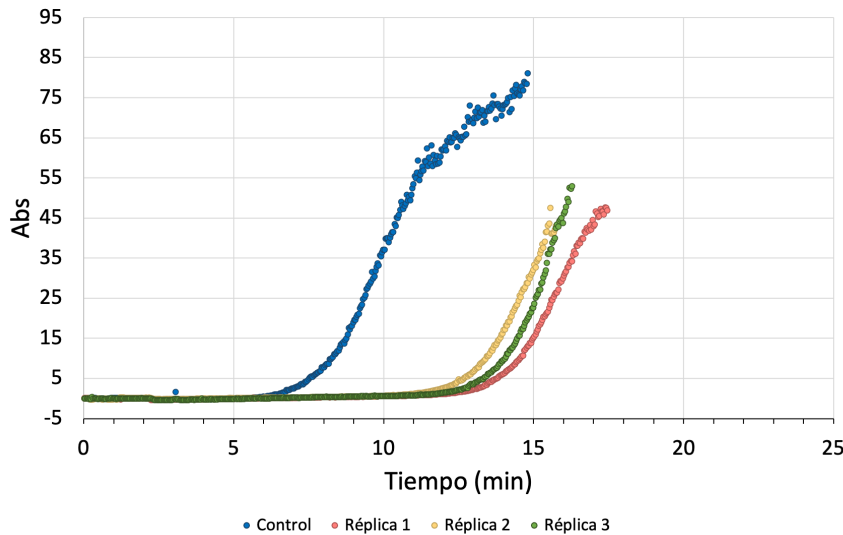
Insp6 sin hidrolizar (1 μM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	1,97
Réplica 2	1,07
Réplica 3	1,67

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

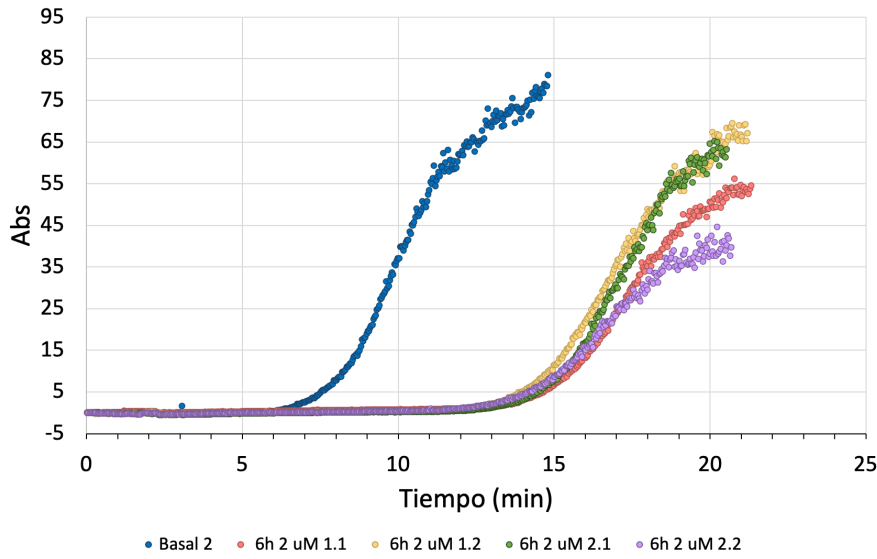
Insp6 sin hidrolizar (2 μM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	5,27
Réplica 2	4,07
Réplica 3	4,87

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

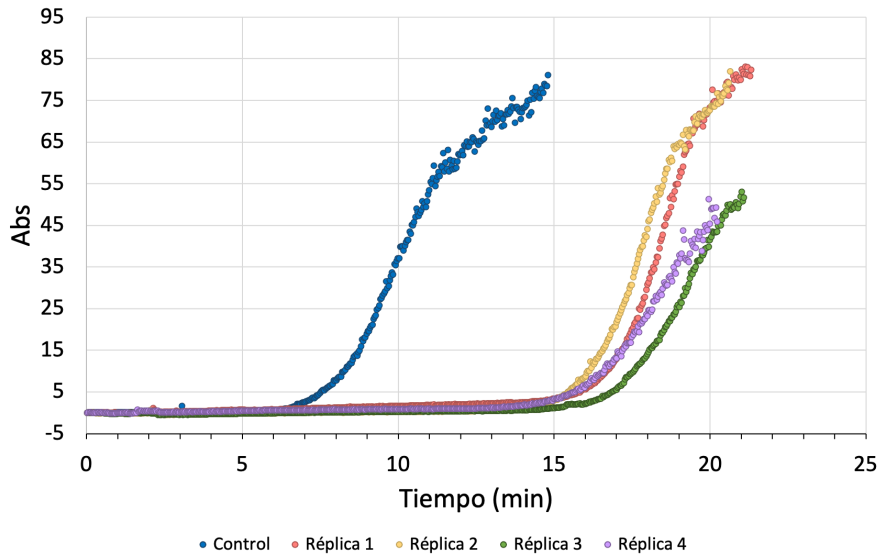
InsP6 hidrolizado 6 horas (2 µM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	5,67
Réplica 2	4,97
Réplica 3	5,67
Réplica 4	4,97

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

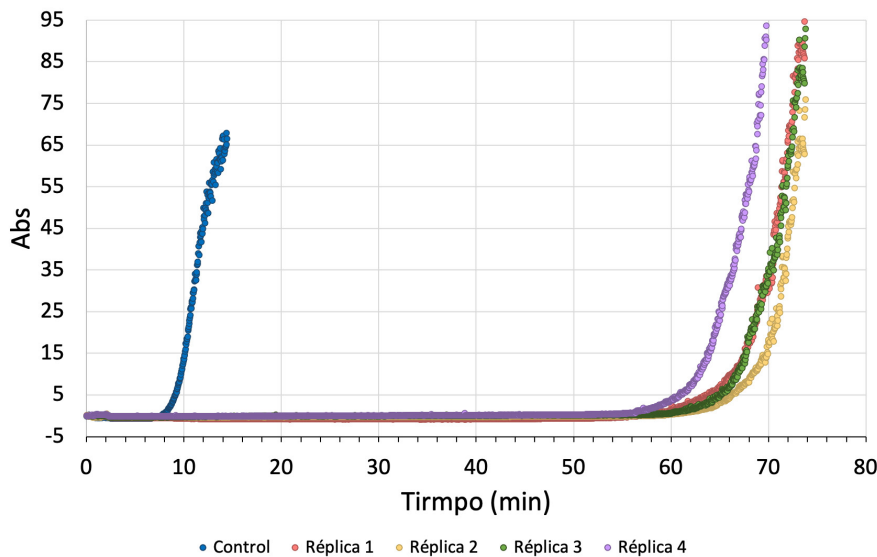
InsP6 hidrolizado 9 horas (2 µM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	6,67
Réplica 2	6,67
Réplica 3	8,27
Réplica 4	6,67

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

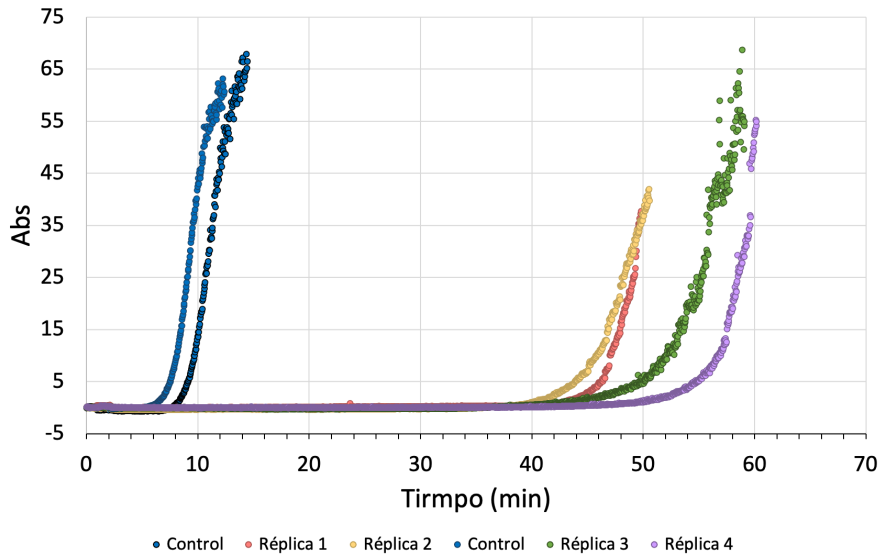
InsP6 hidrolizado 16 horas (2 µM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	52,8
Réplica 2	55,5
Réplica 3	54,2
Réplica 4	50,4

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

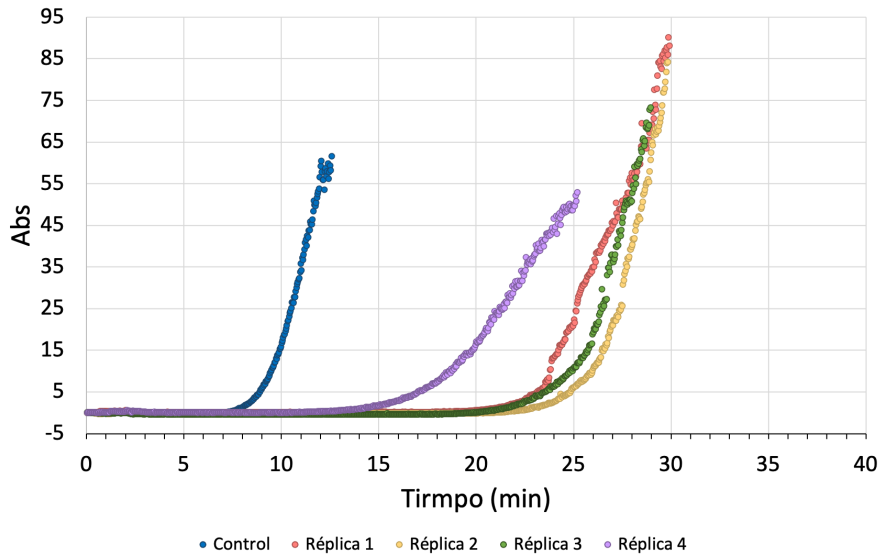
InsP6 hidrolizado 24 horas (2 μM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	36,4
Réplica 2	34,2
Réplica 3	41,1
Réplica 4	45,7

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

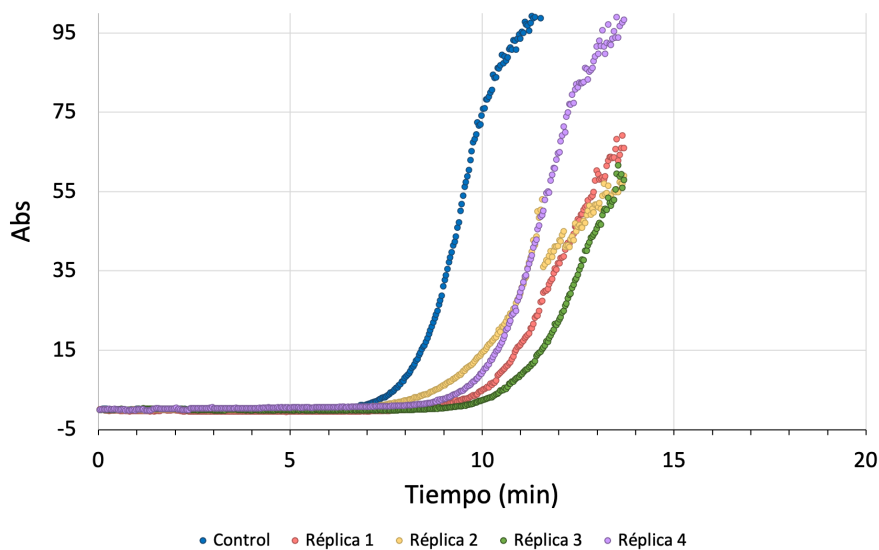
InsP6 hidrolizado 48 horas (2 μM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	14,5
Réplica 2	16,0
Réplica 3	14,5
Réplica 4	7,9

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

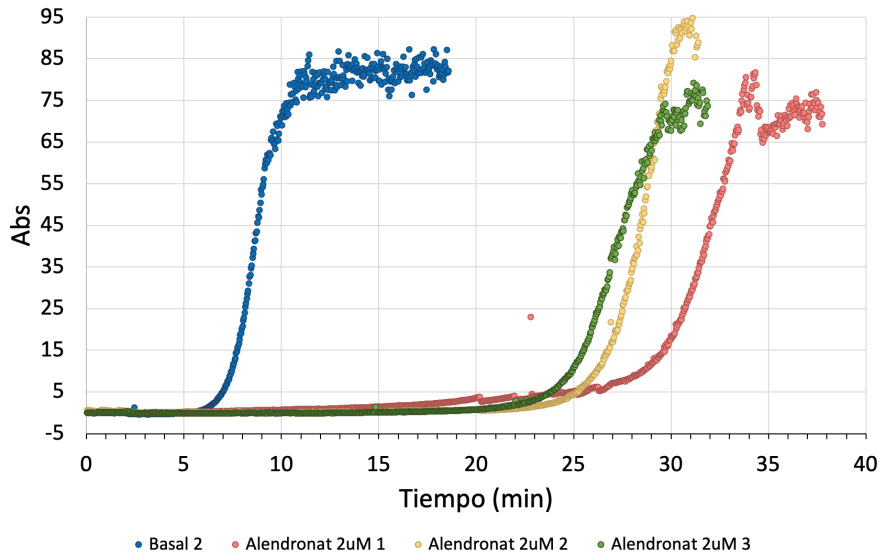
InsP6 hidrolizado 72 horas (2 μM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	1,8
Réplica 2	0,4
Réplica 3	2,4
Réplica 4	1,2

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

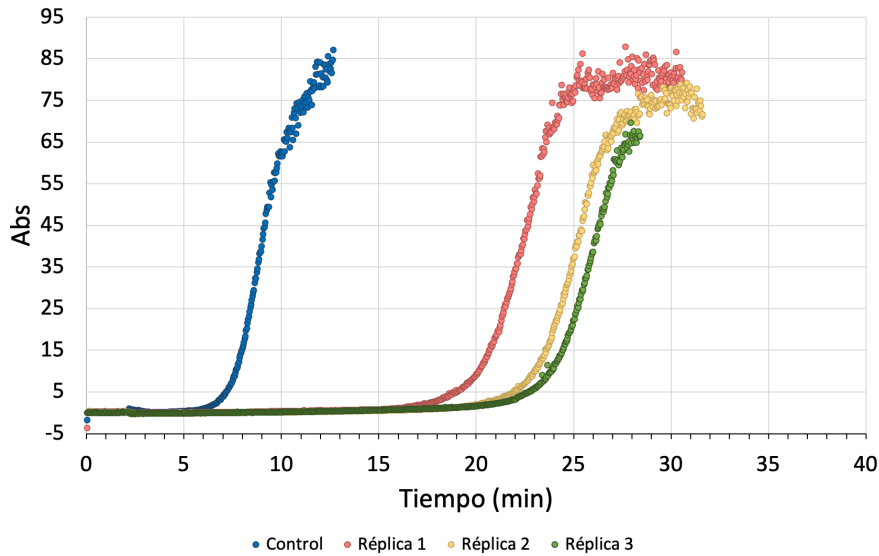
Alendronato (2 μ M)



Δt_i (min)	
Réplica 1	19,10
Réplica 2	17,40
Réplica 3	16,10

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

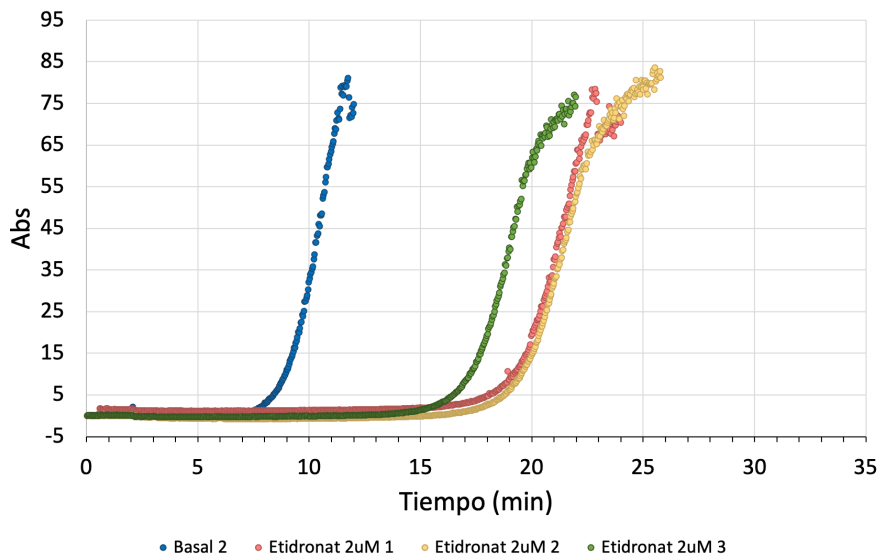
Pamidronato (2 μ M)



Δt_i (min)	
Réplica 1	11,10
Réplica 2	14,00
Réplica 3	15,00

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

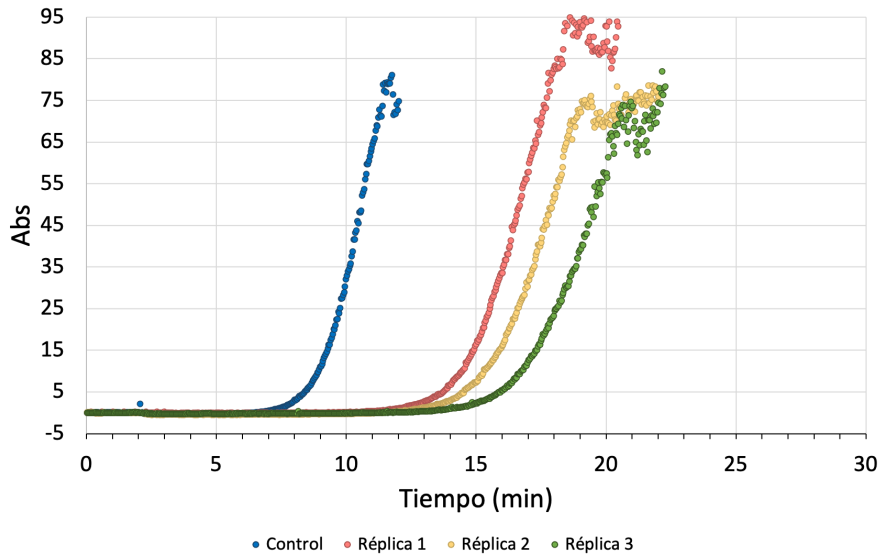
Etidronato (2 μ M)



Δt_i (min)	
Réplica 1	8,80
Réplica 2	9,40
Réplica 3	7,30

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

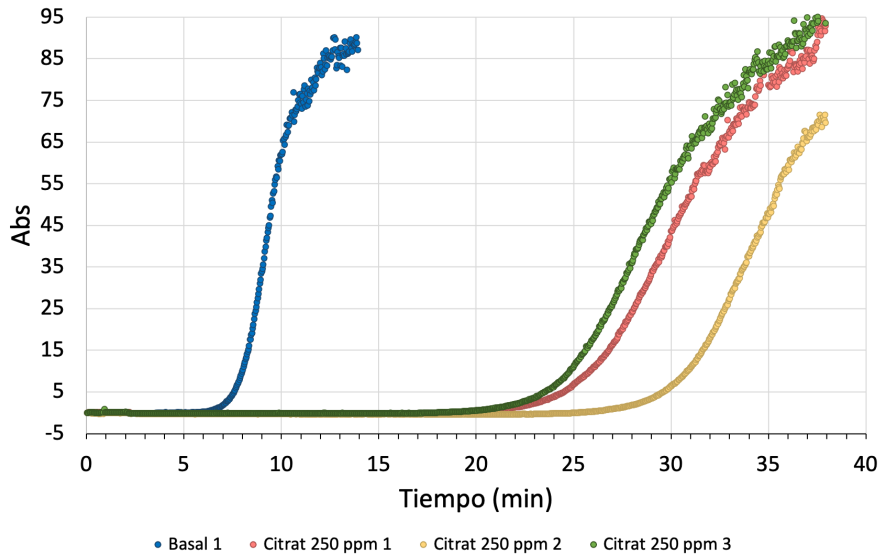
Ibandronato (2 μ M)



Δt_i (min)	
Réplica 1	4,40
Réplica 2	5,20
Réplica 3	6,30

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

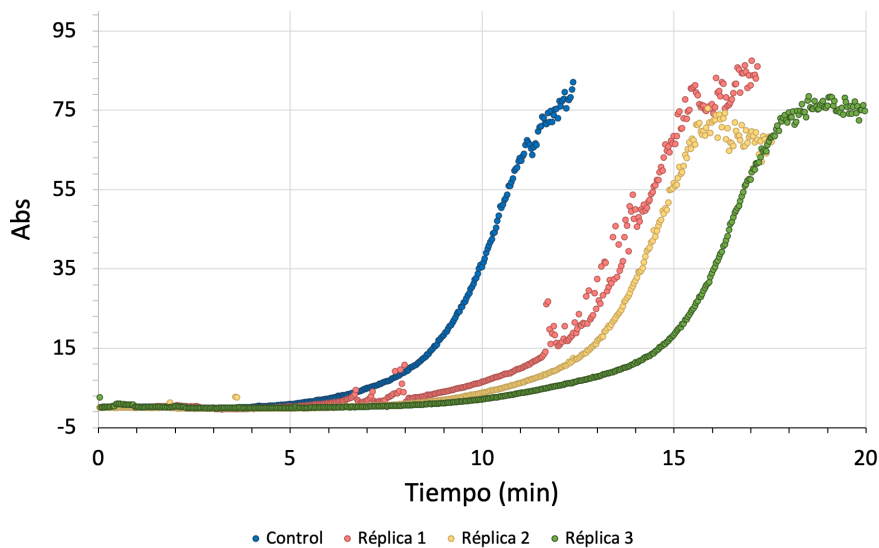
Citrato (250 ppm)



Δt_i (min)	
Réplica 1	16
Réplica 2	21,3
Réplica 3	14,9

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

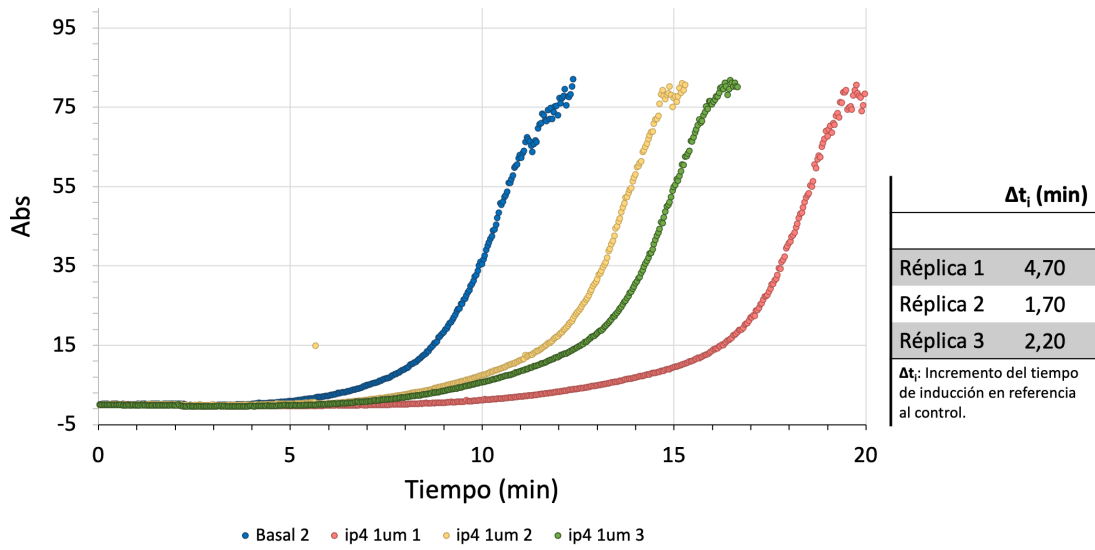
Ins-1,2,3,5,6-P5 (2 μ M)



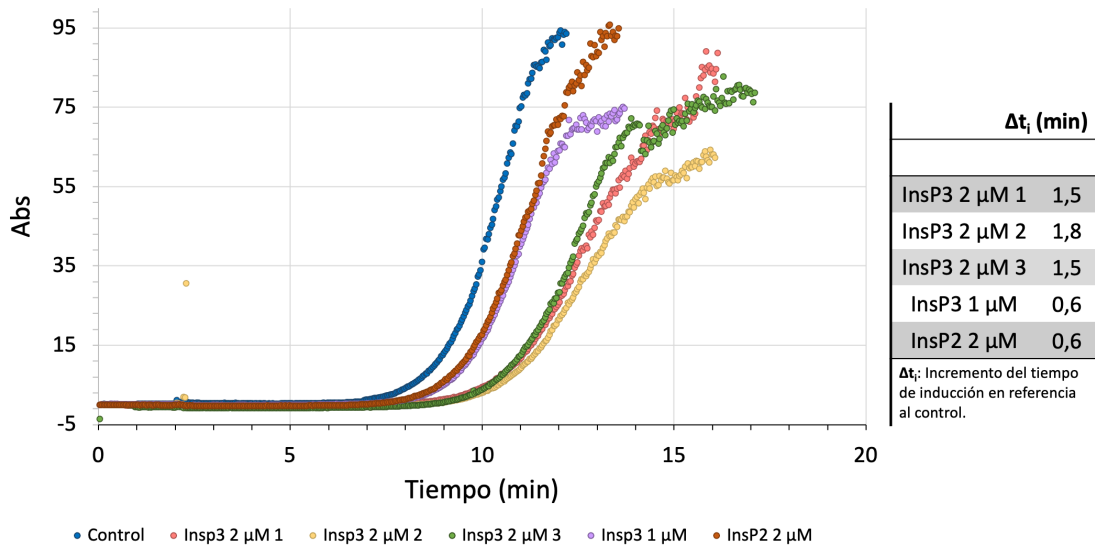
Δt_i (min)	
Réplica 1	2,20
Réplica 2	3,10
Réplica 3	3,50

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

Ins-2,3,5,6-P4 (2 μM)

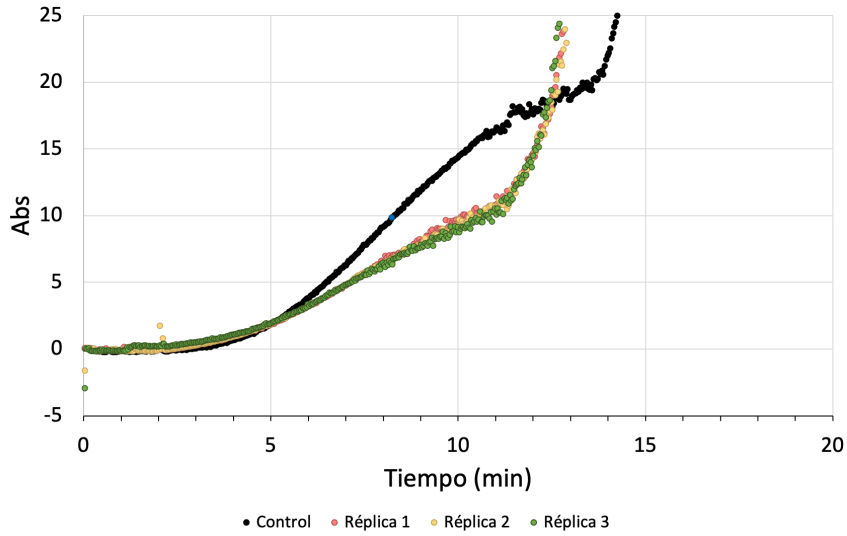


Ins-1,4,5-P3 e Ins-2,4-P2 a distintas concentraciones



3. Cinéticas de cristalización de la hidroxiapatita

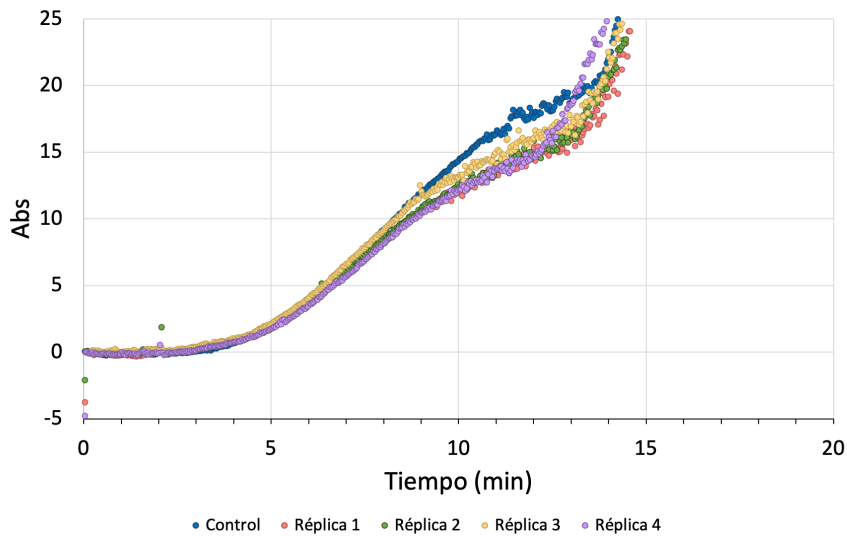
InsP6 sin hidrolizar (2 μM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	0
Réplica 2	0
Réplica 3	0

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

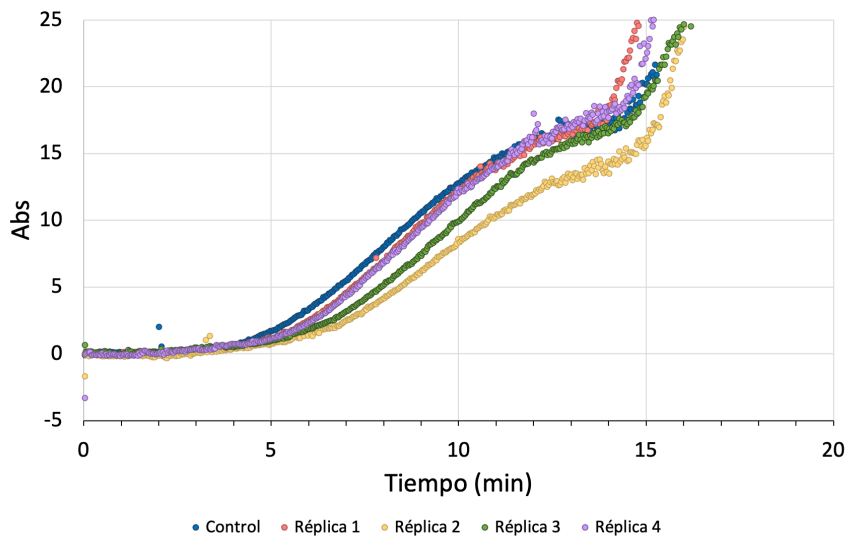
InsP6 hidrolizado 6 horas (2 μM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	0
Réplica 2	0
Réplica 3	0
Réplica 4	0

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

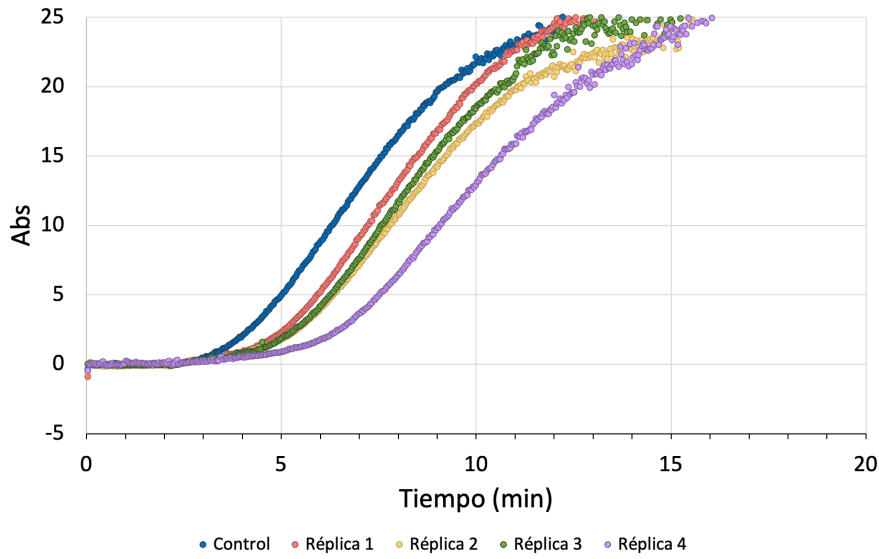
InsP6 hidrolizado 9 horas (2 μM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	0,6
Réplica 2	0,8
Réplica 3	0,6
Réplica 4	0,8

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

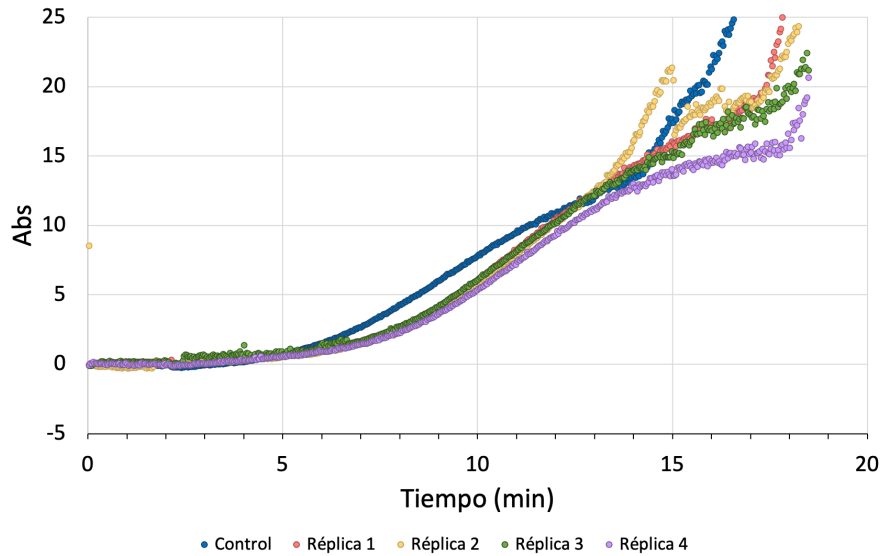
InsP6 hidrolizado 16 horas (2 μ M)



Δt_i (min)	
Réplica 1	0,85
Réplica 2	1,15
Réplica 3	1,15
Réplica 4	1,95

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

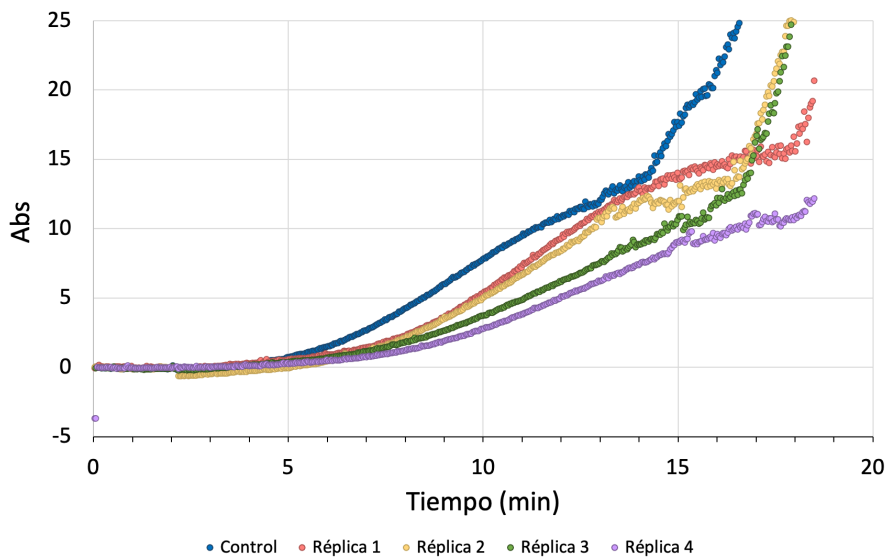
InsP6 hidrolizado 24 horas (2 μ M)



Δt_i (min)	
Réplica 1	1,9
Réplica 2	1,9
Réplica 3	1,9
Réplica 4	1,9

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

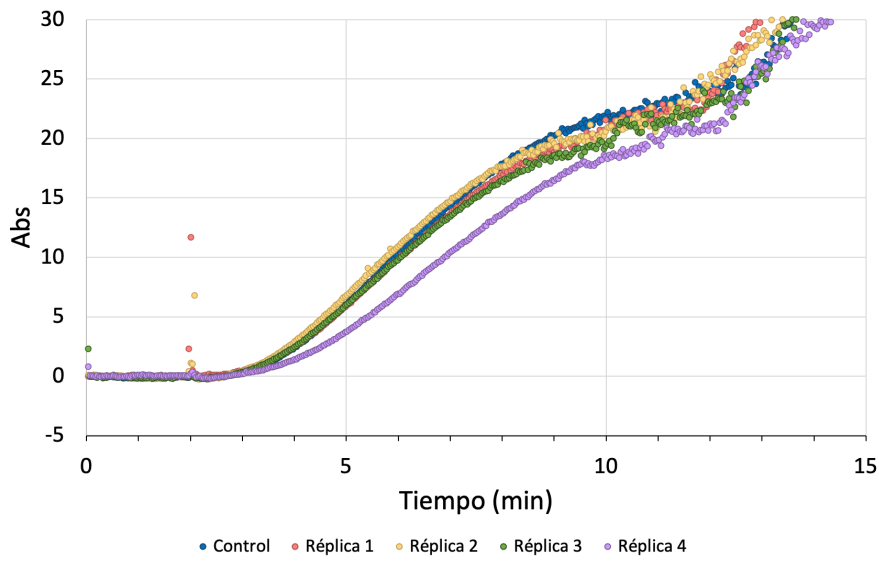
InsP6 hidrolizado 48 horas (2 μ M)



Δt_i (min)	
Réplica 1	1,6
Réplica 2	1,6
Réplica 3	1,6
Réplica 4	2,7

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

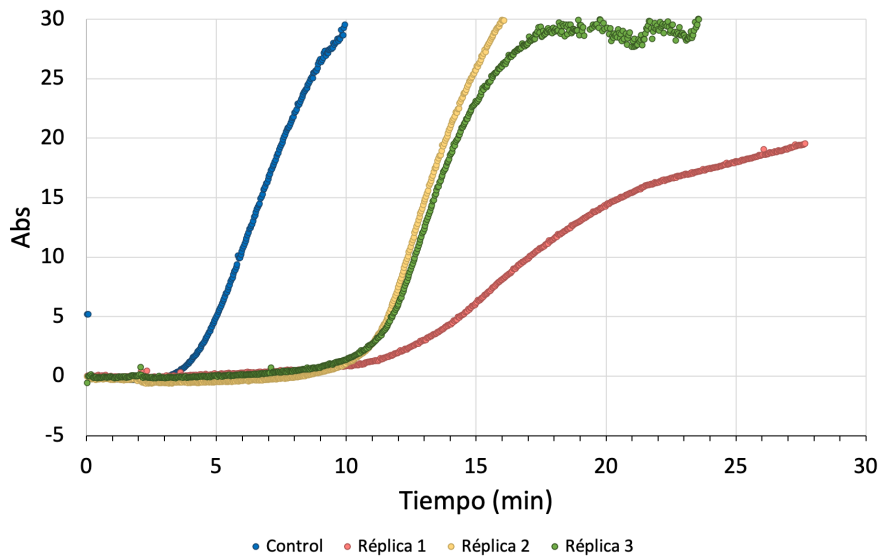
InsP6 hidrolizado 72 horas (2 μM)



	Δt_i (min)
Réplica 1	0,0
Réplica 2	0,0
Réplica 3	0,0
Réplica 4	0,4

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

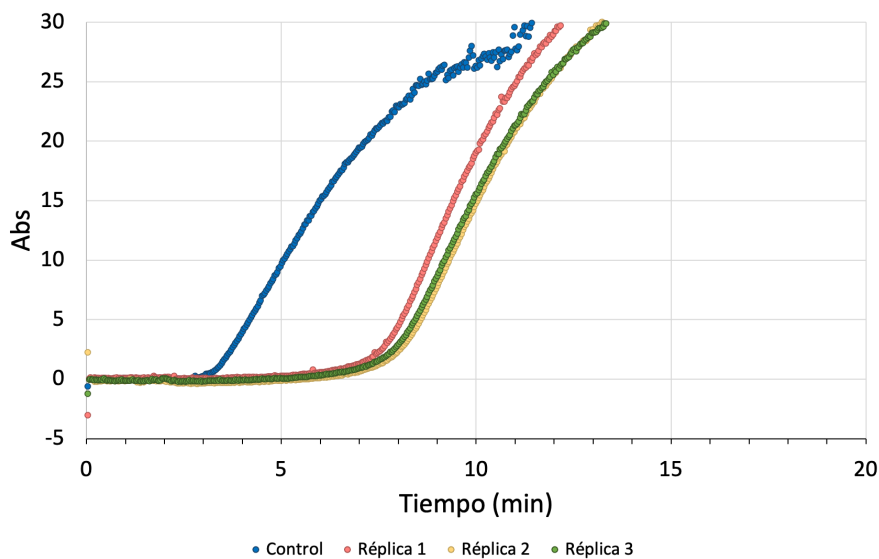
Alendronato (2 μM)



	Δt_i (min)
Réplica 1	7
Réplica 2	6,8
Réplica 3	6,8

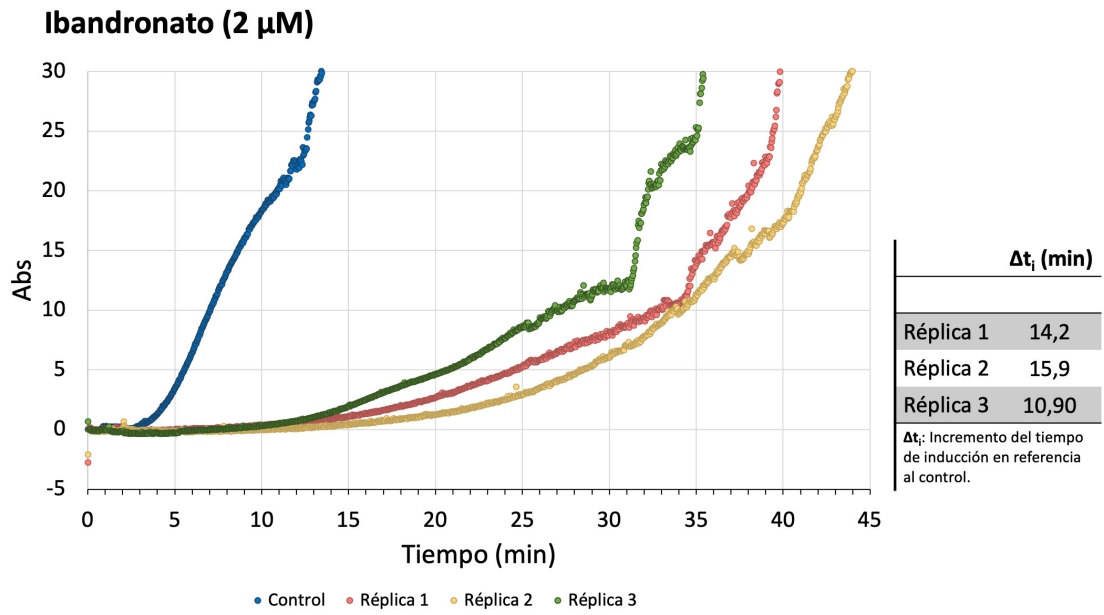
Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

Pamidronato (2 μM)



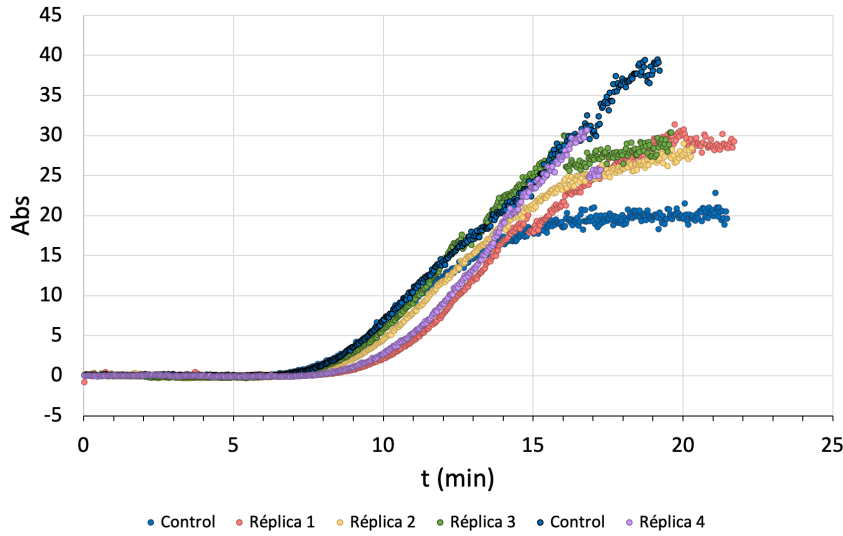
	Δt_i (min)
Réplica 1	3,9
Réplica 2	4,3
Réplica 3	4,1

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.



4. Cinéticas de cristalización del ácido úrico

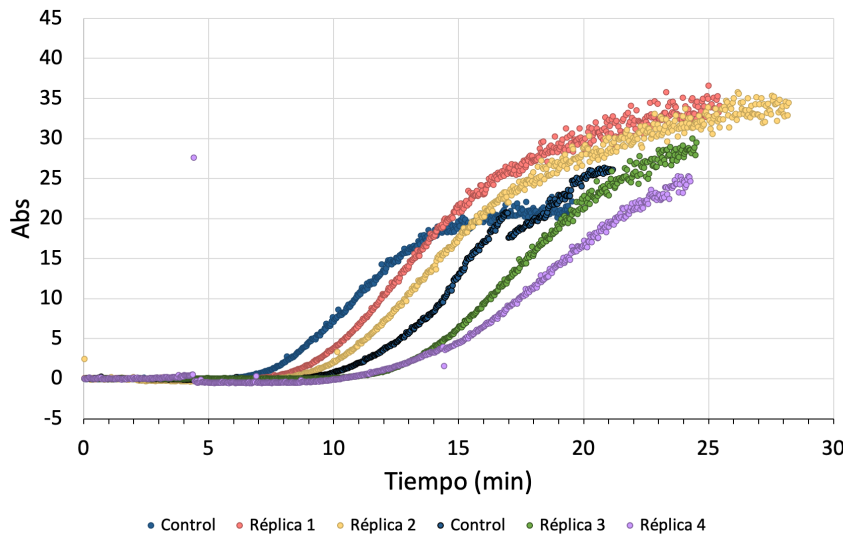
Teobromina (0,05 mM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	1,1
Réplica 2	0,4
Réplica 3	0,1
Réplica 4	1,65

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

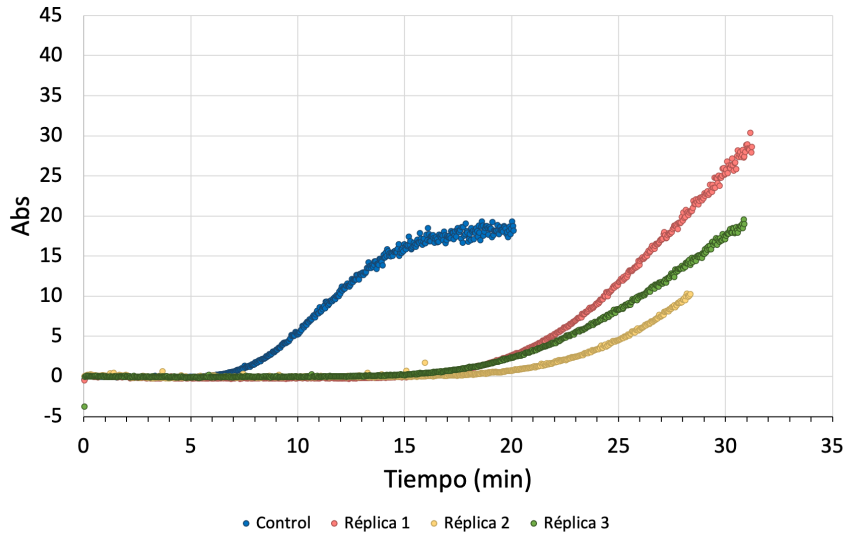
Teobromina (0,1 mM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	1
Réplica 2	1,2
Réplica 3	1,8
Réplica 4	1,4

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

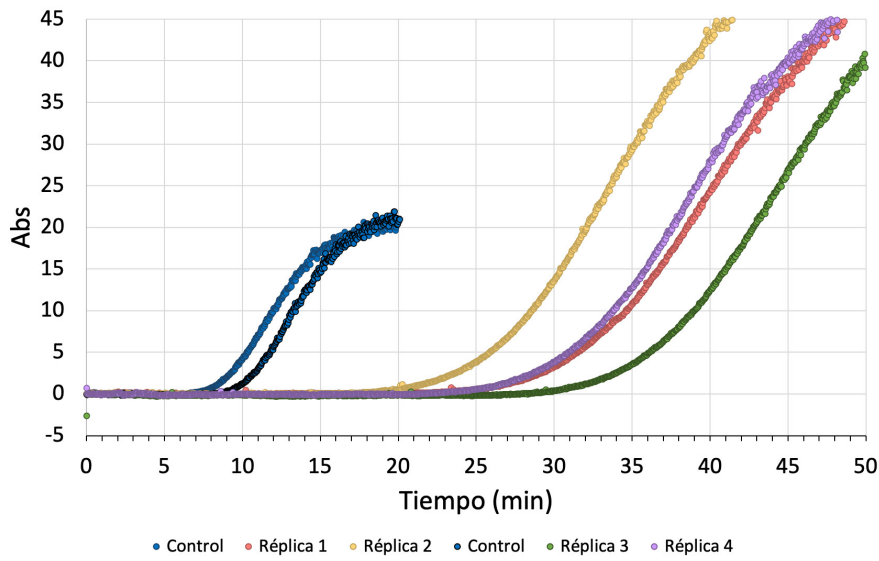
Teobromina (0,2 mM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	9,43
Réplica 2	11,63
Réplica 3	9,43

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

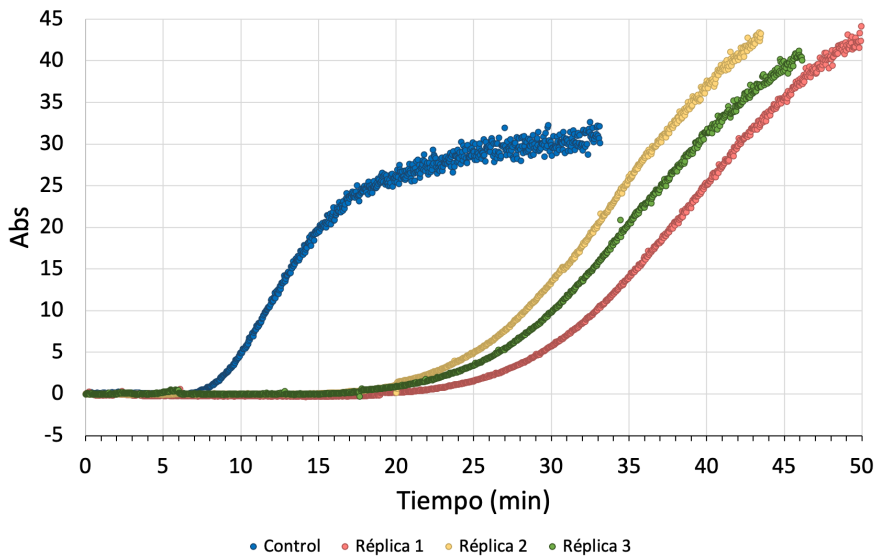
Teobromina (0,4 mM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	16,8
Réplica 2	11,4
Réplica 3	19,6
Réplica 4	14,8

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

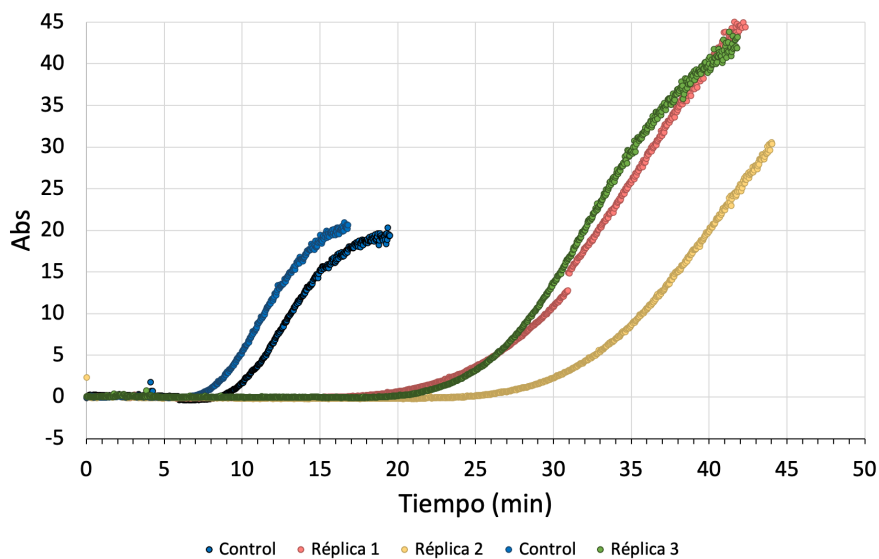
Teobromina (0,6 mM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	15,8
Réplica 2	12,8
Réplica 3	13,8

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

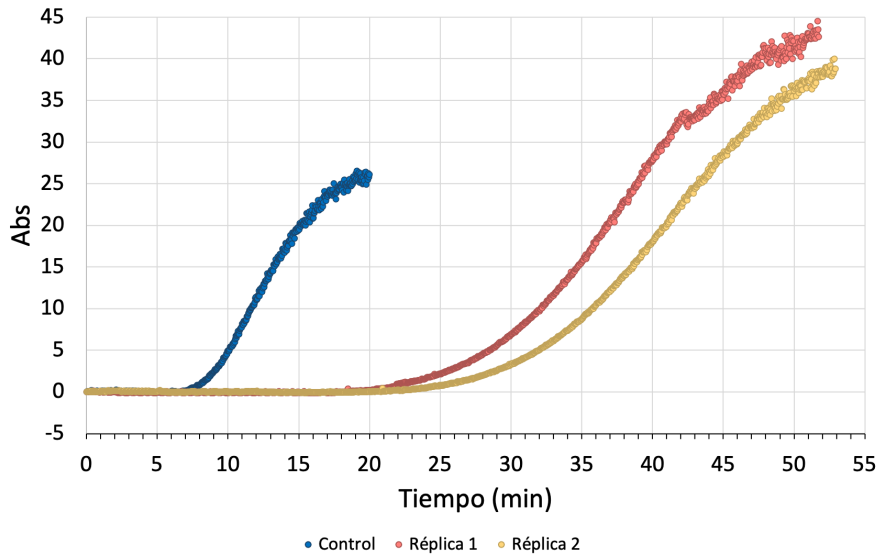
3,7-dimetilúrico (0,2 mM)



ΔT_i (min)	
Réplica 1	11,5
Réplica 2	17,8
Réplica 3	15,4

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

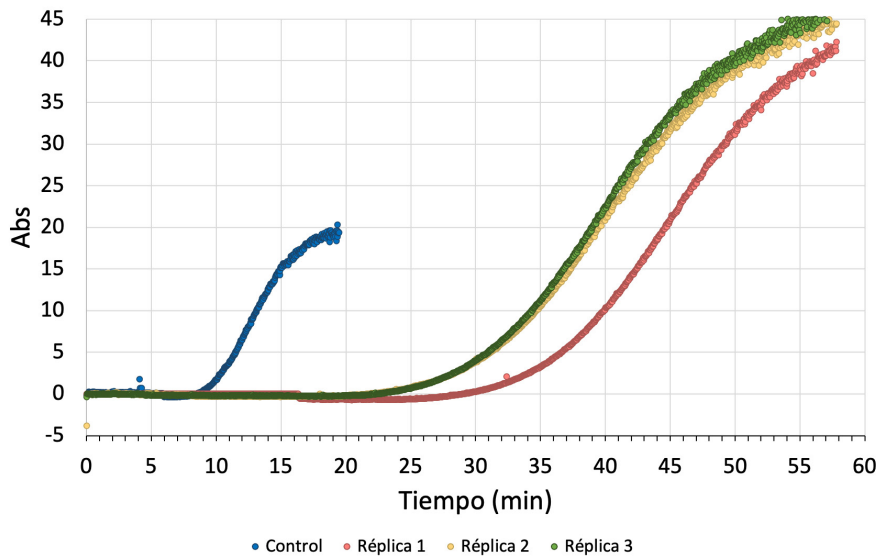
3,7-dimetilúrico (0,4 mM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	1,9
Réplica 2	1,9

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

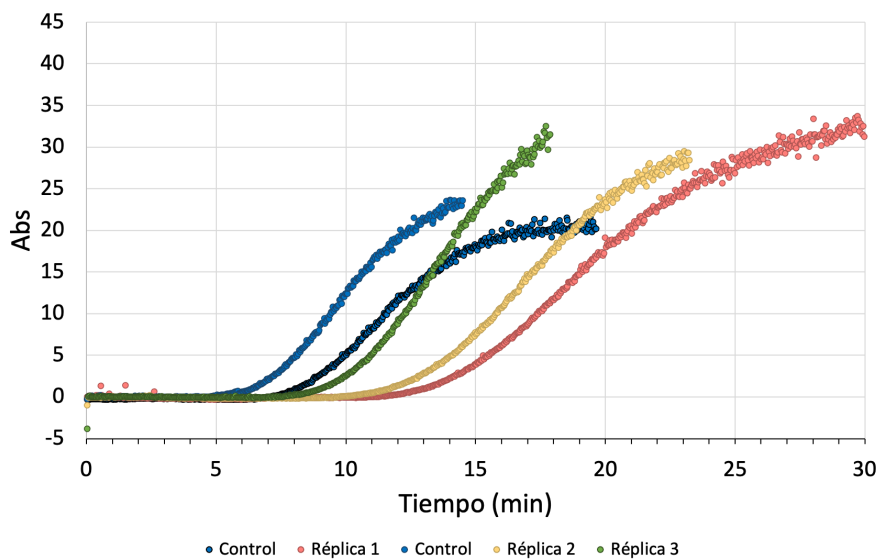
3,7-dimetilúrico (0,6 mM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	21
Réplica 2	16,8
Réplica 3	16,8

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

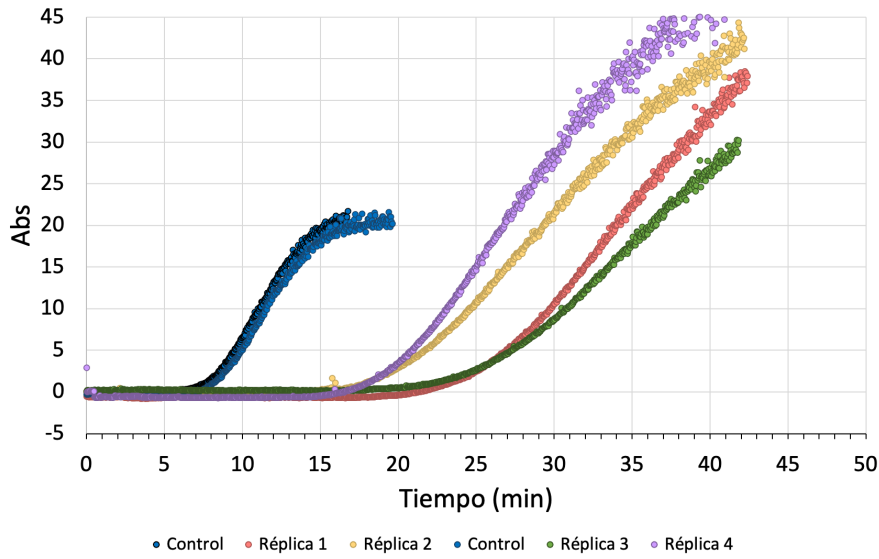
7-metilxantina (0,2 mM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	5,1
Réplica 2	4,6
Réplica 3	2,2

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

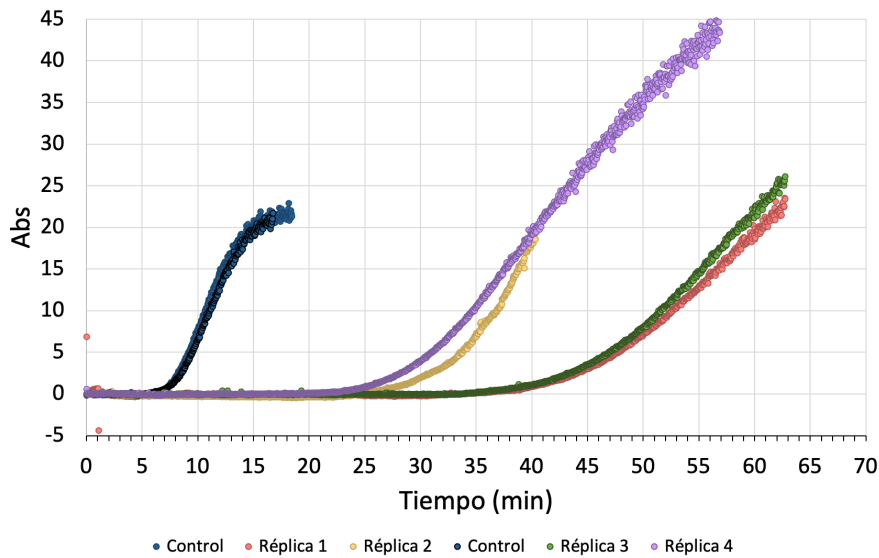
7-metilxantina (0,4 mM)



	Δt_i (min)
Réplica 1	14,2
Réplica 2	10,8
Réplica 3	14,2
Réplica 4	10,4

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

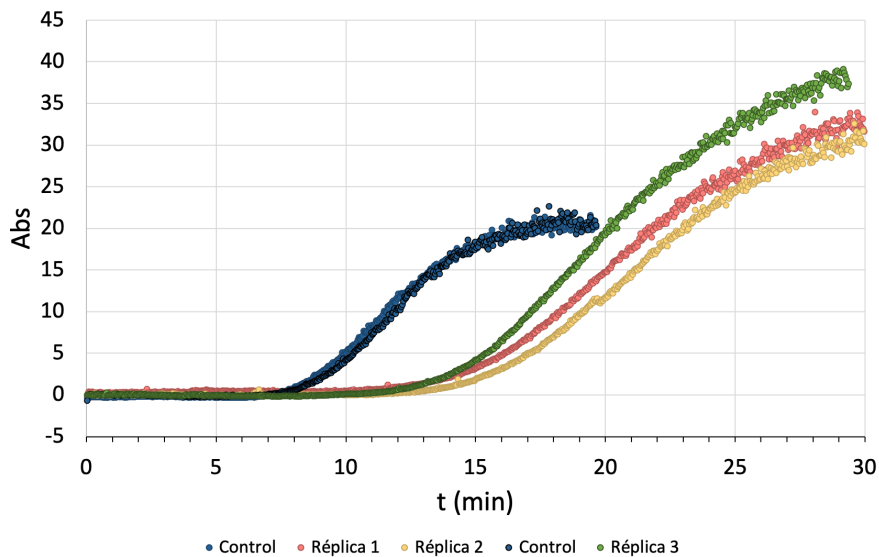
7-metilxantina (0,6 mM)



	Δt_i (min)
Réplica 1	32,2
Réplica 2	20,4
Réplica 3	32,1
Réplica 4	18,4

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

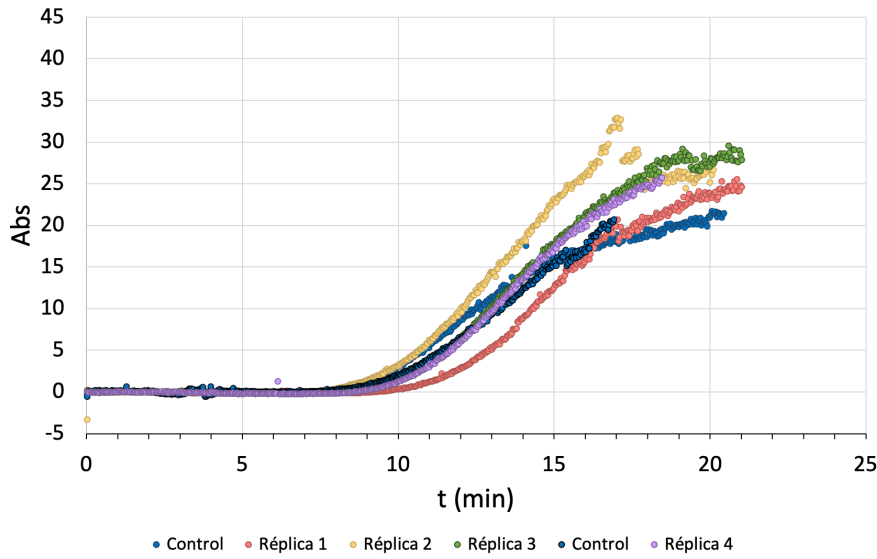
3-metilxantina (0,6 mM)



	Δt_i (min)
Réplica 1	5,7
Réplica 2	6,4
Réplica 3	5,5

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

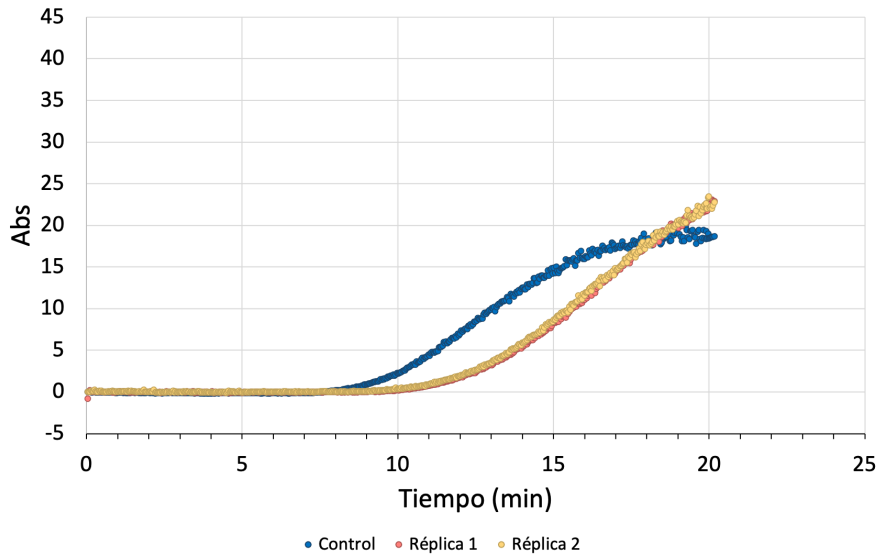
1-metilxantina (0,6 mM)



	Δt_i (min)
Réplica 1	1,8
Réplica 2	0
Réplica 3	0,5
Réplica 4	0,1

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

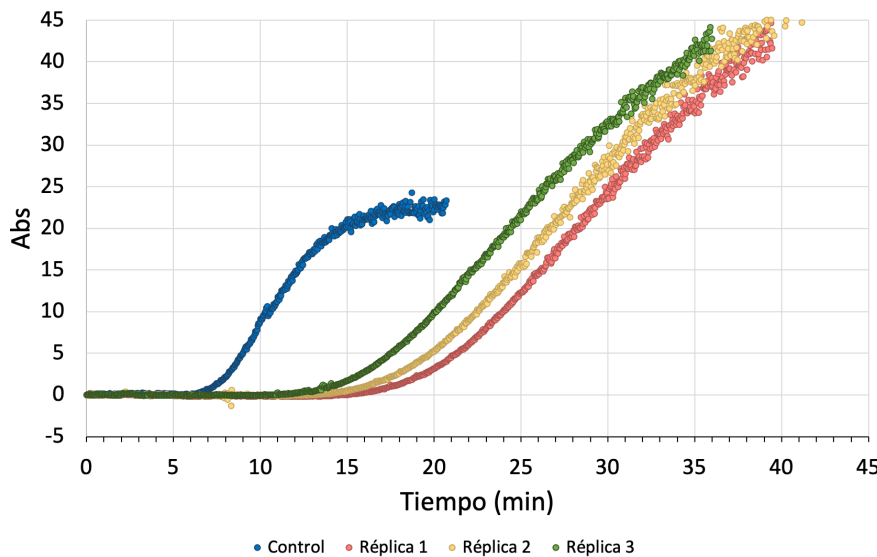
Paraxantina (0,6 mM)



	Δt_i (min)
Réplica 1	1,9
Réplica 2	1,9

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

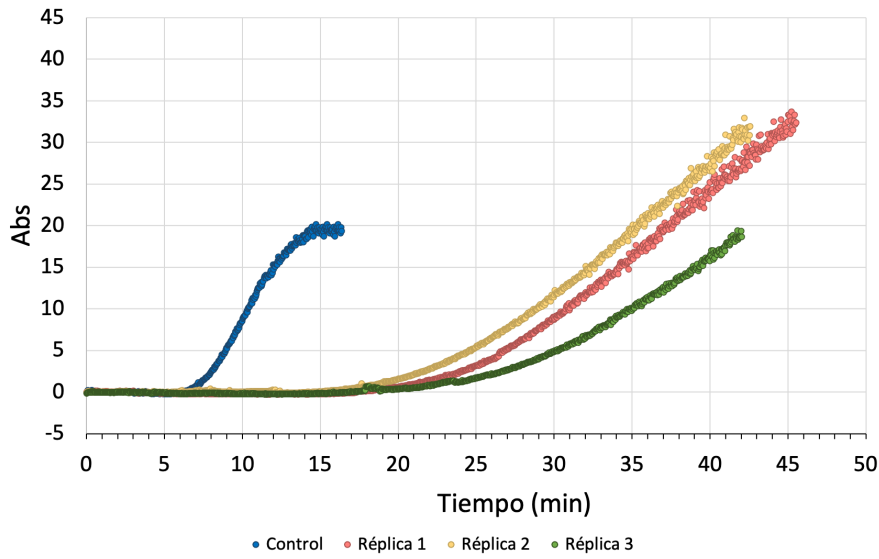
Teobromina (0,1 mM) + 7-metilxantina (0,2 mM)



	Δt_i (min)
Réplica 1	10,1
Réplica 2	9,1
Réplica 3	7

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

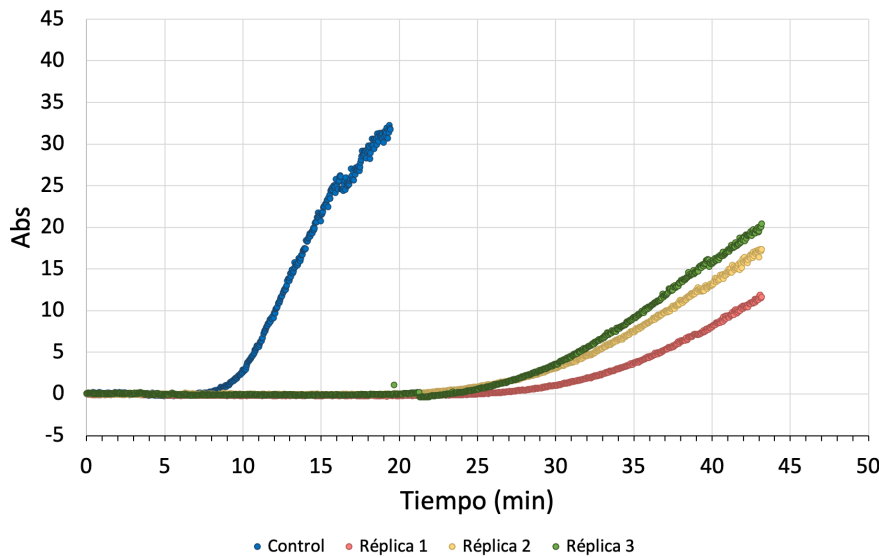
Teobromina (0,2 mM) + 7-metilxantina (0,2 mM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	12,7
Réplica 2	11,8
Réplica 3	15,3

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

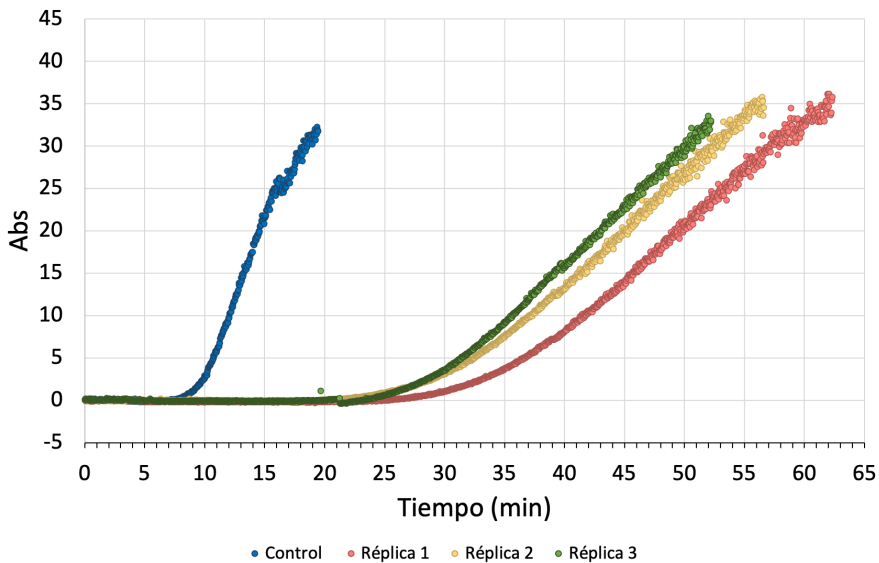
Teobromina (0,4 mM) + 7-metilxantina (0,2 mM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	22,9
Réplica 2	18,2
Réplica 3	21,3

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

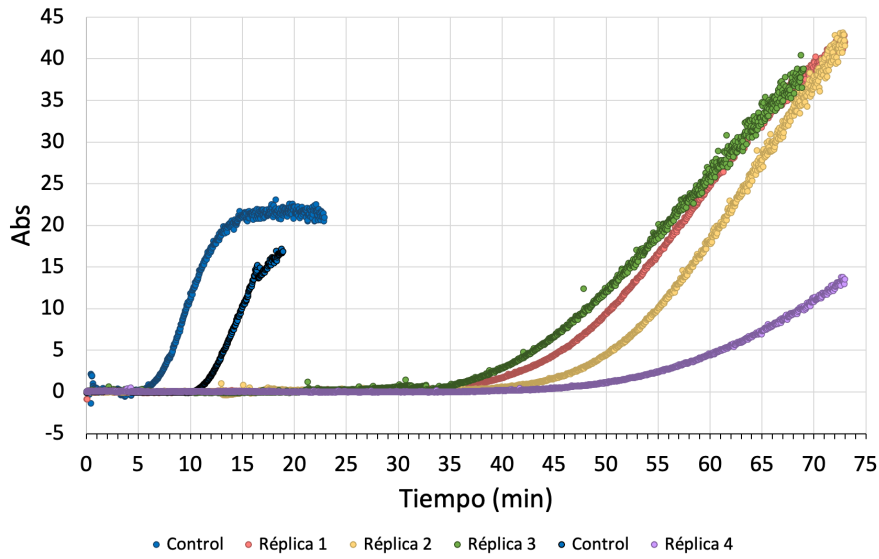
Teobromina (0,1 mM) + 7-metilxantina (0,4 mM)



Δt_i (min)	
Réplica 1	21,9
Réplica 2	18,1
Réplica 3	18,1

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

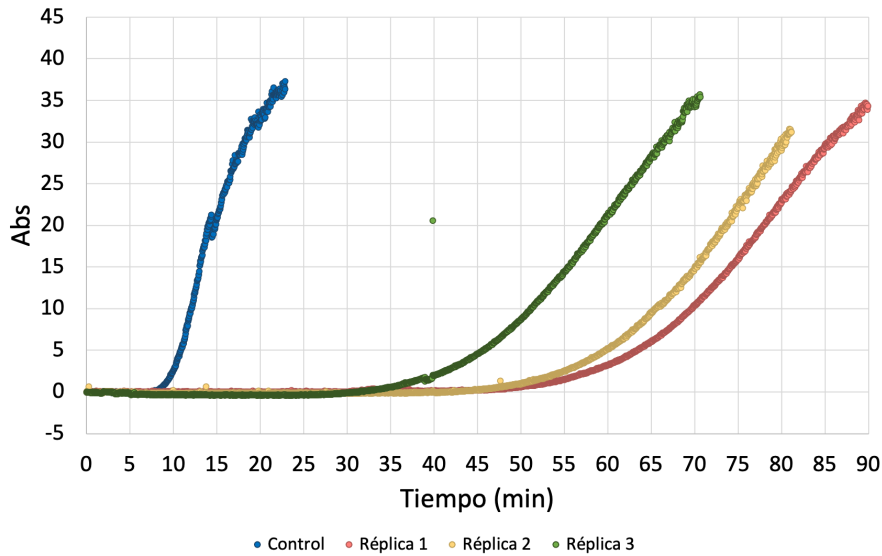
Teobromina (0,2 mM) + 7-metilxantina (0,4 mM)



	Δt_i (min)
Réplica 1	31,5
Réplica 2	34,8
Réplica 3	27,4
Réplica 4	38,8

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

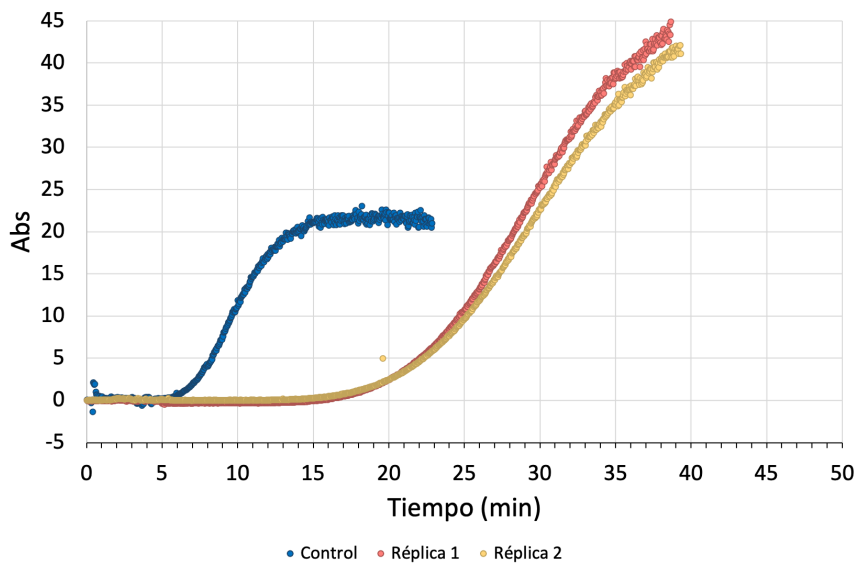
Teobromina (0,4 mM) + 7-metilxantina (0,4 mM)



	Δt_i (min)
Réplica 1	44,5
Réplica 2	38,5
Réplica 3	24,6

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

Teobromina (0,4 mM) + 3-metilxantina (0,4 mM)







	Δt_i (min)
Réplica 1	9,95
Réplica 2	9,95

Δt_i : Incremento del tiempo de inducción en referencia al control.

***Anexo 3. Artículos científicos
originales***

Article

Phytate Dephosphorylation Products Also Act as Potent Inhibitors of Calcium Oxalate Crystallization

Felix Grases ¹, Antonia Costa-Bauzá ^{1,*}, Paula Calvó ¹, Francesca Julià ¹, Jaume Dietrich ¹, Rosa Maria Gomila ², Gabriel Martorell ² and Pilar Sanchis ¹

¹ Laboratory of Renal Lithiasis Research, University Institute of Health Sciences Research (IUNICS-IdISBa), University of Balearic Islands, 07122 Palma de Mallorca, Spain

² Serveis Científicotècnics, University of Balearic Islands, 07122 Palma de Mallorca, Spain

* Correspondence: antonia.costa@uib.es

Abstract: Phytate has been classified as an anti-nutrient, but there are no adverse effects from the consumption of a balanced diet with 1 to 2 g of daily phytate (inositol-hexaphosphate, InsP₆) as a calcium magnesium salt, the form naturally present in grains. Furthermore, recent research has shown that phytate consumption may prevent pathological calcifications, such as kidney stones and cardiovascular calcifications. However, many endogenous and exogenous enzymes can hydrolyze phytate to lower inositol phosphates (InsPs) that also have biological activity. We performed a controlled hydrolysis of phytate and identified the products (InsPs) using tandem mass spectrometry (MS/MS). The total level of all InsPs was measured using a non-specific methodology. In addition, we evaluated the effects of the InsP₆ hydrolysates on calcium oxalate crystallization using scanning electron microscopy and measuring the time needed for the induction of crystallization. Our results indicate that InsP₆ and its hydrolysis products functioned as effective inhibitors of calcium oxalate crystallization. Thus, even though InsP₆ is hydrolyzed after consumption, the enzymatic products also have the potential to reduce pathological calcifications. Finally, although it is useful to measure the overall level of InsPs in biological fluids, such as urine, there is a need to develop simple analytical methods to quantify the level of individual InsPs.

Keywords: inositol hexaphosphate (InsP₆; phytate); inositol phosphates (InsPs); crystallization inhibitor; calcium oxalate



Citation: Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Calvó, P.; Julià, F.; Dietrich, J.; Gomila, R.M.; Martorell, G.; Sanchis, P.

Phytate Dephosphorylation Products Also Act as Potent Inhibitors of Calcium Oxalate Crystallization. *Molecules* **2022**, *27*, 5463. <https://doi.org/10.3390/molecules27175463>

Academic Editors: Lillian Barros and David Barker

Received: 31 May 2022

Accepted: 23 August 2022

Published: 25 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Researchers first identified inositol-hexaphosphate (InsP₆, phytate) in 1855–56 and determined its structure in 1914. Mellanby performed the first studies of the possible health effects of phytate during the 1940s by administering sodium phytate to dogs [1]. These early animal experiments indicated that the consumption of a large amount of the sodium salt of phytate with a nutrient-deficient diet caused rickets. This led to the initial classification of phytate as an anti-nutrient. Subsequent studies reported that phytate had the capacity to form complexes with metal cations, and when administered in large doses with an unbalanced diet (deficient in trace elements such as Cu and Zn), it led to malabsorption and nutritional deficiency [2–4]. However, more recent studies have shown that the intake of a balanced diet with a moderate amount of phytate (1–2 g/day) in the form of a calcium–magnesium salt led to no adverse effects. In fact, ingesting this amount of phytate is a central part of the "Mediterranean diet" [5]. Studies of the effects of dietary phytate should be performed by supplying it in the form of a calcium magnesium salt and not in the sodium form, as suggested in some recent studies [6].

Recent studies reported that the intake of InsP₆ can provide numerous interesting and unexpected beneficial effects on health. For example, phytate can function as an antioxidant [7], protect against some types of cancer [8], prevent the development of pathological

calcifications [9] and prevent diabetes and its adverse effects [10,11]. Thus, the currently available literature indicates that the intake of phytate has many beneficial effects [12]. InsP₆ has a strong negative charge, so it is difficult to explain its entry into the body through the gastrointestinal tract. Although similar molecules such as bisphosphonates enter the body by this route (albeit in small amounts), it is thought that there are no specific transporters for phytate, as its absorption is produced by paracellular transport.

The analytical determination of InsP₆ can be difficult because it does not have any characteristic spectral properties and because of its capacity to form metal complexes, allowing it to bind to multiple metal surfaces and molecules. A further complication is that the body has enzymes that hydrolyze phytate (InsP₆) to other inositol phosphates (InsP₅ to InsP₁) that may also have biological activity. This topic has not been thoroughly studied and has led to various controversies. However, the development of new analytical methodologies that incorporate tandem mass spectrometry (MS/MS) [13,14] has made it possible to reinterpret the results of previous experiments.

Studies of experimental animals and humans have demonstrated that the consumption of InsP₆ reduced the development of pathological calcifications, such as cardiovascular calcifications, soft tissue calcifications and kidney stones [9]. Since the ingestion of InsP₆ leads to the formation of less phosphorylated InsPs, it is also necessary to assess the activity of these derivatives as crystallization inhibitors. Polyphosphates with two phosphate groups, such as pyrophosphate and bisphosphonates, are potent inhibitors of the crystallization of calcium salts (phosphates and oxalates) in blood and urine [15,16]. Renal lithiasis is a highly prevalent disease (more than 10% of the population and is increasing), and calcium oxalate lithiasis (in its different types) accounts for around 70–80% of cases. Therefore, the reduction in this type of pathological calcification is important [9].

In the present study, we performed a controlled hydrolysis of phytate and evaluated the hydrolysis process using MS/MS and the total pool of inositol phosphates (InsPs) using a non-specific methodology. We also evaluated for the first time the effects of the different InsP₆ hydrolysates on inhibiting the crystallization of calcium oxalate (CaOx).

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of InsP₆ Hydrolysates

A phytate stock solution (1.12 mM) was prepared from phytic acid sodium salt hydrate (68388, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany) and was adjusted to a pH of 2 using HCl (0.5 M). Duplicate aliquots (5 mL) were kept in a dry bath at T = 97 °C for 6, 9, 16, 24, 48 or 72 h for hydrolysis.

2.2. Identification of InsPs Using MS/MS

Diluted samples (1:1000) were injected into a Q Exactive Orbitrap high-resolution mass spectrometer equipped with a heated electrospray ionization (HESI) probe (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), which was operated in a negative ionization mode. The temperature of the ion transfer capillary was set to 320 °C, the spray voltage was set to 2.9 kV in negative mode and the S-lens RF level was 50 AU. Direct injection in the full scan acquisition mode over a range of 150 to 700 m/z was performed with a resolution of 140,000.

2.3. Crystallization Experiments

The effects of phytate and its hydrolysis products mixture on CaOx crystallization in synthetic urine were assessed using a kinetic turbidimetric system. This system consisted of a spectrometer equipped with a fiber-optic light-guide measuring cell (AvaSpec-ULS2048CL-EVO, Avantes, The Netherlands). Crystallization was assessed at a constant temperature (37 °C) with magnetic stirring (300 rpm).

In these experiments, the synthetic urine solution, obtained by mixing equal volumes of Solution A and Solution B (Table 1), was previously sonicated and adjusted to a pH of 6. Then, 200 mL was transferred to a crystallization flask, and 0.2 mL of phytate stock solution

or hydrolyzed mixture was added. When the resulting solution reached a temperature of 37 °C, 2 mL of a sodium oxalate stock solution (5 g/L) was added to induce CaOx crystallization. The time for the induction of CaOx crystallization (which correlates with inhibition of crystallization) was then determined using turbidimetry.

Table 1. Composition of synthetic urine. Synthetic urine was obtained by mixing equal volumes of Solution A and Solution B and was sonicated, and the pH was adjusted to 6.0 before starting experiments.

Solution A		Solution B	
Na ₂ SO ₄ · 10H ₂ O	19.34 mM	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	15.45 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5.92 mM	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	15.64 mM
NH ₄ Cl	86.75 mM	NaCl	223.31 mM
KCl	162.69 mM	Na ₂ C ₂ O ₄	0.6 mM
CaCl ₂	10 mM		

2.4. Scanning Electron Microscopy

The morphological and structural characteristics of the CaOx crystals that formed in synthetic urine in the absence and presence of InsP₆ and its hydrolysis products mixture were examined using scanning electron microscopy (SEM, Hitachi S-3400N, Tokyo, Japan) coupled with RX energy dispersive microanalysis (Bruker AXS XFlash Detector 4010, Berlin, Germany).

2.5. Nonspecific Quantification of InsPs

The nonspecific quantification of InsPs, before and after the hydrolysis process, was performed by purification using AG 1-X8 resin and by the formation of InsPs complexes with Al(III), in which InsPs displaced the aluminum-xylene orange dye, as previously described [17].

2.6. Quantification of Inorganic Phosphate

The amount of inorganic phosphate that was liberated during phytate hydrolysis was determined using ammonium molybdate and ascorbic acid (a reducing agent), according to the phosphomolybdate–ascorbic acid method [18]. The absorbance of the blue phosphomolybdous complex was measured at 880 nm.

3. Results

Our MS/MS measurements of a freshly prepared phytate (InsP₆) solution prior to hydrolysis (0 h in Figure 1) indicated that it was mainly detected as InsP₅ and that the signal corresponding to InsP₆ was half that of InsP₅. This was due to the fact that the MS/MS detector ionization process produced InsP₆ fragmentations that mainly involved the loss of a phosphate group. Consequently, the most abundant derivative detected was InsP₅, even when the original sample did not contain this compound. Hydrolysis for different times in an acid medium (pH 2) led to changes in the levels of the six different InsPs (Figure 1). Thus, at 6 h, the level of InsP₆ declined to about one-third of its initial value. InsP₅ and InsP₄ accounted for greater percentages of the total, and there were greater levels of InsP₃ and InsP₂. At 9 h, the InsP₆ concentration was slightly lower, and the levels of InsP₄ and InsP₃ were slightly greater. At 16 h, the level of InsP₆ was much lower. The predominant species was InsP₄, and the level of InsP₁ increased significantly. At 72 h, the predominant species was InsP₁, followed by InsP₂, InsP₃, InsP₄ and InsP₅. InsP₆ was undetectable at 48 h of hydrolysis.

and InsP₄ accounted for greater percentages of the total, and there were greater levels of InsP₃ and InsP₂. At 9 h, the InsP₆ concentration was slightly lower, and the levels of InsP₄ and InsP₃ were slightly greater. At 16 h, the level of InsP₆ was much lower. The predominant species was InsP₄, and the level of InsP₁ increased significantly. At 24 h, the predominant species was InsP₁, followed by InsP₂, InsP₃, InsP₄ and InsP₅. InsP₆ was undetectable at 48 h of hydrolysis.

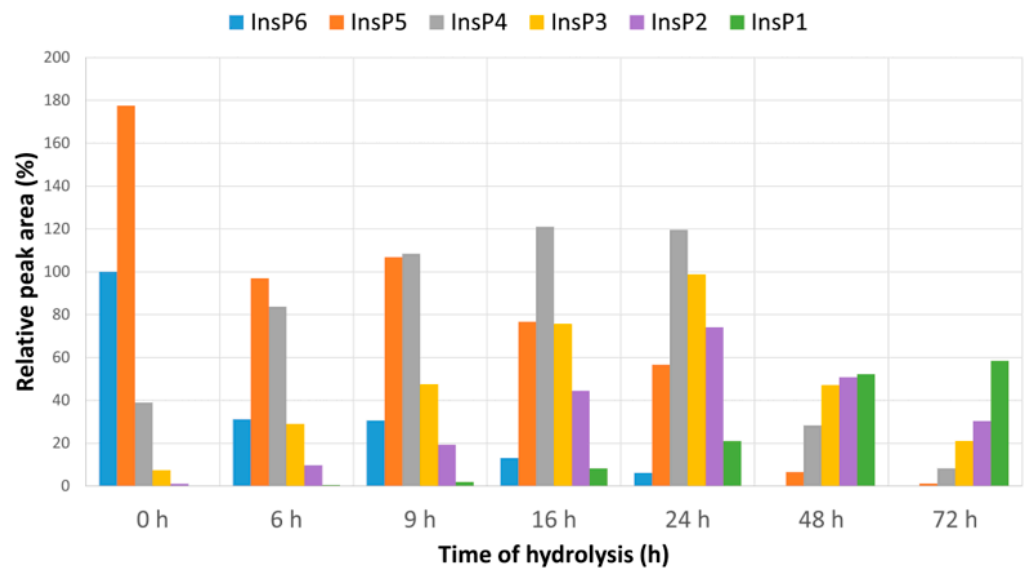


Figure 1. MS signal of the six InsPs after different times of hydrolysis (0 to 72 h) relative to the InsP₆ signal in a MS/MS used for measurements, the relative level of InsP₆ at 0 h was 100% and InsP₆ was undetectable at 48 and 72 h.

We then examined the effects of InsP₆ and its hydrolysates on the inhibition of the nucleation of CaOx of CaOx crystallization in urine (Figure 2). (Figure 2) It showed that hydrolyzed phytate at 1.12 μM at a concentration of 1.12 μM inhibited the initial nucleation of crystallization. Samples with hydrolysis times of 6, 9 and 16 h similarly inhibited CaOx crystallization, producing a higher inhibition than 0.56 μM InsP₆ even though the presence of InsP₆ in these samples was much lower (28% and 10% of initial concentration) (Figure 1). The sample with a hydrolysis time of 24 h had slightly reduced inhibition of crystallization with respect to the 0.56 μM of InsP₆ and the samples with hydrolysis times of 48 h and 72 h which still inhibited crystallization, but they presented considerably minor effects.

We used SEM to observe the different types of CaOx crystals that formed in synthetic urine in the presence of the different InsP hydrolysates (Figure 3). In the absence of InsP₆ or its hydrolysates, calcium oxalate trihydrate (COT) crystals were predominant. This product is kinetically favored because the thermodynamically stable form is calcium oxalate monohydrate (COM) [19]. Notably, COT crystals did not form in the presence of InsP₆ and samples subjected to hydrolysis for 6, 9, 16 or 24 h, indicating significant inhibition of crystallization of all these samples. However, COT crystals formed in the presence of samples that were hydrolyzed for 48 h or 72 h.

We then used a non-specific method to determine the level of total InsPs and free phosphate ions after different times of hydrolysis (Table 2). The non-hydrolyzed sample with phytate at a concentration of 1.12 μM (0 h), when the level of total InsP₆ was the greatest (Figure 1), led to an InsPs level of 0.82 mM (which corresponds to InsP₆) and no detectable free phosphate ion. The 6 h hydrolyzed sample had an InsPs level of 0.71 mM and a free phosphate level of 0.45 mM. As the hydrolysis time increased further, the level of InsPs decreased, and the level of the phosphate ions increased. The 48 and 72 h hydrolyzed samples had detectable InsPs by the non-specific method (0.16 and 0.10 mM respectively), despite the absence of InsP₆ and a very low amount of InsP₅ in the hydrolyzed mixtures (Figure 1).

Table 2. Level of total InsPs and Pi after different times of hydrolysis. A non-specific method was used to determine InsPs (see Material and Methods).

Time of Hydrolysis (h)	InsPs (mM)	Pi (mM)
0	0.82	0
6	0.71	0.45
9	0.60	0.74
16	0.53	1.3
24	0.39	2.01
48	0.16	4.18
72	0.10	5.41

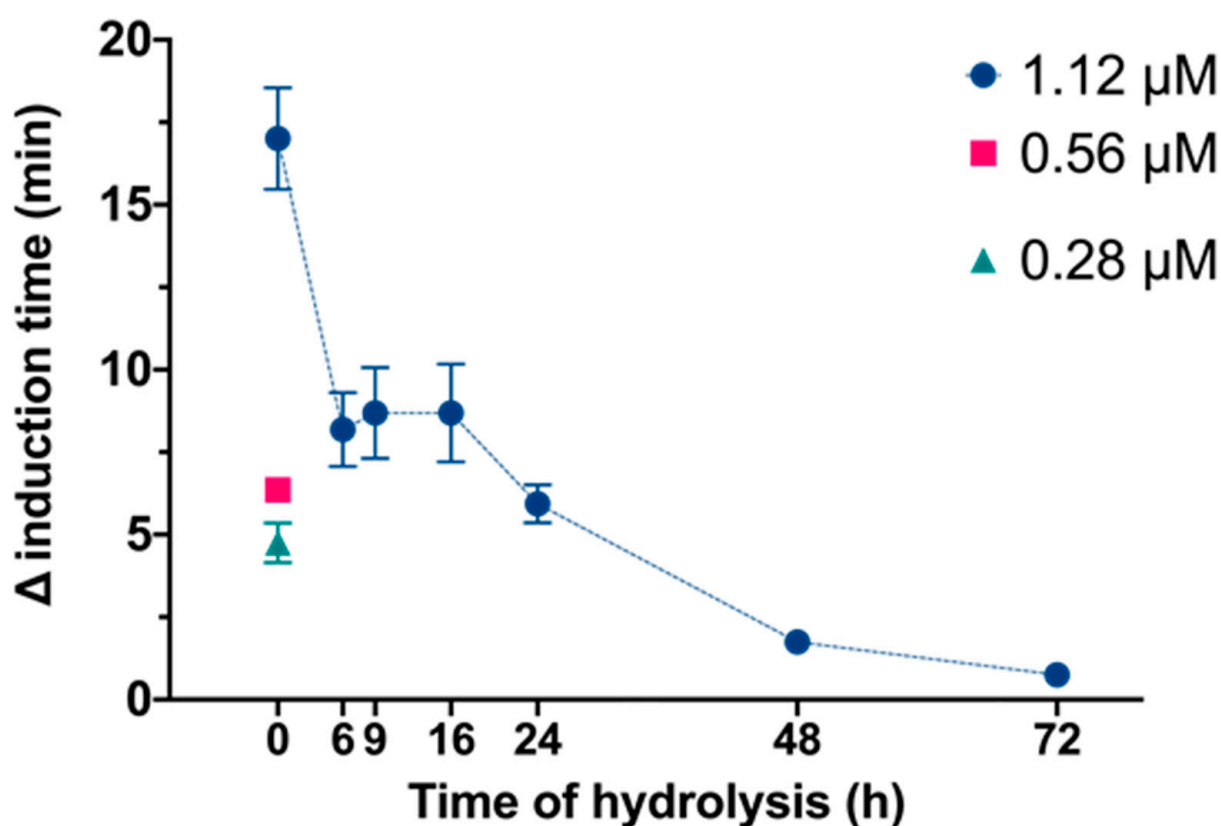


Figure 2. Effect of different InsP₆ concentrations and InsP₆ hydrolysates (6 to 72 h) on the increase in the time needed for the induction of CaOx crystallization in synthetic urine. The InsP₆ levels were 1.12, 0.56 or 0.28 μM for non-hydrolyzed InsP₆ (0 h), and the total InsP₆ level was 1.12 μM for hydrolyzed samples. Values are expressed as mean \pm SE of three experiments.

We used SEM to observe the different types of CaOx crystals that formed in synthetic urine in the presence of the different InsP hydrolysates (Figure 3). In the absence of InsP or its hydrolysates, calcium oxalate trihydrate (COT) crystals were predominant. This product is kinetically favored because the thermodynamically stable form is calcium oxalate monohydrate (COM) [19]. Notably, COT crystals did not form in the presence of InsP and samples subjected to hydrolysis for 6, 9, 16 or 24 h, indicating significant inhibition of crystallization of all these samples. However, COT crystals formed in the presence of samples that were hydrolyzed for 48 h or 72 h.

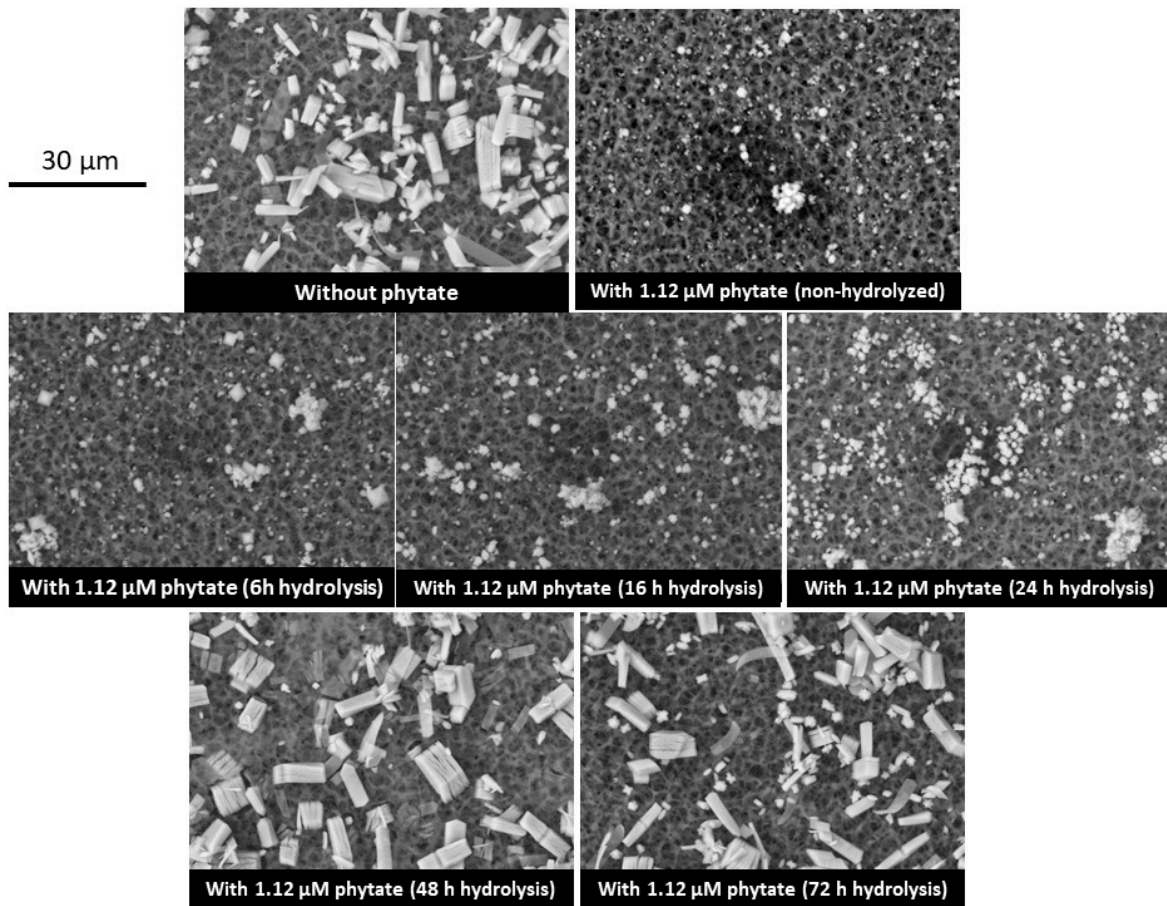


Figure 3. Scanning electron microscopy of CaOx crystals that formed in synthetic urine without phytate, with 1.12 μM phytate (InsP₆) and with different InsP₆ hydrolysates (6 to 72 h). Note the presence of COL crystals with a few COM crystals in the experiment without phytate, after 48 h and 72 h of phytate hydrolysis, but not in the presence of non-hydrolyzed phytate or phytate after 6 to 24 h of hydrolysis.

4. Discussion used a non-specific method to determine the level of total InsPs and free phosphate ions after different times of hydrolysis (Table 2). The non-hydrolyzed sample with phytate at phytate concentration of 1.12 μM (0 h), where the level of total InsP₆ was the greatest (Figure 1), led to an InsP₆ level of 0.82 mM (which corresponds to InsP₆) and no detectable free phosphate ion. The 6 h hydrolyzed sample had an InsP₆ level of 0.71 mM the liver [21]. Foods rich in phytate that have been processed may contain various InsPs due to the degradation of InsP₆ [20]. Therefore, the ingestion of InsP₆ and its subsequent degradation (externally, in the digestive tract, and in the liver) can give rise to a diversity of InsPs in the blood, tissues and urine, as documented in previous studies [22,23]. The variety of these different InsPs could explain why the consumption of InsP₆ is associated with health benefits [24]. In particular, these different InsPs may have different specific activities and benefits, as previously suggested to explain the effects of InsPs on Table 2. The level of total InsPs and free phosphate ions after different times of hydrolysis is shown in Table 2. The less phosphorylated InsPs (a value lower than 0.82 mM) were used and InsP₆ while InsP₆ (a value lower than 0.82 mM) were used. The less phosphorylated InsPs may be responsible for some of the positive effects of phytate intake on osteoporosis [27], similar to the effects of bisphosphonates. The less phosphorylated InsPs, as bisphosphonates, can also decrease urinary calcium.

Time of Hydrolysis (h)	InsP ₆ (mM)	P _i (mM)
0	0.82	0
6	0.71	0.11
24	0.39	2.01
48	0.16	4.18
72	0.10	5.41

A 1972 publication reported that partially hydrolyzed InsP₆ was a potent inhibitor of the in vitro crystallization of hydroxyapatite [28]. Another 1972 publication reported that partially hydrolyzed InsP₆ inhibited the in vitro calcification of rat cartilage and that

the parenteral injection of partially hydrolyzed InsP₆ prevented aortic calcification in rats treated with high doses of vitamin D [29]. However, there have been no recent studies of these phenomena or of the effects of different InsPs on CaOx crystallization. Thus, our use of MS/MS provides new information on the effects of these complex mixtures of InsPs. In particular, this study showed that InsP₆ had the greatest capacity to inhibit CaOx crystallization, but that mixtures of InsP₅, InsP₄ and InsP₃ also functioned as important crystallization inhibitors. Our results confirm that a mixture of InsPs inhibits CaOx crystallization, even when InsP₆ is not abundant in these mixtures. Therefore, the inhibition of CaOx crystallization *in vivo* after the consumption of InsP₆ is likely attributable to InsP₆ and other hydrolyzed InsPs. Thus, it is very important to consider that the products resulting from InsP₆ dephosphorylation are also potent inhibitors of calcium oxalate crystallization.

A limitation of many *in vivo* studies that examined the beneficial effects of InsP₆ ingestion is their lack of analytical determination of the different InsPs in biological fluids and tissues. InsP₆ lacks spectral characteristics that allow easy identification and does not have properties that enable the development of simple analytical methods. An added difficulty is that it is necessary to consider that numerous InsPs products result from InsP₆ dephosphorylation (the different isomers should also be considered), and these products have similar chemical and biological properties. The most common analytical methods used to quantify InsP₆ are based on the non-specific evaluation of total inorganic phosphate or complex formation by phosphate groups [17,20], but these procedures obviously require previous purification and separation. Since these methods are nonspecific and the different InsPs have similar properties, the application of these methods may overestimate the amount of InsP₆ when other InsPs are present [22,23]. In the study of this paper, we assessed the performance of one of these nonspecific methods for measuring InsPs [17] to quantify the content of InsPs of the different hydrolysates, and we then compared the results with those obtained by MS/MS. The results indicated that, as the amount of InsP₆ decreased because of hydrolysis, the overall amount of InsPs also decreased, and the phosphate ion concentration increased, as can be seen in Table 2. After 24 h of hydrolysis, our MS/MS results indicated that there was very little InsP₆, and yet the total amount of InsPs was only reduced by about 50% (from 0.82 to 0.39 mM). Only after 72 h of hydrolysis, when the level of total InsPs was very low (with InsP₂ being the predominant species), the non-specific method indicated a greatly reduced level of total InsPs (0.10 mM).

It is important to note that, in animal experiments in which InsP₆ was eliminated from the diet, the nonspecific determination of InsPs in the urine indicated extremely low levels [9], and these levels increased significantly when dietary InsP₆ was re-administered. Other research has shown that experimental animals that were given diets that did not contain InsP₆ only excreted small amounts of InsP₂ in their urine [22]. Therefore, the nonspecific determination of InsPs in urine can provide some useful information. However, there is a need for sensitive and specific methods for the determination of the different InsPs in biological fluids. Although the development of such methods appears difficult, it is clearly important because the different InsPs seem to have different biological effects.

5. Conclusions

Our *in vitro* experiments indicated that the hydrolysis products of InsP₆ functioned as inhibitors of CaOx crystallization. Thus, even though InsP₆ is enzymatically hydrolyzed after consumption, its hydrolysis products also inhibit crystallization. This may explain the positive effects of the consumption of phytate on pathological calcifications. Although the determination of total InsPs level can be useful, it is necessary to develop sensitive and specific analytical methods that can quantify each of the hydrolyzed InsPs.

Author Contributions: Conceptualization, F.G. and A.C.-B.; Investigation, P.C., F.J., J.D., R.M.G. and G.M.; Methodology, F.G., A.C.-B., P.C., F.J., R.M.G., G.M. and P.S.; Writing—original draft, F.G., A.C.-B., P.C. and P.S.; Writing—review & editing, F.G., A.C.-B. and P.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Grant PID2019-104331RB-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: P. Calvó is grateful to the Conselleria d'Educació, Universitat i Recerca of the Government of the Balearic Islands for a fellowship (FPI_003_2020). F. Julià: Grant PEI2018-001928-A funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by "ESF Investing in your future".

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mellanby, E. The rickets-producing and anti-calcifying action of phytate. *J. Physiol.* **1949**, *109*, 488–533. [\[CrossRef\]](#)
2. Forbes, R.M.; Parker, H.M.; Erdman, J.W. Effects of dietary phytate, calcium and magnesium levels on zinc bioavailability to rats. *J. Nutr.* **1984**, *114*, 1421–1425. [\[CrossRef\]](#)
3. Khokhar, S.; Pushpanjali; Fenwick, G.R. Phytate Content of Indian Foods and Intakes by Vegetarian Indians of Hisar Region, Haryana State. *J. Agric. Food. Chem.* **1994**, *42*, 2440–2444. [\[CrossRef\]](#)
4. Zhou, J.R.; Fordyce, E.J.; Raboy, V.; Dickinson, D.B.; Wong, M.-S.; Burns, R.A.; Erdman, J.W. Reduction of phytic acid in soybean products improves zinc bioavailability in rats. *J. Nutr.* **1992**, *122*, 2466–2473. [\[CrossRef\]](#)
5. Grases, F.; Simonet, B.M.; Prieto, R.M.; March, J.G. Dietary phytate and mineral bioavailability. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* **2001**, *15*, 221–228. [\[CrossRef\]](#)
6. Kim, O.-H.; Booth, C.J.; Choi, H.S.; Lee, J.; Kang, J.; Hur, J.; Jung, W.J.; Jung, Y.-S.; Choi, H.J.; Kim, H.; et al. High-phytate/low-calcium diet is a risk factor for crystal nephropathies, renal phosphate wasting, and bone loss. *eLife* **2020**, *9*, e52709. [\[CrossRef\]](#)
7. Graf, E.; Eaton, J.W. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, *8*, 61–69. [\[CrossRef\]](#)
8. Vucenik, I.; Druzijanic, A.; Druzijanic, N. Inositol Hexaphosphate (IP6) and Colon Cancer: From Concepts and First Experiments to Clinical Application. *Molecules* **2020**, *25*, 5931. [\[CrossRef\]](#)
9. Grases, F.; Costa-Bauza, A. Key aspects of myo-inositol hexaphosphate (phytate) and pathological calcifications. *Molecules* **2019**, *24*, 4434. [\[CrossRef\]](#)
10. Sanchis, P.; Rivera, R.; Berga, F.; Fortuny, R.; Adrover, M.; Costa-Bauza, A.; Grases, F.; Masmiquel, L. Phytate Decreases Formation of Advanced Glycation End-Products in Patients with Type II Diabetes: Randomized Crossover Trial. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9619. [\[CrossRef\]](#)
11. Omoruyi, F.O.; Stennett, D.; Foster, S.; Dilworth, L. New frontiers for the use of ip6 and inositol combination in treating diabetes mellitus: A review. *Molecules* **2020**, *25*, 1720. [\[CrossRef\]](#)
12. Silva, E.O.; Bracarense, A.P.F. Phytic Acid: From Antinutritional to Multiple Protection Factor of Organic Systems. *J. Food Sci.* **2016**, *81*, R1357–R1362.
13. McIntyre, C.A.; Arthur, C.J.; Evershed, R.P. High-resolution mass spectrometric analysis of myo-inositol hexakisphosphate using electrospray ionisation Orbitrap. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2017**, *31*, 1681–1689. [\[CrossRef\]](#)
14. Yu, S.; Cai, C.; Wang, Y.; Sheng, C.; Jiang, K. Quantification of phytic acid in baby foods by derivatization with (trimethylsilyl)diazomethane and liquid chromatography–mass spectrometry analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2021**, *35*, e9194. [\[CrossRef\]](#)
15. Widler, L.; Jahnke, W.; Green, J.R. The Chemistry of Bisphosphonates: From Antiscaling Agents to Clinical Therapeutics. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2012**, *12*, 95–101. [\[CrossRef\]](#)
16. Kovacevic, L.; Lu, H.; Kovacevic, N.; Lakshmanan, Y. Effect of bisphosphonates on the crystallization of stone-forming salts in synthetic urine. *Investig. Clin. Urol.* **2020**, *61*, 310–315. [\[CrossRef\]](#)
17. Berga, F.; Rodriguez, A.; Costa-Bauzá, A.; Grases, F. Novel Colorimetric Determination of Phytate in Urine. *Anal. Lett.* **2016**, *49*, 307–318. [\[CrossRef\]](#)
18. Murphy, J.; Riley, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* **1962**, *27*, 31–36. [\[CrossRef\]](#)
19. Nancollas, G.H. The mechanism of formation of renal stone crystals. *Proc. Eur. Dial. Transpl. Assoc.* **1983**, *20*, 386–397.
20. Schlemmer, U.; Fröllich, W.; Prieto, R.M.; Grases, F. Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, S330–S375.
21. Eiseman, J.; Lan, J.; Guo, J.; Joseph, E.; Vucenik, I. Pharmacokinetics and tissue distribution of inositol hexaphosphate in C.B17 SCID mice bearing human breast cancer xenografts. *Metabolism* **2011**, *60*, 1465–1474. [\[CrossRef\]](#)
22. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Berga, F.; Rodriguez, A.; Gomila, R.; Martorell, G.; Martínez-Cignoni, M. Evaluation of inositol phosphates in urine after topical administration of myo-inositol hexaphosphate to female Wistar rats. *Life Sci.* **2018**, *192*, 33–37. [\[CrossRef\]](#)

23. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Berga, F.; Gomila, R.M.; Martorell, G.; Martínez-Cignoni, M.R. Intake of myo-inositol hexaphosphate and urinary excretion of inositol phosphates in Wistar rats: Gavage vs. Oral administration with sugar. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0223959. [[CrossRef](#)]
24. Gonzalez-Uarquin, F.; Kenéz, A.; Rodehutschord, M.; Huber, K. Dietary phytase and myo-inositol supplementation are associated with distinct plasma metabolome profile in broiler chickens. *Animal* **2020**, *14*, 549–559. [[CrossRef](#)]
25. Foster, S.R.; Dilworth, L.L.; Thompson, R.K.; Alexander-Lindo, R.L.; Omoruyi, F.O. Effects of combined inositol hexakisphosphate and inositol supplement on antioxidant activity and metabolic enzymes in the liver of streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* **2017**, *275*, 108–115. [[CrossRef](#)]
26. Chen, C.; Yang, F.; Liu, C.; Cui, L.; Fu, M.; Song, Y. Inositol hexaphosphate hydrolysate competitively binds to AKT to inhibit the proliferation of colon carcinoma. *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 2901–2910. [[CrossRef](#)]
27. López-González, A.A.; Grases, F.; Roca, P.; Mari, B.; Vicente-Herrero, M.T.; Costa-Bauza, A. Phytate (myo-inositol hexaphosphate) and risk factors for osteoporosis. *J. Med. Food* **2008**, *11*, 747–752. [[CrossRef](#)]
28. Thomas, W.C.; Tilden, M.T. Inhibition of mineralization by hydrolysates of phytic acid. *Johns Hopkins Med. J.* **1972**, *131*, 133–142.
29. Van den Berg, C.J.; Hill, L.F.; Stanbury, S.W. Inositol phosphates and phytic acid as inhibitors of biological calcification in the rat. *Clin. Sci.* **1972**, *43*, 377–383. [[CrossRef](#)]

Article

Effect of Phytate (InsP6) and Other Inositol-Phosphates (InsP5, InsP4, InsP3, InsP2) on Crystallization of Calcium Oxalate, Brushite, and Hydroxyapatite

Paula Calvó, Antònia Costa-Bauza  and Felix Grases * 

Laboratory of Renal Lithiasis Research, University Institute of Health Sciences Research (IUNICS-IdISBa), University of Balearic Islands, 07122 Palma de Mallorca, Spain; paula.calvo@uib.es (P.C.); antonia.costa@uib.es (A.C.-B.)

antonia.costa@uib.es (A.C.-B.)

* Correspondence: fgrases@uib.es

Abstract: Pathological calcifications may consist of calcium oxalate (CaOx), hydroxyapatite (HAP), and brushite (BRU). The objective of this study was to evaluate the effect of phytate (inositol hexakisphosphate, InsP6), InsP6 hydrolysates, and individual lower InsPs (InsP5, InsP4, InsP3, and InsP2) on the crystallization of CaOx, HAP and BRU in artificial urine. All of the lower InsPs seem to inhibit the crystallization of calcium salts in biological fluids, although our in vitro results showed that InsP6 and InsP5 were stronger inhibitors of CaOx crystallization, and InsP5 and InsP4 were stronger inhibitors of BRU crystallization. For the specific in vitro experimental conditions we examined, the InsPs had very weak effects on HAP crystallization, although it is likely that a different mechanism is responsible for HAP crystallization in vivo. For example, calciprotein particles seem to have an important role in the formation of cardiovascular calcifications in vivo. The experimental conditions that we examined partially reproduced the in vivo conditions of CaOx and BRU crystallization, but not the in vivo conditions of HAP crystallization.

Keywords: renal lithiasis; phytate; lower inositol phosphates; crystallization inhibitors; calcium oxalate; calcium phosphates



Citation: Calvó, P.; Costa-Bauza, A.; Grases, F. Effect of Phytate (InsP6) and Other Inositol-Phosphates (InsP5, InsP4, InsP3, InsP2) on Crystallization of Calcium Oxalate, Brushite, and Hydroxyapatite. *Biomolecules* **2023**, *13*, 1061. <https://doi.org/10.3390/biom13071061>

Academic Editor: Paolo Paoli

Received: 9 May 2023

Revised: 14 June 2023

Accepted: 28 June 2023

Published: 29 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Phytate was first discovered in vegetable seeds during the 1850s, its chemical formula (inositol hexakisphosphate, InsP6) was established in the early 1900s, and the first animal experiments assessed the effects of phytate consumption in the 1940s [1]. These early animal experiments supplied high doses of sodium phytate to dogs and found that this led to the development of rickets [2]. These studies led to the belief that the consumption of phytate can cause rickets and a deficiency of certain mineral elements, particularly iron, calcium, and zinc. Importantly, these early studies fed dogs with very large amounts of sodium phytate. Other studies that have also found negative effects of consuming high doses of phytate together with low calcium intake have also used sodium phytate [3]. However, phytate naturally occurs in vegetables at a low level, and mainly as a calcium-magnesium salt that is insoluble in water. Therefore, the effect of consuming a moderate amount of phytate when administered in the form of this salt and with a balanced diet does not significantly affect the absorption of calcium (which is actually incorporated in phytate) or other trace elements, such as copper and zinc. However, the consumption of large amounts of phytate with a very unbalanced diet, as occurs in some South Asian countries, can induce deficiencies of trace elements [1]. In fact, the “Mediterranean diet”, which is rich in legumes and nuts, involves a daily consumption of 1 to 2 g of phytin (calcium-magnesium phytate), and this diet clearly has beneficial health effects. By around the year 2000, researchers confirmed the important health benefits from the moderate consumption of phytate with a balanced diet [1]. Phytate is now well-known as an antioxidant [4] as well as for its

ability to prevent the development of kidney stones and other pathological calcifications [5], osteoporosis [6], some types of cancer [7,8], and the formation of glycation end-products in patients with diabetes [9,10].

The activity of phytate and its derivatives as inhibitors of the crystallization of calcium salts must be attributed to the presence of various phosphate groups in its molecule, which can interact with areas of nuclei or crystalline surfaces where calcium is found. In fact, all polyphosphates have the capacity to inhibit the crystallization of calcium salts, with pyrophosphate being the first to be described [11]. Precisely because of their hydrolysis in the gastrointestinal tract, Fleisch designed bisphosphonates [12] to treat calcium lithiasis, although they are currently more commonly used for the treatment of osteoporosis [13]. In this sense, phytate has been shown both in *in vitro* and *in vivo* studies to prevent the development of calcium kidney stones [5], as well as other pathological calcifications such as cardiovascular ones [5]. We currently know that the consumption of phytate, either by the action of phytases present in the intestine from the food itself or by the action of phosphatases present in the liver or other tissues, gives rise to the formation of various dephosphorylation products, which, being polyphosphates, must also act as inhibitors, as has already been demonstrated in some cases [14].

A notable difficulty in studies that evaluate the effects of InsP6 and its metabolites is determining the levels of all these substances in biological fluids and tissues [15]. One issue is that phytate and other highly phosphorylated InsPs have a very high capacity to bind metallic elements and calcium, and these elements are present in the systems used for detection and determination. A second issue is that the less phosphorylated InsPs have many isomers, and suitable laboratory standards are often unavailable. Moreover, after an individual consumes InsP6, intestinal phytases (also from the diet) cause phytate dephosphorylation [16,17]. All the InsP6 hydrolysates, many of which are likely in low concentrations, cross the intestine by paracellular transport. Once in the liver or other tissues, alkaline phosphatases [1] dephosphorylate these InsPs. Because of these many possibilities, the body contains a great diversity of InsPs, and its levels are affected by InsP6 consumption and endogenous metabolism.

Pyrophosphate is one of the first described inhibitors of calcium salt crystallization in living organisms [18,19]. The digestive system can hydrolyze pyrophosphate. Fleisch first described the chemical synthesis of bisphosphonates [12]. Bisphosphonates are not hydrolyzed by the digestive system, and they are also absorbed at low doses via the paracellular route and are effective crystallization inhibitors, but they are now better known for their prevention of osteoporosis [20]. In fact, all of these polyphosphates (pyrophosphate, bisphosphonates, InsP6, and InsP6 derivatives) have some activities at the intracellular and extracellular level, although these *in vivo* activities are complex and many are not well known.

The objective of this study is to evaluate the effect of InsP6, mixtures of InsP6 hydrolysates, and individual lower InsPs (InsP5, InsP4, InsP3, and InsP2) on the crystallization of three compounds that are fundamentally involved in pathological calcifications: calcium oxalate (CaOx), hydroxyapatite (HAP), and brushite (BRU).

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

The synthetic urine components were obtained from PanReac (Barcelona, Spain). Myo-Inositol-1,2,3,5,6-pentaphosphate (1,2,3,5,6-InsP5), myo-Inositol-2,3,5,6-tetraphosphate (2,3,5,6-InsP4), myo-Inositol-1,4,5-triphosphate (1,4,5-InsP3), and myo-Inositol-2,4-diphosphate (2,4-InsP2) isomers were purchased from SiChem (Bremen, Germany). Phytic acid sodium salt hydrate and etidronate were purchased from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Bavaria, Germany). Bisphosphonates, alendronate, pamidronate and ibandronate were purchased from Molekula (Darlington, UK). All solutions were prepared in ultra-pure deionized water from a Milli-Q system.

2.2. Preparation of InsP6 Hydrolysates

A phytate stock solution (2 mM) was prepared from phytic acid sodium salt and adjusted to pH 2 using 0.5 M HCl. Duplicate aliquots (5 mL) were kept in a metallic dry bath block heater (Selecta, Barcelona, Spain) at 97 °C for 6, 9, 16, 24, 48, or 72 h to obtain the mixtures of its dephosphorilation products at different hydrolysis time.

2.3. Evolution of the Relative Proportion of the InsPs in Hydrolysates

The estimation of the evolution of the relative proportion of the InsPs of hydrolysates during thermal hydrolysis was performed by MS/MS spectrometry and the concentration of inorganic phosphate released was determined.

A Q Exactive Orbitrap high-resolution mass spectrometer equipped with a heated electrospray ionization (HESI) probe (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), operated in a negative ionization mode, was used to evaluate the evolution of the relative proportion of the InsPs in function of the hydrolysis time. The temperature of the ion transfer capillary was set to 320 °C, the spray voltage was set to 2.9 kV in negative mode, and the S-lens RF level was 50 AU. Direct injection of properly diluted samples was performed in the full-scan acquisition mode over a range of 150 to 700 m/z and a resolution of 140,000.

The amount of inorganic phosphate that was liberated during InsP6 hydrolysis was determined using ammonium molybdate and ascorbic acid (a reducing agent), according to the phosphomolybdate–ascorbic acid method [21], measuring the absorbance of the phosphomolybdous complex at 880 nm.

The consideration of the relative MS/MS peaks of each InsP at the different hydrolysis times together with the corresponding liberated inorganic phosphate concentrations allows the estimation of the evolution of the concentration of each InsP in the hydrolysate samples.

2.4. Crystallization Experiments

The effects of phytate and the mixtures of its dephosphorilation products at different hydrolysis times on the crystallization of CaOx, HAP, and BRU in synthetic urine were assessed using a kinetic turbidimetric system, as previously described [14]. This system consisted of a spectrometer equipped with a fiber-optic light-guide measuring cell (AvaSpec-ULS2048CL-EVO, Avantes, Apeldoorn, The Netherlands). Crystallization was assessed at a constant temperature (37 °C) with magnetic stirring (300 rpm). Turbidity was used as an indicator of the induction time of CaOx, BRU, and HAP crystallization, and a longer induction time indicated greater inhibition of crystallization.

The induction time (t_i) was set as the point at which the absorbance zero line crosses the tangent line of the first straight zone of the absorbance curve vs. time. The effects of tested substances on the induction time for the crystallization of CaOx, BRU, and HAP were expressed as the increment of that time (Δ induction time, Δt_i) with respect to the induction time of the corresponding control, that is, $\Delta t_i = \text{induction time} - \text{induction time of control}$.

The synthetic urine solution was prepared by making a fresh mixture of equal volumes of solution A and solution B (Table 1), followed by sonication. The pH of this solution was adjusted to 6.0 for CaOx experiments, 6.5 for BRU experiments, and 7.5 for HAP experiments.

For the CaOx experiments, 200 mL of synthetic urine at pH 6.0 was transferred into a 250 mL crystallization flask placed in a thermostatic bath at 37 °C, and 0.2 mL of InsP6 stock solution or a hydrolyzed mixture was added. When the resulting solution reached a temperature of 37 °C, 2 mL of a sodium oxalate stock solution (5 g/L) was added to induce CaOx crystallization.

For the BRU and HAP experiments, 100 mL of synthetic urine solution A at pH 6.5 or 7.5, respectively, was transferred into a 250 mL crystallization flask placed in a thermostatic bath at 37 °C, and 0.2 mL of InsP6 stock solution or a hydrolyzed mixture was added. When the resulting solution reached a temperature of 37 °C, 100 mL of synthetic urine

solution B at 37 °C and pH 6.5 or 7.5, respectively, was added to induce crystallization. All experiments were performed in triplicate.

Table 1. Composition of synthetic urine.

Solution A		Solution B	
Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	6.23 g/L	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	2.41 g/L for CaOx and HAP 4.06 g/L for BRU
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.46 g/L	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	5.6 g/L for CaOx and HAP 9.31 g/L for BRU
NH ₄ Cl	4.64 g/L	NaCl	13.05 g/L
KCl	12.13 g/L		
CaCl ₂	5 mM for CaOx 4.25 mM for BRU 3 mM for HAP		

2.5. Structural Analysis of Crystals

The morphological and structural characteristics of the CaOx, BRU, and HAP crystals that formed in synthetic urine in the absence or presence of different InsPs were examined using a scanning electron microscopy system (SEM, Hitachi S-3400N, Tokyo, Japan) coupled with XR energy dispersive microanalysis (Bruker AXS XFlash Detector 4010, Berlin, Germany). Crystals formed during crystallization experiments in the absence and presence of additives were collected at the end of each experiment by passing the solution through a 0.45 µm filter. They were then dried in a desiccator and examined by SEM. The methodology used for SEM consists of placing the crystals on a sample holder with fixation on adhesive conductive copper tape, with no need to cover the sample with gold. FTIR spectra of crystals were also obtained by the KBr pellet method with a Bruker Hyperion IR spectrometer (Bruker, Berlin, Germany) to confirm the crystalline phases identified by SEM.

3. Results

We first recorded the evolution of hydrolysates (dephosphorylation products) of InsP6 during thermal hydrolysis in a metallic dry bath block heater at pH 2.0 and 97 °C (Figure 1). The InsP6 level decreased by about 50% and the InsP5 level reached its maximum at about 6 h; InsP4 reached a maximum at about 24 h; and InsP3 and InsP2 reached their maxima at about 48 h. These results coincide with those obtained in previous studies by us [14] and other authors in the same conditions [22].

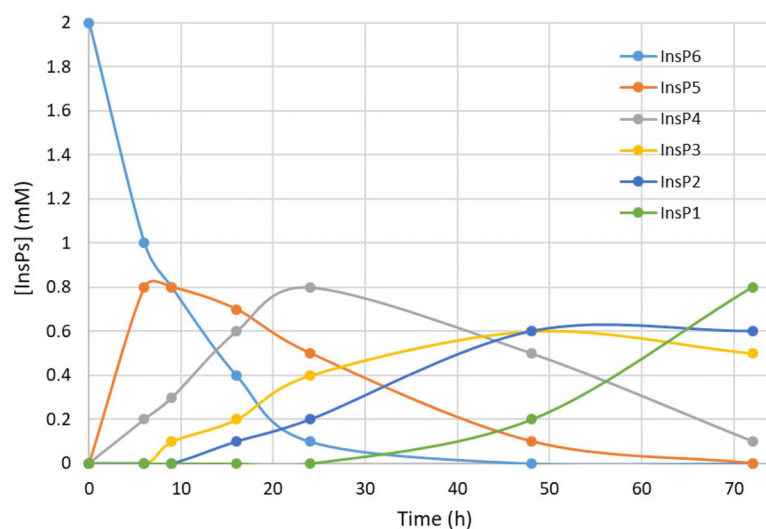


Figure 1. Kinetics of InsP6 hydrolysis in a metallic dry bath block heater at pH 2.0 and 97 °C. Concentrations were estimated from MS/MS measurements and the concentration of inorganic phosphorus and agree with previously published data [22].

We then determined the effect of InsP6 and the mixtures of its dephosphorilation products at different hydrolysis times on the time needed for CaOx crystallization in artificial urine at pH 6.0 and 37 °C (Figure 2). In this experiment, InsP6 alone (0.5 μ M, 1.0 μ M, or 2.0 μ M) or different mixtures of InsP6 hydrolysates that formed after hydrolysis of 2 μ M InsP6 for 6 to 72 h were added, and the evolution of the absorbance of such a solution was recorded in order to determine the induction time of CaOx crystallization. InsP6 had the strongest inhibitory effect, causing a delay of almost 20 min in the induction time of CaOx crystallization compared to that obtained in its absence, while the hydrolysate mixtures collected from 6 h to 72 h had progressively weaker effects. These results are similar to those in previous studies under different conditions [14]. Previous studies demonstrated that although InsP6 had the strongest inhibitory effect on CaOx crystallization (it was also at the highest concentration), a mixture of InsP4 and InsP5 also had significant inhibitory effects.

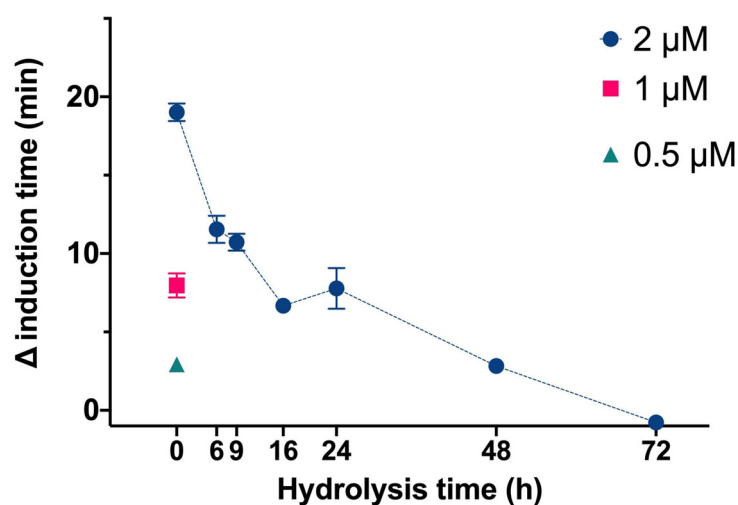


Figure 2. Effect of InsP6 concentration (hydrolysis time: 0 h) and different mixtures of InsP6 hydrolysates (hydrolysis time of 2 μ M InsP6: 6 h to 72 h) on the induction time of CaOx crystallization. Values are the means of three experiments \pm standard error of mean.

We then compared the effects of different specific InsPs on the induction time of CaOx crystallization (Figure 3). The results showed that InsP6 and 1,2,3,5,6-InsP5 had similar inhibitory effects, and this effect was greater than that of 2,3,5,6-InsP4, 1,4,5-InsP3, and 2,4-InsP2.

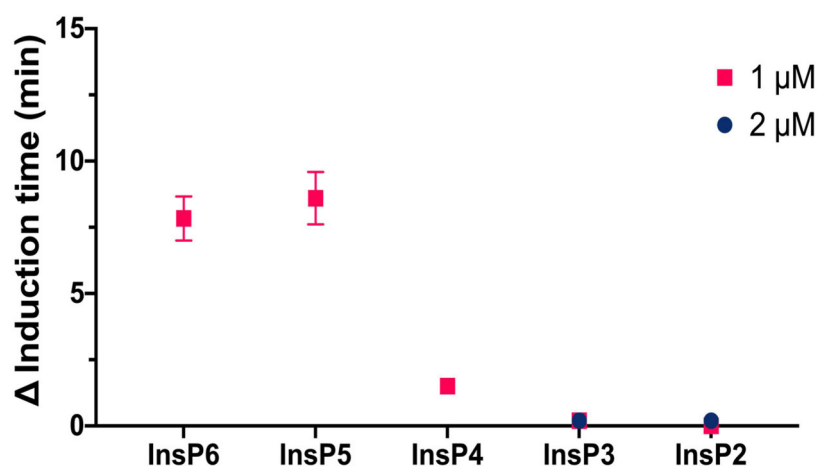


Figure 3. Effect of individual InsPs (InsP6, 1,2,3,5,6-InsP5, 2,3,5,6-InsP4, 1,4,5-InsP3, and 2,4-InsP2 at 1 or 2 μ M) on the induction time of CaOx crystallization. Values are the means of three experiments \pm standard error of mean.

We also compared the effect of four different bisphosphonates at the same concentration to InsPs (2 μM) on the induction time for CaOx crystallization. Under the conditions studied, alendronate, pamidronate, ibandronate, and etidronate had much weaker inhibitory effects (they only caused a delay between 0.6 to 1 min of CaOx crystallization) than InsP6 and its hydrolysates (up to 18 min).

As can be seen in Table 2, both phytate and its dephosphorylated products have weak inhibitory activity against HAP crystallization, even less than bisphosphonates, and it is interesting to observe that this inhibitory capacity increases as the hydrolysis time increases until 48 h, which corresponds mainly to the presence of InsP2 and InsP3, more similar to bisphosphonates.

Table 2. Effect of different bisphosphonates and of phytate and phytate hydrolysis products on the time needed for HAP crystallization. All values are the means of three experiments \pm standard error of mean. Δt_i = induction time–induction time of control.

	Δt_i (min)
Bisphosphonates	
Alendronate (2 μM)	6.95 \pm 0.07
Pamidronate (2 μM)	4.10 \pm 0.12
Ibandronate (2 μM)	13.67 \pm 1.47
Phytate and Hydrolysis Products	
Phytate (2 μM), nonhydrolyzed	0 \pm 0
Phytate (2 μM), 6 h hydrolysis	0 \pm 0
Phytate (2 μM), 9 h hydrolysis	0.70 \pm 0.06
Phytate (2 μM), 16 h hydrolysis	1.28 \pm 0.24
Phytate (2 μM), 24 h hydrolysis	1.90 \pm 0.00
Phytate (2 μM), 48 h hydrolysis	1.88 \pm 0.28
Phytate (2 μM), 72 h hydrolysis	0.10 \pm 0.10

We used the same basic procedures to determine the effect of different InsPs and bisphosphonates on the formation of BRU crystals in artificial urine at pH 6.5 and 37 $^{\circ}\text{C}$. The results showed that the InsP6 hydrolysates collected at 16 h and 24 h (which were abundant in InsP4 and InsP5) had much stronger inhibitory effects on the crystallization of BRU than InsP6 alone (Figure 4). However, examination of individual InsPs showed that InsP6, 1,2,3,5,6-InsP5, and 2,3,5,6-InsP4 each had about the same inhibitory effects on the crystallization of BRU, and 1,4,5-InsP3 and 2,4-InsP2 had weaker effects (Figure 5).

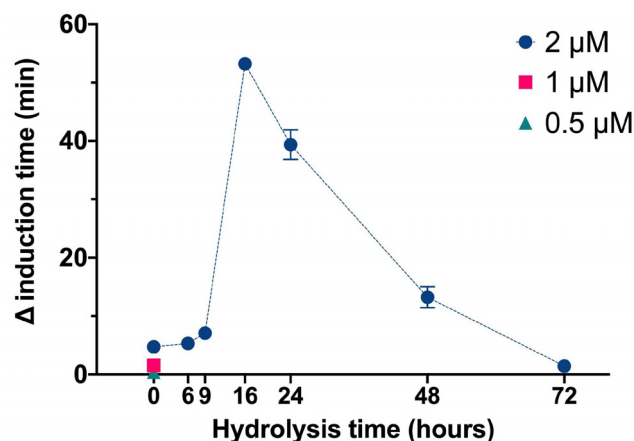


Figure 4. Effect of InsP6 concentration (hydrolysis time: 0 h) and different mixtures of InsP6 hydrolysates (hydrolysis time of 2 μM InsP6: 6 h to 72 h) on the induction time of BRU crystallization. Values are the means of three experiments \pm standard error of mean.

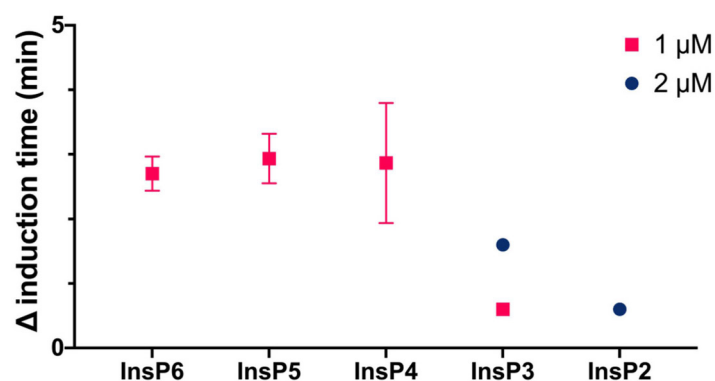


Figure 5. Effect of individual InsPs (InsP6, 1,2,3,5,6-InsP5, 2,3,5,6-InsP4, 1,4,5-InsP3, and 2,4-InsP2 at 1 or 2 μM) on the induction time of BRU crystallization. Values are the means of three experiments \pm standard error of mean.

We then examined the effects of four different bisphosphonates (2 μM) on the inhibition of BRU crystallization relative to 2 μM phytate alone (Figure 6). Alendronate had the greatest inhibition of BRU crystallization, and pamidronate, etidronate, and ibandronate had weaker effects. The effect of ibandronate was similar to that of phytate.

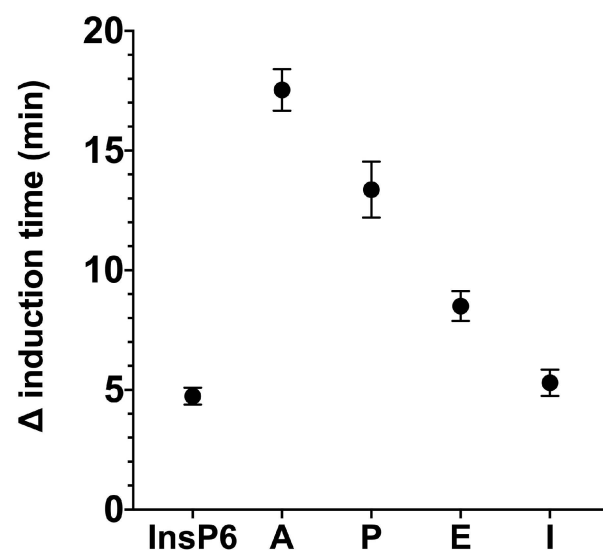


Figure 6. Effect of InsP6 and different bisphosphonates at a concentration of 2 μM on the induction time of BRU crystallization. A: Alendronate; P: Pamidronate; E: Etidronate; I: Ibandronate. Values are the means of three experiments \pm standard error of mean.

We also determined the effects of four different bisphosphonates and InsP6 and its hydrolysates on the induction time of HAP crystallization (Table 2). These results showed that ibandronate had a remarkable inhibitory effect, followed by alendronate and pamidronate. Moreover, InsP6 and its hydrolysates had very weak inhibitory effects of HAP crystallization under the tested conditions, and the most effective hydrolysates were those collected at 16 h and 48 h (predominantly the lower InsPs).

We performed scanning electron microscopy to confirm the inhibitory effects of the different treatments. The results showed that CaOx crystallized as a CaOx trihydrate (Figure 7A) in the absence of inhibitors (control), and as a CaOx monohydrate–dihydrate mixture in the presence of InsP5, InsP6 (Figure 7B), and InsP6 hydrolysates that were collected at 6 h. In the presence of the InsP6 hydrolysate obtained after 48 h (mainly containing InsP4, InsP3 and InsP2), the appearance of CaOx trihydrate crystals was observed, and for the InsP6 hydrolysate obtained at 72 h (mainly containing InsP3, InsP2 and InsP1),

practically all the formed crystals were CaOx trihydrate. Infrared spectra of crystallized CaOx confirmed the presence of CaOx trihydrate or CaOx monohydrate-dihydrate mixture in each case. The InsP6 hydrolysates that were collected at 16 h and 24 h, InsP5 alone, and InsP4 alone inhibited the formation of BRU crystals and also altered the organization and size of these crystals (Figure 8). In Figure 9, the SEM images of the HAP spherulites obtained in the absence (Figure 9A) and presence (Figure 9B) of InsP6 are shown. As can be seen, these were spheroidal amorphous structures in which individual crystals cannot be distinguished.

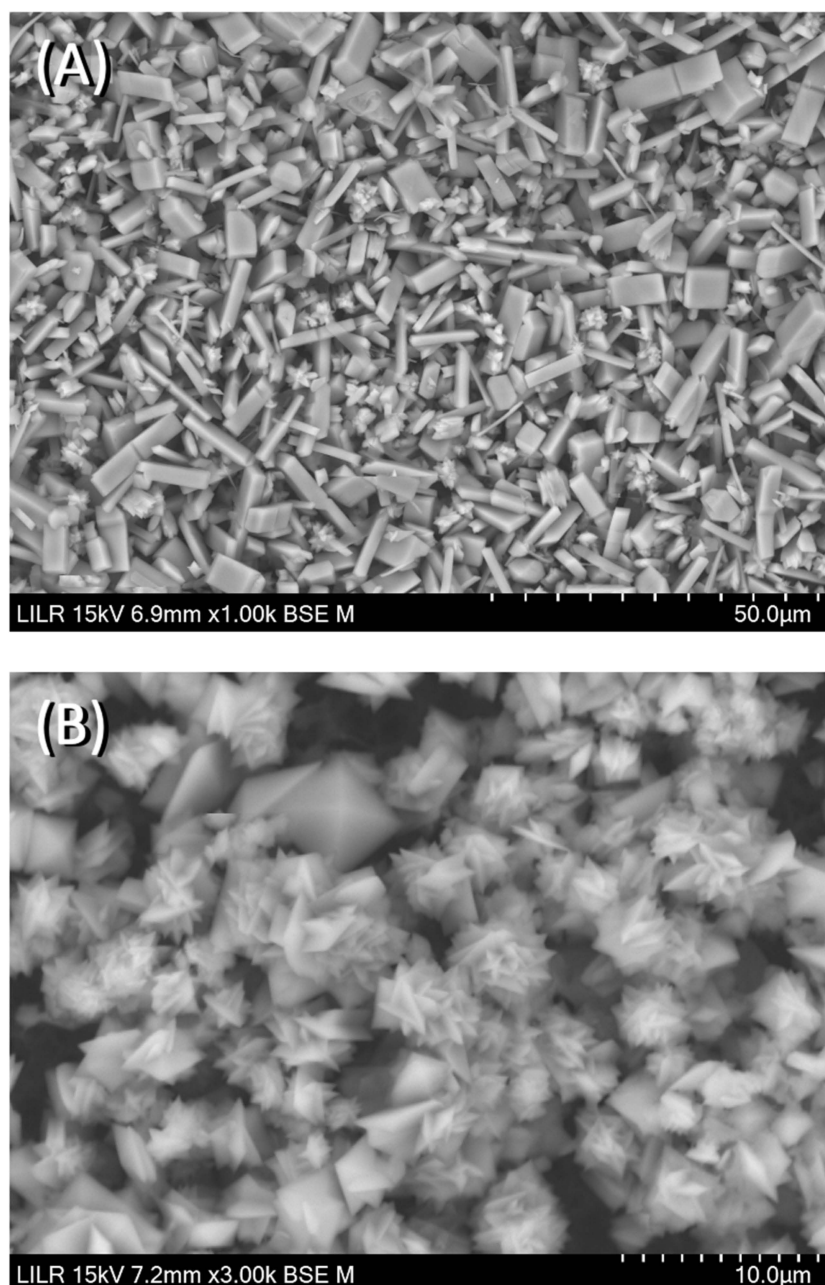


Figure 7. Scanning electron microscopy of CaOx crystals obtained after completion of the turbidimetric assay with (A) no phytate (control), (B) 2 μM InsP6.

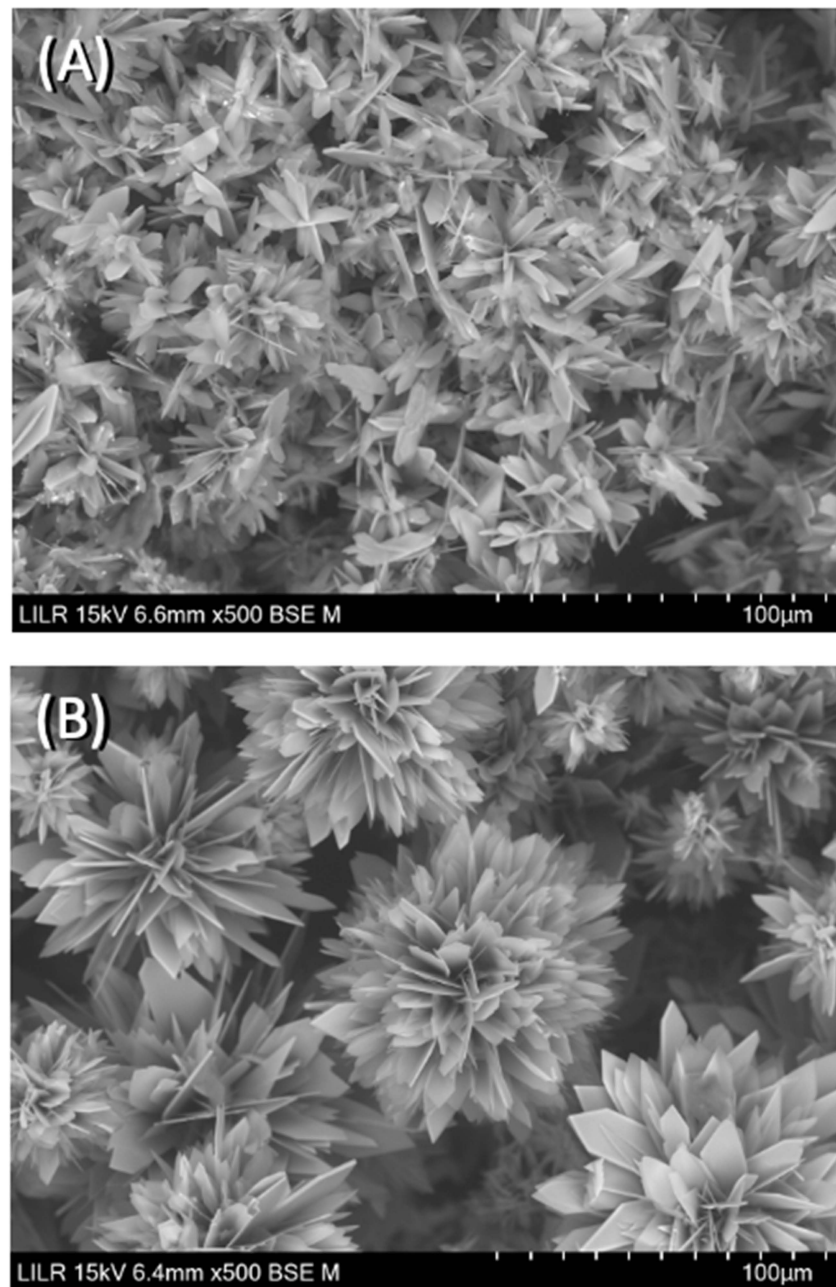


Figure 8. Scanning electron microscopy of BRU crystals obtained after completion of the turbidimetric assay with (A) no phytate (control) and (B) InsP6 (2 μM) hydrolysate after 16 h.

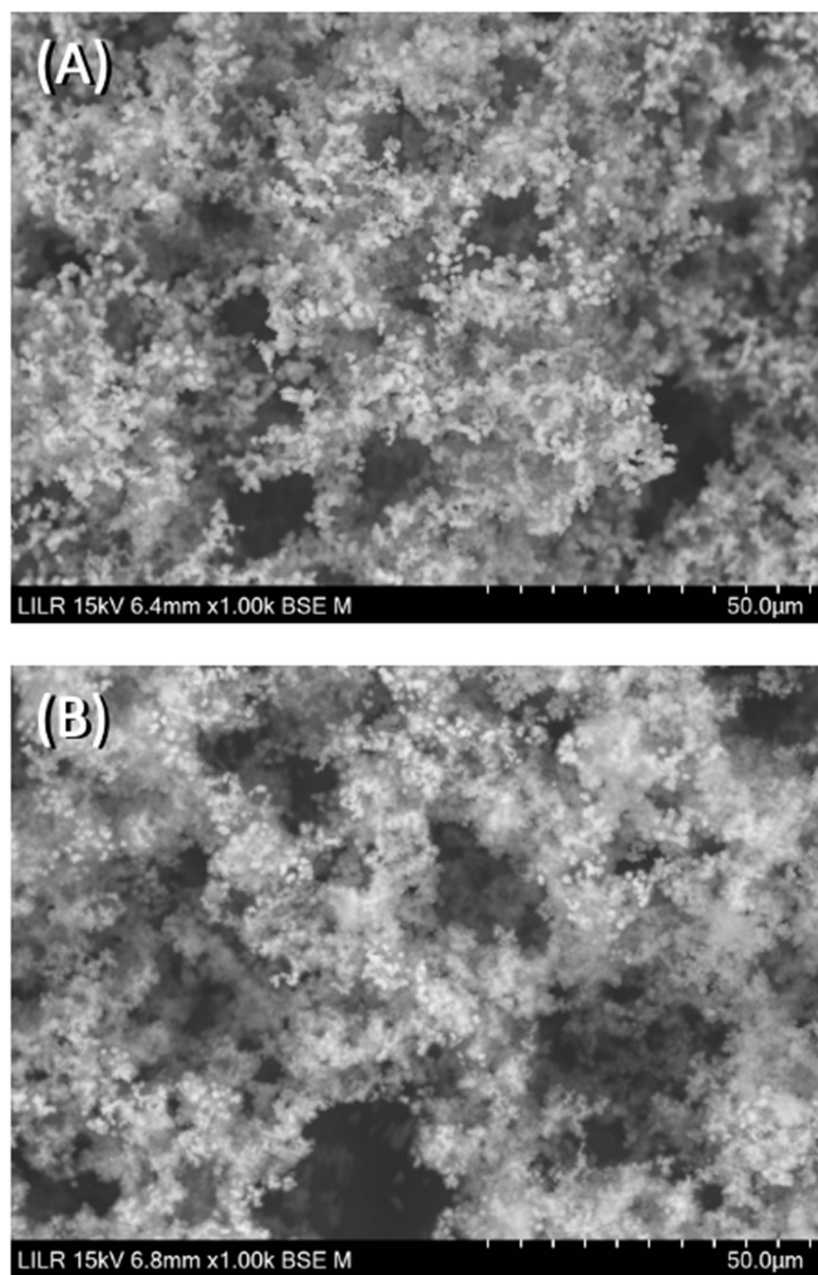


Figure 9. Scanning electron microscopy of HAP spherulites obtained after completion of the turbidimetric assay with (A) no phytate (control) and (B) InsP6 (2 μM).

4. Discussion

The present study extended our previous findings [14] by examining the effect of InsP6 alone, hydrolysates of InsP6, and individual InsPs on the crystallization of CaOx, BRU, and HAP. Our results indicated that the lower InsPs (InsP3 and InsP2) and bisphosphonates had weak effects on CaOx crystallization. However, it must be considered that this inhibition depends on InsP concentration; the more concentrated a species is, the greater the interaction with the nucleation-growth centers, and therefore, the greater its inhibitory effect.

As shown in previous studies [15,23], these lower InsPs are the most abundant InsPs in blood and urine. Because of their higher concentrations, these lower InsPs could have major inhibitory effects *in vivo* than those observed in the present study, in which low concentrations have been tested.

Our study on InsP6 hydrolysates suggested that InsP4 inhibited CaOx crystallization, but the effect of the pure 2,3,5,6-InsP4 isomer was less than expected. This might be because

2,3,5,6-InsP4 is a weaker inhibitor than the InsP4 isomers that are present in the hydrolysate mixture. Alternatively, it is possible that there are synergistic effects in the mixture of InsP hydrolysates. As noted above, the plasma and urinary levels of InsP4, InsP3, and InsP2 are also much higher than those of InsP6 and InsP5 [15,23], and the inhibition of crystallization is related to the concentration.

Our examination of BRU crystallization showed that the 16 h and 24 h hydrolysates (which were enriched with InsP5 and InsP4) had the strongest effects. Nevertheless, our examination of individual InsPs showed that InsP6, InsP5, and InsP4 had similar effects. As outlined above, these results can be explained by synergistic effects of the multiple InsPs or different InsPs isomers in the hydrolysate.

Interestingly, we found that InsP6 and its hydrolysates had little effect on the crystallization of HAP, and that bisphosphonates (except ibandronate) also had little effect. In contrast, studies with experimental animals and humans showed that the intake of InsP6 significantly reduced HAP calcification [24–26]. This may be because the mechanism responsible for the formation of HAP amorphous spherulite deposits is completely different from the mechanism responsible for the formation of CaOx and BRU well-defined crystals [27]. In particular, the formation of a HAP crystal begins with the formation of discrete ion clusters consisting of about 10 to 15 calcium and phosphate ions. These clusters are grouped into larger units (nanoparticles) that form HAP deposits in the presence of appropriate substrates [27–29]. For example, calciproteins seem to play an important role in the development of cardiovascular calcifications [30,31]. More precisely, inorganic pyrophosphate (an analogue of bisphosphonates) hinders the nucleation and crystallization of amorphous calcium phosphate and inhibits the growth and maturation of HAP crystals [32]. Therefore, pyrophosphate and polyphosphates affect the evolution of calciprotein particles *in vivo* in that they can prevent or inhibit calcification. Obviously, because the formation of HAP crystals is strongly dependent on the presence of other compounds, the inhibitory effects we observed *in vitro* are likely to be very different from those *in vivo*.

Our results suggest that the effects of InsP6 on experimental animals and humans on crystallization are a consequence of the mixture of the different InsPs. These mixtures of hydrolysates can form in the intestine prior to paracellular absorption (despite the absence of phytases in the human intestine) because certain foods contain phytases. Once in the blood, phytases/phosphatases produced by humans and experimental animals can give rise to lower InsPs. Obviously, we did not demonstrate whether the *in vivo* effects are due to the presence of certain isomers, differences in the concentrations of different InsPs, or interactions among different InsPs. To answer these questions, it is necessary to use analytical methods that can determine all of these different InsP isomers in biological fluids, and appropriate InsPs standards must be available. At present, most of these standards are not available, and the currently available analytical methods do not allow the precise determination of different InsPs isomers.

Finally, it is necessary to consider that in addition to the direct interference of crystallization by the different InsPs examined here, many other dephosphorylated InsP6 molecules can also indirectly affect crystallization. For example, previous research reported that InsPs can inhibit osteoclastogenesis and mineralization of osteoblasts [33]. Another recent study showed that the intake of InsP6 by menopausal women with hypercalciuria significantly decreased the elimination of urinary calcium [34]. In these cases, phytate or its derivatives do not act as crystallization inhibitors, but due to their activity at the cellular level, the elimination of urinary calcium decreases, so the supersaturation of calcium salts also decreases, and as a consequence their ability to crystallize.

The major limitations of this study are that we did not determine the specific InsPs isomers that formed during the thermal hydrolysis of InsP6, and we did not test the effect of these different isomers. This is simply because these isomers are not readily available or are extremely expensive.

5. Conclusions

Although the lower InsPs appear to be responsible for the inhibition of the crystallization of calcium salts in vivo, our in vitro studies showed that the higher InsPs (InsP6 and InsP5) were the most effective in inhibiting CaOx crystallization and that InsP5 and InsP4 were the most effective in inhibiting BRU crystallization. For the specific in vitro experimental conditions of the present study, the InsPs had very weak effects on HAP crystallization. HAP deposits seem to form by a mechanism totally different to the formation of well-defined crystals, depending on the conditions of each case. The in vitro conditions that we examined do not correspond exactly to the in vivo conditions in which HAP deposits are usually formed.

Author Contributions: Conceptualization, A.C.-B. and F.G.; methodology, A.C.-B. and F.G.; formal analysis, P.C.; investigation, P.C.; writing—original draft preparation, P.C., A.C.-B. and F.G.; writing—review and editing, A.C.-B. and F.G.; supervision, A.C.-B. and F.G.; funding acquisition, A.C.-B. and F.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Grant PID2019-104331RB-I00 funded by the Ministerio de Ciencia e Innovación, Agencia Estatal de Investigación, MCIN/AEI/10.13039/501100011033.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author [F.G.], upon reasonable request.

Acknowledgments: P.C. is grateful to the Conselleria d'Educació, Universitat i Recerca of the Government of the Balearic Islands for a fellowship (FPI_003_2020).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Schlemmer, U.; Frølich, W.; Prieto, R.M.; Grases, F. Phytate in Foods and Significance for Humans: Food Sources, Intake, Processing, Bioavailability, Protective Role and Analysis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, S330–S375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mellanby, E. The Rickets-producing and Anti-calcifying Action of Phytate. *J. Physiol.* **1949**, *109*, 488–533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kim, O.H.; Booth, C.J.; Choi, H.S.; Lee, J.; Kang, J.; Hur, J.; Jung, W.J.; Jung, Y.S.; Choi, H.J.; Kim, H.; et al. High-phytate/low-calcium diet is a risk factor for crystal nephropathies, renal phosphate wasting, and bone loss. *Elife* **2020**, *9*, e52709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Graf, E.; Empson, K.L.; Eaton, J.W. Phytic Acid. A Natural Antioxidant. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11647–11650. [[CrossRef](#)]
- Grases, F.; Costa-Bauza, A. Key Aspects of Myo-Inositol Hexaphosphate (Phytate) and Pathological Calcifications. *Molecules* **2019**, *24*, 4434. [[CrossRef](#)]
- López-González, Á.A.; Grases, F.; Monroy, N.; Marí, B.; Vicente-Herrero, M.T.; Tur, F.; Perelló, J. Protective Effect of Myo-Inositol Hexaphosphate (Phytate) on Bone Mass Loss in Postmenopausal Women. *Eur. J. Nutr.* **2013**, *52*, 717–726. [[CrossRef](#)]
- Vucenik, I.; Shamsuddin, A.M. Protection against Cancer by Dietary IP6 and Inositol. *Nutr. Cancer* **2006**, *55*, 109–125. [[CrossRef](#)]
- Shamsuddin, A.M. Inositol Phosphates Have Novel Anticancer Function. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 725S–732S. [[CrossRef](#)]
- Lee, S.H.; Park, H.J.; Chun, H.K.; Cho, S.Y.; Cho, S.M.; Lillehoj, H.S. Dietary Phytic Acid Lowers the Blood Glucose Level in Diabetic KK Mice. *Nutr. Res.* **2006**, *26*, 474–479. [[CrossRef](#)]
- Sanchis, P.; Rivera, R.; Berga, F.; Fortuny, R.; Adrover, M.; Costa-Bauza, A.; Grases, F.; Masmiquel, L. Phytate Decreases Formation of Advanced Glycation End-Products in Patients with Type II Diabetes: Randomized Crossover Trial. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9619. [[CrossRef](#)]
- Fleisch, H.; Bisaz, S. Mechanism of calcification: Inhibitory role of pyrophosphate. *Nature* **1962**, *195*, 911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fleisch, H. Diphosphonates: History and mechanisms of action. *Metab. Bone Dis. Relat. Res.* **1981**, *3*, 279–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fleisch, H. Bisphosphonates in osteoporosis. *Eur. Spine J.* **2003**, *12* (Suppl. S2), S142–S146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Calvó, P.; Julià, F.; Dietrich, J.; Gomila, R.M.; Martorell, G.; Sanchis, P. Phytate Dephosphorylation Products Also Act as Potent Inhibitors of Calcium Oxalate Crystallization. *Molecules* **2022**, *27*, 5463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Liu, G.; Riemer, E.; Schneider, R.; Cabuzu, D.; Bonny, O.; Wagner, C.A.; Qiu, D.; Saiardi, A.; Strauss, A.; Lahaye, T.; et al. The Phytase RipBL1 Enables the Assignment of a Specific Inositol Phosphate Isomer as a Structural Component of Human Kidney Stones. *RSC Chem. Biol.* **2023**, *4*, 300–309. [[CrossRef](#)]
- Sandberg, A.S.; Andersson, H. Effect of Dietary Phytase on the Digestion of Phytate in the Stomach and Small Intestine of Humans. *J. Nutr.* **1988**, *118*, 469–473. [[CrossRef](#)]

17. Rapp, C.; Lantzsch, H.J.; Drochner, W. Hydrolysis of Phytic Acid by Intrinsic Plant and Supplemented Microbial Phytase (*Aspergillus Niger*) in the Stomach and Small Intestine of Minipigs Fitted with Re-Entrant Cannulas 3. Hydrolysis of Phytic Acid (IP6) and Occurrence of Hydrolysis Products (IP5, IP4, IP3 and IP2). *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2001**, *85*, 420–430. [[CrossRef](#)]
18. Fleisch, H.; Russell, R.G.G.; Straumann, F. Effect of Pyrophosphate on Hydroxyapatite and Its Implications in Calcium Homeostasis. *Nature* **1966**, *212*, 901–903. [[CrossRef](#)]
19. Russell, R.G.; Fleisch, H. Inorganic Pyrophosphate and Pyrophosphatases in Calcification and Calcium Homeostasis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1970**, *69*, 101–117. [[CrossRef](#)]
20. Fleisch, H.; Russell, R.G.G. A Review of the Physiological and Pharmacological Effects of Pyrophosphate and Diphosphonates on Bones and Teeth. *J. Dent. Res.* **1972**, *51*, 323–332. [[CrossRef](#)]
21. Murphy, J.; Riley, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* **1962**, *27*, 31–36. [[CrossRef](#)]
22. Lehrfeld, J. HPLC Separation and Quantitation of Phytic Acid and Some Inositol Phosphates in Foods: Problems and Solutions. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2726–2731. [[CrossRef](#)]
23. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Berga, F.; Gomila, R.M.; Martorell, G.; Martínez-Cignoni, M.R. Intake of Myo-Inositol Hexaphosphate and Urinary Excretion of Inositol Phosphates in Wistar Rats: Gavage vs. Oral Administration with Sugar. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0223959. [[CrossRef](#)]
24. Thomas, W.C.; Tilden, M.T. Inhibition of Mineralization by Hydrolysates of Phytic Acid. *Johns Hopkins Med. J.* **1972**, *131*, 133–142.
25. Grases, F.; Perelló, J.; Prieto, R.M.; Simonet, B.M.; Torres, J.J. Dietary Myo-Inositol Hexaphosphate Prevents Dystrophic Calcifications in Soft Tissues: A Pilot Study in Wistar Rats. *Life Sci.* **2004**, *75*, 11–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Grases, F.; Sanchis, P.; Perello, J.; Isern, B.; Prieto, R.M.; Fernandez-Palomeque, C.; Fiol, M.; Bonnin, O.; Torres, J.J. Phytate (Myo-Inositol Hexakisphosphate) Inhibits Cardiovascular Calcifications in Rats. *Front. Biosci.* **2006**, *11*, 136–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Grases, F.; Zelenková, M.; Söhnle, O. Structure and Formation Mechanism of Calcium Phosphate Concretions Formed in Simulated Body Fluid. *Urolithiasis* **2014**, *42*, 9–16. [[CrossRef](#)]
28. Onuma, K.; Ito, A. Cluster Growth Model for Hydroxyapatite. *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 3346–3351. [[CrossRef](#)]
29. Rhee, S.H.; Do Lee, J.; Tanaka, J. Nucleation of Hydroxyapatite Crystal through Chemical Interaction with Collagen. *J. Am. Ceram. Soc.* **2000**, *83*, 2890–2892. [[CrossRef](#)]
30. Heiss, A.; Eckert, T.; Aretz, A.; Richtering, W.; Van Dorp, W.; Schäfer, C.; Jahnen-Dechent, W. Hierarchical Role of Fetuin-A and Acidic Serum Proteins in the Formation and Stabilization of Calcium Phosphate Particles. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 14815–14825. [[CrossRef](#)]
31. Bostom, A.; Pasch, A.; Madsen, T.; Roberts, M.B.; Franceschini, N.; Steubl, D.; Garimella, P.S.; Ix, J.H.; Tuttle, K.R.; Ivanova, A.; et al. Serum Calcification Propensity and Fetuin-A: Biomarkers of Cardiovascular Disease in Kidney Transplant Recipients. *Am. J. Nephrol.* **2018**, *48*, 21–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bäck, M.; Aranyi, T.; Cancela, M.L.; Carracedo, M.; Conceição, N.; Leftheriotis, G.; Macrae, V.; Martin, L.; Nitschke, Y.; Pasch, A.; et al. Endogenous Calcification Inhibitors in the Prevention of Vascular Calcification: A Consensus Statement from the COST Action EuroSoftCalcNet. *Front. Cardiovasc. Med.* **2019**, *5*, 196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. del Mar Arriero, M.; Ramis, J.M.; Perelló, J.; Monjo, M. Inositol Hexakisphosphate Inhibits Osteoclastogenesis on RAW 264.7 Cells and Human Primary Osteoclasts. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43187. [[CrossRef](#)]
34. Guimerà, J.; Martínez, A.; Bauza, J.L.; Sanchis, P.; Pieras, E.; Grases, F. Effect of Phytate on Hypercalciuria Secondary to Bone Resorption in Patients with Urinary Stones: Pilot Study. *Urolithiasis* **2022**, *50*, 685–690. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Article

Efficacy of Theobromine and Its Metabolites in Reducing the Risk of Uric Acid Lithiasis

Antonia Costa-Bauzá ^{1,*} , Paula Calvo ¹, Yumaira Hernández ² and Fèlix Grases ¹

¹ Laboratory of Renal Lithiasis Research, University Institute of Health Sciences Research (IUNICS-IdISBa), University of Balearic Islands, 07122 Palma de Mallorca, Spain; paula.calvo@uib.es (P.C.); fgrases@uib.es (F.G.)

² Urology Service of Manacor Hospital, 07500 Manacor, Spain; yhernandez@hmanacor.com

* Correspondence: antonia.costa@uib.es

Abstract: Uric acid lithiasis accounts for about 10% of all types of renal lithiasis. The most common causes of uric acid lithiasis are low urinary pH, followed by high concentration of urinary uric acid, and low diuresis. Treatment of patients consists of alkalinization of urine, reducing the consumption of purine-rich foods, and administration of xanthine oxidase inhibitors, because there are no established therapeutic inhibitors of uric acid crystallization. We recently found that theobromine inhibited uric acid crystallization in vitro, and that the increased urinary level of theobromine following its oral consumption was associated with the prevention of uric acid crystallization. In this study, we evaluated the inhibitory effects of theobromine metabolites and other methylxanthine-related compounds on uric acid crystallization. We also measured the urinary concentrations of theobromine and its metabolites in samples from healthy individuals and patients with uric acid stones and compared the extent of uric acid supersaturation and uric acid crystal formation in these different samples. Theobromine and other methylxanthines that lacked a substituent at position 1 inhibited uric acid crystallization, but other methylxanthines did not have this effect. Individuals with clinical parameters that favored uric acid crystallization did not develop uric acid crystals when theobromine and its metabolites were in the urine at high levels. Thus, theobromine and its metabolites reduced the risk of uric acid lithiasis.

Keywords: uric acid lithiasis; theobromine; methylxanthines; crystallization inhibitors; lithiasis risk



Citation: Costa-Bauzá, A.; Calvo, P.; Hernández, Y.; Grases, F. Efficacy of Theobromine and Its Metabolites in Reducing the Risk of Uric Acid Lithiasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 10879. <https://doi.org/10.3390/ijms241310879>

Academic Editor: Manoocher Soleimani

Received: 8 May 2023

Revised: 23 June 2023

Accepted: 27 June 2023

Published: 29 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Renal lithiasis has a worldwide prevalence of about 10% [1–3], and the prevalence has increased over time [3,4]. A 2008 study estimated that the prevalence of renal lithiasis in 2050 could exceed 30% in some geographic areas due to increases in ambient temperature [5]. Kidney stones can have different compositions, and about 10% of them consist of uric acid (UA) [6–9]. A high percentage of patients with UA lithiasis also have comorbidities such as hyperglycemia, obesity, and metabolic syndrome [8–10].

There are different types of renal stones, and these different stones have different etiologies. Stone formation can be affected by metabolic factors, genetic factors, and lifestyle factors, including diet and drug use. Urinary alterations and physiochemical factors also affect the risk of crystallization. An important etiological factor is urinary supersaturation of compounds that readily crystallize.

The main etiologic factors associated with the development of UA stones are urinary pH below 5.5, hyperuricosuria (defined as 24 h urinary UA exceeding 750 mg/day in females and 800 mg/day in males), and low diuresis [9,11,12]. These conditions have different possible causes but are generally related to lifestyle [13]. For example, low fluid intake is the most common cause of low diuresis, and this leads to increased urinary UA concentration (values greater than 500 mg/L) and eventually supersaturation. The consumption of foods with abundant purines, such as red meat, fish, shellfish, and to a

lesser extent legumes, can cause hyperuricosuria because the body's catabolism of purine produces UA as the final product. Certain drugs that inhibit renal tubular reabsorption of UA or increase purine catabolism can also cause hyperuricosuria. Finally, a urinary pH below 5.5, which may be due to chronic diarrhea or high production of endogenous acids due to the consumption of a high-protein diet, also increases the risk for UA stones. However, many patients with UA lithiasis do not present with any of these characteristics, and recent studies found that patients with metabolic syndrome often present with a low urinary pH, regardless of diet [10]. The use of certain drugs, such as thiazides or furosemide, also decreases the urinary pH [14].

Although the major etiological factors associated with UA lithiasis are low urinary pH, followed by high urinary levels of UA, and low diuresis, many individuals who have elevated urinary UA levels or low urinary pH do not develop UA stones [15]. This indicates that other factors also affect the formation of these stones. In fact, the presence of certain kinetic factors can affect crystallization, and these include heterogeneous nucleants that facilitate crystallization and crystallization inhibitors [16,17].

The traditional treatments for UA lithiasis are alkalinization of urine, restricting the consumption of purine-rich foods, and pharmacological treatment with a xanthine oxidase inhibitor [18]. In contrast to calcium lithiasis, there are no available therapeutic agents that inhibit the crystallization of UA. We recently found that theobromine, a dimethylxanthine alkaloid that is abundant in cocoa, inhibits UA crystallization [19] and therefore may be useful for the prevention of UA lithiasis. In order to verify this usefulness, we carried out a comparative study of the treatment of UA lithiasis with citrate versus citrate+theobromine [20]. In particular, our results confirmed that dietary theobromine increased urinary theobromine excretion, and that this was related to a decreased risk of UA crystallization. Nevertheless, the theobromine urinary concentrations found under citrate+theobromine treatment (0.102 ± 0.083 mmol/L) [20] were in the low limit of efficacy (0.055 mmol/L) [19], and for some patients, theobromine urinary concentrations were much lower than 0.055 mmol/L, which does not allow justification of the observed protective effect of theobromine against AU crystallization.

After intake of theobromine, the human body metabolizes it and excretes different products into the urine, mainly 7-methylxanthine (36%), unmetabolized theobromine (21%), 3-methylxanthine (21%), and 3,7-dimethyluric acid (1.3%) [21].

Thus, in order to better characterize the effects of methylxanthine consumption in the prevention of UA lithiasis, one objective of this study was to evaluate the inhibitory effects of theobromine metabolites and other methylxanthine-related compounds such as pentoxifylline (used as a drug to treat muscle pain in people with peripheral artery disease), dyphylline (used in the treatment of respiratory disorders such as asthma), and 7-(β -hydroxyethyl)theophylline on UA crystallization *in vitro*. A second objective was to measure the urinary concentrations of theobromine and its metabolites in healthy individuals and in patients with UA stones, and to relate them to UA supersaturation and UA crystal formation in urine samples from these different individuals.

2. Results

2.1. Turbidimetric Assay with Synthetic Urine Samples

We first measured the effect of the mixing time of synthetic urine with theobromine prior to the induction of UA supersaturation (Figure 1). The results demonstrated that the time needed for induction of UA crystals increased as the mixing time increased, but there was very little difference for mixing times of 15 min and 30 min.

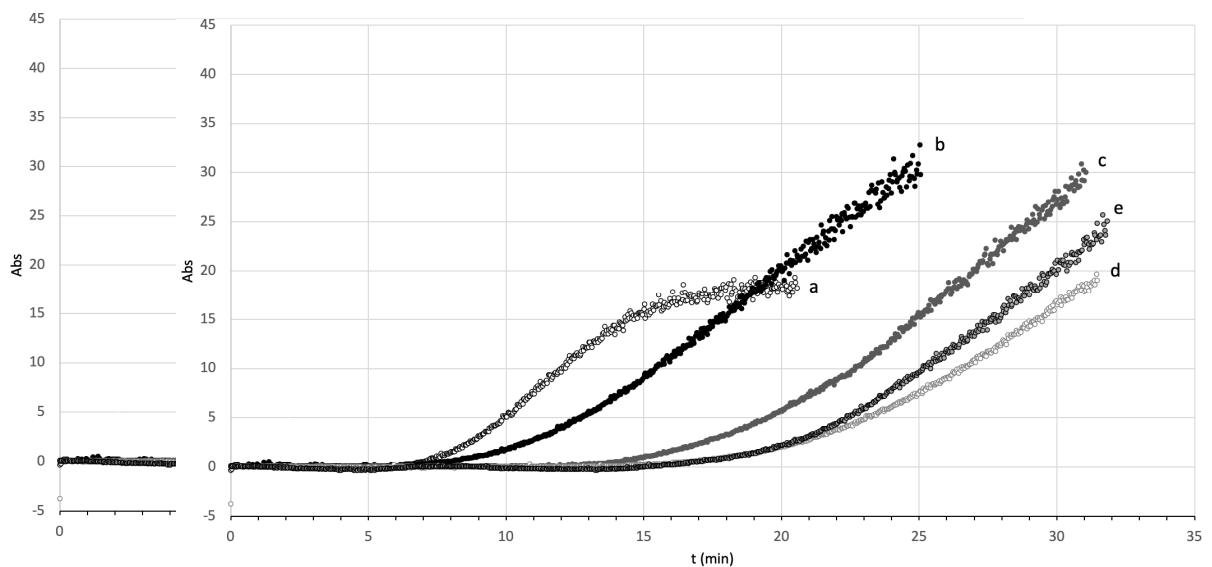


Figure 1. Effect of the mixing time of synthetic urine with theobromine prior to the induction of UA supersaturation on the kinetics of UA crystallization followed by turbidimetry. A control sample was incubated without theobromine (a) (1000 samples) were incubated with theobromine (0.2 mM) and were mixed for 0 min (b), 5 min (c), 15 min (d), or 30 min (e).

The addition of 1-methylxanthine, pentoxifylline, 7-(8-hydroxyethyl)theophylline, theophylline, and dyphylline at concentrations of 0.60 mM had no significant effect on the time for induction of crystallization. However, under conditions of UA supersaturation ($SS_{UA} = 3.55$), 0.60 mM 7-methylxanthine, 3,7-dimethyluric acid, and 3-methylxanthine inhibited crystallization; the first two of these compounds were about as effective as theobromine, but 3-methylxanthine had a weaker effect (Figure 2).

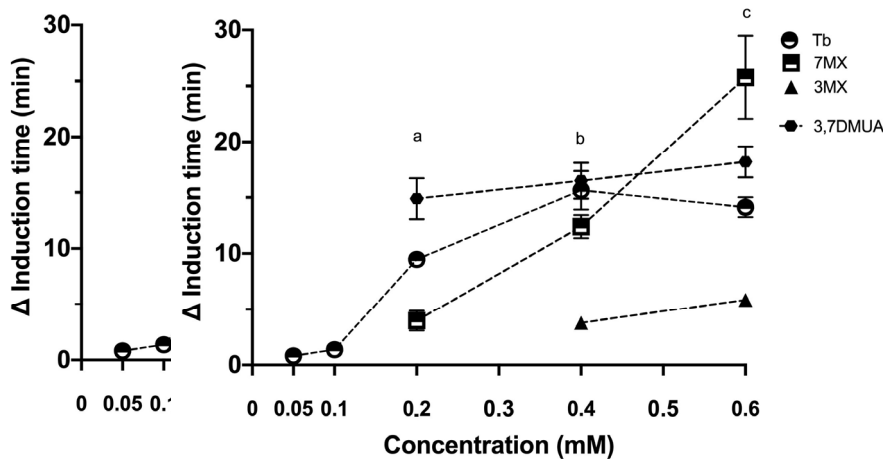


Figure 2. Effect of the concentration of theobromine and related methylxanthines on the induction time of UA crystallization in synthetic urine at pH 4.65. Induction times were obtained from crystallization curves (Figure 1) and all results are expressed as the increment of the induction time with respect to the induction time of the control (Δ induction time) and are means of triplicates \pm standard deviation (n = 3). Statistical differences between the different compounds at 0.2 mM concentration ($p < 0.05$), (b) statistical differences between 3MX and the other compounds at 0.4 mM concentration ($p < 0.05$), (c) statistical differences between 7MX and the other compounds at 0.4 mM concentration ($p < 0.05$), (d) statistical differences between 7MX and the other compounds at 0.6 M concentration. The abbreviations are: Tb: theobromine; 7MX: 7-methylxanthine; 3MX: 3-methylxanthine; 3,7DMUA: 3,7-dimethyluric acid.

We then examined the effects of the combined presence of theobromine with two methylxanthines (3-methylxanthine and 7-methylxanthine) on the time for induction of UA crystallization (Figure 3). We did not test 3,7-dimethyluric acid because its level in

crystallization (Figure 3). We did not test 3,7-dimethyluric acid because its level in urine is only 6% that of theobromine. The results showed that the combination of theobromine with 7-methylxanthine had a stronger effect and this effect appeared to increase as the concentration of 7-methylxanthine increased. The results showed that the combination of theobromine with 7-methylxanthine had a stronger effect and this effect appeared to increase as the concentration of 7-methylxanthine increased.

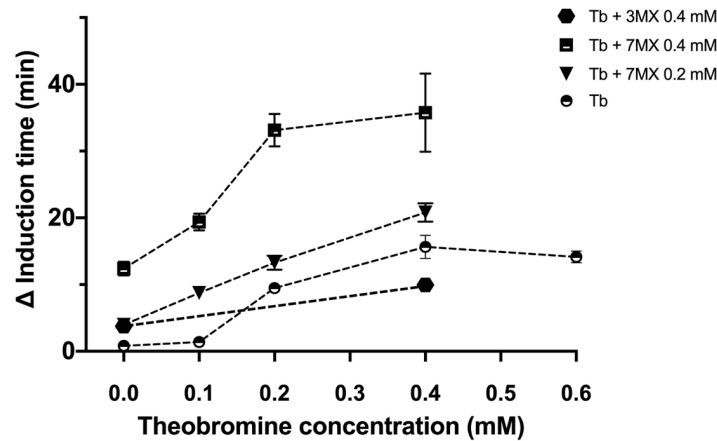


Figure 3. Effect of the combination of theobromine with different methylxanthines on the induction time of UA crystallization in synthetic urine at pH 4.55. All results are expressed as the increment of the induction time with respect to the induction time of the control (Δ induction time) and are means ± standard deviations of triplicates.

We then examined the effect of the different tested methylxanthines on morphology of UA crystals formed in artificial urine at pH 4.55. Scanning electron microscopy showed that the presence of all the methylxanthines altered the morphology of crystals, in that all obtained samples had thinner and longer crystals (Figure 4) in contrast with the crystals obtained in their absence, which had rectangular prism form.

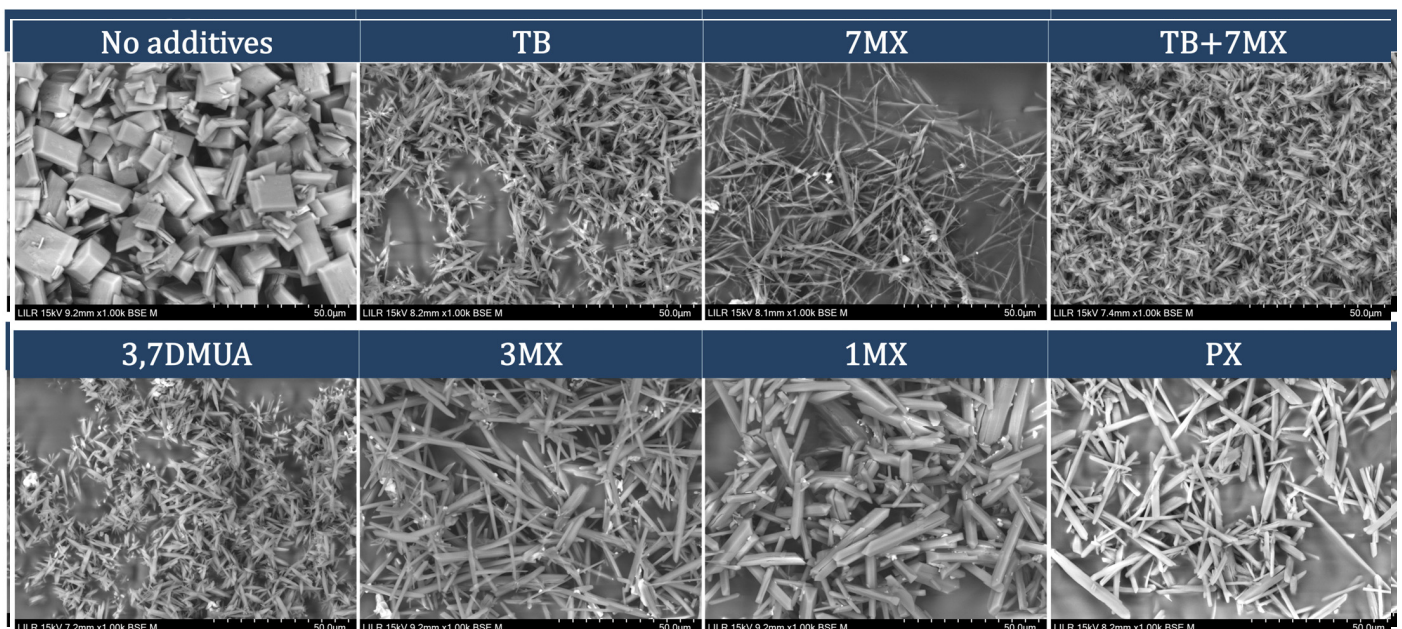


Figure 4. Scanning electron microscopy of UA crystals formed in artificial urine collected after the turbidimetric assay. Top row: no additives; 0.60 mM of theobromine (Tb); 0.60 mM 7-methylxanthine (7MX); mixture of 0.4 mM Tb with 0.40 mM 7MX; bottom row: 0.60 mM 3,7-dimethyluric acid (3,7DMUA); 0.60 mM 9-methylxanthine (9MX); 0.60 mM 1-methylxanthine (1MX); or 0.60 mM paraxanthine (PX).

2.2.2. Urine Samples from Healthy Individuals and Patients with UA Stones

We then applied the UA crystallization test (RUAC) in 60 urine samples from 20 healthy volunteers and 153 urine samples from 54 UA stone formers. There were 66 samples that had a risk for crystallization (Figure 5A) and 17 samples that did not have a risk for crystallization (Figure 5B). The results showed that only five samples with a risk for crystallization were false positive results (red in Figure 5A), but thirty-four samples with no risk for crystallization were false negatives (red in Figure 5B). These classifications were based on curves for saturation ($SS_{UA}=1$) and supersaturation ($SS_{UA}=2$) that were calculated as previously described [8,22].

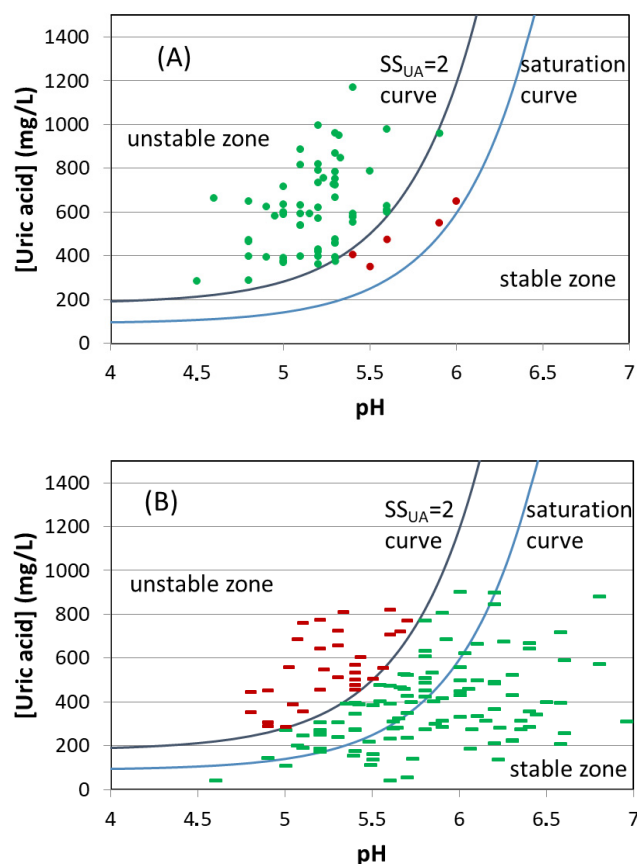


Figure 5. Urinary pH and UA concentration of individual urine samples, and UA saturation curves ($SS_{UA}=1$) and supersaturation curves ($SS_{UA}=2$). (A) Samples with positive UA crystallization results, with true positives (green) and false negatives (red). (B) Samples with negative UA crystallization results, with true negatives (green) and false positives (red).

We also measured the concentration of theobromine (Figure 6A) and of the sum of theobromine + 7-methylxanthine + 3,7-dimethyluric acid (Figure 6B; compounds with similar inhibitory effects on UA crystallization) of the 34 samples with false negative results. Further analysis showed that the concentration of theobromine and its metabolites (7-methylxanthine and 3,7-dimethyluric acid) was nearly two-and-a-half times higher than the concentration of theobromine alone (Figure 7A) and that those samples with SS_{UA} greater than two for which the UA crystallization test was negative had the highest urinary concentrations of theobromine and its metabolites, while those samples with SS_{UA} lower than two for which the UA crystallization test was positive had the lowest ones (Figure 7B).

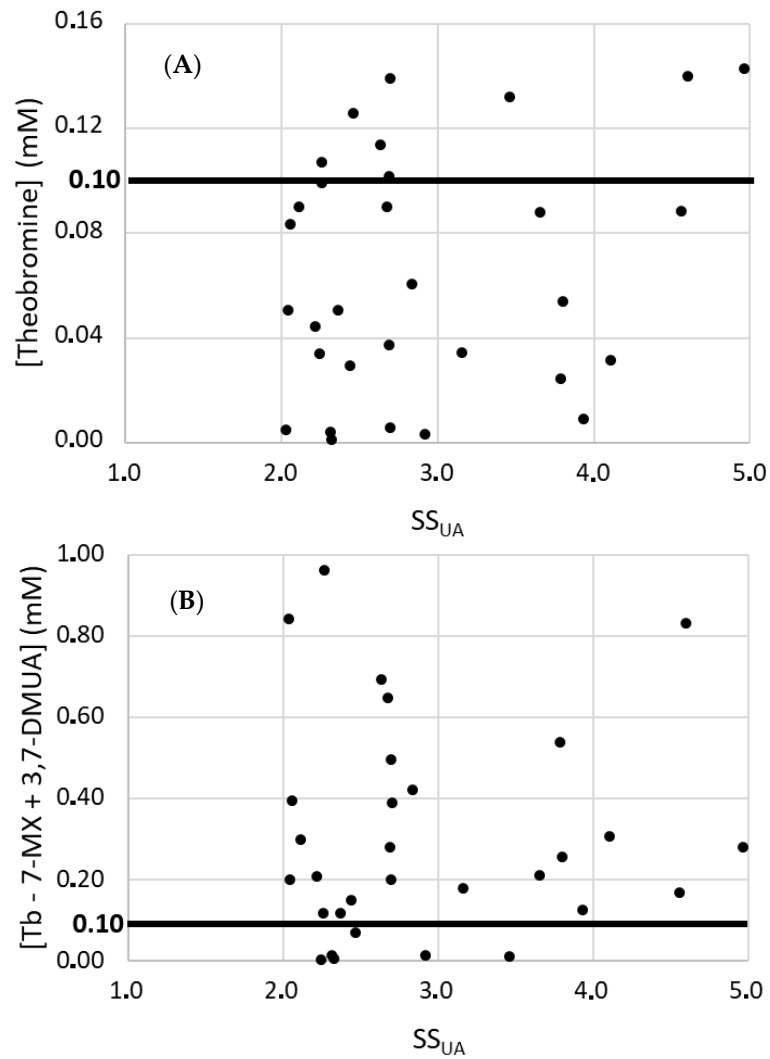
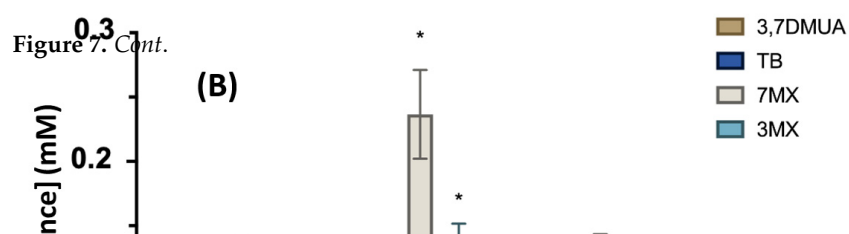
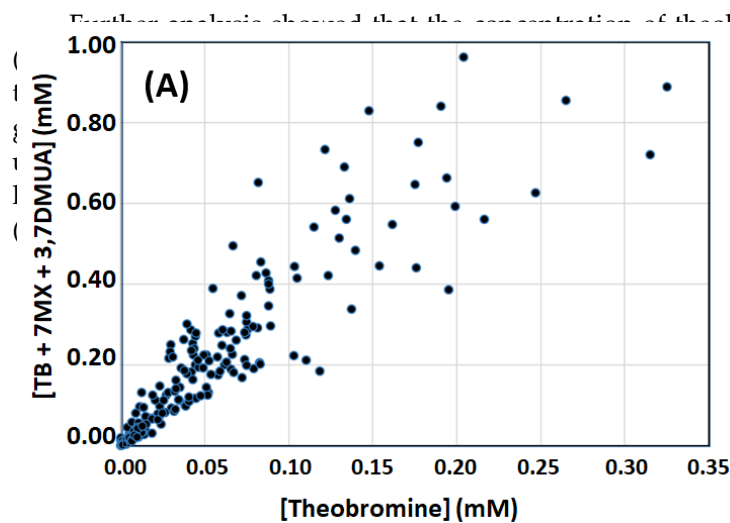


Figure 6. Urinary theobromine concentration (A) and sum of theobromine, 7-methylxanthine, and 3,7-dimethyluric acid concentrations (B) in the 34 urine samples with SS_{UA} greater than 2 for which the UA crystallization test was negative (See Figure 5B). Tb: theobromine; 7-MX: 7-methylxanthine; 3,7-DMUA: 3,7-dimethyluric acid.

Further analysis showed that the concentration of theobromine and its metabolites was 70-and-a-half times higher at those samples with SS_{UA} negative had the highest while those samples with SS_{UA} positive had the lowest ones



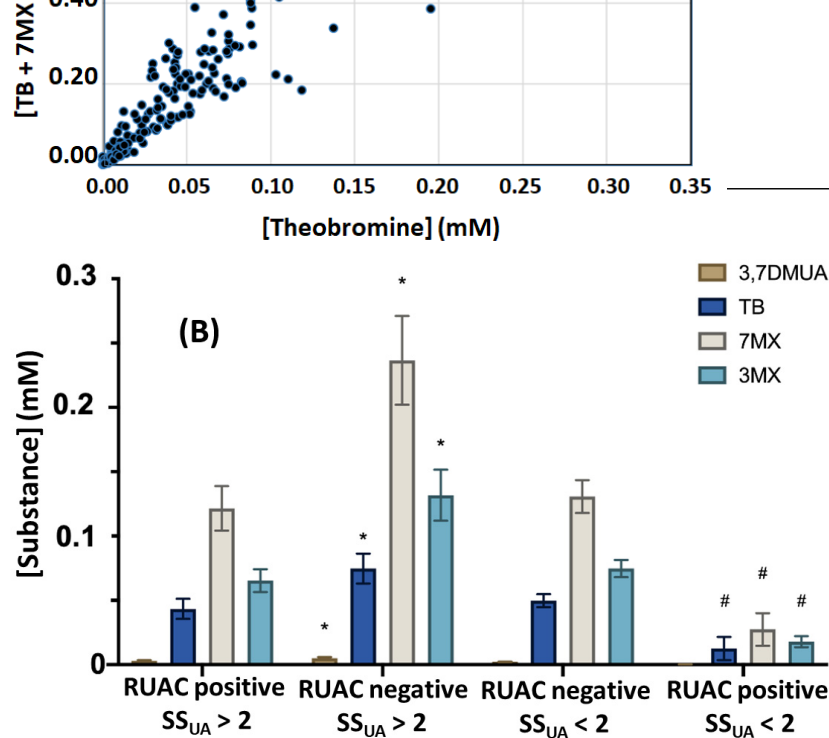


Figure 7. Relationship of the concentration of theobromine with the concentration of theobromine and metabolites that had similar inhibitory effects on UA crystallization (A) and concentration of each compound (mean \pm standard error of mean) in urine samples with different results for RUAC test and $SS_{UA} > 2$ or $SS_{UA} < 2$ (B). * Significant differences with the “RUAC positive with $SS_{UA} > 2$ ” group, $p < 0.005$; # Significant differences with the “RUAC negative with $SS_{UA} < 2$ ” group, $p < 0.05$. TB: theobromine; 7MX: 7-methylxanthine; 3MX: 3-methylxanthine; 3,7DMUA: 3,7-dimethyluric acid.

3. Discussion

The obvious effect of mixing time prior to the induction of UA supersaturation on the inhibitory effects of theobromine (Figure 1) suggests that this inhibition is related to an interaction between theobromine and UA at the crystalline interface and in solution. The obvious effect of mixing time prior to the induction of UA supersaturation found that these molecules had a π -stacking interaction [23]. The formation of theobromine–UA clusters would decrease the supersaturation of UA and thus delay the formation of UA crystals. Our results demonstrated that the formation of UA crystals was delayed when the mixing time was 15 min or longer (Figure 1), which agrees with previous results, which reported that caffeine, paraxanthine, and theophylline, each of which has a methyl group at position 1, do not inhibit UA crystallization [19]. Moreover, we found that compounds with the greatest inhibition of UA crystallization had a methyl group at position 7. However, none of the tested xanthine derivatives with substituents at position 1, 7-methylxanthine, 3,7-dimethyluric acid, and 3-methylxanthine inhibited UA crystallization. In contrast, the positions of different substituents appear to affect the capacity to inhibit UA crystallization. Theophylline, paraxanthine, and caffeine, each of which has a methyl group at position 1, do not inhibit UA crystallization [19], and the total concentration of these metabolites is expected to be sufficient for inhibition of UA crystallization, based on the results presented herein. Consumption of theobromine, which is abundant in cocoa, is excreted in the urine mainly as 7-methylxanthine (9%), unmetabolized theobromine (21%), 3-methylxanthine (21%), and 3,7-dimethyluric acid (B) and analyses of dietary risk factors for kidney stones following caffeine consumption. For this reason, we tested the effects of mixtures of theobromine with 7-methylxanthine and 3-methylxanthine (Figure 3). The results showed that the total inhibitory effect was greater than or equal to the sum of the effects of each individual compound, with some evidence of synergistic effects at higher concentrations.

Thus, UA crystallization in urine is affected by the global concentration of theobromine and several of its metabolites, especially 7-methylxanthine and 3,7-dimethyluric acid, which may also come from the metabolism of caffeine.

UA solubility obviously depends on pH (Figure 5). Thus, solubility is below 110 mg/L for a urinary pH below 5.0, below 250 mg/L at pH 5.5, and higher than 600 mg/L for a pH over 6.0. Consequently, UA supersaturation in urine is a function of urinary pH as well as UA concentration [8].

Crystal formation is only possible in a supersaturated solution ($SS > 1$), although there is a range of supersaturation values at which a medium is metastable, in which crystals already formed can grow, but new crystals do not form. For supersaturation values above the upper limit of the metastable zone, the medium becomes unstable, and crystallization is spontaneous. For UA in urine, this limit corresponds to a SS_{UA} level above 2 [8,22], even though certain factors can modify the kinetics of the process increasing the metastable range.

The risk of UA crystallization in urine samples, determined as explained above, was positive for samples with UA supersaturation values higher than 2 (Figure 5A), and there was no risk of crystallization in samples with supersaturation values below 2 (Figure 5B). However, we found that 34 of the 147 samples with no risk for UA crystallization had supersaturation values greater than 2; these samples should have crystallized, but they did not. Heterogeneous nucleants reduce the supersaturation value required for nucleation of new crystals. The presence of such factors in urine may explain why some of our samples developed UA crystals even when the SS_{UA} was below 2 (Figure 5A). However, this situation was not frequent (five of sixty-six samples).

Conversely, inhibitors of crystallization retard or impede one or more different steps of the crystallization process, and the presence of these inhibitors increases resistance to crystallization when the SS is above the metastable limit. This phenomenon seemed to be more common in our samples (Figure 5B), indicating that many of our urine samples contained substances that prevented UA crystallization.

Analysis of the urinary theobromine concentration of samples in which UA crystallization did not occur when the supersaturation exceeded 2 showed that most of them had a theobromine concentration below 0.1 mM (Figure 6A). This is the lowest theobromine concentration at which there was inhibition of crystallization for UA supersaturation of 3.55. Nevertheless, the total concentration of theobromine and its metabolites was usually higher than 0.1 mM (Figure 6B). Thus, theobromine and its metabolites are likely responsible for preventing UA crystallization under these conditions. These results show that with a low intake of theobromine, crystallization inhibition values of the order of three times higher than expected, if only urinary theobromine concentration is considered, can be achieved. However, we have to consider that some samples with SS_{UA} above 2 that had very low concentrations of theobromine and metabolites did not form UA crystals. This suggests that other heretofore unidentified inhibitors were also present in the urine samples.

4. Materials and Methods

4.1. Reagents and Solutions

UA, theobromine, 1-methylxanthine, 3-methylxanthine, 7-methylxanthine, 3,7-dimethyluric acid, pentoxifylline, 7-(β -hydroxyethyl)theophylline, and dyphylline (Figure 8) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Synthetic urine components were obtained from Panreac (Montcada i Reixac, Barcelona, Spain). Chemicals of analytical reagent-grade purity were dissolved in ultra-pure deionized water from a Milli-Q system and passed through a 0.45 μ m filter before use. A UA stock solution (2 g/L) was prepared daily by dissolving 1 g of UA in 0.5 L of water, followed by addition of NaOH to achieve a final pH of 10.70. Synthetic urine (Table 1) was prepared without calcium or oxalate to prevent calcium oxalate crystallization. The pH of the solution was adjusted to 5.40 before use.

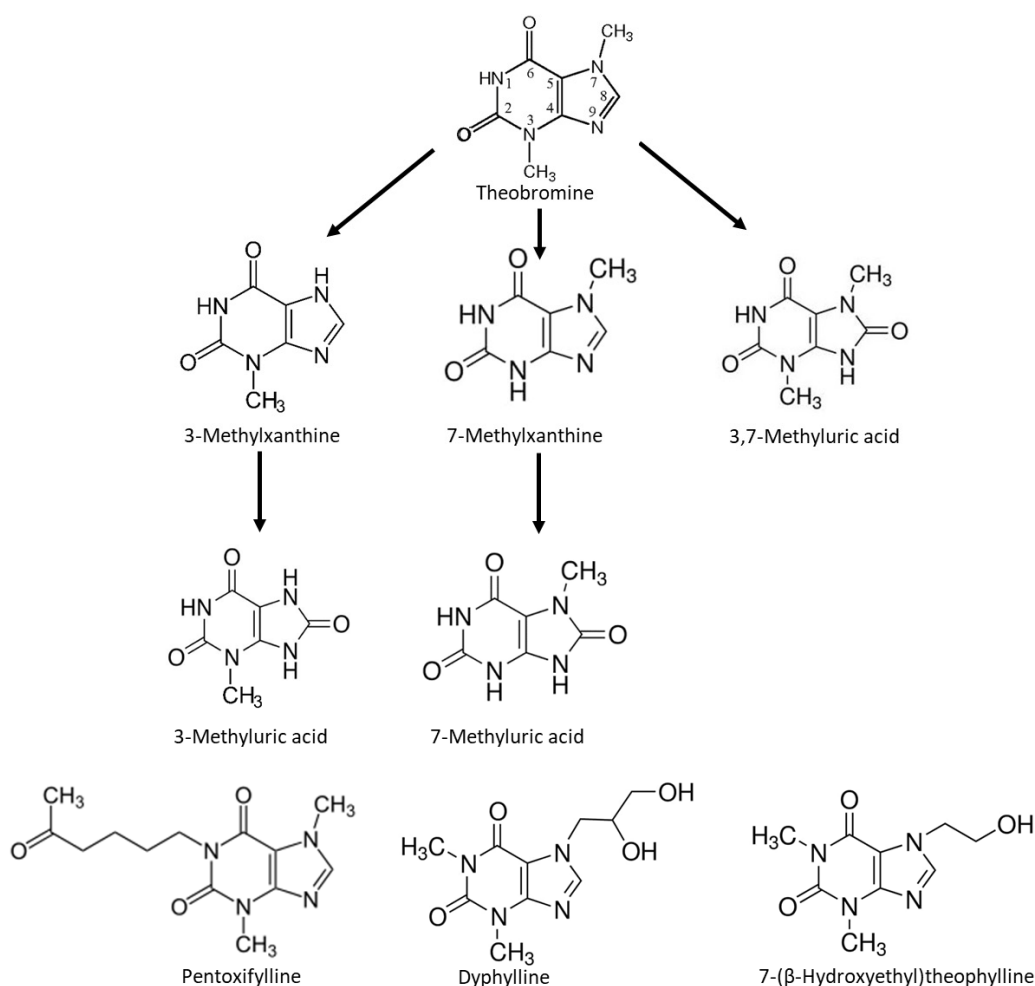


Figure 8. Chemical structures of theobromine, theobromine metabolites, and related methylxanthines: pentoxifylline (3,7-dimethyl-1-(5-oxohexyl)xanthine), dyphylline (7-(2,3-dihydroxypropyl)theophylline), and 7-(β-hydroxyethyl)theophylline (1,3-dimethyl-7-(2-hydroxyethyl)xanthine). Note the presence or absence of different substituents at position 1 and the presence or absence of a methyl group at position 7 in the different molecules.

4.2. Turbidimetric Assay

Table 1. Composition of the stock solution of synthetic urine (adjusted to pH 5.0). Synthetic urine samples were obtained by diluting 80 mL of stock solution to a final volume of 200 mL, which contained 400 mg/L of UA at a pH of 4.65 [19]. These conditions correspond to supersaturation of UA ($SS_{UA} = 3.55$). The turbidimetric system consisted of a photometer (AvaSpec-ULS2048CL-EVO, Avantes, The Netherlands) that was equipped with a fiber-optic light-guide measuring cell that was attached to a light path (2×10 mm) reflector. Crystallization was assessed at a constant temperature (37°C) via mixing using a magnetic stir bar (300 rpm).

A stock solution of synthetic urine (80 mL) was added to a crystallization flask, followed by the addition of 80 mL of water and 40 mL of a 2 g/L UA solution. Then, 0.5 M HCl was added until the pH reached 4.65 to achieve UA supersaturation. This pH value was selected to ensure a short crystallization time (6–10 min without an inhibitor). Absorbance was recorded continuously to monitor crystal formation.

The studied compounds (Figure 8) were assayed at concentrations of 0.05 to 0.60 mM. These concentrations were achieved by adding an appropriate volume of a 2 mM solution of each compound to the crystallization vial. UA with a corresponding initial concentration of 400 mg/L was added to the vial and the pH of the solution was fixed with a magnetic stir bar (300 rpm) for 15 min before induction of UA supersaturation.

Compound	Concentration (mM)
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	19.54
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.92
NH_4Cl	86.75
KCl	162.69
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15.45
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	15.64
NaCl	271.31

supersaturation of UA ($SS_{UA} = 3.55$). The turbidimetric system consisted of a photometer (AvaSpec-ULS2048CL-EVO, Avantes, The Netherlands) that was equipped with a fiber-optic light-guide measuring cell that was attached to a light path (2×10 mm) reflector. Crystallization was assessed at a constant temperature (37°C) via mixing using a magnetic stir bar (300 rpm).

A stock solution of synthetic urine (80 mL) was added to a crystallization flask, followed by the addition of 80 mL of water and 40 mL of a 2 g/L UA solution. Then, 0.5 M HCl was added until the pH reached 4.65 to achieve UA supersaturation. This pH value was selected to ensure a short crystallization time (6–10 min without an inhibitor). Absorbance was recorded continuously to monitor crystal formation.

The studied compounds (Figure 8) were assayed at concentrations of 0.05 to 0.60 mM. These concentrations were achieved by adding an appropriate volume of a 2 mM solution of each compound to the crystallization mixture (with a corresponding reduction in the volume of added water) prior to the addition of HCl. This solution was mixed with a magnetic stir bar (300 rpm) for 15 min before induction of UA supersaturation.

Induction time (t_i) was set as the time when the absorbance first began to increase. The effects of tested substances on the crystallization of UA were expressed as the increment of the induction time with respect to the induction time of the control (Δ induction time). Each experiment was performed in triplicate.

For compounds that inhibited crystallization, the effects of different combinations were also determined.

4.3. Structural Analysis of Crystals

The morphologies of the UA crystals that formed in synthetic urine in the absence or presence of the different tested compounds were examined using a scanning electron microscopy system (SEM, Hitachi S-3400N, Tokyo, Japan) coupled with XR energy dispersive microanalysis (Bruker AXS XFlash Detector 4010, Berlin, Germany). Crystals were collected at the end of each experiment by passing the solution through a $0.45\ \mu\text{m}$ filter. They were then dried in a desiccator and examined using SEM by placing the crystals on a sample holder with fixation on adhesive conductive copper tape.

4.4. Participants

Urine samples were provided by 20 healthy adult volunteers (11 males and 9 females, mean age: 37 years, age range: 22 to 65 years) and 54 volunteers who were active formers of UA stones (43 males and 11 females, mean age: 60 years, age range: 43 to 75 years). All volunteers were from Mallorca, Spain, and individuals with urinary infections were excluded.

The study design was approved by the local Ethics Investigation Committee of the Balearic Islands (IB 3475/17 PI) and by the Research Committee of Hospital Manacor and the Research Ethics Committee of Balearic Islands [CEI-IB] (IB3414). All participants provided written informed consent before participation.

4.5. Urine Samples

Three spot urine samples were collected from each participant at intervals of at least 7 days. Samples were collected under standard conditions in a sterile container, with no additives or preservatives, as they were processed immediately after collection. All participants were instructed to follow their usual diets. Patients with UA stones received oral theobromine (120 mg/day) for 14 days before collection of the third sample, and the results are included in a previously published study [20] of dietary intervention to assess the efficacy of theobromine in UA stone prevention.

The main urinary parameters related to UA lithogenesis were determined. Thus, urinary pH was measured using a Crison pH meter, and UA concentration was determined using the uricase method. Theobromine and its metabolites were measured using ultra-high-performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry (UHPLC/HRMS), as previously described [27].

The urinary pH and UA concentrations were used to determine the UA supersaturation (SS_{UA}) of a sample. As previously described [20], the solubility (S) and SS_{UA} were calculated using the following formulas at the pH of the sample:

$$S = \frac{K_{sp}}{K_{a1}} \left[1 + \frac{K_{a1}}{10^{-pH} \gamma_{HU^-}} \right] \quad SS_{UA} = \frac{c(H_2U)}{S}$$

where S (mol/L) and SS_{UA} are at the pH of the sample, K_{sp} is the solubility product of UA ($2.25 \times 10^{-9} \text{ mol}^2\text{L}^{-2}$ at 37°C), K_{a1} is the first dissociation constant of UA ($4.2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ at 37°C) [28], γ_{HU^-} is the monovalent ion activity coefficient of HU^- at the characteristic ionic strength of urine (~ 0.75) [29], and $c(H_2U)$ is the molar concentration of UA in the sample [29].

4.6. UA Crystallization Test

UA crystallization was determined by measuring the formation of UA crystals in polystyrene non-treated culture dishes (Corning, NY, USA), in which 5 mL of urine was maintained for 24 h at room temperature and then carefully removed via aspiration with a pipette. This test is a simplified version of the Risk to UA Crystallization (RUCAC) test [30]. A test is considered positive when UA crystals are formed in the dish and negative when the dish contained no crystals (Figure 9).

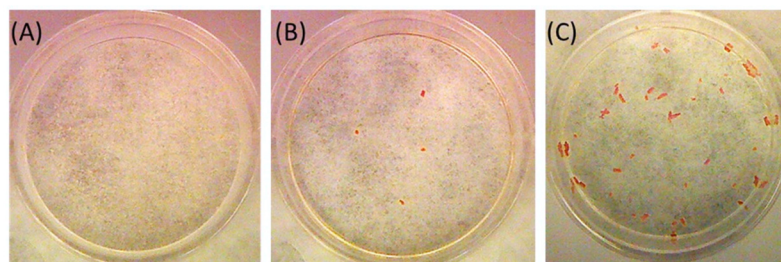


Figure 9. UA crystallization test results after incubation of 5 mL of different urine samples for 24 h. (A) No UA crystals (negative result); (B,C) UA crystals with typical orange color (positive results).

4.7. Statistics

Intergroup comparisons (Δ induction time between compounds) and intragroup comparisons (Δ induction time between different concentrations of the same compound) were performed using a one-way ANOVA test. A two-tailed p -value less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS version 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5. Conclusions

The bromine and other methylxanthines that lacked a substituent at position 1 inhibited UA crystallization, but other methylxanthines did not have this effect. Individuals with clinical parameters that favored UA crystallization did not develop UA crystals when the bromine and its metabolites were in the urine at high levels. Thus, the bromine and its metabolites reduced the risk of UA lithiasis.

Author Contributions: A.C.-B.: Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing—Original draft. P.C.: Investigation, Formal analysis, Writing—Original draft. Y.H.: Investigation, Resources. F.G.: Conceptualization, Methodology, Writing—Original draft. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Grant PID2019-104331RB-I00 was funded by the Ministerio de Ciencia e Innovación, Agencia Estatal de Investigación, MCIN/AEI/10.13039/501100011033.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Investigation Committee of the Balearic Islands (IB 3475/17 PI, approval 2017) and by the Research Committee of Hospital Manacor and the Research Ethics Committee of Balearic Islands [CEI-IB] (IB3414/17PI, approval 2017)

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Investigation Committee of the Balearic Islands (IB 3475/17 PI, approval 2017) and by the Research Committee of Hospital Manacor and the Research Ethics Committee of Balearic Islands [CEI-IB] (IB3414/17PI, approval 2017).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author [A.C.-B.], upon reasonable request.

Acknowledgments: P. Calvó is grateful to the Conselleria d'Educació, Universitat i Recerca of the Government of the Balearic Islands for the fellowship FPI_003_2020.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Romero, V.; Akpınar, H.; Assimos, D.G. Kidney stones: A global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors. *Rev. Urol.* **2010**, *12*, e86–e96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Scales, C.D.; Smith, A.C.; Hanley, J.M.; Saigal, C.S.; Urologic Diseases in America Project. Prevalence of kidney stones in the United States. *Eur. Urol.* **2012**, *62*, 160–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Stamatelou, K.; Goldfarb, D.S. Epidemiology of Kidney Stones. *Healthcare* **2023**, *11*, 424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Chewcharat, A.; Curhan, G. Trends in the prevalence of kidney stones in the United States from 2007 to 2016. *Urolithiasis* **2021**, *49*, 27–39. [[CrossRef](#)]
5. Brikowski, T.H.; Lotan, Y.; Pearle, M.S. Climate-related increase in the prevalence of urolithiasis in the United States. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9841–9846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Daudon, M.; Bader, C.A.; Jungers, P. Urinary calculi: Review of classification methods and correlations with etiology. *Scanning Microsc.* **1993**, *7*, 1081–1104; discussion 1104–1106.
7. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Ramis, M.; Montesinos, V.; Conte, A. Simple classification of renal calculi closely related to their micromorphology and etiology. *Clin. Chim. Acta* **2002**, *322*, 29–36. [[CrossRef](#)]
8. Wiederkehr, M.R.; Moe, O.W. Uric Acid Nephrolithiasis: A Systemic Metabolic Disorder. *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.* **2011**, *9*, 207–217. [[CrossRef](#)]
9. Sakhaee, K. Epidemiology and clinical pathophysiology of uric acid kidney stones. *J. Nephrol.* **2014**, *27*, 241–245. [[CrossRef](#)]
10. Maalouf, N.M. Metabolic syndrome and the genesis of uric acid stones. *J. Ren. Nutr.* **2011**, *21*, 128–131. [[CrossRef](#)]
11. Ngo, T.C.; Assimos, D.G. Uric Acid nephrolithiasis: Recent progress and future directions. *Rev. Urol.* **2007**, *9*, 17–27.
12. Sakhaee, K.; Adams-Huet, B.; Moe, O.W.; Pak, C.Y. Pathophysiologic basis for normouricosuric uric acid nephrolithiasis. *Kidney Int.* **2002**, *62*, 971–979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Siener, R.; Löhr, P.; Hesse, A. Urinary risk profile, impact of diet, and risk of calcium oxalate urolithiasis in idiopathic uric acid stone disease. *Nutrients* **2023**, *15*, 572. [[CrossRef](#)]
14. de Bruijn, P.I.; Larsen, C.K.; Frische, S.; Himmerkus, N.; Praetorius, H.A.; Bleich, M.; Leipziger, J. Furosemide-induced urinary acidification is caused by pronounced H⁺ secretion in the thick ascending limb. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2015**, *309*, F146–F153. [[CrossRef](#)]
15. Rodgers, A.L. Urinary saturation: Casual or causal risk factor in urolithiasis? *BJU Int.* **2014**, *114*, 104–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Grases, F.; Costa-Bauzá, A.; Königsberger, E.; Königsberger, L.C. Kinetic versus thermodynamic factors in calcium renal lithiasis. *Int. Urol. Nephrol.* **2000**, *32*, 19–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ratkalkar, V.N.; Kleinman, J.G. Mechanisms of Stone Formation. *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.* **2011**, *9*, 187–197. [[CrossRef](#)]
18. Kenny, J.E.; Goldfarb, D.S. Update on the pathophysiology and management of uric acid renal stones. *Curr. Rheumatol. Rep.* **2010**, *12*, 125–129. [[CrossRef](#)]
19. Grases, F.; Rodriguez, A.; Costa-Bauza, A. Theobromine inhibits uric acid crystallization. A potential application in the treatment of uric acid nephrolithiasis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e111184. [[CrossRef](#)]
20. Hernandez, Y.; Costa-Bauza, A.; Calvó, P.; Benejam, J.; Sanchis, P.; Grases, F. Comparison of two dietary supplements for treatment of uric acid renal lithiasis: Citrate vs. citrate + theobromine. *Nutrients* **2020**, *12*, 2012. [[CrossRef](#)]
21. Rodopoulos, N.; Höjvall, L.; Norman, A. Elimination of theobromine metabolites in healthy adults. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* **1996**, *56*, 373–383. [[CrossRef](#)]
22. Lifshitz, D.A.; Shalhav, A.L.; Lingeman, J.E.; Evan, A.P. Metabolic evaluation of stone disease patients: A practical approach. *J. Endourol.* **1999**, *13*, 669–678. [[CrossRef](#)]
23. Chattaraj, K.G.; Paul, S. Inclusion of Theobromine Modifies Uric Acid Aggregation with Possible Changes in Melamine-Uric Acid Clusters Responsible for Kidney Stones. *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123*, 10483–10504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ferraro, P.M.; Taylor, E.N.; Gambaro, G.; Curhan, G.C. Caffeine intake and the risk of kidney stones. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, *100*, 1596–1603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chewcharat, A.; Thongprayoon, C.; Vaughan, L.E.; Mehta, R.A.; Schulte, P.J.; O'Connor, H.M.; Lieske, J.C.; Taylor, E.N.; Rule, A.D. Dietary risk factors for incident and recurrent symptomatic kidney stones. *Mayo Clin. Proc.* **2022**, *97*, 1437–1448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Rybak, M.E.; Sternberg, M.R.; Pao, C.I.; Ahluwalia, N.; Pfeiffer, C.M. Urine excretion of caffeine and select caffeine metabolites is common in the U.S. population and associated with caffeine intake. *J. Nutr.* **2015**, *145*, 766–774. [[CrossRef](#)]
27. Rodriguez, A.; Gomila, R.M.; Martorell, G.; Costa-Bauza, A.; Grases, F. Quantification of xanthine- and uric acid-related compounds in urine using a “dilute-and-shoot” technique coupling ultra-high-performance liquid chromatography and high-resolution Orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, *1067*, 53–60. [[CrossRef](#)]
28. Grases, F.; Villacampa, A.I.; Costa-Bauzá, A.; Söhnel, O. Uric acid calculi. *Scanning Microsc.* **1999**, *13*, 223–234.
29. Coe, F.L.; Strauss, A.L.; Tembe, V.; Le Dun, S. Uric acid saturation in calcium nephrolithiasis. *Kidney Int.* **1980**, *17*, 662–668. [[CrossRef](#)]
30. Calvó, P.; Costa-Bauzá, A.; Grases, F.; Hernandez, Y.; Sanchis, P. Validation of a novel diagnostic test for assessing the risk of urinary uric acid crystallization. *Clin. Chim. Acta* **2021**, *519*, 187–193. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

***Capítulo 3. Estudio de la formación
de depósitos sobre secciones de
catéteres doble J***

Objetivos

Los objetivos específicos del presente capítulo fueron:

- Estudiar el efecto de la albúmina en la formación de depósitos de BRU, COM, HAP y AU sobre secciones tygon.
- Estudiar la morfología y mecanismos de formación de los depósitos formados in vitro y compararlo con las morfologías observadas in vivo.
- Estudiar el efecto del fitato en la adhesión bacteriana en condiciones que favorecen la formación de depósitos cálcicos.
- Estudiar los efectos del fitato, las mezclas de sus productos de hidrólisis, el alendronato y el citrato en la formación de depósitos de BRU, COM y HAP.
- Estudiar los efectos de la teobromina, la 7-metilxantina y su mezcla en la formación de depósitos de AU sobre secciones tygon.

Introducción

1. Complicaciones asociadas al uso de catéteres doble J

1.1 Infección del tracto urinario y formación del *biofilm* bacteriano

Aunque normalmente resuelve el problema obstructivo, la introducción del catéter puede provocar diversos efectos adversos, como el desarrollo de infección en el sistema urinario, así como la incrustación y obstrucción del catéter con el tiempo[1].

El número de infecciones del tracto urinario (ITU) por la implantación de catéteres ureterales se ha incrementado durante las últimas décadas. Los catéteres urinarios se han convertido en el segundo dispositivo más utilizado que se inserta en el cuerpo humano. Más del 40% de las infecciones nosocomiales son infecciones del tracto urinario, especialmente infecciones en pacientes cateterizados[2].

El riesgo de padecer infección del tracto urinario aumenta linealmente con la duración de la permanencia del catéter, observando que el 50% de los pacientes tienen bacteriuria durante los primeros 10 a 14 días del cateterismo[3]. Además, la presencia de ITUs es significativamente mayor en los catéteres insertados durante un largo plazo, de manera que un uso superior a los 30 días aumenta mucho el riesgo de presencia de bacteriuria[4,5]. Esto se debe a que los microorganismos tienden a colonizar la superficie del catéter, lo que lleva a la formación del *biofilm* bacteriano[6]. A mayor tiempo de cateterización del paciente, mayor es la diversidad que muestra la comunidad microbiana del *biofilm*. Así, los pacientes con cateterismo durante largo plazo suelen presentar infecciones por comunidades de bacterias más complejas y diversas[4].

El tratamiento de las ITUs también es complicado, ya que el uso continuo de antibióticos, aunque sea en dosis bajas, está contraindicado por la posible adquisición de resistencias y tampoco ha demostrado reducción en la cantidad y la gravedad de las ITUs[7]. Así, teniendo en cuenta que las bacterias causantes de las ITUs son difíciles de eliminar, la posibilidad de causar resistencia a los antibióticos y que la mayoría de las infecciones son asintomáticas, la bacteriuria asociada a la implantación de un catéter generalmente no se trata[5].

1.2 El *biofilm* bacteriano

1.2.1 Proceso de formación

El *biofilm* bacteriano comprende una comunidad estructurada de microorganismos y sus productos extracelulares que se agregan en la superficie de los dispositivos médicos implantados, en este caso el catéter ureteral[8]. La unidad básica del *biofilm* es la microcolonia, formada por las células bacterianas y una matriz de exopolisacáridos. Esta matriz es un microambiente rico en proteínas, ADN y polisacáridos que sustentan la supervivencia y proliferación de colonias[9]. Si bien a menudo existen en un estado de flotación libre (llamado también estado planctónico), muchos patógenos tienen la capacidad de adherirse a las estructuras y persistir en ellas formando matrices que incorporan otras estructuras moleculares (Figura 3.1).

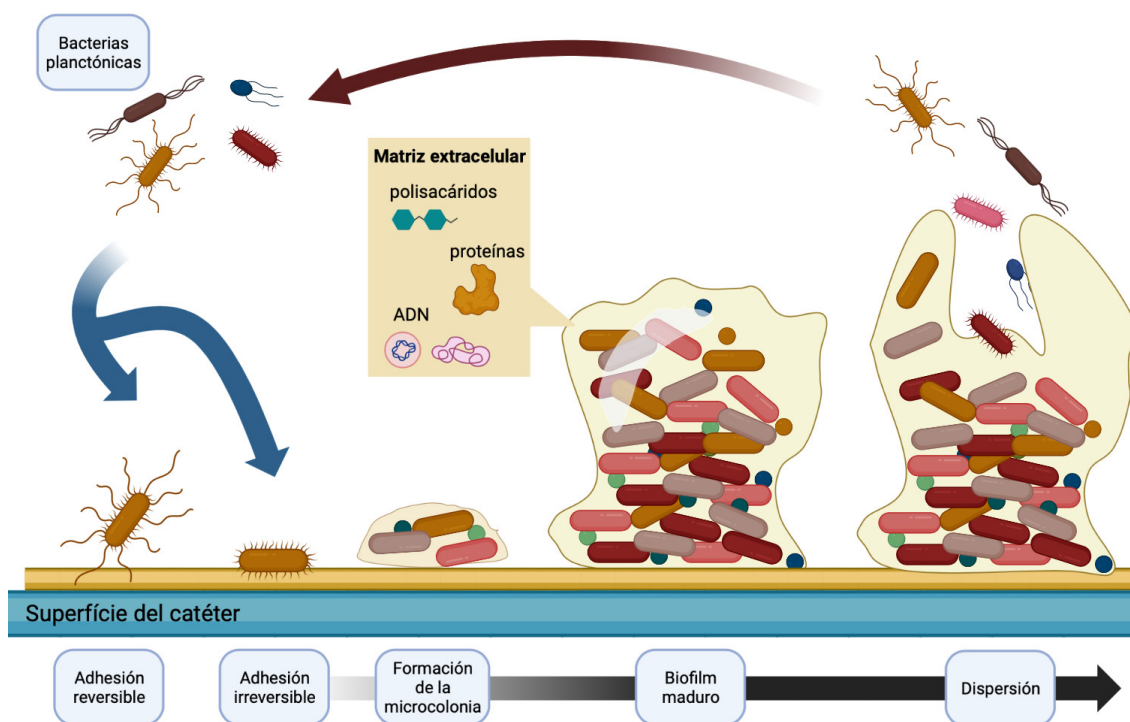


Figura 3.1 Proceso de formación del *biofilm* bacteriano.

La formación del *biofilm* en la superficie del catéter se ha relacionado como un paso importante en el proceso del desarrollo de ITUs e incrustaciones asociadas a llevar un catéter ureteral. La formación del *biofilm* es un proceso que consta de varios pasos y que da como resultado una estructura organizada y compleja compuesta de moléculas orgánicas, espacios llenos de líquido y bacterias que se adhieren a la superficie del

catéter[8]. Dentro del *biofilm* los microorganismos están protegidos de las defensas del huésped y los antibióticos, lo que explicaría su baja eficacia y el desarrollo acelerado de resistencia a los antibióticos[10].

El primer paso de la formación del *biofilm* comienza casi inmediatamente después de la inserción del catéter en el cuerpo humano. Al entrar en contacto con los fluidos corporales (como la orina y la sangre, así como el tejido urotelial) ya se produce el primer depósito de moléculas de origen extracelular (como polisacáridos, iones y glicoproteínas), que formarán el *conditioning film*[2,11]. La acumulación del *conditioning film* en la superficie de los catéteres estimula la adhesión de los uropatógenos bacterianos y la formación del *biofilm* bacteriano. Al ser la orina una mezcla compleja con composición variable, a día de hoy, aun es limitada la información que hay disponible sobre la composición del *conditioning film*, y se desconoce en gran medida hasta qué punto sus componentes desempeñan un papel en la facilitación de la adhesión bacteriana. Se ha observado que la albúmina, en conjunción con el fibrinógeno y la uromodulina (Tamm-Horsfall) fueron los constituyentes más predominantes de los *conditioning film* formados en catéteres ureterales extraídos de pacientes[12]. Además, un estudio reciente ha mostrado que, así como el *conditioning film* no se distribuye de igual manera sobre la superficie del catéter, tampoco lo hacen las bacterias, las cuales se adhieren preferentemente en las zonas donde el *conditioning film* es mayor, lo que respalda la importancia del *conditioning film* para facilitar la adhesión bacteriana[13]. Se han observado diferentes mecanismos de adhesión, entre ellos los llevados a cabo mediante los apéndices de las bacterias (como por ejemplo fimbrias presentes en E.Coli[14]), así como la adhesión a las sustancias poliméricas excretadas por las propias bacterias que también podrían contribuir a la formación del *biofilm*[15]. La interacción inicial entre las bacterias y la superficie del catéter es reversible, ya que está impulsada por fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas débiles. Sin embargo, con el tiempo, la adherencia se vuelve irreversible debido a la unión de las adhesinas bacterianas (flagelos) a sus moléculas diana en la superficie del dispositivo, que producen un cambio en la expresión génica de la bacteria que aumenta la biosíntesis de exopolisacáridos bacterianos que permiten una adherencia más permanente con la superficie[15] (Figura 3.1).

La presencia de esta gruesa capa protectora, combinada con el hecho de que se modifican los fenotipos y las funciones metabólicas de las bacterias incrustadas, da como resultado un *biofilm* significativamente más resistente a los fármacos antimicrobianos debido al hecho de no pueden penetrar lo suficiente a través de la capa de exopolisacárido para llegar las bacterias subyacentes[16]. De esta manera, se ha observado que las bacterias que forman parte de un *biofilm* bien establecido sobreviven a concentraciones de antibiótico de hasta 1000 veces más altas que la concentración inhibitoria mínima para sus contrapartes libres[10] (en estado planctónico). Finalmente, la expansión del *biofilm* a las áreas "despobladas" de los catéteres se ve facilitada por el desprendimiento de las células bacterianas del *biofilm*, que vuelven de nuevo al estado planctónico. La difusión de estas bacterias planctónicas a áreas no colonizadas de la superficie da como resultado el inicio de la formación de nuevos *biofilms*[17] (Figura 3.1).

Aún queda mucho por elucidar del *biofilm* bacteriano y de su formación, ya que su contenido probablemente cambia con el tiempo debido a la adsorción, desorción y reemplazo de componentes y alteraciones conformacionales que se realizan en la interfase líquido-superficie. Así, hoy en día todavía no está claro qué cambios ocurren en la superficie de los catéteres ureterales al insertarlos en el cuerpo y qué impacto potencial tienen sobre la incrustación y la infección de los distintos componentes que pueden depositarse.

1.2.2 Cepas más comunes e implicaciones

Tanto las bacterias gramnegativas como las grampositivas son capaces de formar *biofilms* complejos. En un estudio donde se recolectaron 535 catéteres urinarios con urocultivo positivo las cepas más frecuentemente aisladas fueron *E. faecalis* (294 cepas), *E. coli* (213 cepas), *P. aeruginosa* (148 cepas) y *Candida albicans* (141 cepas). Por otro lado, *E. faecalis* (94,2 %), *P. mirabilis* (94 %), *Candida tropicalis* (90,8 %) y *Staphylococcus aureus* (100 %) fueron las que presentaron proporciones más altas de cepas capaces de formar *biofilms* más fuertes y resistentes. *P. aeruginosa* mostró también una elevada proporción de cepas positivas en la formación de un *biofilm* resistente (74,5%)[18]. Estos resultados coinciden con otro estudio donde se identifican las especies bacterianas más

comunes de los *biofilms* de un conjunto de 106 catéteres urinarios, que fueron *E. faecalis* (34.0%), *P. aeruginosa* (35.9%), *E. coli* (31,1%), and *P. mirabilis* (30,2%)[19]. Aunque se ha observado algún caso de *biofilm* compuesto por una sola especie bacteriana, la mayoría de los *biofilms* contienen comunidades bacterianas mixtas que de hasta cinco o seis especies.

Se ha observado que la colonización del catéter ureteral por parte de las bacterias ocurre antes que la colonización de la orina[20]. Sin embargo, es importante destacar que la colonización del catéter no siempre se traduce en una infección urinaria sintomática. Además, debido a que los cultivos de orina tienen una sensibilidad baja (aproximadamente 40%) para detectar la colonización del catéter, un resultado negativo en un cultivo de orina no descarta la presencia de un catéter colonizado[21]. Los microorganismos comúnmente identificados como agentes causantes de las (ITUs) asociadas con los catéteres ureterales son *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Candida spp*[21].

Las bacterias que forman *biofilms* se adhieren rápidamente a estos dispositivos, incluso dentro de las primeras 24 horas después de su colocación[22]. Se ha comprobado que, tras la administración de profilaxis antibiótica en un corto periodo de 2 a 3 días, se puede detectar la colonización bacteriana del catéter dos semanas después de su implantación[23]. Además, se ha observado que esta colonización del catéter ocurre antes que la colonización de la orina, siendo posible detectar bacterias en estado planctónico (libre)[20]. Según el estudio realizado por Rahman et al.[24], se reportaron tasas de colonización del 24% antes de las 4 semanas, del 33% entre las 4 y 6 semanas, y del 71% después de las 6 semanas de la implantación del catéter. Por otro lado, Riedl et al.[25] encontraron que el 100% de los pacientes con catéter ureteral permanente (con un tiempo de inserción promedio de 39,5 días) presentaron colonización del catéter. En el caso de los catéteres temporales, la tasa de colonización fue del 69% con una duración media de 11 días. En pacientes con factores de riesgo como diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica y nefropatía diabética, se ha recomendado utilizar tiempos de implantación más cortos para los catéteres ureterales, debido a un riesgo significativamente mayor de colonización y bacteriuria. Esta medida se toma con el

objetivo de minimizar las complicaciones asociadas a la presencia del catéter en estos pacientes[26].

1.3 Incrustación del catéter doble J

Varias especies que se encuentran comúnmente en el *biofilm* del catéter producen ureasa. De las nombradas anteriormente encontramos actividad ureasa positiva en *P. aeruginosa* y especies de *Proteus*, incluyendo *P. mirabilis*. La ureasa producida por *P. mirabilis* es una enzima potente y capaz de hidrolizar la urea hasta 10 veces más rápido que la ureasa producida por otras especies bacterianas[27,28].

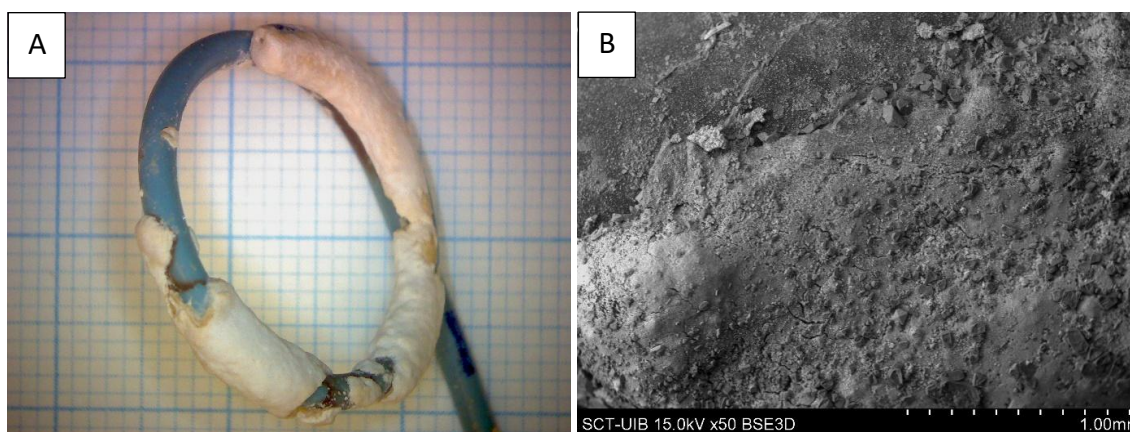


Figura 3. 2 Superficie de un catéter ureteral cubierto por depósitos de HAP y FAM (A) Imagen óptica, (B) Imagen de microscopía electrónica de barrido.

La presencia de bacterias productoras de ureasa en el *biofilm* provoca un aumento el pH de la orina debido a la formación de amoníaco que proviene de la hidrólisis de la urea. Cuando el pH de la orina es superior a 6,2 se pueden formar depósitos de HAP ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$), BRU ($\text{Ca}(\text{PO}_3\text{OH})\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y estruvita (FAM, $\text{NH}_4\text{MgPO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en el catéter, lo que provoca la presencia de incrustaciones y bloqueo del flujo urinario[29,30] (Figura 3.2). No es extraño entonces que *P. mirabilis* se aísle más comúnmente de la orina de pacientes que sufren de incrustaciones y bloqueos recurrentes del catéter[31,32] y que sea la especie que se recupera con mayor frecuencia de los catéteres incrustados de los pacientes[33].

La incrustación también puede ocurrir sin infección bacteriana, porque el catéter puede funcionar como nucleante heterogéneo para sustancias que están sobresaturadas en la orina[34–36], de manera que proporciona un marco para el

depósito de los componentes de la orina que, con el tiempo, acabaría ocurriendo con cualquier catéter[37]. Además, se ha demostrado que existe una correlación significativa entre la composición mineral de los catéteres ureterales y el análisis de cálculos en pacientes con cálculos urinarios[38,39]. Se ha observado que el tipo de incrustación más común es la de oxalato de calcio, aunque en presencia de un alto grado de incrustación el fosfato infeccioso fue el predominante[40]. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Bounzidi *et. al*[35]. En el estudio llevado a cabo por Bauzà *et. al*[41] se observó que los catéteres con un mayor grado de incrustación presentaban niveles más altos de calciuria, uricosuria, tiempo de permanencia y disminución de la diuresis en comparación con aquellos sin incrustaciones. Además, se encontró que los valores del pH urinario eran más bajos en pacientes con incrustaciones de ácido úrico y más altos en aquellos con incrustaciones infecciosas de fosfato. En comparación con los catéteres sin incrustaciones, los pacientes con catéteres incrustados con oxalato de calcio mostraron una mayor calciuria, tiempo de permanencia y una reducción en la diuresis. Los pacientes con catéteres incrustados de ácido úrico mostraron una mayor uricosuria, mientras que los pacientes con incrustaciones de fosfato infecciosas y no infecciosas mostraron un pH urinario más alto.

En cuanto a la tasa de incrustación, en un grupo de pacientes en los que se implantaron catéteres ureterales debido a la presencia de cálculos en las vías urinarias se encontró que se produjo incrustación en el 9,2 % de los catéteres recuperados antes de las 6 semanas, en el 47,5 % de los que se dejaron colocados entre 6 y 12 semanas y en el 76,3 % de los que se dejaron colocados más de 12 semanas. Por lo tanto, la morbilidad asociada era mínima si los tiempos de permanencia no superaban las 6 semanas[42]. En cambio, en otro estudio, aunque el porcentaje de catéteres ureterales con incrustaciones entre 6 y 12 semanas y más de 12 semanas fueron parecidos (56,9% y 75,9% respectivamente), el porcentaje de catéteres incrustados antes de las 6 semanas fue mayor (26.8%)[43]. En un estudio retrospectivo de catéteres ureterales con presencia de grandes incrustaciones y bloqueos que requerían procedimientos de extracción avanzados, el 43 % de los catéteres se habían incrustado después de un período de implantación de 4 meses y el 76 % de 6 meses[8].

Estos números manifiestan la importancia de un estrecho seguimiento y control de los pacientes implantados con catéteres. Por tanto, el tiempo de implantación del catéter es un factor a tener en cuenta y a día de hoy, aunque se recomiendan unos tiempos de implantación no superiores a cuatro y seis semanas, es común encontrar pacientes con tiempos de implantación superiores.

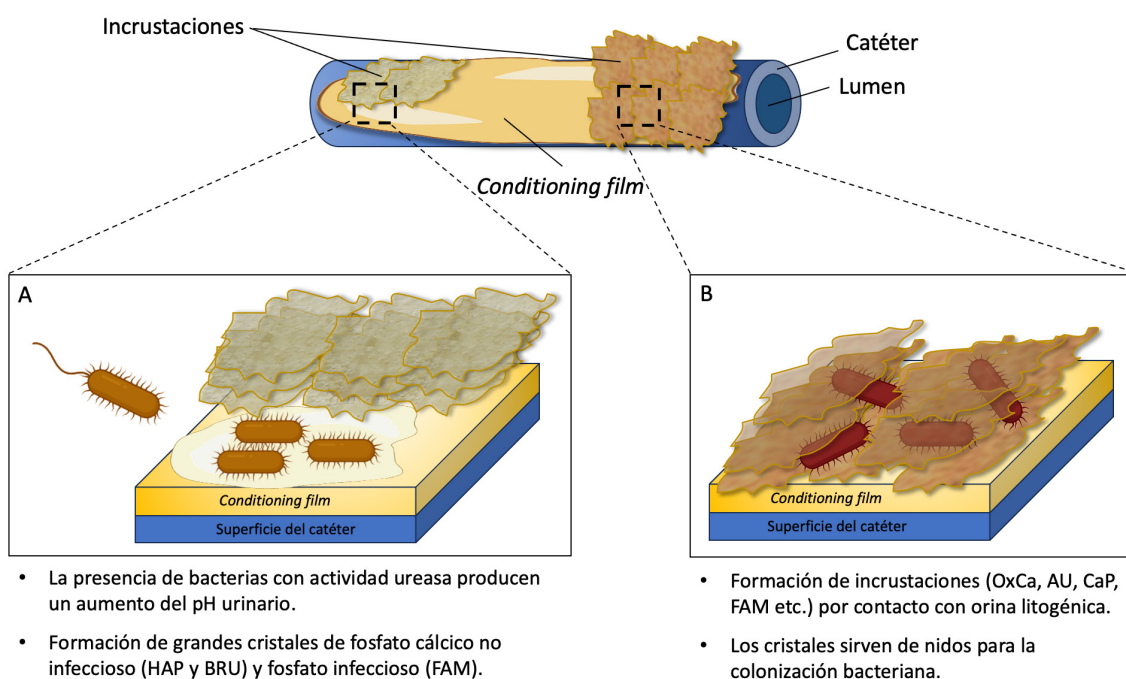


Figura 3.3 Ilustración de la interacción entre las bacterias, el *conditioning film* y la incrustación en la superficie de los catéteres. A) Proceso de formación de grandes incrustaciones de fosfato infeccioso y no infeccioso por la presencia de bacterias con actividad ureasa. B) La formación de depósitos cristalinos sirven como nidos para la colonización y posterior infección bacteriana.

La relación entre la formación del *biofilm* y la incrustación del catéter no está del todo clara, aunque algunos estudios con catéteres uretrales y ureterales han mostrado una clara retroalimentación durante el proceso. Por un lado, la adhesión bacteriana y la formación del *biofilm* en la superficie del catéter pueden promover la deposición e incrustación de cristales debido al aumento del pH provocado por la presencia de bacterias con actividad ureasa, como se ha comentado anteriormente (Figura 3.3 A). Por otro lado, el estudio de las primeras etapas de la formación de *biofilms* cristalinos en presencia de orina alcalina y *P. mirabilis* reveló una primera formación de una capa microcristalina de fosfato cálcico que recubría las superficies del catéter. Posteriormente siguió la colonización bacteriana de esta capa cristalina base, con

microcolonias de células desarrollándose en los microcristales. Así, la incrustación puede proporcionar nidos para la colonización bacteriana y la formación de un *biofilm* cristalino bacteriano(Figura 3.3 B)[44–46].

Por lo tanto, un aumento de la permanencia del catéter en el organismo se ha relacionado directamente con un aumento del riesgo de UTIs, que a su vez también se relaciona con un aumento de la incrustación y bloqueo del catéter[42,43,47]. Estas también pueden ocurrir en ausencia de infección, ya que, a parte de los tiempos prolongados de implantación, la presencia de orina litogénica también aumenta claramente el riesgo de incrustación. Estas incrustaciones pueden conducir a la rigidez del catéter, lo que provoca resistencia y una tracción reducida[48]. Estos hechos aumentan el riesgo de trauma o lesión del uréter durante la extracción del catéter y la pérdida de orina dentro del cuerpo.

1.4. Biofilms no cristalinos

Estudios experimentales en modelos de laboratorio de vejiga cateterizada ha demostrado que especies como *M. morganii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* no producen orina alcalina, por lo que consecuentemente no producen una incrustación apreciable en los catéteres[49]. Las únicas especies capaces de producir orina alcalina y causar incrustaciones extensas fueron *P. mirabilis*, *P. vulgaris* y *Providencia rettgeri*. Al ser estas dos últimas especies solo encontradas en alrededor del 5 al 10 % de los *biofilms* de los catéteres[19], *P. mirabilis* sería el principal responsable de la formación de *biofilms* cristalinos en los catéteres.

Además de *Proteus mirabilis*, muchas otras especies tienen la capacidad de formar *biofilms* extensos en los catéteres urinarios. Aunque estos *biofilms* no generen depósitos cristalinos, siguen siendo de interés clínico relevante. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* son capaces de producir grandes cantidades de exopolisacáridos y formar *biofilms* mucoides que pueden obstruir la luz del catéter[50]. Aunque estos *biofilms* no obstruyen tan eficientemente los catéteres como sí lo hacen los depósitos cristalinos, pueden obstaculizar significativamente el flujo de orina[6].

1.5 Manejo y tratamiento del implante de catéteres ureterales

Las bacterias que se encuentran en los *biofilms* son conocidas por ser notablemente difíciles de erradicar mediante fármacos bactericidas (Figura 3.4)[51]. Esta resistencia universal de las bacterias del *biofilm* a los agentes antibacterianos es clínicamente importante y debe ser considerada al iniciar la terapia con antibióticos para infecciones sintomáticas. Una opción sensata sería reemplazar los catéteres previos que han formado *biofilm* antes de administrar antibióticos. En este caso, el tratamiento debe basarse en la susceptibilidad de los organismos aislados de la orina obtenida del nuevo catéter, ya que las muestras recolectadas del propio catéter pueden contener diferentes especies y un mayor número de organismos[52]. Como se mencionó previamente, la evidencia indica que el tratamiento de las ITUs sintomáticas es más efectivo si primero se retira el catéter recubierto de *biofilm* antes de iniciar el tratamiento con antibióticos[53].

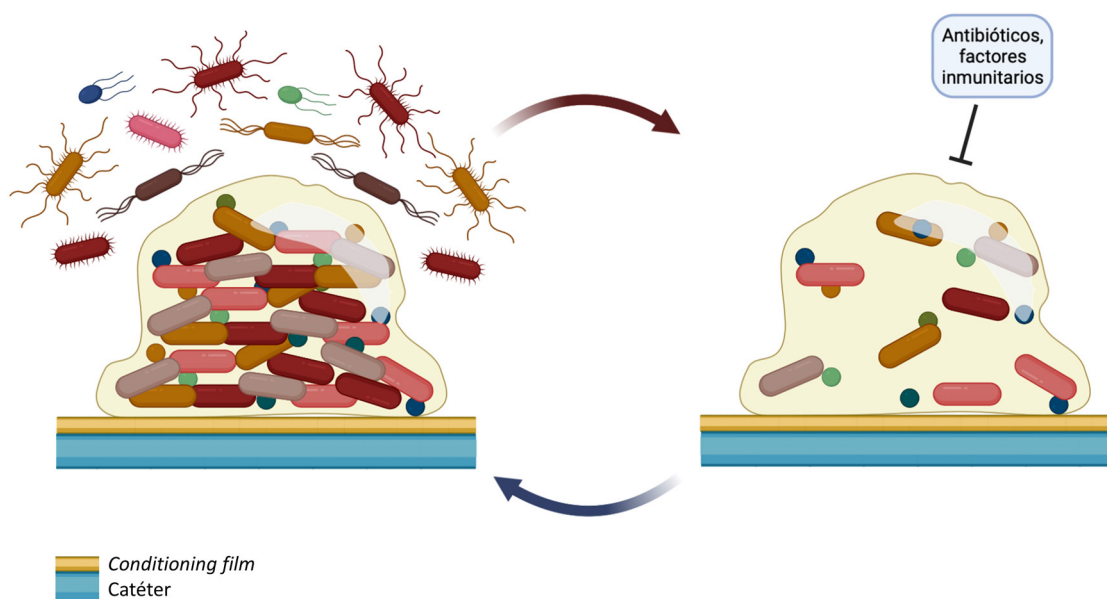


Figura 3.4 Modelo de resistencia del *biofilm* basado en la supervivencia bacteriana. El tratamiento inicial con antibióticos mataría las células planctónicas y la mayoría de las células del *biofilm*. El sistema inmunitario mataría a los persistentes planctónicos, pero las células persistentes del *biofilm* están protegidas de las defensas del huésped por la matriz de exopolisacáridos. Después de que disminuya la concentración de antibiótico, las bacterias sobrevivientes regeneran el *biofilm* y se recae en la infección[51].

Para los pacientes con antecedentes de incrustación y bloqueo del catéter, Norberg *et al.*[54] sugirieron monitorear el tiempo que tardan los catéteres en bloquearse para identificar un patrón y establecer un programa de reemplazo de

catéteres anticipado, de modo que los catéteres se cambiasen antes del tiempo esperado de bloqueo. Esta estrategia podría ayudar a reducir la incidencia de crisis clínicas en pacientes propensos a bloqueos recurrentes. Sin embargo, la implementación de esta estrategia se ve dificultada por dos hechos. En primer lugar, existe una gran variabilidad en los tiempos que los catéteres tardan en bloquearse[55]. En segundo lugar, la implementación de esta estrategia requeriría un consumo considerable de tiempo. Por lo tanto, de acuerdo con la evidencia científica, es más práctico establecer un tiempo general de implantación de no más de seis semanas para evitar la mayoría de las incrustaciones y bloqueos, aunque no se puedan evitar todos.

Al ser el pH de la orina y la sobresaturación dos factores que juegan un papel importante en la incrustación y formación de bloqueos[56,57], un enfoque alternativo para estos pacientes recurrentes sería alterar la composición de la orina para reducir la alcalinización y aumentar la excreción de inhibidores de la cristalización para minimizar la incrustación del catéter. Torrecilla et. al[36] llevó a cabo un ensayo prospectivo, paralelo, doble ciego y aleatorizado entre 9 hospitales públicos de España. En este, 105 sujetos fueron aleatorizados en una proporción de 1:1 para recibir una composición oral con acidificante de la orina juntamente con un inhibidor de la cristalización de sales cálcicas (en este caso fitato, InsP6) o un placebo. Debido al tratamiento, en este estudio se excluyeron pacientes con litiasis úricas. Para este estudio los pacientes tenían que monitorearse ellos mismos el pH urinario. Los resultados mostraron que el grupo que tomó la composición oral se benefició de una tasa de incrustación global más baja que el grupo de placebo, con mayores disminuciones del pH de la orina. Así, el monitoreo constante del pH urinario por parte de los pacientes[58], el uso de acidificantes o basificantes para su corrección, así como de los distintos inhibidores de la cristalización establecidos[36], también tendría que ser una terapia a tener en cuenta para esos pacientes con incrustaciones y bloqueos recurrentes.

En muchos pacientes que experimentan incrustaciones recurrentes en el catéter el enfoque habitual de manejo consiste en reemplazar el catéter por uno nuevo. Es poco probable que los intentos de inhibir la adhesión bacteriana y el desarrollo de *biofilms* mediante la incorporación de agentes antibacterianos en el catéter prevengan la

formación de incrustaciones en pacientes infectados con *P. mirabilis*[6]. Por lo tanto, la lección evidente para prevenir la incrustación del catéter es controlar el pH de la orina para evitar que exceda el rango de seguridad (5,5-6,2), ya que por encima de este se favorece la formación de cristales de BRU/HAP/FAM, y por debajo la formación de AU.

Los catéteres ureterales altamente incrustados representan un gran desafío para los urólogos cuando se requiere su cambio o extracción. En casos graves, puede ser necesario utilizar un enfoque multimodal que incluya litotricia de onda de choque extracorpórea, ureteroscopia, nefrolitotomía percutánea o incluso cirugía abierta[59]. Dado que el grado de incrustación está relacionado con el tiempo de residencia del catéter[43], los "catéteres olvidados", en particular, a menudo presentan graves problemas. Esto se debe a que la obstrucción del catéter puede llevar a la retención del tracto urinario superior, lo que provoca dolor en el costado, deterioro de la función renal, pielonefritis obstructiva e incluso sepsis, y, por lo tanto, a menudo se requiere una intervención quirúrgica. Sin embargo, incluso los catéteres completamente obstruidos a menudo pasan desapercibidos, ya que la orina todavía puede fluir a lo largo del catéter disfuncional[60,61].

2. La albúmina

2.1 Descripción general

La albúmina es una proteína soluble en agua que se encuentra principalmente en la sangre y sintetizada por el hígado. Es una de las proteínas más abundantes en el plasma sanguíneo y desempeña diversas funciones esenciales en el organismo (Figura 3.5). La concentración normal de albúmina en sangre humana oscila entre 3,5 y 5,0 gramos por decilitro y supone alrededor del 50 % de la proteína plasmática. En cuanto a la albúmina en la orina, normalmente no debería haber una cantidad significativa presente. En condiciones normales, se considera que la excreción de albúmina en la orina se encuentra entre 1,6 y 34,2 mg/día, lo que equivaldría a una concentración de 1-23mg/L[62].

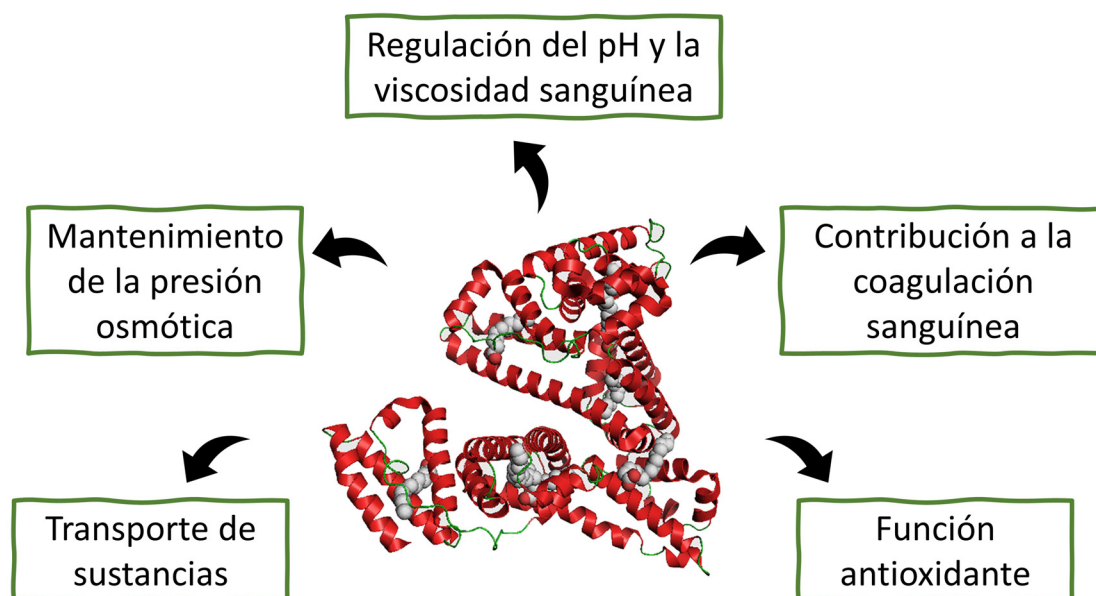


Figura 3.5 Estructura terciaria de la albúmina y sus principales funciones en el organismo.

Además de su papel fisiológico, los niveles de albúmina en sangre pueden ser utilizados como un indicador importante de la función hepática y renal, así como del estado nutricional del individuo. Valores bajos de albúmina en sangre (hipoalbuminemia) pueden estar asociados con enfermedades hepáticas, renales o gastrointestinales, desnutrición o inflamación crónica. Entre las enfermedades renales destaca el síndrome nefrótico, un trastorno renal caracterizado por la presencia de proteinuria masiva en orina. Una de las proteínas más comúnmente afectadas en el síndrome nefrótico es la albúmina, lo que resulta en niveles anormalmente bajos de esta proteína en la sangre y altos en orina. La albumina es una proteína de tamaño relativamente grande (60 kD) que normalmente se retiene en el torrente sanguíneo debido a su carga eléctrica negativa y su tamaño molecular. Sin embargo, en el síndrome nefrótico, hay una alteración en la barrera de filtración glomerular en los riñones que permite que la albumina y otras proteínas pasen a través de los glomérulos y se excreten en la orina.

2.2 Efecto dual de las proteínas en la cristalización

La albúmina es una de las proteínas más abundantes en la orina y en la matriz orgánica de los cálculos renales[62], siendo su presencia más pronunciada en los cristales inducidos en orinas procedentes de formadores de cálculos[63]. Como ya se ha comentado en el capítulo anterior, las proteínas presentan un papel dual en la

cristalización patológica, ya que se han descrito tanto estudios donde su efecto es inhibitorio y como otros donde tendría un efecto promotor.

Para el CaP, un estudio reciente[64] mostró que la albúmina de suero humano tuvo un efecto inhibitorio global en la nucleación en todas las concentraciones utilizadas (0,5 a 5 mg/L), mientras que en la fase de crecimiento de cristales de CaP parecía tener una actividad dual: concentraciones bajas mostraron inhibición, mientras que concentraciones más altas promovieron el crecimiento de cristales.

Para el OxCa, se observó que la albúmina tanto inmovilizada en superficies como libre en disolución promueve la nucleación de cristales de OxCa cuando se expone a una disolución metaestable de este[65,66]. En este caso la nucleación mediada por la albúmina conduce exclusivamente a la formación de cristales de COD, teniendo más efecto la extraída de orinas de no formadores de cálculos. Es por este motivo que dichos autores destacaron tal efecto promotor como protector. Así, la nucleación de un gran número de pequeños cristales COD permitiría su fácil eliminación y disminuir la saturación del OxCa evitando el crecimiento y la agregación de cristales y la posterior formación de cálculos. Otro estudio[67] respaldó esta teoría al observar que la albúmina no solo inhibe la nucleación de COM, sino que también promueve la formación de COD, el cual se expulsa por la orina más fácilmente que el COM. En cambio, resultados no publicados de nuestro laboratorio mostraron que la albúmina no presentó efecto de nucleante heterogéneo de la cristalización del OxCa con una concentración máxima testada de 1 g/L[68].

Por otro lado, en otros estudios realizados no tuvo efectos sobre el crecimiento del OxCa[69,70] a una concentración máxima de 100 mg/L, pero sí sobre su agregación de manera dependiente de su concentración[66,70–72]. Parece que la albúmina ejercería su papel como modulador a partir de la interacción de los grupos carboxilo de los aminoácidos con el calcio de los cristales[65], siendo los residuos ácidos de arginina y lisina las que interaccionarían con el calcio de los cristales COM[73]. Así, estas interacciones provocarían el recubrimiento de los cristales por la albúmina[74], lo que parece prevenir o al menos retrasar la agregación cristalina del OxCa, a menudo más allá del tiempo de tránsito urinario a través del riñón[75,76].

Materiales y métodos

1. Estudio del efecto del fitato en la formación de depósitos cálcicos y la adhesión bacteriana

1.1 Reactivos y disoluciones

Los componentes de la orina artificial, medio en el cual se llevan a cabo todos los experimentos, así como la albúmina y glucosa utilizados se obtuvieron de las casas comerciales Panreac (Montcada i Reixac, Barcelona, Spain), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y Fisher Scientific TM (Waltham, Massachusetts, USA). Todos los reactivos se disolvieron en agua desionizada y ultrapura obtenida de un sistema Milli Q.

Para el estudio del efecto del fitato en la cristalización cálcica y la adhesión bacteriana la OA utilizada se preparó mezclando el mismo volumen de dos disoluciones, la disolución A y la disolución B (Tabla 3.1). Además, a la disolución B se le añadió glucosa (20 g/L), que actuó como fuente de carbono para el crecimiento bacteriano; la albúmina (2g/L), que se añadió para mimetizar los restos proteicos presentes en la orina infectada; y también se agregaron diferentes cantidades de fitato sódico (P8810, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.) (0, 2.4, o 4.8 μ M). El pH de cada disolución se ajustó a 6,5, condición que favoreció la cristalización conjunta del fosfato cálcico (HAP y BRU) y el oxalato cálcico monohidratado (COM).

Tabla 3.1 Composición de la orina artificial para la cristalización de BRU/COM en estático y flujo.

Disolución A			Disolución B		
Na ₂ SO ₄ · 10H ₂ O	6,23 g/L	19,34 mM	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	2,41 g/L	15,45 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,46 g/L	5,92 mM	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	5,6 g/L	15,64 mM
NH ₄ Cl	4,64 g/L	86,75 mM	NaCl	13,05 g/L	223,31 mM
KCl	12,13 g/L	162,69 mM	Na ₂ C ₂ O ₄	0,08 g/L	0,6 mM
CaCl ₂	0,34 g/L	8,5 mM			

1.2. Sistema de cristalización en estático (*Batch*)

Los experimentos de cristalización para la formación de depósitos sobre secciones de catéter se realizaron en un sistema en estático. El sistema estático utilizado para el estudio del efecto del fitato en la cristalización cálcica y la adhesión bacteriana consistió en tubos Falcon estériles de 50 mL (Figura 3.6). Cada tubo contenía una sección de catéter doble J de silicona hidrovestido de 1,5 cm de largo (BCHG64, Coloplast, Humle-baek, Dinamarca) unido a una aguja como soporte que quedaba sin estar fijada dentro de la disolución de orina artificial (Figura 3.6). Cada tubo Falcon se llenaba con 20 mL de disolución A y 20 mL de disolución B de la orina artificial (Tabla 3.1).

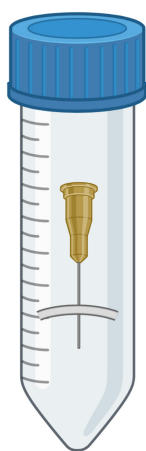
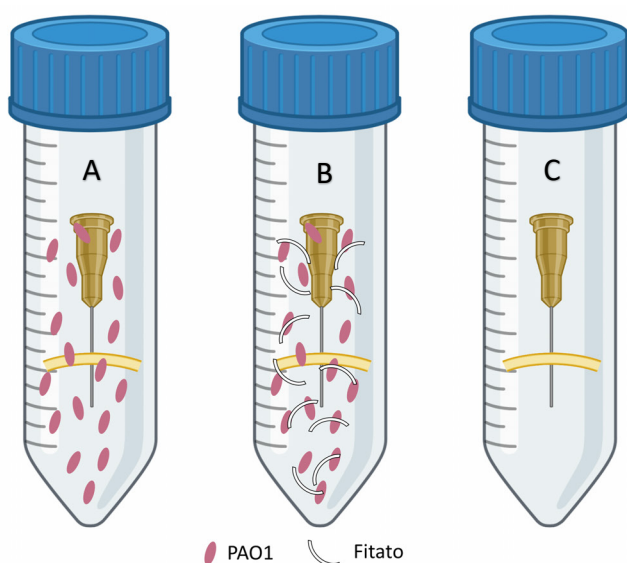


Figura 3.6 Modelo del sistema estático (*Batch*) utilizado en el **Ensayo de adhesión bacteriana**. Consta de una sección de 1,5 cm de un catéter de silicona hidrocubierto clavado a una aguja que funciona como soporte. Para realizar los experimentos, una sección de catéter de 1,5 cm con la aguja se incubó con 40 mL de orina sintética (pH 6,5) a 37 °C durante 24 horas dentro de un tubo Falcon de 50 mL.

1.3. Ensayos de adhesión bacteriana

Los ensayos de unión bacteriana se realizaron utilizando la cepa de referencia PAO1 de *P. aeruginosa*, que se aisló originalmente de una herida infectada[77]. Para estos ensayos, la cepa se cultivó durante 18 horas a 37 °C en orina artificial sin InsP6.



PAO1 Fitato

Figura 3.7 Esquema de las condiciones en las cuales se desarrollaron los ensayos bacterianos. Se colocaron las secciones de catéter de 1,5 cm en tubos Falcon con 40 mL de OA y A) en presencia de bacterias de la cepa PAO1, B) en presencia de PAO1 e InsP6 a distintas concentraciones (1,2 y 2,4 μM) y C) sin bacterias ni fitato (Control negativo).

Las secciones de catéter doble J de 1,5 cm se colocaron en tubos estériles que contenían 40 ml de orina artificial (20 ml de disolución A + 20 ml de disolución B) en ausencia (Figura 3.7 A) o presencia fitato (0, 1,2 o 2,4 μM , Figura 3.7 B). Los tubos se inocularon con células bacterianas de *P. aeruginosa* PAO1 que se cultivaron durante la noche anterior en OA sin fitato hasta una concentración final de 10⁸ células bacterianas viables/mL. En paralelo se procesó un control negativo consistente en la incubación de una sección de catéter en ausencia de bacterias y fitato (Figura 3.7 C). La incubación de los tubos con las secciones en las distintas condiciones descritas se llevó a cabo durante 24 horas a 37 °C sin agitación.

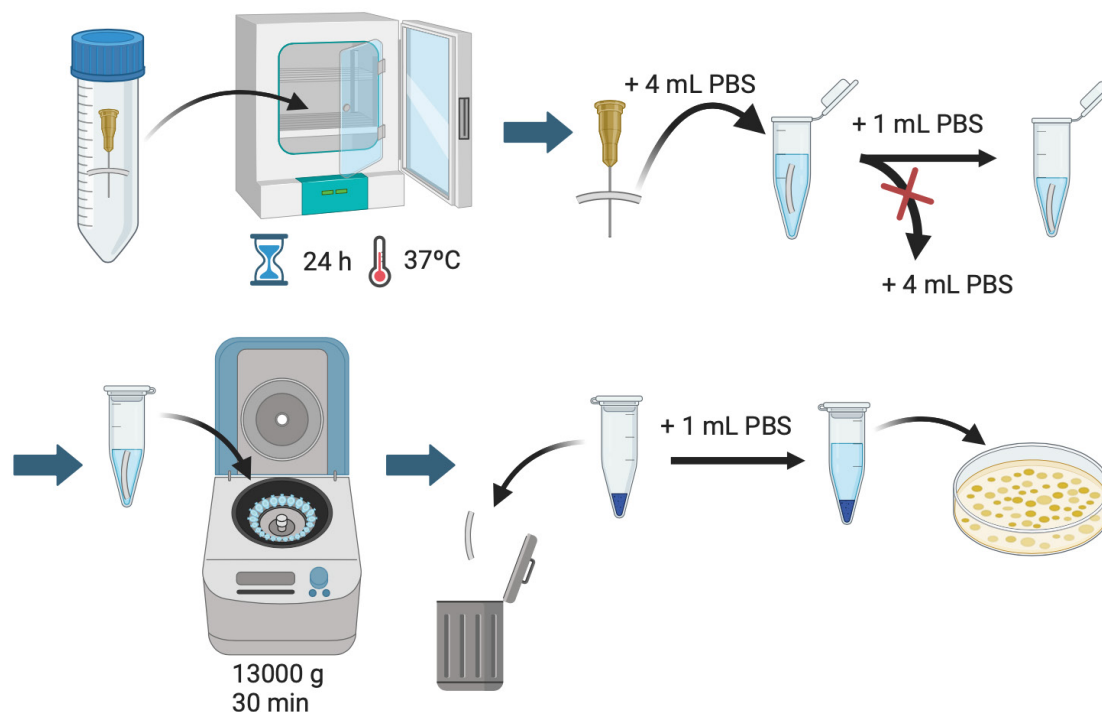


Figura 3.8 Esquema del procedimiento para la incubación, extracción, siembra y contaje de las bacterias PAO1.

Después de esta incubación, las secciones del catéter se transfirieron a nuevos tubos de microcentrífuga estériles utilizando fórceps estériles y se enjuagaron con 4 ml de disolución salina tamponada con fosfato (PBS, Ref. 806552, Sigma-Aldrich) estéril para eliminar las bacterias no adheridas. A continuación, las secciones del catéter se colocaron en nuevos tubos de microcentrífuga que contenían 1 mL de PBS que se centrifugaron a 13 000 g durante 30 minutos para recolectar las células bacterianas. Finalmente, se desecharon las secciones del catéter y el sedimento de bacterias

desprendido de los catéteres se resuspendió en 1 mL de PBS. Las células bacterianas se cuantificaron sembrando diluciones apropiadas de la suspensión bacteriana en placas de agar Luria Bertani. Este procedimiento se encuentra esquematizado en la Figura 3.8. Los resultados se expresaron como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml de PBS.

1.4 Protocolo de determinación del calcio para el estudio del efecto del fitato en la cristalización cálcica y la adhesión bacteriana

Para la determinación de los depósitos cálcicos formados en la superficie de las secciones de catéteres ureterales se utilizó el método colorimétrico Arsenazo III e imadazol como tamponador[78]. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Después de 24 horas, los depósitos formados en la superficie de la sección catéter se disolvieron mediante la adición de 1 mL de HCl 1 M y 1 mL de H₂O. Seguidamente se vortexó y se dejó reposar durante 30 minutos. Después de ese tiempo se hicieron las diluciones pertinentes y se ajustó cada una de ellas a pH 3 para su análisis.

2. Estudio del efecto de la albúmina y de distintos compuestos en la formación de depósitos cálcicos y de ácido úrico en estático y flujo

2.1 Reactivos y disoluciones

Los componentes de la orina artificial, medio en el cual se llevan a cabo todos los experimentos, se obtuvieron de las casas comerciales Panreac (Montcada i Reixac, Barcelona, Spain), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y Fisher Scientific TM (Waltham, Massachusetts, USA). El fitato se preparó a partir de su sal de sodio (Ref. 68388, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Alemania). El alendronato (ID 53141945), pamidronato (ID 60704450) e ibandronato (ID 46946205) se prepararon a partir de su sal de sodio y se obtuvieron de la casa comercial Molekula. El etidronato (Ref. 54342) se obtuvo de la casa comercial Sigma-Aldrich. El citrato (Ref. C7254) se preparó a partir de su sal sódica y se obtuvo de la casa comercial Sigma-Aldrich. Todos los reactivos se disolvieron en agua desionizada y ultrapura obtenida de un sistema Milli Q.

2.1.1 Experimentos de formación de depósitos cálcicos

Para los experimentos de formación de depósitos de OxCa y fosfato cálcico (BRU y HAP) sobre secciones tygon la disolución de orina artificial se obtuvo al mezclar volúmenes iguales de disolución A y disolución B, que fueron previamente ajustadas a un pH de 6 para el OxCa, a un pH de 6,5 para la BRU y a pH 7 para la HAP. En la Tabla 3.2 se resumen las concentraciones finales de pH, fósforo, calcio y oxalato utilizadas para cada tipo experimental.

Tabla 3.2 Resumen de las condiciones de las distintas cristalizaciones cálcicas:

	pH	ppm P	ppm Ca	ppm Ox
OxCa	6	482	170	40
BRU	6,5	482	170	-
HAP	7	482	170 (estático) 120 (flujo)	-

2.1.1.1 Experimentos de formación de depósitos de brushita y oxalato cálcico

Para la cristalización de BRU y COM sobre secciones de tygon la OA se preparó mezclando el mismo volumen de dos disoluciones, la disolución A y la disolución B (Tabla 3.1). Estas fueron previamente ajustadas a pH 6,5 para favorecer la formación de BRU y a 5,7 para favorecer la cristalización de COM.

2.1.1.2 Experimentos de formación de depósitos de hidroxiapatita

Por otro lado, la orina artificial utilizada en la cristalización en estático de la HAP sobre secciones de tygon se preparó mezclando el mismo volumen de las dos disoluciones (A y B) descritas en la Tabla 3.3. Estas fueron previamente ajustadas a pH 7 para favorecer su cristalización. Para los experimentos en flujo se disminuyó la concentración de calcio a 0,24 g/L.

Tabla 3.3 Composición de la orina artificial para la cristalización de la HAP.

Disolución A			Disolución B		
Na ₂ SO ₄ · 10H ₂ O	6,23 g/L	19,34 mM	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	2,41 g/L	15,45 mM
NH ₄ Cl	4,64 g/L	86,75 mM	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	5,6 g/L	15,64 mM
KCl	12,13 g/L	162,69 mM	NaCl	13,05 g/L	223,31 mM
CaCl ₂	0,34 g/L	8,5 mM			
	0,24 g/L	6 mM			

2.1.2 Experimentos de formación de depósitos de ácido úrico

Para la cristalización del AU se descartó preparar la orina artificial con dos disoluciones por separado (A y B) e igual que con los ensayos turbidimétricos, también se utilizó orina artificial doble concentrada (OADC) (Tabla 3.4) ajustada a pH 5,4. Así se permite preparar la disolución de AU 2 g/L a parte y no integrada en una de las dos disoluciones, lo que permite probar diferentes concentraciones de AU y utilizar siempre la misma disolución de OADC preparada desde el inicio. Esto resultó muy útil al optimizar el método de cristalización de AU sobre secciones tygon.

Tabla 3.4 Composición de la orina artificial para los ensayos de cristalización del ácido úrico.

Compuesto	g/L	mM
Na ₂ SO ₄ .10H ₂ O	6,23	19,34
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,46	5,93
NH ₄ Cl	4,64	86,75
KCl	12,13	162,6
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2,41	15,45
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	5,6	15,64
NaCl	13,05	223,08

Igual que con los ensayos turbidimétricos, también se preparó una disolución madre de AU 2 g/L ajustada a pH 10,7 para disolver bien todo el AU. A partir de aquí se mezclaron las cantidades siguientes de OADC, H₂O y AU 2 g/L para obtener la disolución de AU de 200 ppm, que se ajustó a pH 4,92:

- **AU 200 ppm:** 45 mL de OADC + 45 mL de H₂O + 10 mL AU 2g/L

2.2. Sistemas de cristalización para el estudio de formación de depósitos cálcicos y de ácido úrico sobre secciones de la marca tygon

Para el estudio del efecto de la albúmina y de distintos compuestos en la formación de depósitos en estático y flujo de BRU, COM, HAP y AU se sustituyeron las secciones de catéteres ureterales (BCHG64, Coloplast, Humle-baek, Dinamarca) por secciones de la marca comercial tygon (Ref 3350) después de comprobar que se daba un nivel de cristalización equiparable.

2.2.1 Sistema de cristalización en estático (*Batch*).

Para estudiar el efecto de la albúmina y de distintos compuestos en la formación de depósitos cálcicos (OxCa, BRU y HAP) y de AU sobre secciones tygon en estático se usaron unos recipientes de 30 mL (Deltalab, Ref. 409426) cuya tapa permitía la fijación de la aguja, lo que evitaba su desplazamiento dentro de la disolución de orina artificial (Figura 3.9). Cada frasco de orina se llenaba con 15 mL de disolución A y 15 mL de disolución B para conformar la orina artificial. En el caso de los experimentos en estático, sea cual fuere el material utilizado, una vez rellenado el recipiente se dejaba reposar a 37°C durante 24 horas.

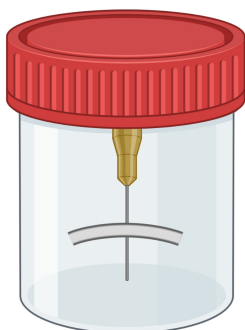


Figura 3.9 Modelo del sistema estático (*Batch*) utilizado en los estudios de formación de depósitos sobre secciones tygon. Constó de un recipiente de 30 mL (Deltalab, Ref. 409426) cuya tapa permitía la fijación de la aguja, y, por lo tanto, evitaba el desplazamiento de la sección de tygon por el medio de incubación.

2.2.2 Sistema de cristalización en flujo.

El modelo usado en el grueso de los experimentos se observa en las figuras 3.10 y 3.11, donde se ilustran tanto de la cápsula como del montaje utilizado para los experimentos. La cápsula utilizada como recipiente consistió en un tubo SPE de 20 mL cortado por la mitad. El tubo llevaba un tapón con un agujero que permitía la salida de los desechos hacia un recipiente (Figura 3.10 c), mientras que la unión de la cápsula a una T de tres vías permitió la entrada de las disoluciones A y B (Figura 3.10 a y b respectivamente).

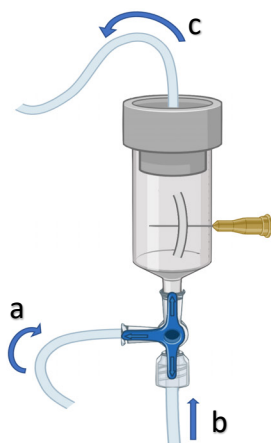


Figura 3.10 Esquema de la cápsula utilizada para el sistema en flujo definitivo. Contiene la sección de tygon de 1,5 cm enganchado a la aguja como soporte. La cápsula se encuentra conectada a una T (mecanismo de 3 vías), mediante la cual recibe la disolución A con el calcio (por a) y la disolución B con los compuestos a testar (por b). Una vez la cápsula está llena se va vaciando por c, hasta terminar en un recipiente (*waste*).

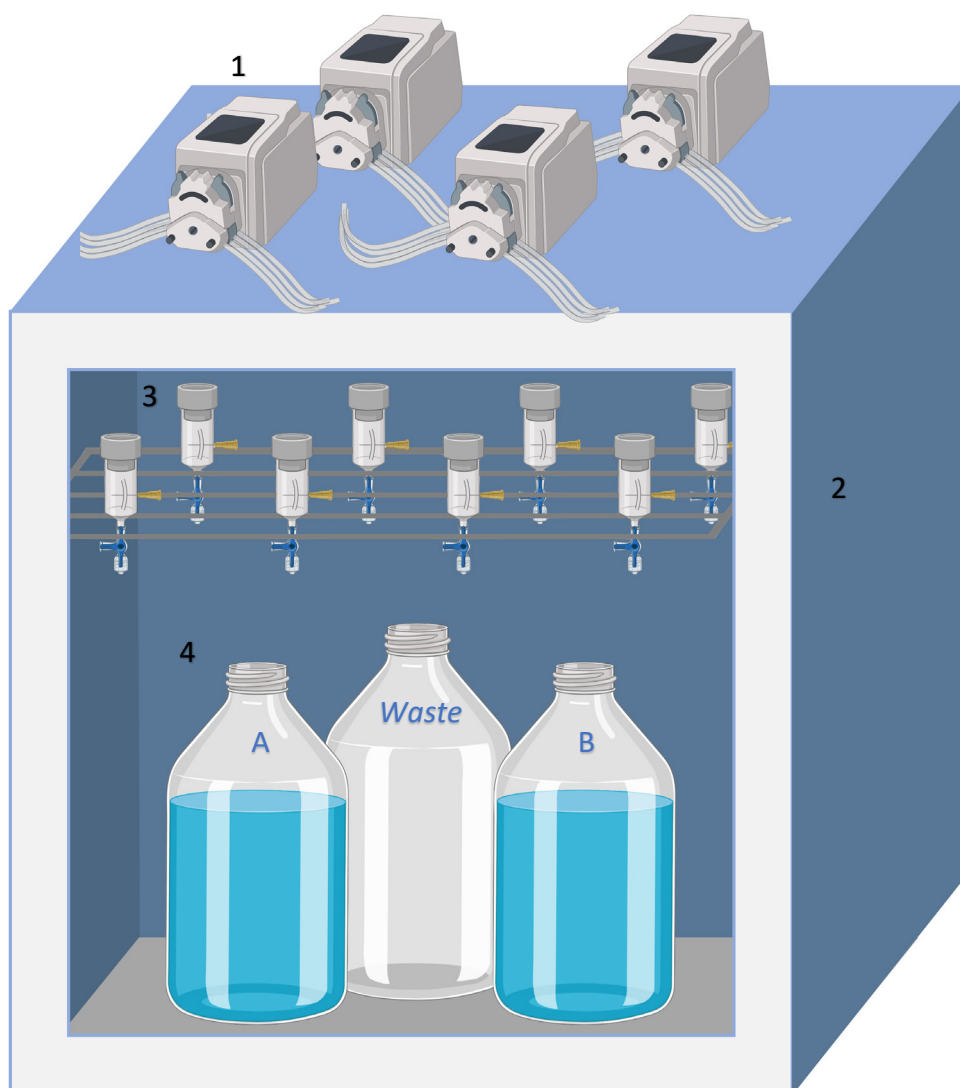


Figura 3.11 Esquema del sistema en flujo definitivo utilizado para la cristalización cálcica sobre las secciones tygon. El montaje del sistema de flujo se encuentra compuesto por 1) 4 bombas peristálticas, cada una de las cuales puede hacer fluir la disolución por 4 tubos 2) estufa a 37 °C, 3) gradilla con 8 cápsulas, cada una de ellas conectada a las dos disoluciones (A y B) y al waste, 4) Las disoluciones utilizadas, en este caso la disolución A, la disolución B y el waste.

Para obtener siempre una $n=4$ por grupo, teniendo en cuenta que 1 de los catéteres por grupo se utilizaría para mirar los cristales en el microscopio electrónico de barrido, fueron necesarias 8 cápsulas y, consecuentemente, 4 bombas peristálticas (Figura 3.11). El flujo establecido para cada bomba era de 0,26 mL/ minuto, teniendo en cuenta que la micción un adulto sano con dos riñones es de 1,5 L por día. El experimento tubo una duración de 48 horas, por lo que era necesario partir de 4 L de disolución A y B, que se tenían que ir renovando cada día. De la misma manera, el waste tenía que vaciarse 1 vez por la mañana y 1 vez por la tarde, para evitar derrames. En caso de querer

probar inhibidores de la cristalización, estos eran añadidos a la disolución B, igual que ocurre en el sistema en estático.

2.3. Procedimiento para el revestimiento de secciones tygon con albúmina

El estudio del efecto de la albúmina en la formación de depósitos sobre secciones tygon se realizó mediante dos vías. La primera fue considerando el efecto que podría tener su presencia en la disolución de OA a una concentración de 0,1 g/L. La segunda fue considerando su efecto como capa de materia orgánica (MO) formada previamente en la superficie de las secciones tygon. Para el estudio de esta segunda vía, grupos de secciones de tygon de 1,5 cm se revistieron con albúmina. Para ello las secciones se introdujeron en recipientes (Deltalab, Ref. 409426) con 30 mL de albúmina 1 g/L, se mantuvieron en el agitador orbital a 50 rpm durante 50 minutos y se dejaron secar a temperatura ambiente toda la noche antes de su uso (Figura 3.12).

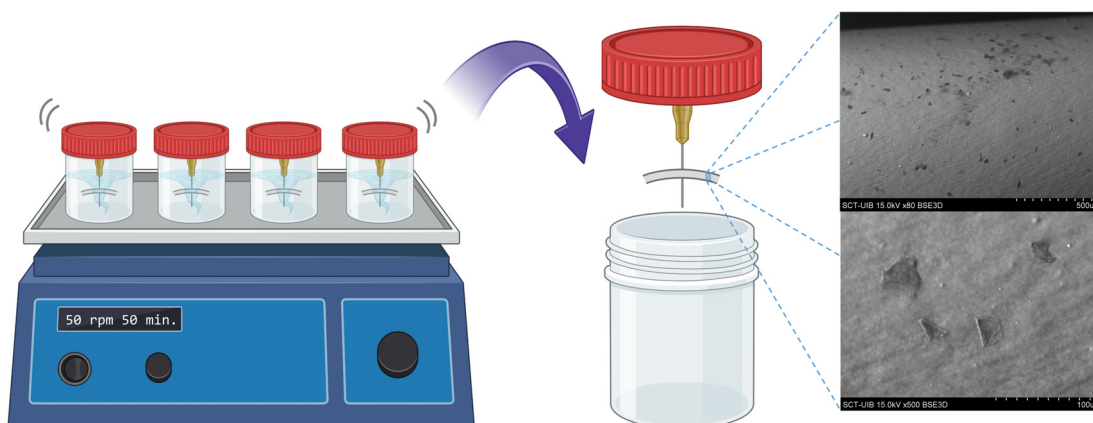


Figura 3.12 Procedimiento llevado a cabo para revestir los trozos de tygon de 1,5 cm. Se llenó cada recipiente con 30 mL de disolución de albúmina 1 g/L y se dejaron en agitación orbital a 50 rpm durante 50 minutos.

2.4. Adaptación del método de Lowry para la determinación de la albúmina en placas de 96 pocillos

2.4.1 Reactivos

La concentración de los puntos de la recta patrón, así como su preparación se encuentran descritos en la Tabla 3.5. Los reactivos utilizados para llevar a cabo a determinación de albúmina de la superficie de las secciones de tygon de 1,5 cm incubadas en albúmina 1 g/L se describen en la Tabla 3.6.

Tabla 3.5 Recta de calibrado para la determinación de albúmina.

Concentración (g/L)	0	0,025	0,05	0,1	0,15	0,2
Albúmina 1 g/L (μL)	0	25	50	100	150	200
Tampón de homogenización (μL)	1000	975	950	900	850	800

El calibrado se preparó en tampón de homogenización y no agua porque presentó unos resultados más precisos y estables (Anexo 3, apartado 1).

Tabla 3.6 Reactivos utilizados para la determinación de albúmina.

Tampón de homogenización compuesto por:	Sacarosa 250 mM	Tris-HCl 10 mM	pH 7,4
Reactivo de Lowry compuesto por:	A: Disolución de Na ₂ CO ₃ 4% en NaOH 0,2 M	B: Disolución de CuSO ₄ 1%	C: Disolución Tartrato sódico-potásico 2%
En el momento de iniciar el ensayo, las disoluciones A, B y C se mezclan en proporción 50:1:1 (en volumen).			
Reactivo Folin-Ciocalteu , que inmediatamente antes de su uso se diluye con agua destilada en una proporción 1:2.			
Disolución patrón de albúmina de suero bovino (BSA) de concentración 1 g/L.			

2.4.2 Procedimiento

Para el procesamiento de las muestras, una vez se hubo revestido la sección el tiempo deseado y secado durante 24 horas, se introdujo en un tubo de microcentrifuga de 2 mL. A este se le añadió 1,5 mL de tampón de homogenización. Posteriormente, se dejó sonicar la muestra durante 50 minutos para que la capa se despegara de la sección. Este procedimiento se comprobó que no causaba la degradación de la albúmina utilizando uno de los puntos del patrón (Anexo 1, apartado 1).

Para llevar a cabo la placa se pipetearon primeramente 175 μL de la muestra/patrón, 125 μL del Reactivo de Lowry y 25 μL del reactivo de Folin diluido 1:2. Posteriormente se agitó y dejó reposar la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente a oscuras. Transcurrido ese tiempo se midió la absorbancia a 700 nm. La concentración de proteínas de la muestra problema se determinó a partir del calibrado.

2.5 Protocolo de determinación del calcio para el estudio del efecto de la albúmina y de distintos compuestos en la cristalización en estático y flujo

Para la cuantificación de los depósitos cálcicos formados en la superficie de las secciones de tygon se utilizó un nuevo protocolo modificado del Arsenazo III en el que en vez de Imidazol como tamponador se utilizó acetato sódico (AcONa), de manera que ya no fue necesario tener que ajustar cada una de las diluciones de las muestras a pH 3, por lo que se ahorró mucho tiempo durante el procedimiento. En este protocolo las muestras se disolvieron con 1 mL de HCl 2 M, se vortearon y se dejaron reposar 30 minutos para favorecer la disolución de los cristales en el ácido. Posteriormente se le añadió 1 mL de AcONa 3,62 mM y 6 mL de H₂O. Todas las diluciones se realizaron en tampón AcONa-HCl. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

2.6 Método de determinación de ácido úrico para los cristales formados en la superficie de las secciones tygon adaptado a placas de 96 pocillos

2.6.1 Fundamento

Para determinar la concentración del ácido úrico formado tanto en los experimentos en flujo (Figura 3.11), como en estático (Figura 3.9), se llevó a cabo una adaptación del método colorimétrico para el ácido úrico[79] mediante su reacción con el ácido fosfotúngstico, que lo reduce a azul de tungsteno en presencia de carbonato sódico, siendo la intensidad del color proporcional a la concentración de ácido úrico en la muestra. La optimización del método con las distintas condiciones probadas se encuentra recogida en el Anexo 2.

2.6.2 Procesamiento de las secciones de tygon 3350

Primeramente, las secciones de tygon de 1,5 cm fueron introducidos en tubos de microcentrífuga de 1 mL de la marca eppendorf después de cada experimento. Para disolver los cristales se introdujo 300 μ L de NaOH 0,5 M y se vorteo la muestra. Al disolver los cristales con NaOH no se podía llevar a cabo la determinación de AU por el método de la uricasa, ya que el pH interfería en el método.

2.6.3 Recta patrón

Se prepararon 50 mL de una disolución madre de ácido úrico de 1 g/L. A partir de ésta, se hicieron las diluciones indicadas en la Tabla 3.7 que componen cada uno de los puntos de la recta patrón del ácido úrico.

Tabla 3.7 Concentraciones de los patrones la determinación del ácido úrico.

Conc. (ppm)	1 g/L AU (μ L)	H ₂ O (mL)
0	0	10
10	100	9,9
20	200	9,8
30	300	9,7
40	400	9,6
50	500	9,5
60	600	9,4
70	700	9,3

2.6.4 Reactivos y lectura de la placa

Se pipetearon 250 mL de muestra, 50 μ L de CONa 10% y 50 μ L de la dilución de Folin. La placa se dejó reposar durante 20 minutos y la lectura se llevó a cabo a 700 nm. La preparación de los reactivos fue la siguiente:

- **Carbonato sódico (CONa) al 10%:** mezclando 10g de carbonato sódico con 100 mL de H₂O.
- **Reactivo de Folin (Ref. F9252, Sigma-Aldrich):** contiene ácido tugstónico. Se llevó a cabo una dilución 1/5.

3. Estudio cristalográfico

Las características morfológicas y estructurales de los depósitos que se formaron en la superficie de las secciones (tanto del catéter doble J como en tygon 3350) se examinaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, Hitachi S-3400N) junto con microanálisis dispersivo de energía RX (Bruker AXS XFlash Detector 4010). Los catéteres se lavaron con agua Mili-Q para eliminar los residuos de orina artificial y evitar la formación de cristales de NaCl y KCl. Después de lavarlos, se dejaron secar durante 1 día a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones se pegaron en un porta muestras con cinta adhesiva para evitar su desplazamiento y se observaron en el SEM sin ninguna otra preparación.

4. Análisis estadístico

Se utilizaron gráficos de normalidad para evaluar las distribuciones de datos. Los datos se presentaron como medias y errores estándar de las medias (SEM). Las variables paramétricas independientes se compararon usando una ANOVA de un factor con la prueba post hoc de Bonferroni para la comparación de más de dos grupos, y la T-student para la comparación entre dos grupos independientes. Para las variables no paramétricas independientes se utilizó la prueba de Mann Whitney para la comparación de dos grupos. Un p-valor de dos colas inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS versión 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

Resultados

1. Estudio del efecto del fitato en la formación de depósitos cálcicos y la adhesión bacteriana

1.1 Optimización de la cristalización sobre catéter doble J en ausencia de fitato

Para estudiar la cristalización de la BRU y el OxCa sobre secciones de catéter doble J se preparó la OA descrita en la Tabla 3.1 y se ajustó a 4 pHs distintos: 6; 6,2; 6,3 y 6,5. Así fue posible observar tanto la cantidad como los tipos de depósitos formados en cada uno de los pH testados.

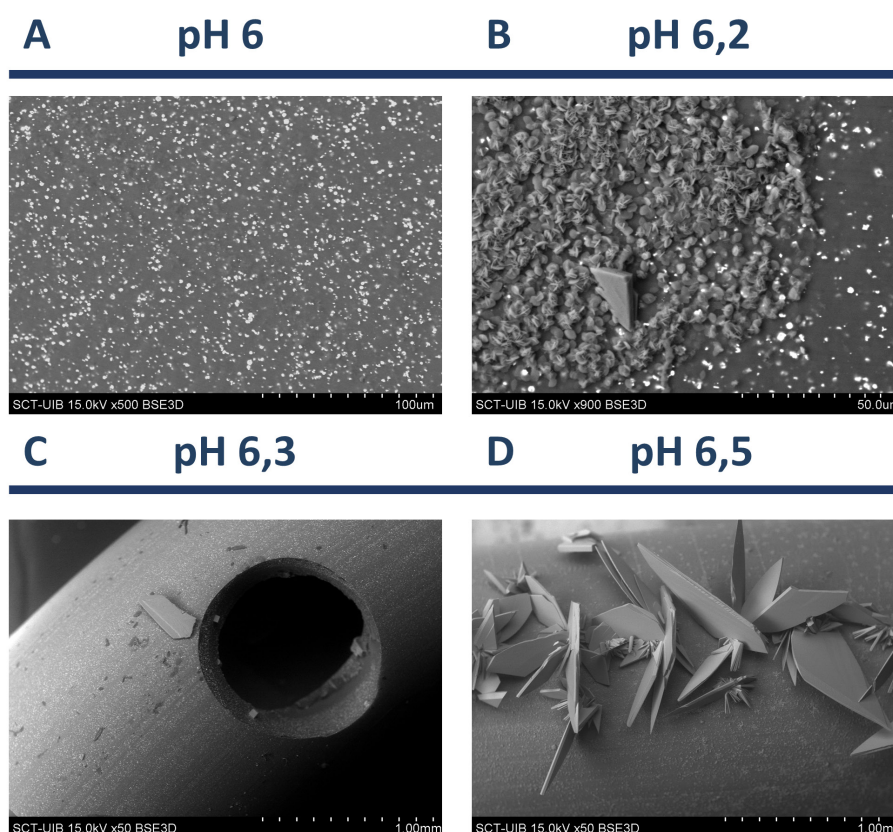


Figura 3.13 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las secciones de catéter después de su incubación en OA con 0,17 g/L de calcio, 40 ppm de oxalato, 1 g/L albúmina y 1% glucosa; a pH A) 6 B) 6,2 C) 6,3 y D) 6,5.

Usando la OA ajustada a un pH 6 (Figura 3.13 A) no se produjo ningún tipo de formación de depósito. A pH 6,2 (Figura 3.13 B), se encuentra una capa de cristales de COM de tamaño muy reducido, con presencia escasa de pequeños cristales de BRU. A pH 6,3 (Figura 3.13 C) la cantidad de cristales de BRU también es escasa, aunque de mayor tamaño. A pH 6,5 (Figura 3.13 D) ya se observa un elevado número de grandes cristales de BRU sobre una capa de COM. Así, se decidió llevar a cabo el estudio del efecto del fitato en la cristalización cálcica y la adhesión bacteriana con OA ajustada a pH 6,5 al darse una mayor cristalización cálcica a este pH.

1.2 Efecto del fitato en la formación de depósitos de fosfato y oxalato cálcico y en la adhesión bacteriana

En primer lugar, se determinó la cantidad de calcio depositado en los catéteres tras 24 horas de incubación con diferentes concentraciones de InsP6 (Figura 3.14 A). Los resultados indicaron que las secciones incubadas con InsP6 a 1,2 y 2,4 μM ($0,136 \pm 0,032$; $0,064 \pm 0,003$ respectivamente) presentaron una disminución significativa de la cantidad de calcio en comparación con el control ($0,661 \pm 0,080$). Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido mostraron que en ausencia de *P. aeruginosa* PAO1, la sección incubada sin InsP6 presentó grandes cristales de BRU con morfología plana y de cuchilla dispersadas sobre una capa de cristales individuales de COM que recubría la sección del catéter (Figura 3.15 A y B). En cambio, en las secciones incubadas sin PAO1 pero con 1,2 y 2,4 μM de InsP6 no se observó ningún cristal (Figura 3.15 C y D), solo una fina capa de materia orgánica en la superficie del catéter identificada por la presencia de fisuras debido al proceso de deshidratación.

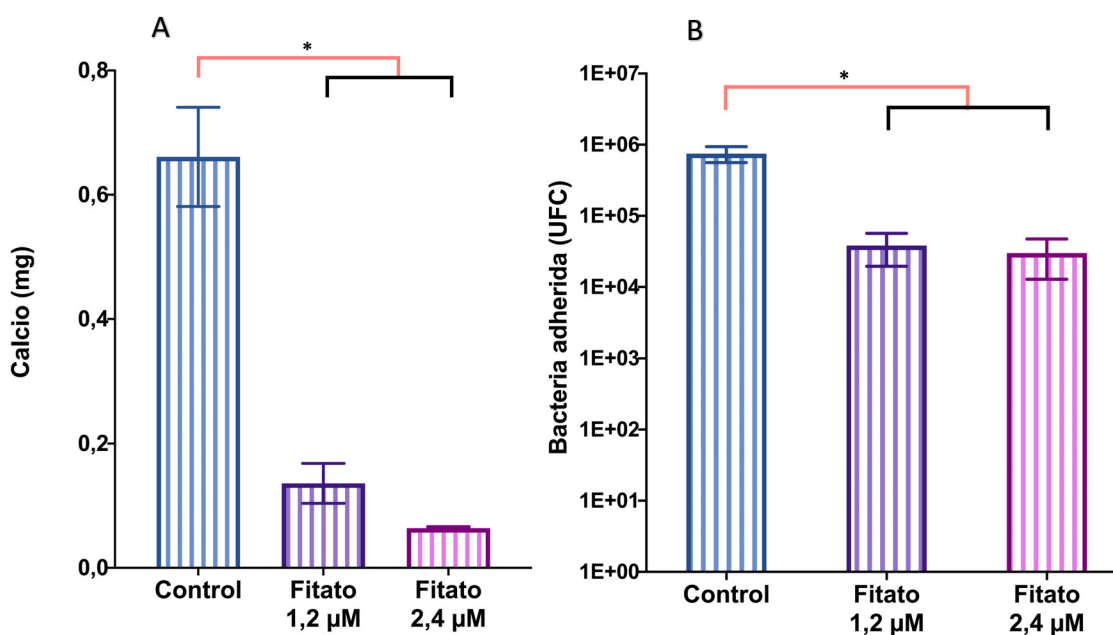


Figura 3.14 A) Efecto del fitato en la formación de depósitos de calcio en las secciones de catéter, representado como media \pm SEM. * El control (InsP6 0 μM) presentó un mayor nivel de calcio (valor de $p < 0,001$) que los grupos incubados con InsP6, pero no hubo diferencias significativas entre los grupos de InsP6 1,2 y 2,4 μM (ANOVA de un factor, prueba post-hoc de Bonferroni). B) Efecto del InsP6 en la adhesión de bacterias (*P. aeruginosa* PAO1) en las secciones de catéter, representado como media \pm SEM. * El grupo de control (0 μM de InsP6) contuvo más bacterias adheridas (valor de $p < 0,05$) que los grupos incubados con InsP6, pero no hubo diferencias significativas entre los grupos de InsP6 1,2 y 2,4 μM (ANOVA de un factor, prueba post-hoc de Bonferroni).

Otra variable determinada fue el nivel de bacterias adheridas a las secciones de catéteres después de 24 horas de incubación con diferentes concentraciones de InsP6 (Figura 3.14 B). Al igual que en los experimentos de cristalización, la cantidad de bacterias disminuyó significativamente en las secciones incubadas con InsP6 1,2 y 2,4 μM .

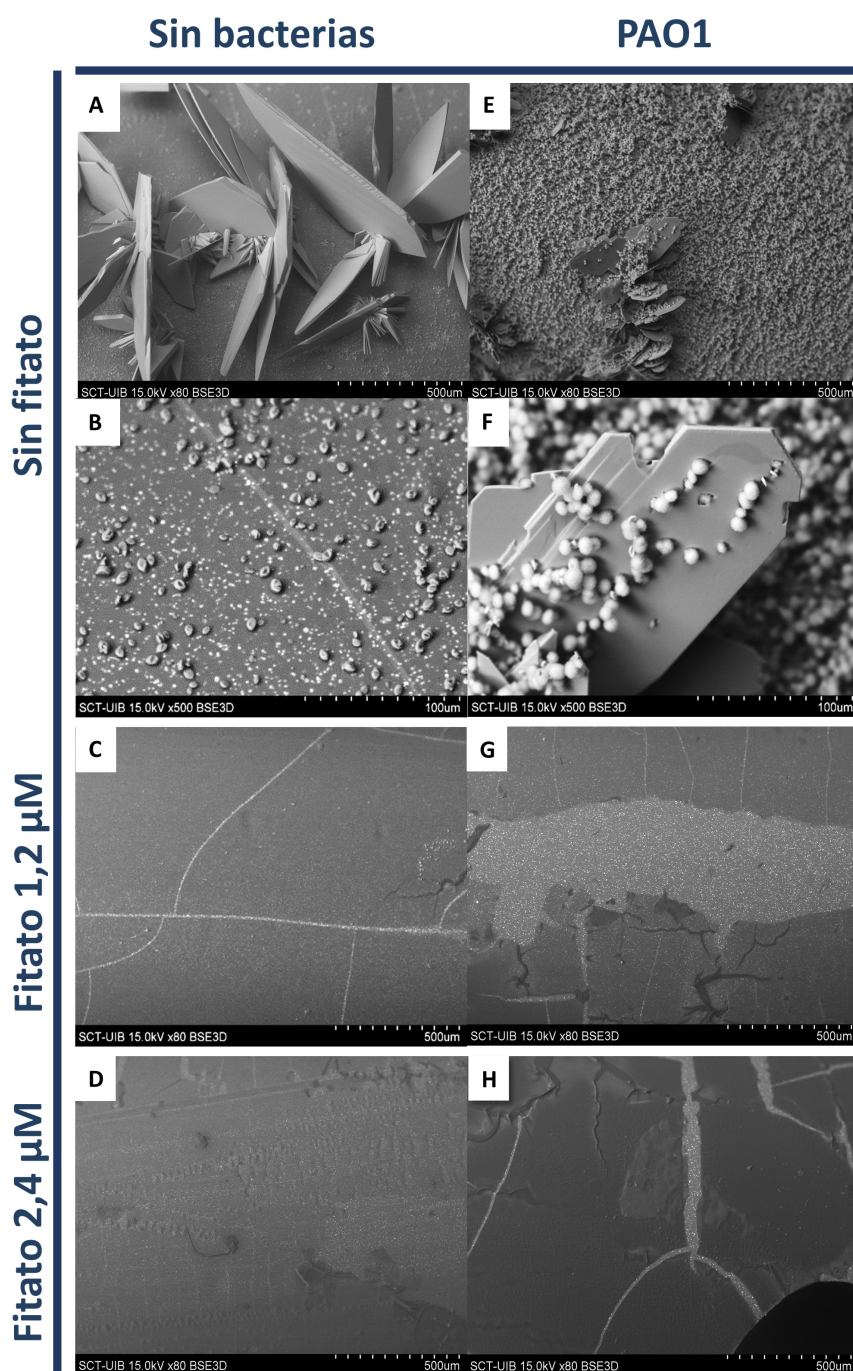


Figura 3.15 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las secciones de catéter después de su incubación en OA (170 ppm de calcio, 40 ppm de oxalato, 1 g/L albúmina y 1% glucosa) con diferentes concentraciones de InsP6 y PAO1. A y B) Sin InsP6 ni bacterias, C) A una concentración de InsP6 de 1,2 μM sin bacterias, D) A una concentración de InsP6 de 2,4 μM sin bacterias, E y F) Sin InsP6 pero en presencia de PAO1, G) En presencia de PAO1 y con una concentración de InsP6 de 1,2 μM y H) En presencia de PAO1 y con una concentración de InsP6 de 2,4 μM .

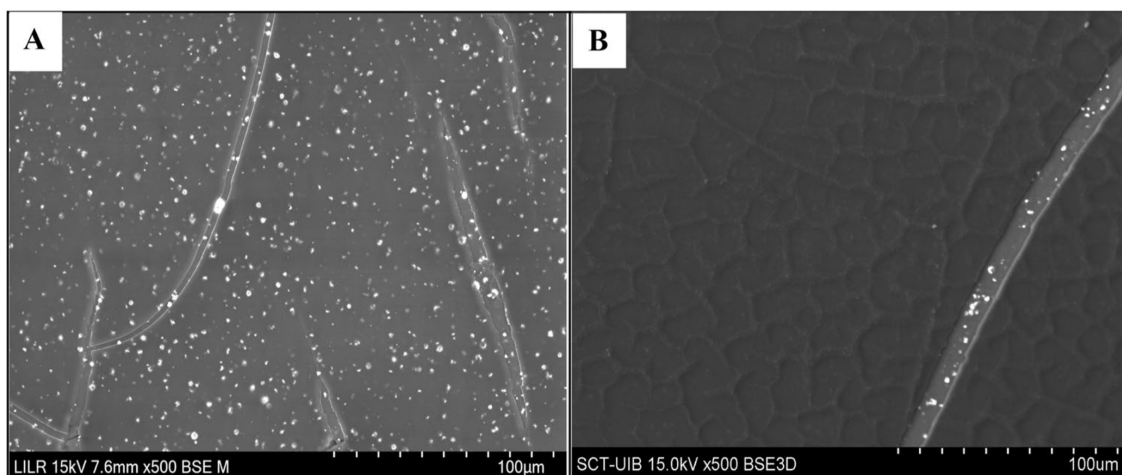


Figura 3.16 Imágenes mediante microscopía electrónica de barrido de una sección de catéter A) antes de su uso en comparación con una sección, B) después de su incubación en OA (0,17 g/L de calcio, 40 ppm de oxalato, 1 g/L albúmina y 1% glucosa, PAO1 y 2,4 μ M de InsP6).

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido de las secciones del catéter indicaron que en presencia de PAO1 se formaron cristales de BRU, HAP y COM cuando la disolución no contenía InsP6 (Figura 3.15 E). Los cristales de Bru observados eran grandes y se distribuían uniformemente sobre una capa densa de HAP. También se observó el HAP recubriendo los cristales de BRU (Figura 3.15 F). Sin embargo, solo se detectó una gran capa de materia orgánica cuando el InsP6 estaba presente en la disolución, sin presencia cristalina. Esta capa de materia orgánica se puede identificar gracias a la presencia de fisuras en la superficie de la sección (Figura 3.15 G y H). Para confirmar que la capa observada era materia orgánica y no solo el recubrimiento del catéter, se tomó una fotografía de una sección del catéter antes de su uso (Figura 3.16 A). Esta presentó una fina capa rota que corresponde al recubrimiento de los catéteres comerciales. Por otro lado, la capa formada después de la incubación del catéter con orina artificial que contiene albúmina y la glucosa es más espesa y recubre la superficie original del catéter (Figura 3.16 B).

2. Estudio del efecto de la albúmina en la formación de depósitos cálcicos y de ácido úrico en estático y flujo

2.1 Optimización de la metodología

2.1.1 Ensayos de cristalización en estático con tubo Tygon 3350: comparación de los niveles de cristalización sobre catéter doble J vs. Tygon 3350

Al ser los catéteres doble J un recurso escaso, se realizó una prueba para encontrar otro tipo de tubo que pudiera sustituirlos y utilizarse en la experimentación en su lugar. La prueba fue en estático, utilizando la misma composición de orina artificial que se usó para el estudio del efecto del fitato en la formación de depósitos de fosfato y oxalato cálcico y en la adhesión bacteriana sobre secciones de catéter doble J (Tabla 3.1), con adición de 1 g/L albúmina y 1% glucosa, a pH 6,5. Para ello se utilizaron secciones de 1,5 cm tanto de catéter ureteral (BCHG64, Coloplast, Humle-baek, Dinamarca) como en tubo de la marca tygon de silicona (Ref 3359). Los resultados se muestran en la Figura 3.17.

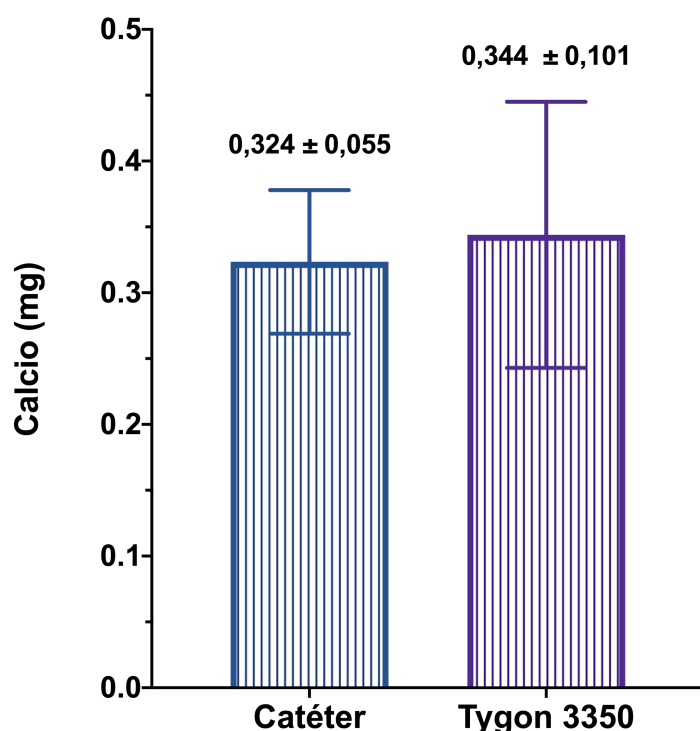


Figura 3.17 Cantidad de calcio (mg) determinada en secciones de 1,5 cm de catéter doble J y tygon 3350. Para esta prueba se utilizó una n= 2 para cada uno de los grupos de estudio.

La cantidad de calcio observada en cada uno de los tipos de sección (Figura 3.17) fue similar y sin diferencias significativas, por lo que se concluyó que se produce una cristalización similar en ambos materiales. Así, se utilizó tubo tygon (Ref. 3350) para realizar todos los siguientes experimentos.

2.1.2 Efecto de la albúmina y mucina en disolución en la formación de depósitos cálcicos sobre tygon 3350

La formación de la capa de materia orgánica (llamada *conditioning film*) sobre la superficie del catéter es el primer proceso que ocurre cuando este entra en contacto con la orina. El componente proteico del *conditioning film* es el más estudiado, aunque también contiene polisacáridos y lípidos. Los experimentos realizados hasta este punto contenían albúmina con la intención de mimetizar el componente proteico que se encuentra en la orina. Así, a continuación, se estudió cómo podría afectar la presencia o ausencia de la albúmina y mucina en la OA en la cristalización cálcica, concretamente en las condiciones de formación de BRU y COM especificadas anteriormente (Tabla 3.1), con adición de 1 g/L albúmina y 1% glucosa.

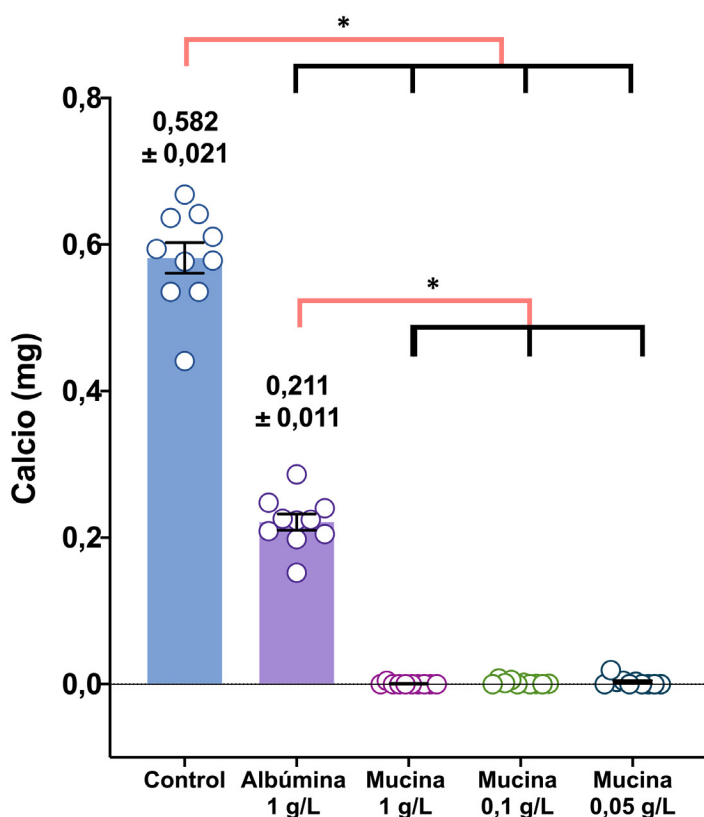


Figura 3.18 Efecto de la presencia y ausencia de albúmina y mucina en la orina artificial para la cristalización de calcio (BRU y COM) en la superficie de secciones tygon de 1,5 cm. *Diferencias significativas con un p-valor <0,001 mediante ANOVA de un factor con prueba posthoc de Bonferroni.

En ausencia de componente proteico en la orina artificial, la cantidad de calcio determinada fue significativamente mayor en comparación a la presencia de albúmina y mucina en la orina artificial (Figura 3.18). Por otro lado, la cantidad de calcio fue significativamente menor en presencia de albúmina 1 g/L en orina, mientras que en presencia de mucina a tres concentraciones distintas (0,5, 0,1 y 1 g/L) fue nula.

2.1.3 Prueba de revestimiento de las secciones tygon con albúmina durante distintos tiempos

Después de comprobar que la presencia de albúmina y mucina en disolución produjeron una menor cristalización de BRU y COM que el experimento control (Figura 3.18), se estudió el efecto de la albúmina en el nivel de formación de depósitos cálcicos y de AU sobre la superficie de secciones tygon.

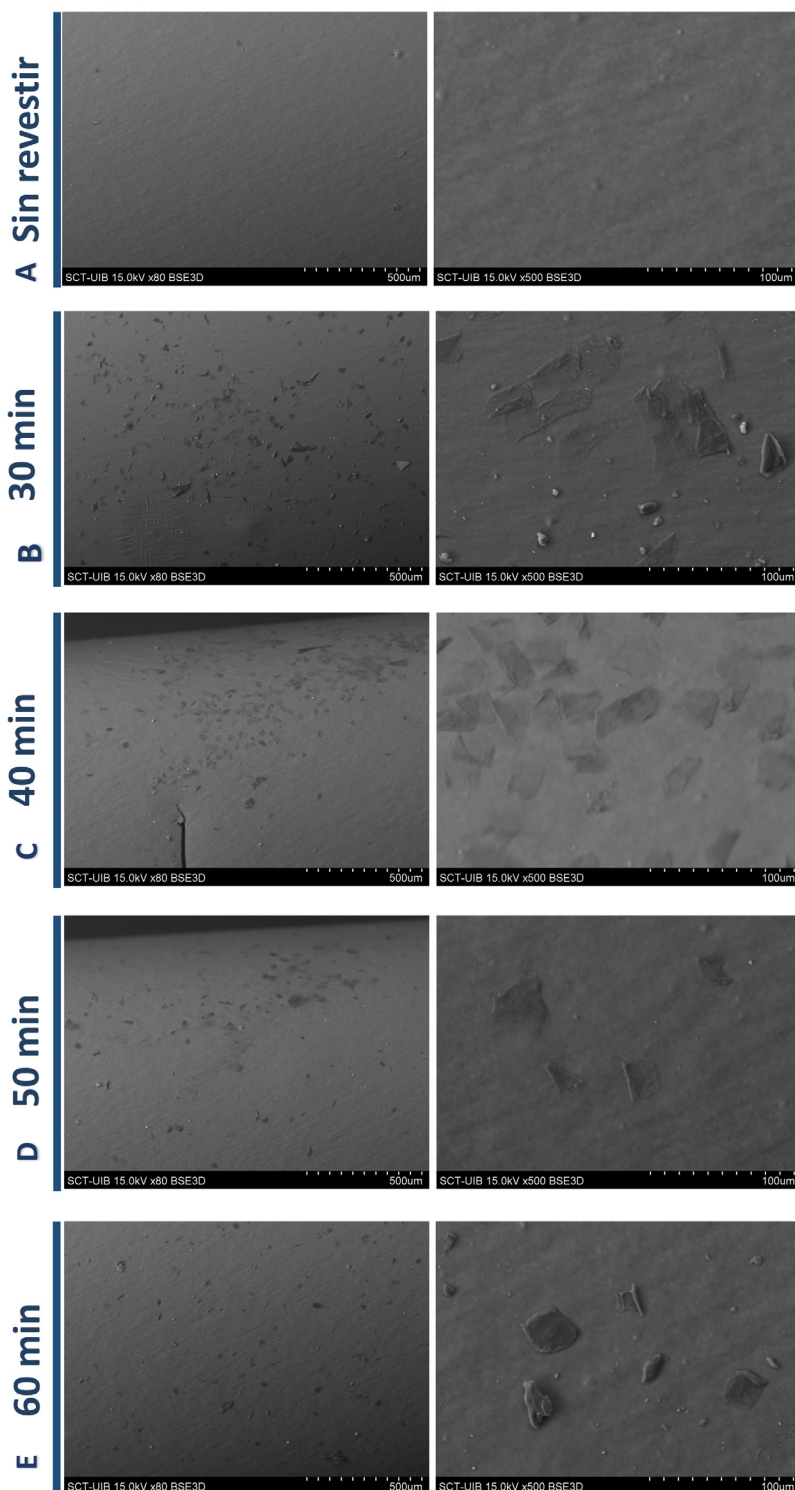


Figura 3.19 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las secciones tygon después de permanecer en una disolución de albúmina 1 g/L en agitación durante A) 0, B) 30, C) 40, D) 50 y E) 60 minutos.

El estudio del efecto de la albúmina se realizó mediante dos vías. La primera fue considerando el efecto que podría tener su presencia en la disolución de OA a una concentración de 0,1 g/L. La segunda fue considerando su efecto como capa de materia orgánica (MO) formada previamente en la superficie de las secciones tygon. Para estudiar esta segunda vía se revistieron las secciones como se indica en la Figura 3.12, en el apartado de materiales y métodos, pero durante distintos tiempos: 0, 30, 40, 50 y 60 minutos.

El resultado del revestimiento de las secciones en una disolución de albúmina de 1 g/L durante 0, 30, 40, 50 y 60 minutos se muestra en la Figura 3.19. La superficie del tygon sin tratar (Figura 3.19 A) es bastante lisa y sin fisuras (debido a la falta de recubrimiento), mientras que las secciones que fueron tratadas con albúmina 1 g/L a distintos tiempos (Figura 3.19 B-E) presentaban unas manchas negras repartidas por toda la superficie, a veces tan finas que costaban de ver. A más aumentos (500x), se pudo observar que se trataba de finas deposiciones orgánicas que dieron señal de carbono y oxígeno y que se correspondían con la albúmina con la cual se trataron.

Tabla 3.8 Resultados de la determinación de lowry en secciones tygon revestidas con albumina 1 g/L a diferentes tiempos.

Tiempo de revestimiento	Réplica	Abs 700 nm	Concentración (mg/L)	Media (mg/L)	SEM
30 min	1	0,14	10,67	11,67	1,51
	2	0,13	8,00		
	3	0,14	13,00		
	4	0,15	15,00		
40 min	1	0,15	17,00	15,17	2,30
	2	0,15	18,33		
	3	0,15	17,00		
	4	0,13	8,33		
50 min	1	0,16	23,00	15,42	4,69
	2	0,17	24,00		
	3	0,13	8,33		
	4	0,13	6,33		
60 min	1	0,14	13,33	9,58	2,26
	2	0,14	13,67		
	3	0,13	5,67		
	4	0,13	5,67		

Por otro lado, a simple vista no se observó una presencia de mayor cantidad de materia orgánica en función del tiempo de revestimiento, aunque no pudo confirmarse mediante la determinación de Lowry (Tabla 3.8). La cuantificación no fue precisa ya que la absorbancia obtenida a través del método de Lowry fue muy baja, siempre muy cercana a la del blanco, dando lugar a mucha variabilidad. Por ello se repitió el experimento, pero sonicando las muestras con 1,5 mL de agua mili Q para después liofilizarlas durante una semana. Al quedar solo el precipitado, se resuspendió con 400 μ L de tampón de homogenización (para tener dos replicados en placa) y se repitió la determinación de Lowry. Aun así, no fue posible aumentar la concentración y absorbancia obtenida en placa (Tabla 3.9).

Tabla 3.9 Resultados de la determinación de lowry para muestras liofilizadas de tygon revestidas con albumina 1 g/L a diferentes tiempos.

Tiempo de revestimiento	Abs 700 nm	Conc. g/L	Conc. mg/L
30 min	0,148	0,015	15
	0,153	0,018	18
40 min	0,168	0,025	25
	0,169	0,026	26
50 min	0,154	0,018	18
	0,156	0,019	19
60 min	0,146	0,014	14
	0,144	0,013	13

2.2 Efecto de la albúmina en la formación de depósitos cálcicos: cristalización de la Brushita

2.2.1 Experimentos mediante el sistema en estático (*Batch*)

Al no poder evaluar la cantidad de albúmina depositada durante los distintos tiempos de revestimiento establecidos, los primeros experimentos en estático se realizaron con secciones revestidas durante 30, 40, 50 y 60 minutos para evaluar su efecto en la cristalización. Por otro lado, estos experimentos se realizaron tanto en presencia como ausencia de albúmina 0,1 g/L en la disolución de OA, para comprobar

también el efecto que puede tener la albúmina presente en la disolución sobre la cristalización. Las primeras cristalizaciones estudiadas fueron las de BRU en el sistema estático.

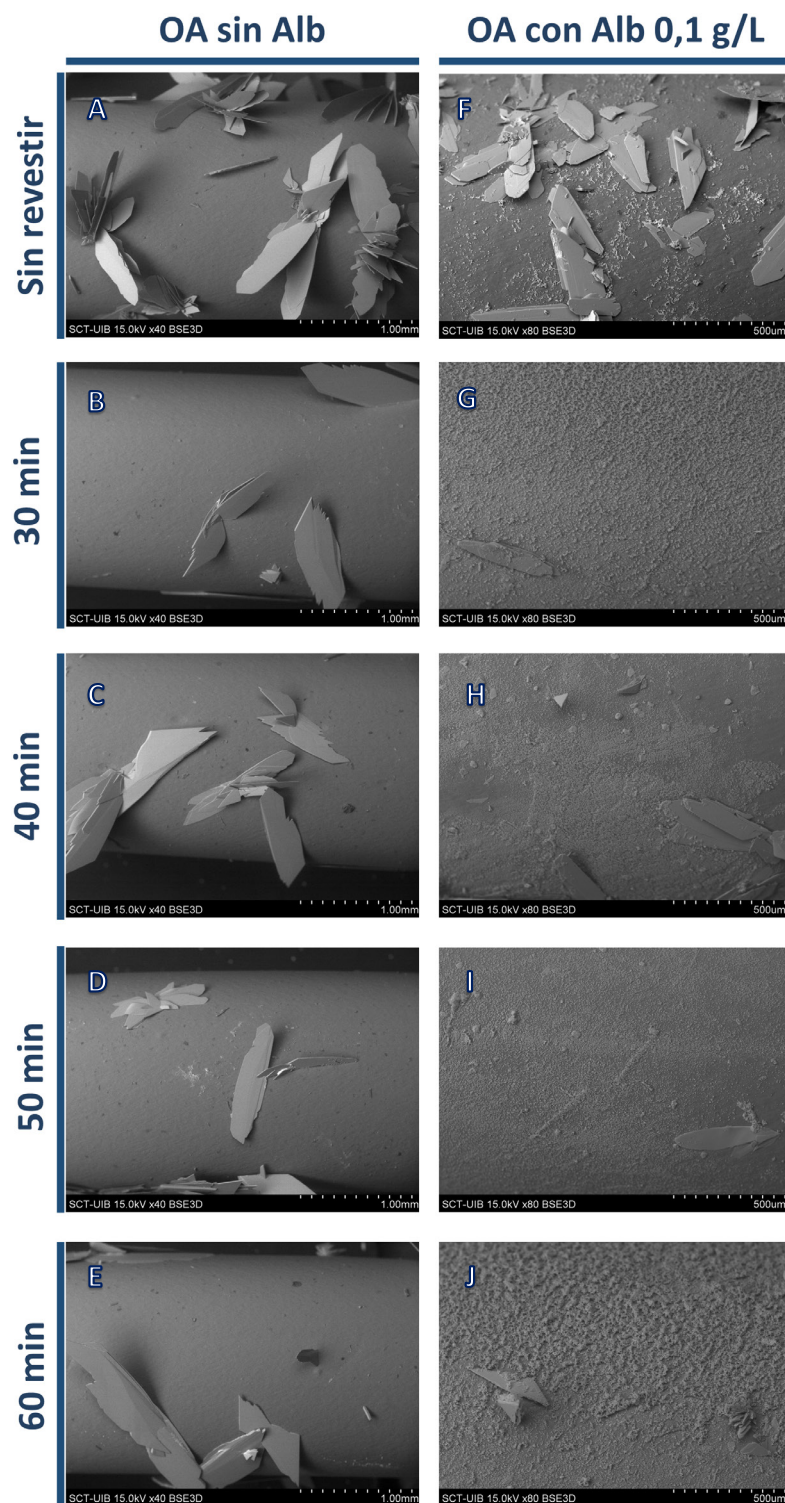


Figura 3.20 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las secciones tygon incubadas en estático en OA en ausencia (A-E) y presencia (F-J) de albúmina 0,1 g/L a un pH 6,5. Las secciones fueron previamente revestidas en albúmina 1 g/L durante 0 (sin revestir) 30, 40, 50 y 60 minutos.

Para el estudio de la BRU, la OA se ajustó a un pH 6,5 para favorecer su formación. En ausencia de albúmina en la OA las secciones tygon sin revestir (Figura 3.20 A) y revestidas con albúmina 1 g/L a distintos tiempos (Figura 3.20 B-E) presentaron principalmente cristales de BRU. La BRU presente era plana con forma de cuchilla y se organizaba en forma de núcleos cristalinos. En la sección sin revestir (Figura 3.20 A) la presencia de núcleos y por tanto de cristales fue mayor en comparación a las secciones previamente revestidas durante 30, 40, 50 y 60 minutos en Albúmina 1 g/L (Figura 3.20 B-E).

En presencia de albúmina 0,1 g/L en la OA, la sección sin revestir (Figura 3.20 F) presentó una mayor cantidad de cristales de BRU en comparación con las secciones revestidas previamente con albúmina 1 g/L a diferentes tiempos (Figura 3.20 G-J). Estos cristales de BRU también mantuvieron la morfología plana de cuchilla repartidos sobre una capa minoritaria distribuida uniformemente sobre la superficie del tygon. Por otro lado, en las secciones revestidas a distintos tiempos (Figura 3.20 G-J) la presencia de BRU fue menor, con los cristales repartidos sobre una capa cristalina uniforme en la superficie de la sección. Observando la superficie de la sección sin revestir a mayores aumentos (Figura 3.21 A) se encontró una capa poco densa formada por COM y HAP. Por otro lado, en las secciones revestidas con albúmina 1 g/L a mayores aumentos se puede apreciar una capa densa de HAP que posiblemente estaría recubriendo el COM, de presencia minoritaria (Figura 3.21 B-E).

Al disolver los depósitos y llevar a cabo la cuantificación de calcio se observó que, para el experimento realizado con orina artificial sin albúmina, la sección sin revestir presentó una concentración de calcio significativamente mayor que las secciones que previamente fueron revestidas con albúmina 1 g/L durante 30, 40, 50 y 60 minutos (Figura 3.22). Por otro lado, en las secciones incubadas en orina artificial con 0,1 g/L de albúmina solo se observa una tendencia, al presentar la sección sin revestir una mayor cantidad de calcio que las secciones revestidas durante 30, 4, 50 y 60 minutos, pero que por la prueba posthoc de Bonferroni no llega a ser significativa. Finalmente, si se comparan las secciones para el mismo tiempo de revestimiento entre los experimentos (OA con albúmina 0,1 g/L vs. OA sin albúmina) se observa que la sección sin revestir

incubada en la OA sin albúmina presenta una cantidad de calcio significativamente mayor que la sección sin revestir incubada en OA con albúmina 0,1 g/L. No se observaron diferencias significativas entre las secciones con el mismo tiempo de revestimiento incubadas en las distintas condiciones de orina artificial. Los valores experimentales se recogen en la Tabla 3.10.

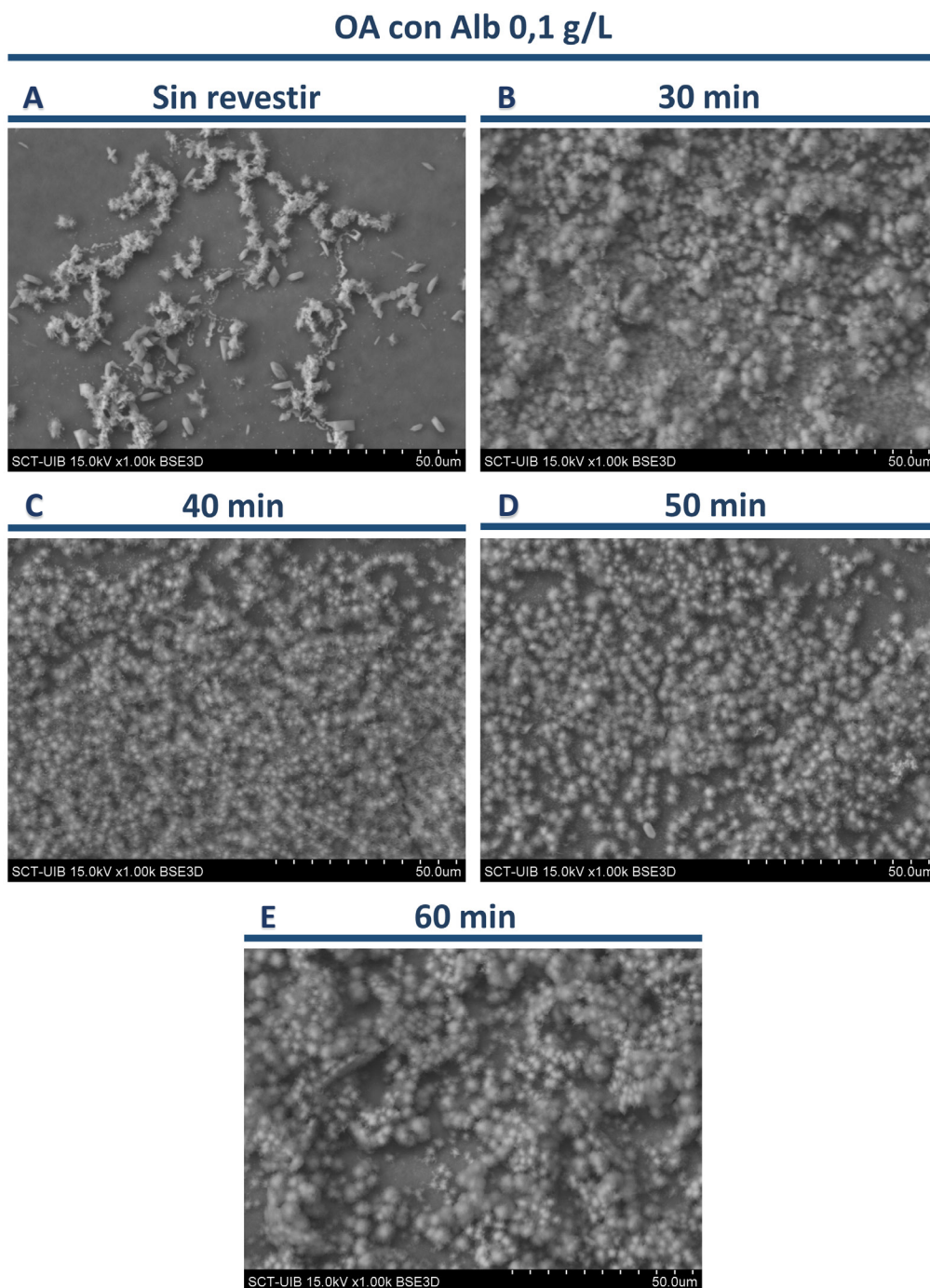


Figura 3.21 Imágenes de microscopía electrónica de barrido a 500 aumentos de las secciones tygon incubadas en estático en OA en presencia de albúmina 0,1 g/L a un pH 6,5. Las secciones fueron previamente revestidas en albúmina 1 g/L durante A) 0 (sin revestir), B) 30, C) 40, D) 50, y E) 60 minutos.

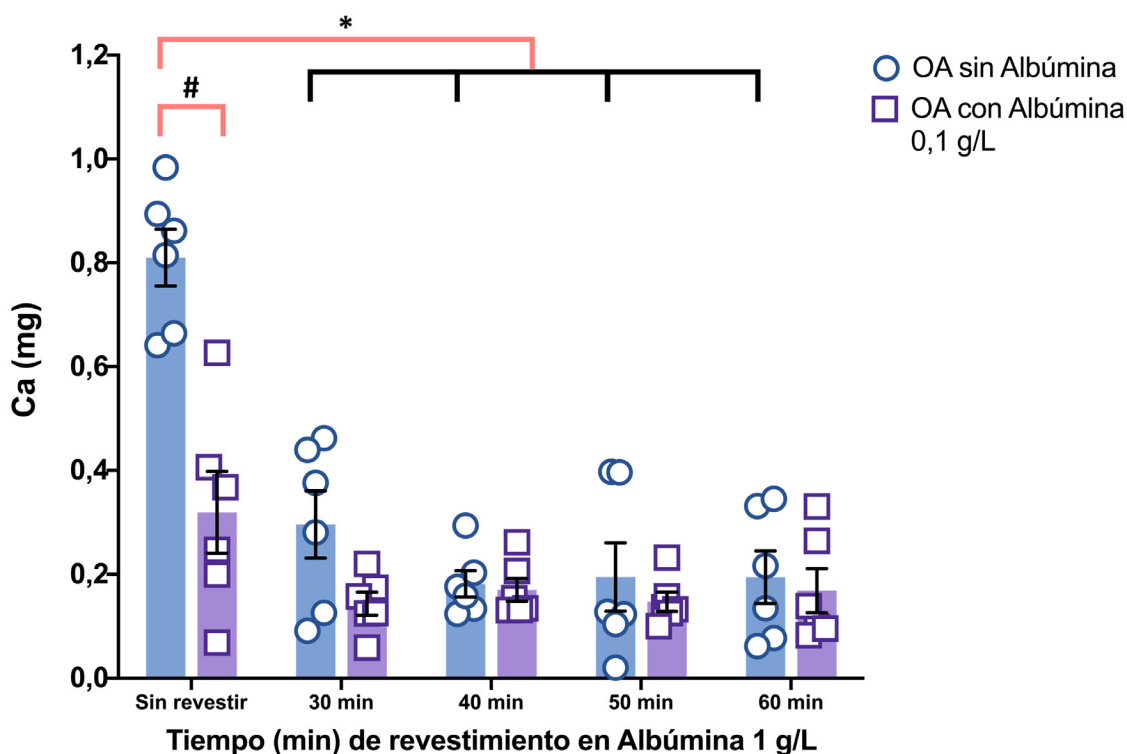


Figura 3.22 Cantidad de calcio determinada en cada una de las secciones (sin revestir y revestidas previamente durante 30, 40, 50 y 60 minutos en albúmina 1 g/L) incubadas mediante dos condiciones diferentes: OA a pH 6,5 con presencia o ausencia de albúmina 0,1 g/L. La incubación se llevó a cabo en estático, durante 24 horas a 37°C. * Diferencias significativas con un p-valor <0,001 mediante ANOVA de un factor con prueba posthoc de Bonferroni. # Diferencias significativas con un p-valor <0,001 mediante T-student para muestras independientes.

Tabla 3.10 Valores de media \pm SEM de la cantidad de calcio (mg) determinada en las secciones tygon incubadas en OA a pH 6,5 para la cristalización de la brushita.

Tiempo de revestimiento de las secciones en albúmina 1 g/L (min)	OA sin albúmina	OA con albúmina 0,1 g/L
0	0,810 \pm 0,055	0,320 \pm 0,079
30	0,296 \pm 0,065	0,144 \pm 0,022
40	0,182 \pm 0,025	0,170 \pm 0,022
50	0,195 \pm 0,066	0,147 \pm 0,019
60	0,195 \pm 0,051	0,169 \pm 0,042

2.2.2 Experimentos mediante el sistema en flujo

Una vez testados los efectos de la albúmina en la formación de depósitos de BRU en estático se procedió a evaluar sus efectos en flujo. Al ser más limitado el número de grupos que se pudieron tener en el sistema en flujo, y al observar que no hubo

diferencias significativas en cuanto a la cristalización de BRU entre las secciones tygon revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 30, 40 50 y 60 minutos (Figuras 3.20, 3.21 y 3.22), se estableció un solo tiempo de revestimiento, 50 minutos.

Para los experimentos en flujo se utilizó el mismo protocolo de elaboración de la OA que el utilizado para los experimentos en estático (Tabla 3.1), ajustándola a pH 6,5 para favorecer la formación de BRU. Después de 48 horas se recolectaron las secciones tygon para examinarlas y fotografiarlas con el microscopio electrónico de barrido con la finalidad de caracterizar los depósitos, así como para determinar la cantidad de depósito formado en la superficie mediante la cuantificación del calcio.

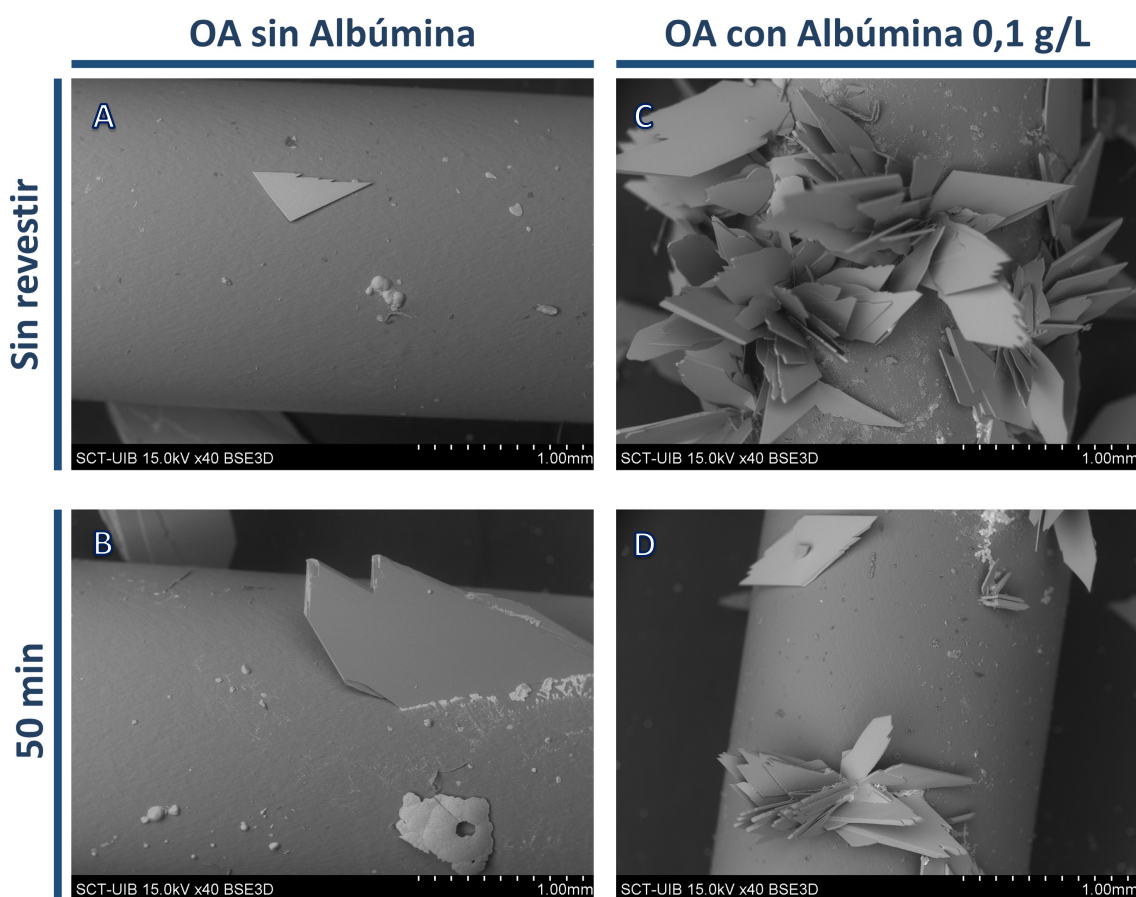


Figura 3.23 Imágenes de microscopía electrónica de las secciones tygon incubadas en OA a un pH 6,5 en ausencia o presencia de albúmina 0,1 g/L. Las secciones fueron previamente revestidas en albúmina 1 g/L durante 0 (A y C) y 50 minutos (B y D).

El análisis observacional mostró que a un pH 6,5 los depósitos mayoritarios fueron BRU, tanto en las secciones incubadas en ausencia como en presencia de albúmina 0,1 g/L en OA (Figura 3.23).

En ausencia de albúmina en OA, tanto en la sección sin revestir como la revestida previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos (Figura 3.23 A y B respectivamente) presentaron grandes cristales de BRU con forma plana y dentada. También se observó HAP minoritario, que tuvo mayor presencia en la sección revestida. Debido al lavado previo con agua mili Q de las secciones para llevarlas al microscopio se produjo una gran pérdida de cristales de BRU, como se puede observar en la Figura 3.24, donde se muestran las secciones antes del lavado y donde se evidencian los grandes cristales de BRU que había anteriormente tanto en la sección sin revestir (Figura 3.24 A) como en la revestida previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos (Figura 3.24 B).

OA sin Albúmina

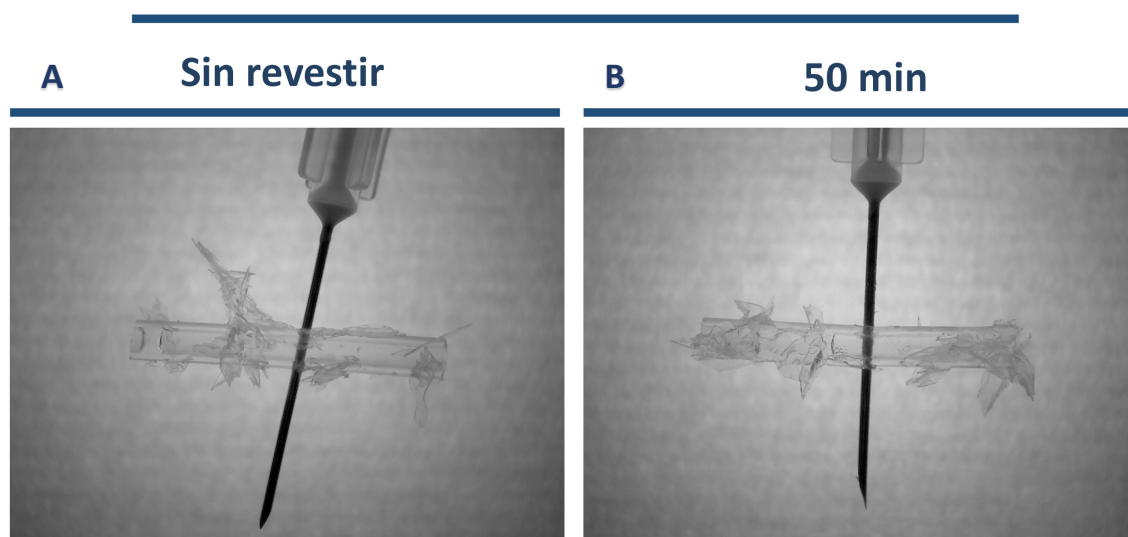


Figura 3.24 Imágenes de lupa binocular de las secciones tygon incubadas en ausencia de albúmina en orina artificial a un pH 6,5. Las secciones se revistieron previamente A) en albúmina 1 g/L durante 0 (sin revestir) y B) 50 minutos. Las imágenes se tomaron previamente al lavado con agua Mili Q de las secciones para su visualización al microscopio electrónico, y, por lo tanto, antes de que se produjera la pérdida de cristales por lavado.

En las secciones sin revestir y revestidas incubadas en OA con albúmina 0,1 g/L (Figura 3.23 C y D respectivamente), también se observaron grandes cristales de BRU, con morfología plana y dentada. En estas imágenes se puede apreciar cómo se agrupan y forman a partir de un núcleo cristalino. Por otro lado, a más aumentos (500x, Figura 3.25) observamos la superficie de estas secciones, donde encontramos una capa poco abundante de COM formada tanto por cristales individuales como agregados repartidos por la superficie.

OA con Albúmina 0,1 g/L

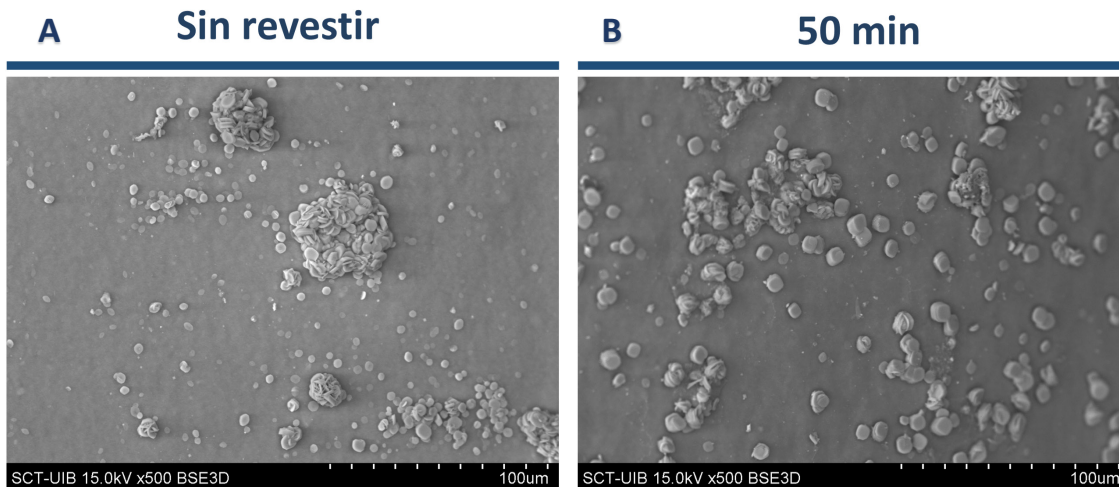


Figura 3. 25 Imágenes de microscopía electrónica a 500 aumentos de las secciones tygon incubadas en presencia de albúmina 0,1 g/L en orina artificial a un pH 6,5. Las secciones fueron previamente revestidas en albúmina 1 g/L durante A) 0 (sin revestir) y B) 50 minutos.

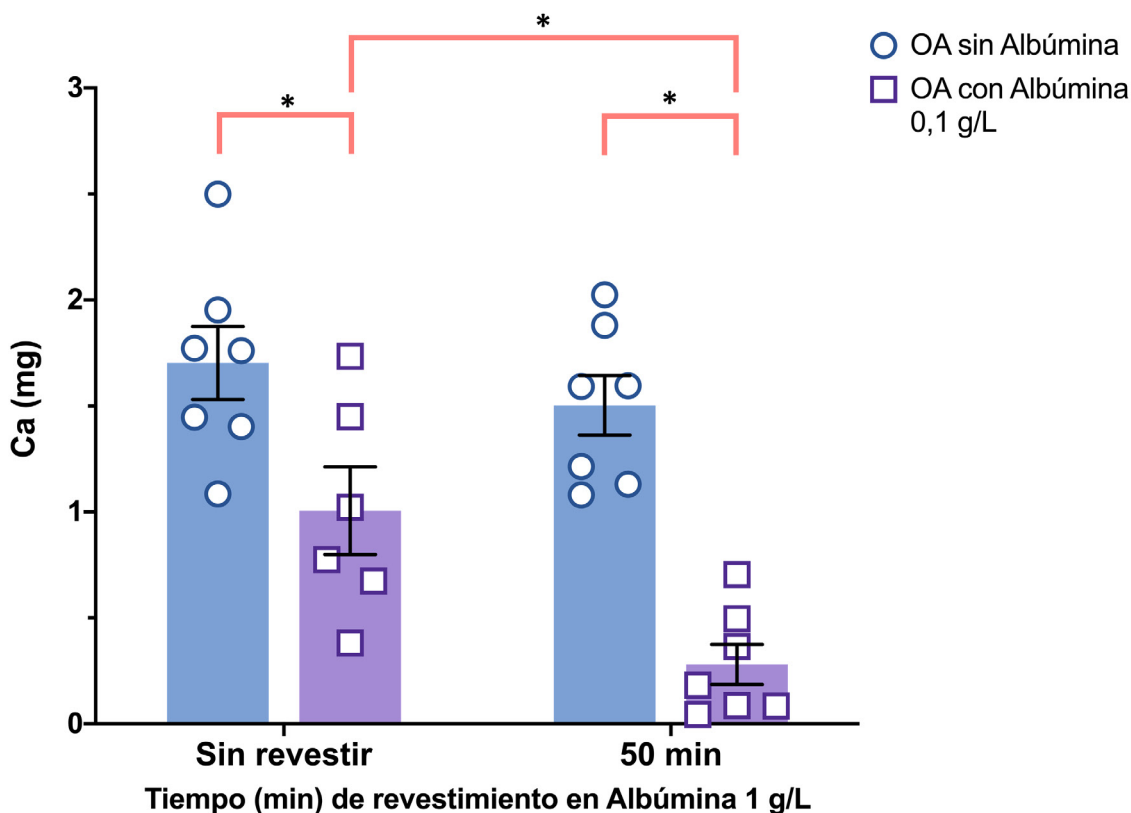


Figura 3.26 Cantidad de calcio determinada en cada una de las secciones (sin revestir y revestidas previamente durante 50 minutos en albúmina 1 g/L) incubadas mediante dos condiciones diferentes: OA a pH 6,5 en presencia o ausencia de albúmina 0,1 g/L. La incubación se llevó a cabo en flujo, durante 48 horas a 37°C. * Diferencias significativas con un p-valor <0,001 mediante la prueba T-student para muestras independientes.

Al disolver los depósitos se observó que no hubo diferencias significativas en la cantidad de calcio entre las secciones sin revestir ($1,703 \pm 0,173$) y revestidas previamente durante 50 minutos en albúmina 1 g/L ($1,503 \pm 0,141$) incubadas en OA sin albúmina, aunque en las segundas fuera menor. Por otro lado, en los experimentos realizados en OA con albúmina con 0,1 g/L, la sección revestida previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos ($0,281 \pm 0,095$) presentó una disminución significativa de calcio respecto a la sección sin revestir ($1,006 \pm 0,207$). Finalmente, las secciones sin revestir y revestidas previamente durante 50 minutos en albúmina 1 g/L incubadas en OA con albúmina 0,1 g/L presentaron una cantidad de calcio significativamente menor que las secciones incubadas en OA sin albúmina (Figura 3.26).

2.3 Efecto de la albúmina en la formación de depósitos cálcicos: cristalización del oxalato cálcico

Para el estudio del efecto de la presencia de albúmina en la cristalización del OxCa, la orina artificial (Tabla 3.1) se ajustó a un pH 5,7 para favorecer solamente su formación y así evitar la formación de depósitos de fosfato cálcico (BRU y HAP).

2.3.1 Experimentos mediante el sistema en estático (*Batch*)

Las secciones de tygon sin revestir y las revestidas previamente con 1 g/L de albúmina durante 30, 40, 50 y 60 minutos, tanto en ausencia (Figura 3.27 A-E) como en presencia de albúmina 0,1 g/L en la disolución de OA (Figura 3.27 F-J) presentaron únicamente cristales de COM.

En las secciones sin revestir, tanto en ausencia (Figura 3.27 A) como en presencia de albúmina 0,1 g/L en la OA (Figura 3.27 F) presentaron una mayor cantidad de cristales COM que las secciones previamente revestidas. Por otro lado, la morfología y la organización de los cristales fue totalmente distinta. En las secciones sin revestir (Figura 3.27 A y F) se observan los cristales distribuidos mayoritariamente formando una capa uniforme sobre la superficie de la sección con algunos COMs agregados, mientras que en las secciones revestidas (Figura 3.27 B-E y G-J) la cantidad de cristales COM observados fue menor, formado pequeños agregados repartidos por la superficie de la sección.

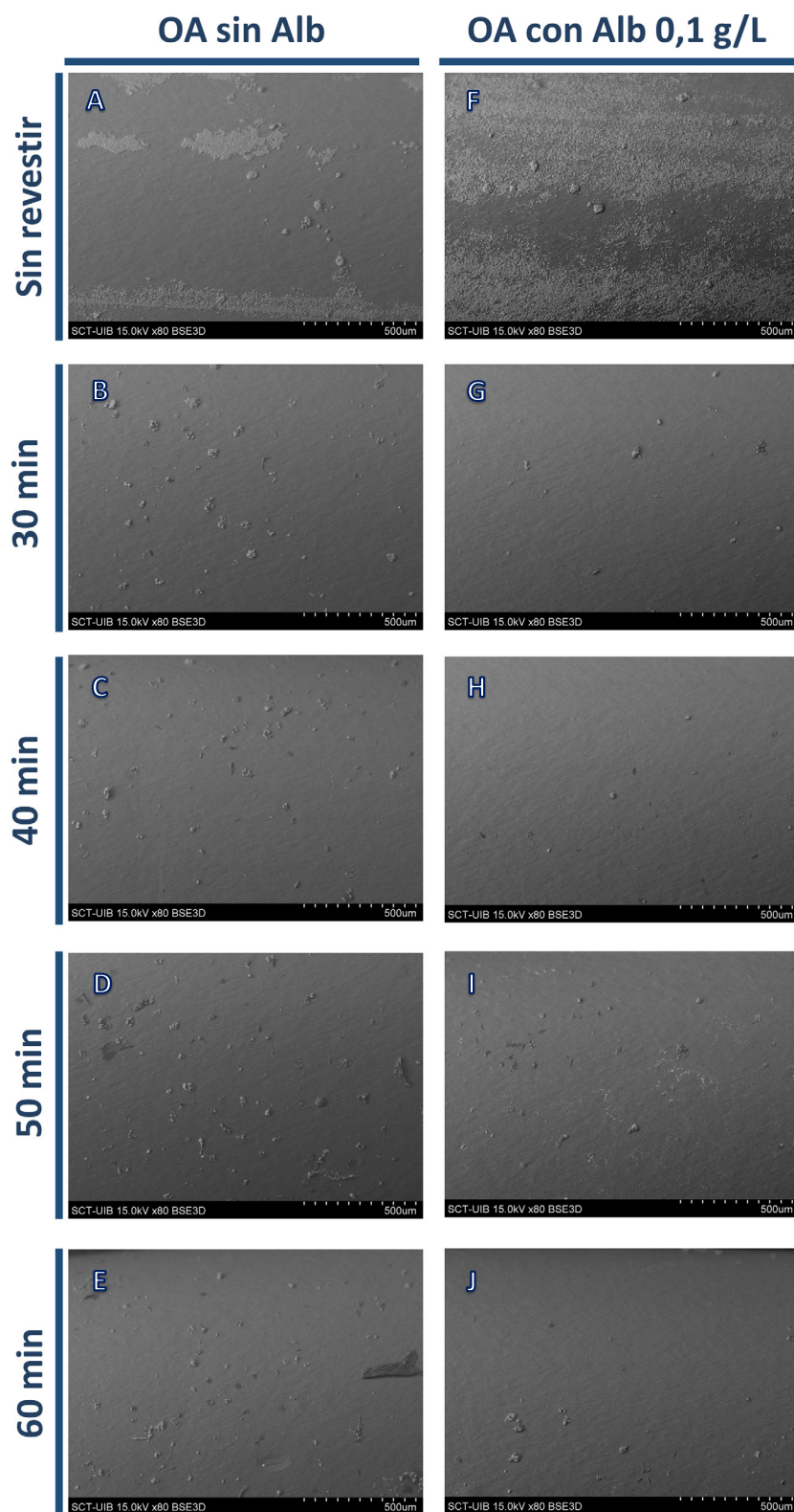


Figura 3.27 Imágenes de microscopía electrónica de las secciones tygon incubadas en ausencia (A-E) o presencia (F-J) de albúmina 0,1 g/L en orina artificial a pH 5,7. Las secciones fueron previamente revestidas en albúmina 1 g/L durante 0 (sin revestir), 30, 40, 50 y 60 minutos.

A más aumentos (1000x) se observaron claramente los cristales COM individuales depositándose una encima de otros y formando una capa uniformemente distribuida sobre la superficie de las secciones sin revestir incubadas en OA sin albúmina (Figura 3.28 A) y en OA con albúmina 0,1 g/L (Figura 3.29 A).

OA sin Alb

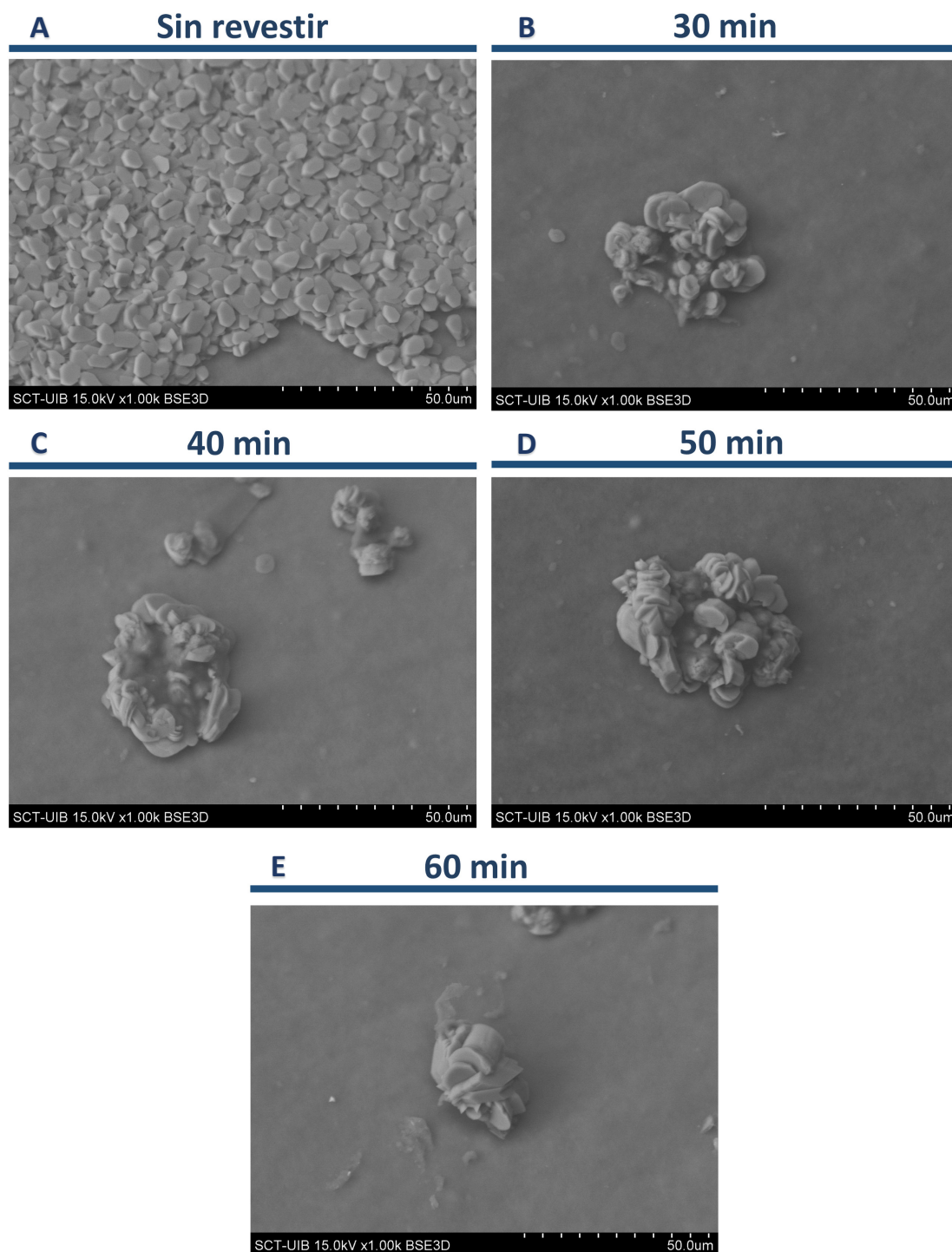


Figura 3.28 Imágenes de microscopía electrónica a 1000 aumentos de las secciones tygon incubadas en ausencia de albúmina en la orina artificial, a un pH de 5,7. Las secciones fueron previamente revestidas en albúmina 1 g/L durante A) 0 (sin revestir), B) 30, C) 40, D) 50 y E) 60 minutos.

En las secciones previamente revestidas con albúmina 1 g/L a distintos tiempos (30, 40, 50, y 60 minutos) a parte de observarse una cantidad visiblemente menor de

COM en la superficie de las secciones (Figura 3.27 B-E y G-J), a más aumentos (1000x, Figuras 3.28 B-E y 3.29 B-D) su morfología y distribución difirieron de lo observado anteriormente. Estos cristales nacían del mismo punto, formando agregados en forma de flor que se encontraban depositados sobre fragmentos de MO que se correspondería con la albúmina del revestimiento.

OA con Alb 0,1 g/L

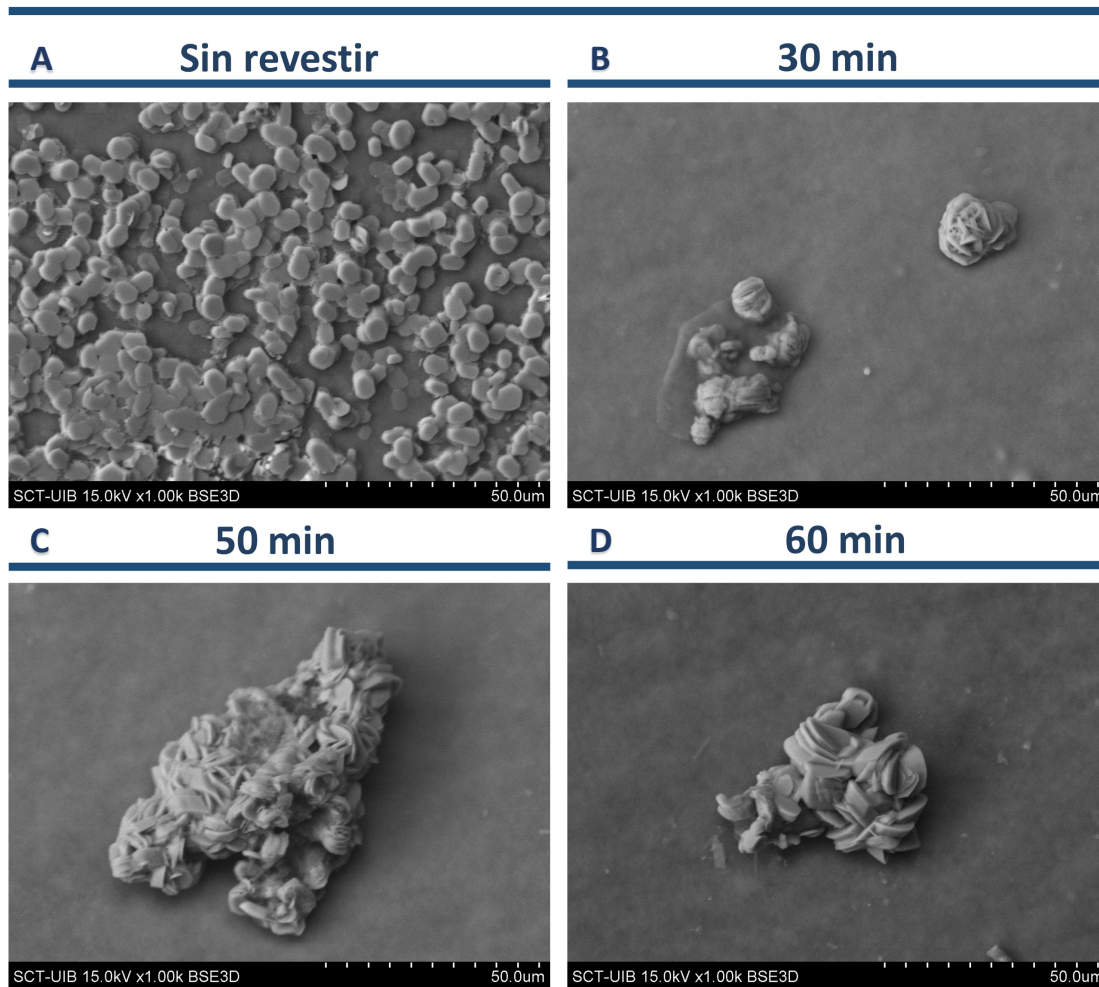


Figura 3.29 Imágenes de microscopía electrónica a 1000 aumentos de las secciones tygon incubadas en presencia de albúmina 0,1 g/L en orina artificial a un pH 5,7. Las secciones fueron previamente revestidas en albúmina 1 g/L durante A) 0 (sin revestir), B) 30, C) 40, D) 50 y E) 60 minutos.

Posteriormente se disolvieron los depósitos de las secciones y se llevó a cabo la determinación de calcio (Figura 2.30). Las secciones sin revestir, tanto en ausencia como en presencia de albúmina 0,1 g/L en OA, mostraron una mayor cantidad de calcio que las secciones previamente revestidas con albúmina 1 g/L durante 30, 40, 50 y 60 minutos,

en las cuales la cantidad de calcio fue significativamente menor. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de calcio determinada para las secciones sin revestir en ausencia y presencia de albúmina 0,1 g /L en OA, aunque en las segundas fuera más alta. Los mismo ocurrió para las secciones con el mismo tiempo de revestimiento (30, 40, 50 y 60 minutos), las cuales presentaron cantidades de calcio parecidas tanto en ausencia como en presencia de albúmina 0,1 g /L en OA. Los valores experimentales se recogen en la Tabla 3.11.

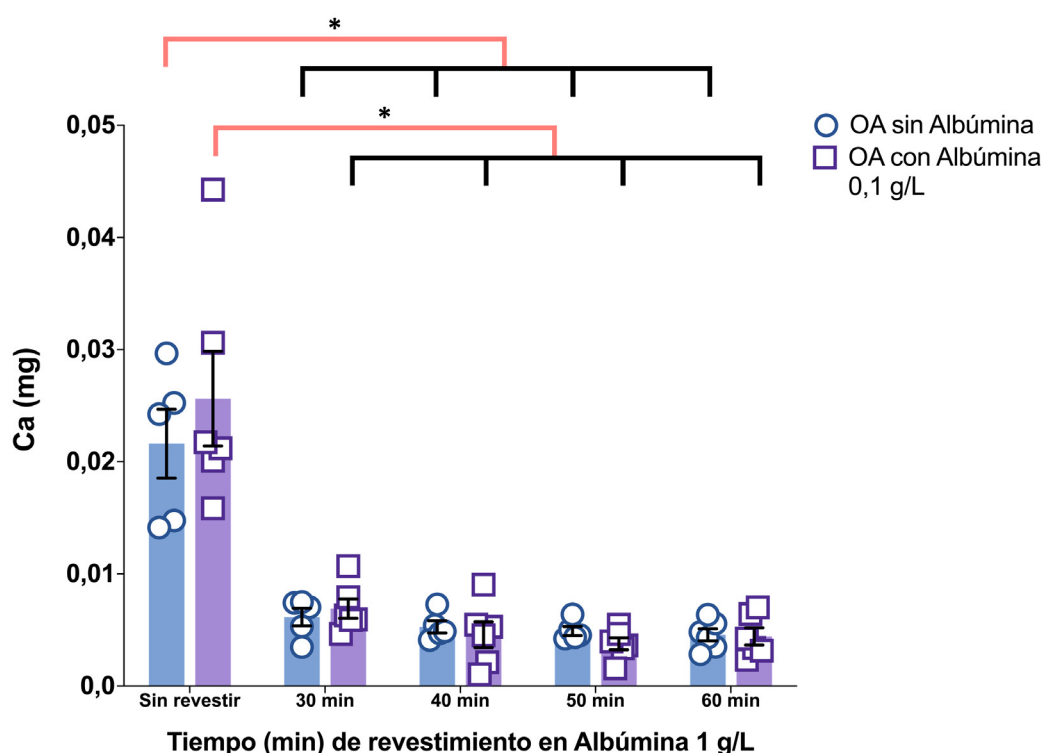


Figura 3.30 Cantidad de calcio determinada en cada una de las secciones (sin revestir y revestidas durante 30, 40, 50 y 60 minutos en albúmina 1 g/L) incubadas mediante dos condiciones diferentes: OA a pH 5,7 con presencia o ausencia de albúmina 0,1 g/L. La incubación se llevó a cabo en estático, durante 24 horas a 37°C. * Diferencias significativas con un p-valor <0,001, ANOVA de un factor, prueba posthoc de Bonferroni.

Tabla 3.11 Valores de media \pm SEM de la cantidad de calcio (mg) determinada en las secciones tygon incubadas en OA a pH 5,7 para la cristalización del OxCa.

Tiempo de revestimiento de las secciones en albúmina 1 g/L (min)	OA sin albúmina	OA con albúmina 0,1 g/L
0	0,022 \pm 0,003	0,026 \pm 0,004
30	0,006 \pm 0,001	0,007 \pm 0,001
40	0,005 \pm 0,001	0,005 \pm 0,001
50	0,005 \pm 0,000	0,004 \pm 0,001
60	0,005 \pm 0,001	0,004 \pm 0,001

2.3.2 Experimentos mediante el sistema en flujo

Para el estudio de la formación de cristales de OxCa en flujo también se evaluó un solo tiempo de revestimiento (50 minutos) utilizando la orina artificial de la Tabla 3.1 ajustada a un pH de 5,7.

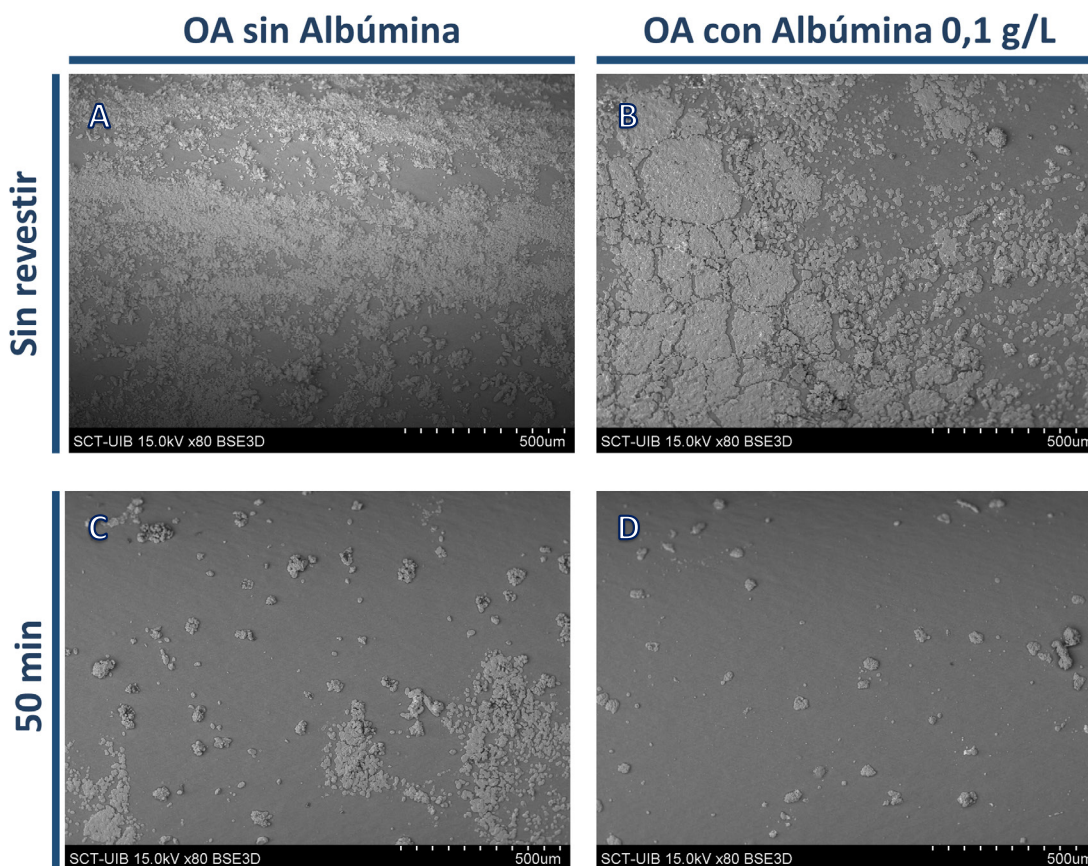


Figura 3.31 Imágenes de microscopía electrónica de las secciones tygon incubadas en ausencia o presencia de albúmina 0,1 g/L en orina artificial a un pH 5,7. Las secciones fueron previamente revestidas en albúmina 1 g/L durante A y B) 0 (sin revestir) y C y D) 50 minutos.

Los cristales COM encontrados en las secciones sin revestir incubadas tanto en OA sin albúmina (Figura 3.31 A) como las incubadas en OA con albúmina 0,1 g/L (Figura 3.31 B) se distribuyeron en forma de capa uniforme en la superficie del tygon, amontonándose unos encima de otros en el caso de la sección sin revestir incubada en OA sin albúmina (Figura 3.32 A), y encontrado más formas agregadas en el caso de la sección sin revestir incubada en OA con albúmina 0,1 g/L (Figura 3.32 B). Las secciones con revestimiento previo en albúmina 1 g/L durante 50 minutos presentaron una cantidad de cristales COM menor, con una distribución distinta (Figura 3.31 C y D),

presentándose mayoritariamente en forma de agregados repartidos sobre la superficie de la sección (Figura 3.32 C y D).

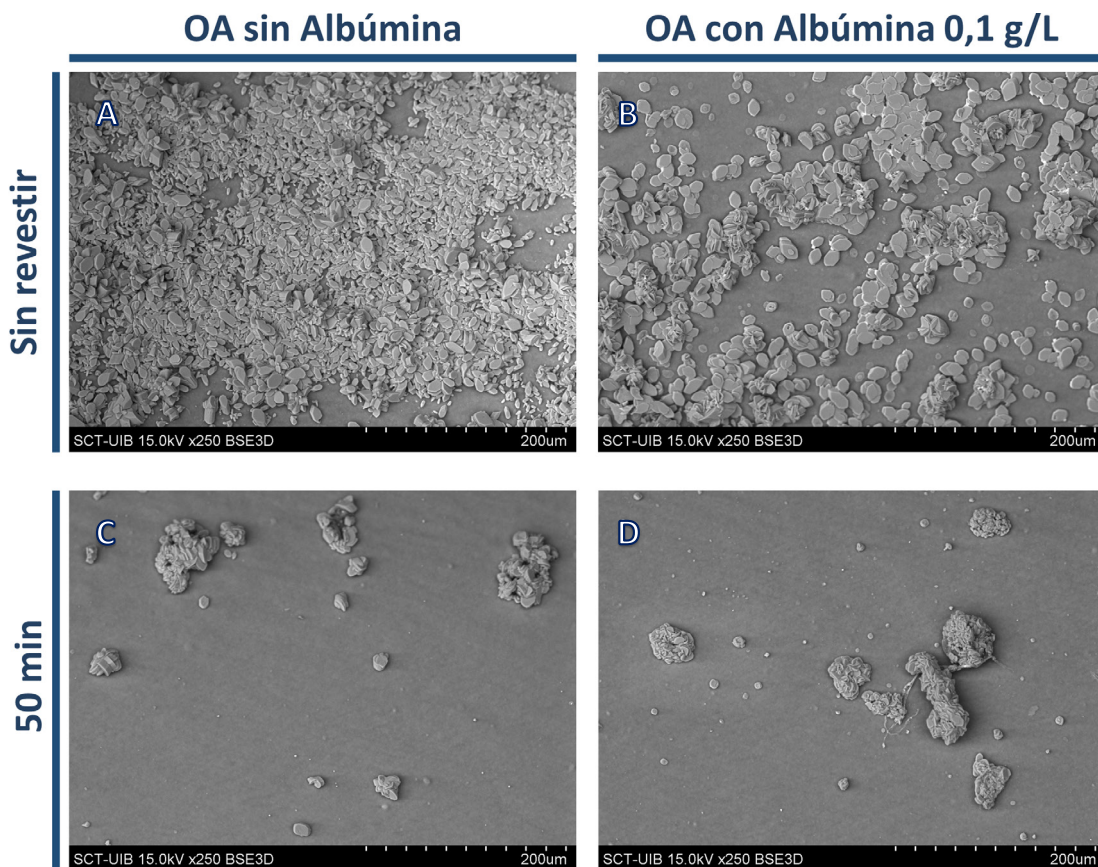


Figura 3.32 Imágenes de microscopía electrónica a 250 aumentos de las secciones tygon incubadas en ausencia o presencia de albúmina 0,1 g/L en orina artificial a un pH 5,7. Las secciones fueron previamente revestidas en albúmina 1 g/L durante 0 (sin revestir, A y B) y 50 minutos (C y D).

En cambio, al disolver los depósitos y realizar la cuantificación del calcio no se observaron diferencias significativas entre las secciones sin revestir ($0,043 \pm 0,007$) y las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos ($0,037 \pm 0,007$) que fueron incubadas en OA sin albúmina (Figura 3.33). En el caso de las secciones incubadas en OA con albúmina 0,1 g/L, no hubo diferencias significativas entre la sección revestida previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos ($0,053 \pm 0,013$) y la sección sin revestir ($0,083 \pm 0,008$), aunque se observó que la primera tendía a ser menor. Por otro lado, para las secciones sin revestir incubadas en distintas condiciones (OA en ausencia o presencia de albúmina 0,1 g/L) se observó que la sección sin revestir incubada en la OA con albúmina 0,1 g/L ($0,083 \pm 0,008$) presentó una cantidad significativamente mayor de calcio que la sección sin revestir incubada en OA sin

albúmina ($0,043 \pm 0,007$). Para las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos no se observaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de calcio según si fueron incubadas en OA sin albúmina o OA con albúmina 1 g/L.

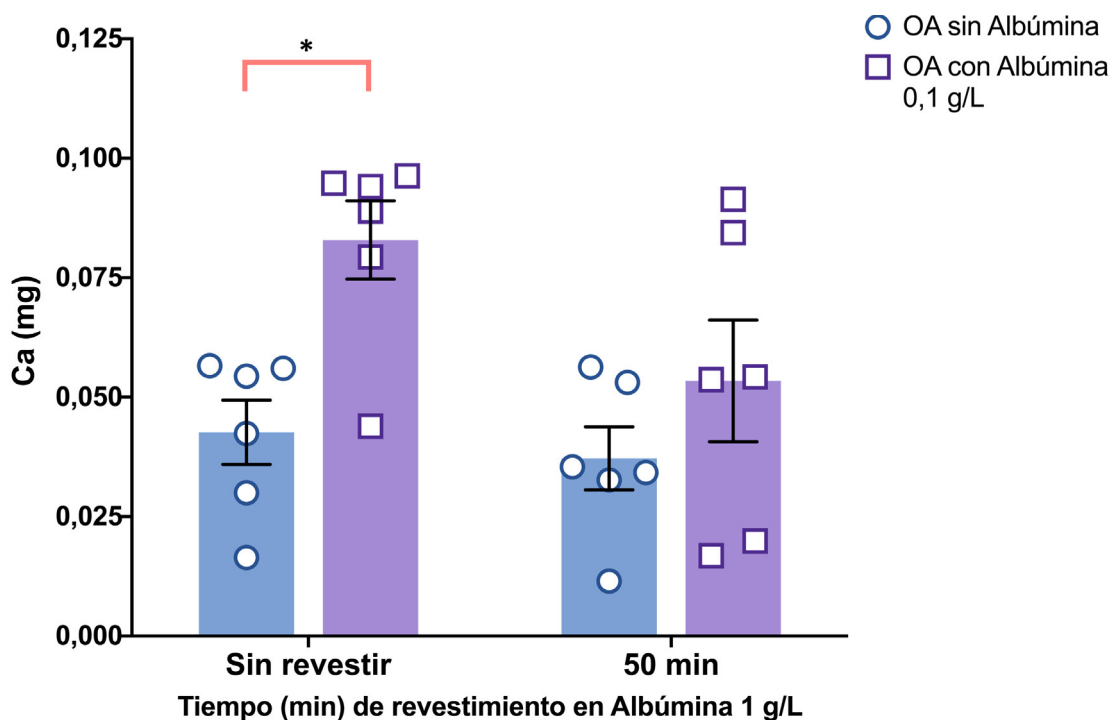


Figura 3.33 Cantidad de calcio determinada en cada una de las secciones (sin revestir y revestidas previamente durante 50 minutos en albúmina 1 g/L) incubadas mediante dos condiciones diferentes: OA a pH 5,7 en presencia o ausencia de albúmina 0,1 g/L. La incubación se llevó a cabo en flujo, durante 48 horas a 37°C. * Diferencias significativas con un p-valor <0,005 mediante la prueba T-student para muestras independientes.

2.4 Efecto de la albúmina en la formación de depósitos cálcicos: cristalización de la hidroxiapatita

También se estudió el efecto de la albúmina, tanto en disolución como revistiendo la sección de tygon, en la formación de depósitos de hidroxiapatita sobre las secciones. Los experimentos también se llevaron a cabo tanto en estático como en flujo, con un solo tiempo de revestimiento para ambos, de 50 minutos.

2.4.1 Optimización de la formación de depósitos de hidroxiapatita en distintas condiciones de pH, fósforo y calcio sobre secciones de tygon

Igual que en el estudio cinético fosfocálcico (Capítulo 2), también se llevaron a cabo distintos experimentos con distintas concentraciones de fósforo, calcio y distintos pHs para encontrar las condiciones más idóneas para la cristalización de la HAP sobre

las secciones tygon y así posteriormente poder estudiar los efectos de la albúmina y posibles inhibidores.

2.4.1.1 Optimización de la formación de depósitos de hidroxiapatita: cristalizaciones mediante el sistema en estático (*Batch*)

Los experimentos en estático duraron 24 horas y permitieron un número ilimitado de réplicas, por lo que fue la metodología más cómoda para llevar a cabo la optimización de la cristalización de la HAP.

Primeramente, se estudió la cristalización a distintos pHs (6,3; 6,4 y 6,5). Para los dos primeros pHs, 6,3 y 6,4, se utilizaron secciones sin revestir y revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos que se incubaron en OA sin albúmina con distintas concentraciones de fósforo (482, 550 y 600 ppm).

Posteriormente, se decidió que el estudio de los compuestos con efecto inhibidor en la formación de depósitos sobre secciones tygon se realizaría en secciones sin revestir incubadas en OA con 0,1 g/L de albúmina. Por este motivo, para los experimentos realizados con OA ajustada a un pH de 6,5 se utilizaron solo secciones sin revestir incubadas en OA con presencia o ausencia de albúmina 0,1 g/L. Además, esta OA contuvo distintas concentraciones de fósforo (482, 550 y 800 ppm). En todos los experimentos la OA tenía con una concentración de calcio de 170 ppm.

Finalmente, se aumentó el número de experimentos en OA con 800 ppm de fósforo para los pHs sin estudiar restantes (6,3 y 6,4) y se juntaron con los resultados obtenidos de los experimentos realizados en OA con 482 y 550 ppm de fósforo. Así se pudo comparar el efecto del pH a cada una de las concentraciones de fósforo enumeradas, en secciones de tygon sin revestir incubadas en OA sin albúmina.

2.4.1.1.1 Experimentos realizados en orina artificial a un pH de 6,3

A pH 6,3 se formaron grandes cristales de BRU planos con forma de cuchilla tanto en la sección sin revestir como es la sección revestida previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos (Figura 3.34). Por otro lado, en todas las secciones revestidas (Figura 3.34 D-F) se observó la presencia de grandes esferulitos de HAP, tanto en presencia de

482 ppm de fósforo como en 550 y 600 ppm. Para las secciones sin revestir (Figura 3.34 A-C) pareció haber una mayor cantidad de BRU en las secciones incubadas con 600 ppm de fósforo.

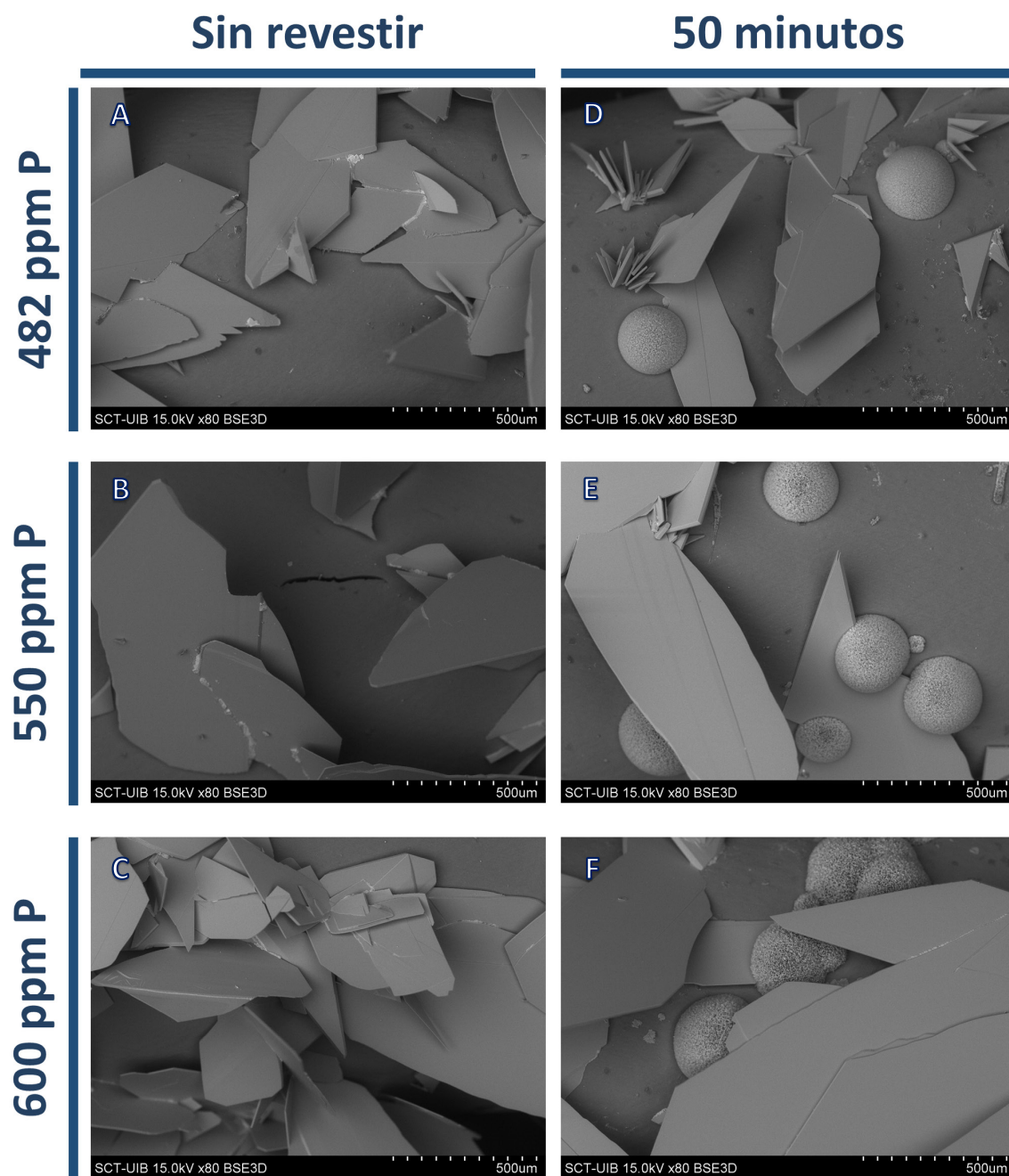


Figura 3.34 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las secciones tygon sin revestir (A-C) y revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos (D-F), incubadas en estático en orina artificial sin albúmina a un pH de 6,3 con diferentes concentraciones de fósforo (482, 550 y 600 ppm).

Por otro lado, las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos presentaron una disminución significativa de la cantidad de calcio en su

superficie en comparación a las secciones sin revestir incubadas con la misma concentración de fósforo (Figura 3.35), tanto en presencia de 482 ppm (0,133 vs. 0,571), como en 550 ppm (0,461 vs. 0,902) y 600 ppm de fósforo (0,507 vs. 1,009). Finalmente, dentro del grupo de secciones sin revestir o revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos, las incubadas con 482 ppm de fósforo presentaron una menor cantidad de calcio que las secciones incubadas con 550 y 600 ppm de fósforo.

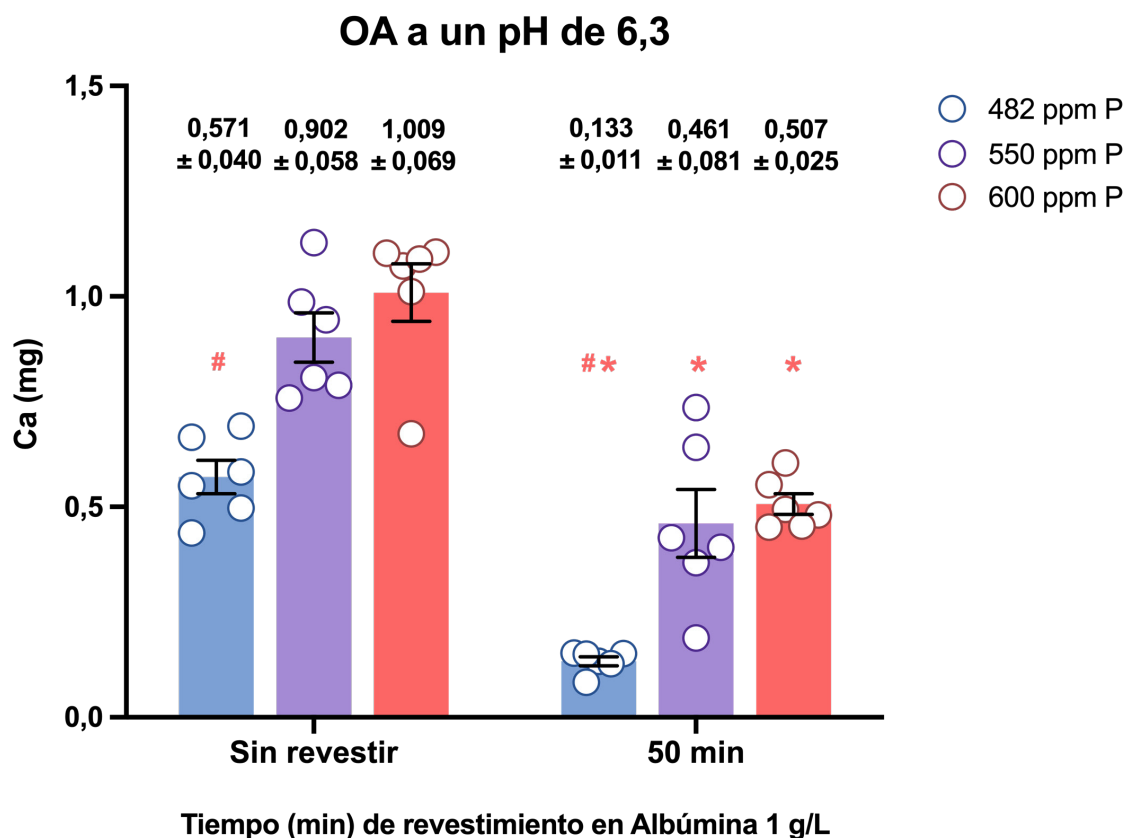


Figura 3.35 Cantidad de calcio determinada en cada una de las secciones (sin revestir y revestidas previamente durante 50 minutos en albúmina 1 g/L) incubadas a pH 6,3 con distintas concentraciones de fósforo (482, 550 y 60 ppm). La incubación se llevó a cabo en estático, durante 24 horas a 37°C. * Para una misma concentración de fósforo, diferencias significativas con las secciones sin revestir con un p-valor <0,01 mediante la prueba T-student para muestras independientes. # Para las secciones del grupo sin revestir o revestidos 50 minutos, diferencias significativas con las secciones incubadas en concentraciones distintas de fósforo, con un p-valor <0,01 mediante la ANOVA de una vía con prueba posthoc de Bonferroni.

2.4.1.1.2 Experimentos realizados en orina artificial a un pH de 6,4

A pH 6,4 se forman grandes cristales de BRU planos y con forma de cuchilla tanto en la sección sin revestir (Figura 3.36 A-C) como es la sección revestida previamente en

albúmina 1 g/L durante 50 minutos (Figura 3.36 D-F). Por otro lado, en todas las secciones revestidas (Figura 3.36 D-F) la cantidad de cristales de BRU era menor y se observó la presencia de grandes esferulitos de HAP, tanto en presencia de 482 ppm de fósforo como en 550 y 600 ppm.

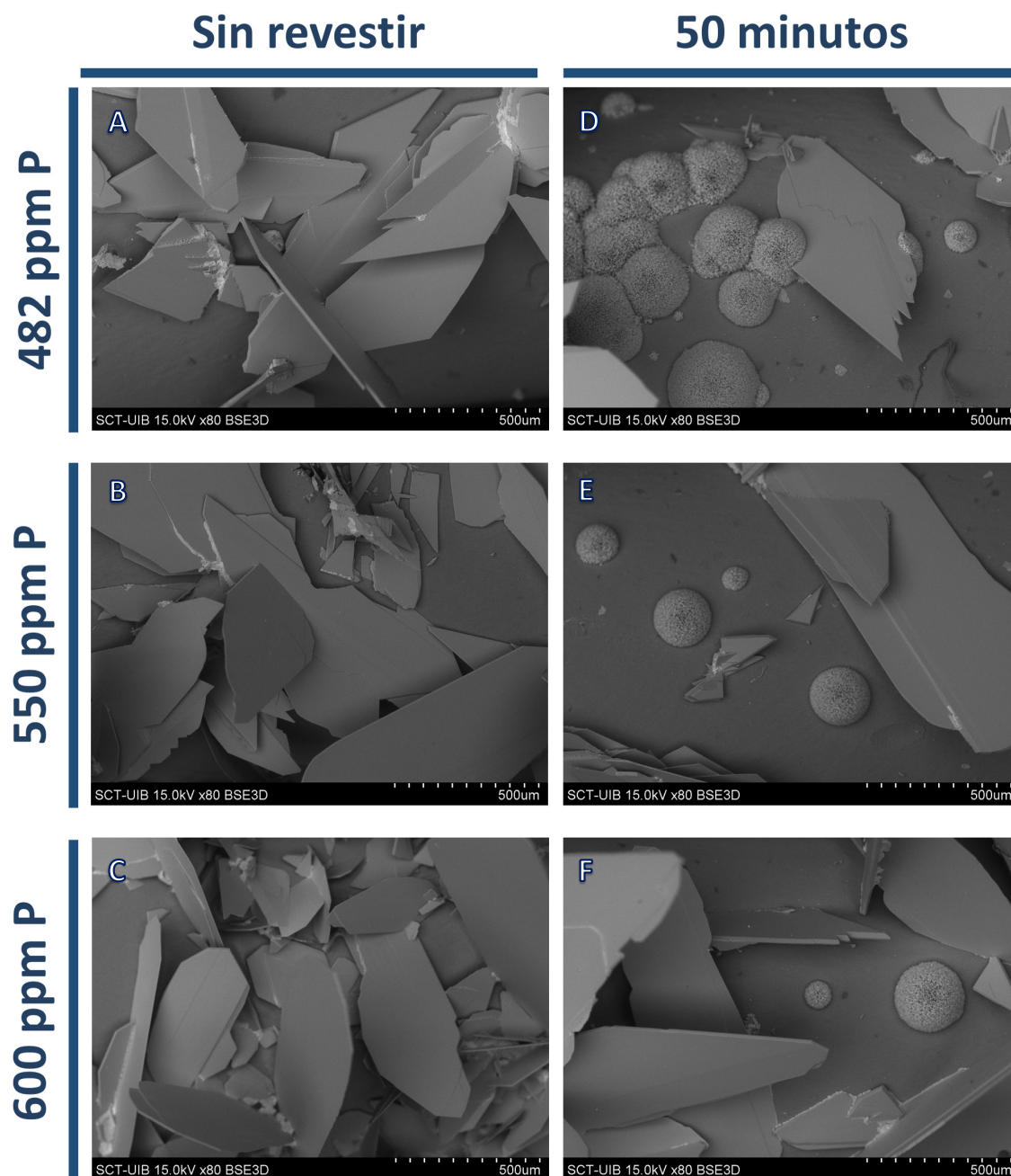


Figura 3.36 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las secciones tygon sin revestir (A-C) y revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos (D-F) incubadas en estático en orina artificial sin albúmina un pH 6,4 a diferentes concentraciones de fósforo (482, 550 y 600 ppm).

Por otro lado, las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos, presentaron una disminución significativa de la cantidad de calcio en su

superficie en comparación a las secciones sin revestir (Figura 3.37), tanto en presencia de 482 ppm de fósforo (0,429 vs. 0,813), como en 550 ppm (0,641 vs. 1,208) y 600 ppm de fósforo (0,445 vs. 1,379). Finalmente, dentro del grupo de secciones sin revestir, las incubadas con 482 ppm de fósforo presentaron una menor cantidad de calcio que las secciones incubadas con 550 y 600 ppm de fósforo.

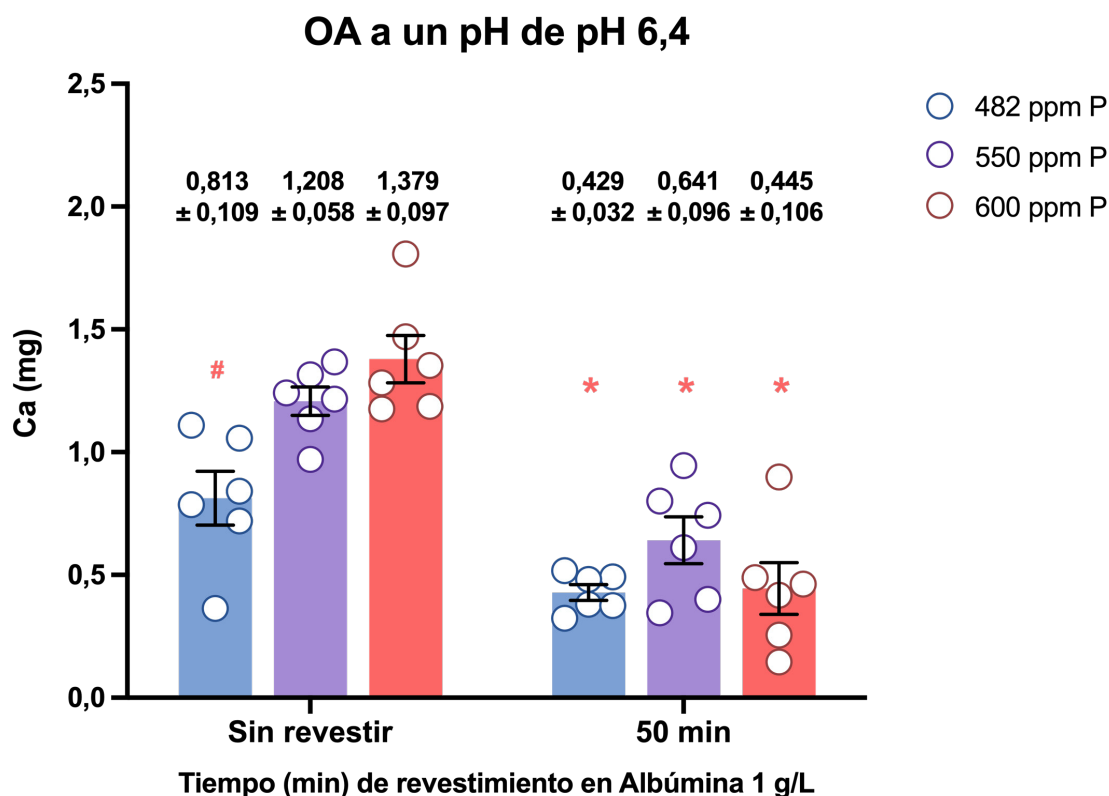


Figura 3.37 Cantidad de calcio determinada en cada una de las secciones (sin revestir y revestidas previamente durante 50 minutos en albúmina 1 g/L) incubadas a pH 6,4 con distintas concentraciones de fósforo (482, 550 y 600 ppm). La incubación se llevó a cabo en estático, durante 24 horas a 37°C. * Para una misma concentración de fósforo, diferencias significativas con las secciones sin revestir con un p-valor <0,01 mediante la prueba T-student para muestras independientes. # Para las secciones del grupo sin revestir, diferencias significativas con las secciones incubadas en concentraciones distintas de fósforo, con un p-valor <0,01 mediante la ANOVA de una vía con prueba posthoc de Bonferroni.

2.4.1.1.3 Experimentos realizados en orina artificial a un pH de 6,5

Como ya se comentó anteriormente, los experimentos a pH 6,5 se realizaron solo con secciones sin revestir y se incubaron en OA en ausencia y presencia de albúmina a una concentración de 0,1 g/L. A demás, se sustituyó la concentración de 600 ppm de fósforo, elevándola hasta 800 ppm.

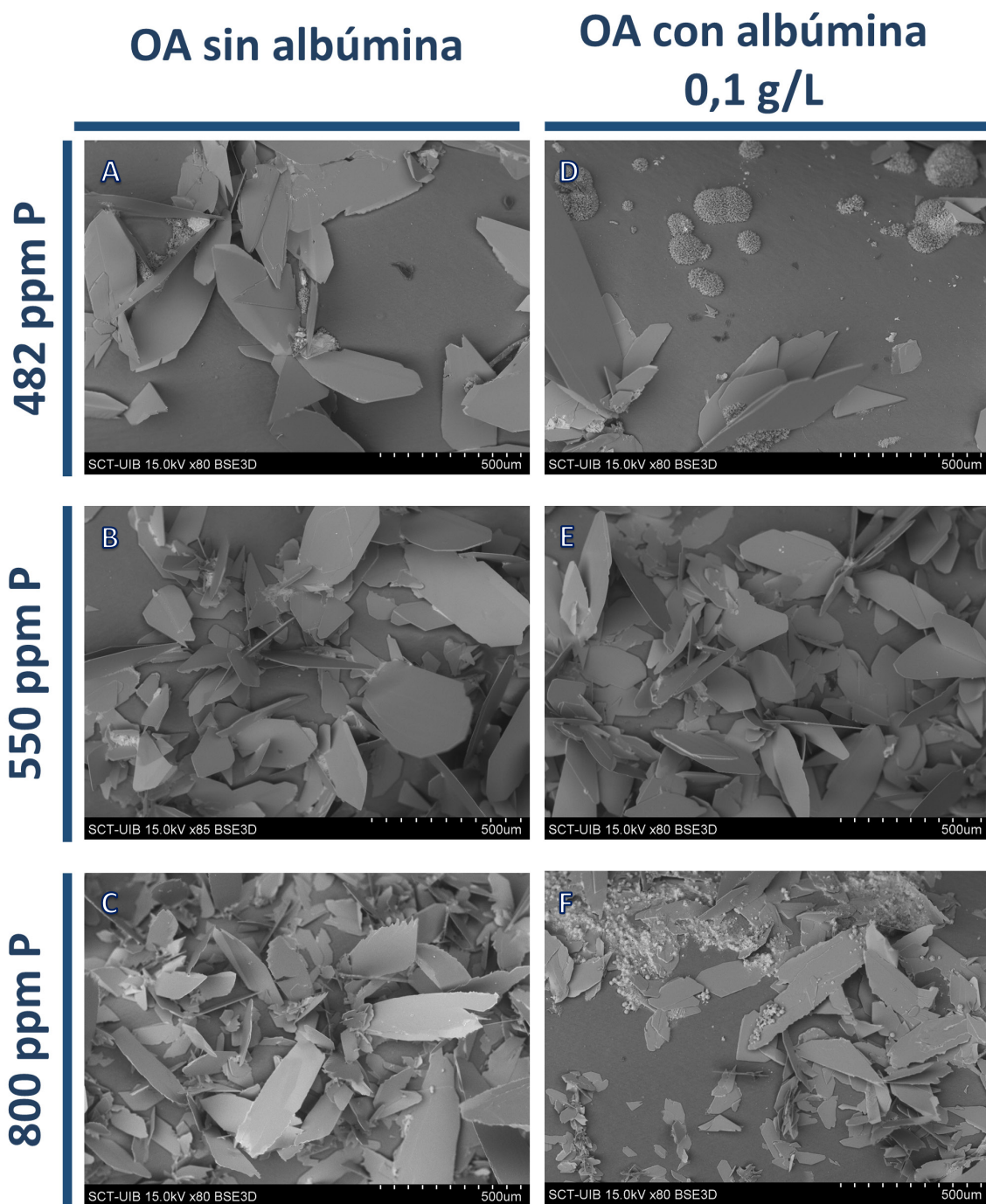


Figura 3.38 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las secciones tygon sin revestir incubadas en estático en orina artificial en ausencia (A-C) y presencia de albúmina 0,1 g/L (D-F) aun pH 6,5 y con diferentes concentraciones de fósforo (482, 550 y 800 ppm).

A pH 6,5 se formaron grandes cristales de BRU planos y con forma de cuchilla en todas las secciones tygon, tanto las incubadas en OA sin albúmina (Figura 3.38 A-C) como las incubadas en OA con albúmina 0,1 g/L (Figura 3.38 D-F). Para las secciones incubadas

en OA sin albúmina (Figura 3.38 A-C), en presencia de 550 y 800 ppm de fósforo la cantidad de BRU observada fue mayor que las secciones incubadas en 482 ppm.

La sección sin revestir incubada en OA con albúmina 0,1 g/L (Figura 3.38 D-F) en presencia de 482 ppm de fósforo presentó grandes esferulitos de HAP en la superficie, mientras que la incubada en 800 ppm de fósforo presentó una capa de HAP en la superficie formada también por esferulitos muy pequeños. En cambio, la incubada en presencia 550 ppm de fósforo no presentó cristalización de HAP aparente.

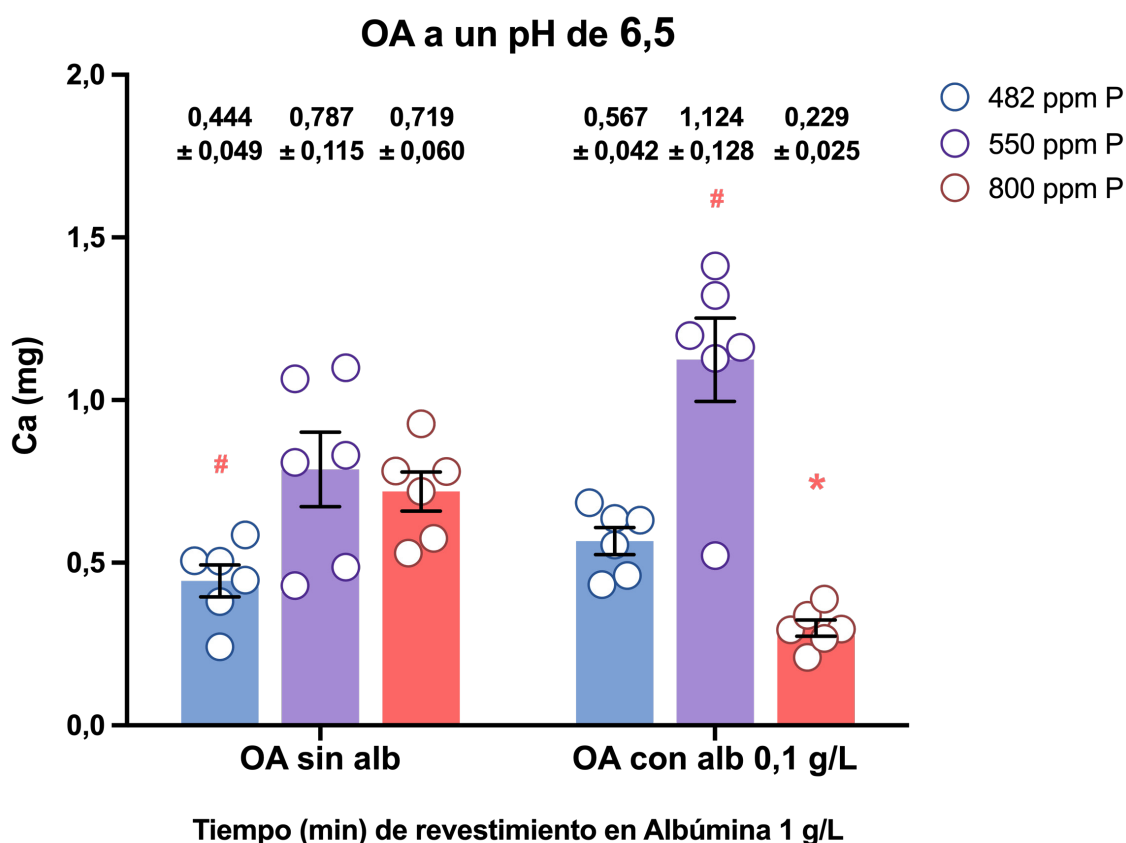


Figura 3.39 Cantidad de calcio determinada en las secciones sin revestir incubadas en OA con ausencia o presencia de albúmina 0,1 g/L a pH 6,5 con distintas concentraciones de fósforo (482, 550 y 800 ppm). La incubación se llevó a cabo en estático, durante 24 horas a 37°C. * Para las secciones incubadas con 800 ppm de fósforo, diferencias significativas con un p-valor <0,001 mediante la prueba T-student para muestras independientes. # Para las secciones incubadas en OA en ausencia o presencia de albúmina 0,1 g/L, diferencias significativas con las secciones incubadas en concentraciones distintas de fósforo, con un p-valor <0,05 mediante la ANOVA de una vía con prueba posthoc de Bonferroni.

Por otro lado, a una concentración de 800 ppm de fósforo las secciones incubadas en OA con albúmina 0,1 g/L presentaron una disminución significativa de la

cantidad de calcio en su superficie en comparación a las secciones incubadas en OA sin albúmina (0,229 vs. 0,749, Figura 3.39). Esto es debido a que en la primera sección disminuye la cantidad de cristales de BRU depositados y aumenta la presencia de la HAP (Figura 3.38 F), la cual da unas señales de calcio más bajas. En OA con albúmina 0,1 g/L, las secciones incubadas con 550 ppm de fósforo presentaron una cantidad de calcio significativamente mayor que las incubadas con 482 y 800 ppm. Esto es debido a la gran cantidad de BRU depositada en la sección, que se traduce en una elevada señal de calcio (Figura 3.38 E). En cambio, en OA sin albúmina las secciones incubadas con 482 ppm de fósforo presentaron una cantidad de calcio significativamente menor que las incubadas con 550 y 800 ppm (Figura 3.39), ya que presentó una menor cantidad de BRU en la superficie (Figura 3.38 A).

2.4.1.1.4 Resultados obtenidos en función del pH y la concentración de fósforo de la orina artificial

Finalmente, se llevaron a cabo experimentos adicionales en OA sin albúmina con 482, 550 y 800 ppm de fósforo ajustada a pH 6,7 y 7 para completar toda la información obtenida y comparar el efecto del pH entre las distintas concentraciones de fósforo.

Primeramente, las imágenes de microscopia electrónica mostraron que a pH 6,3, 6,4 y 6,5 (Figura 3.40 A-C, D-F y G-I respectivamente) se formaron únicamente cristales de BRU con morfología plana y de cuchilla. El tamaño de estos cristales de BRU era menor, pero fueron más abundantes a pH 6,5 (Figura 3.40 G-I). A pH 6,7 (Figura 3.40 L-L) se formaron mayoritariamente HAP en forma de capa poco densa distribuida sobre la superficie de la sección tygon, dejando trozos sin revestir. A una concentración de 482 ppm de fósforo también se observaron algunos cristales de BRU sobre la capa de HAP. Finalmente, a pH 7 (Figura 3.40 M-Ñ) se forma únicamente HAP en todas las secciones incubadas a distintas concentraciones de fósforo (482, 550 y 800 ppm). Esta HAP se encuentra formando una capa densa y gruesa que recubre de manera homogénea toda la superficie de la sección.

La cantidad de calcio determinada fue significativamente menor en las secciones incubadas a pH 6,7 y 7, tanto a 482 ppm de fosforo, como a 550 y 800 ppm (Figura 3.41). Por otro lado, a pH 6,3 y 6,4, las secciones incubadas con 482 ppm de fosforo presentaron

cantidades de calcio inferiores que las secciones incubadas con 550 y 800 ppm de fósforo. Finalmente, para un pH de 6,5, la cantidad de calcio determinada fue equivalente para las secciones incubadas a 482, 550 y 800 ppm de fósforo.

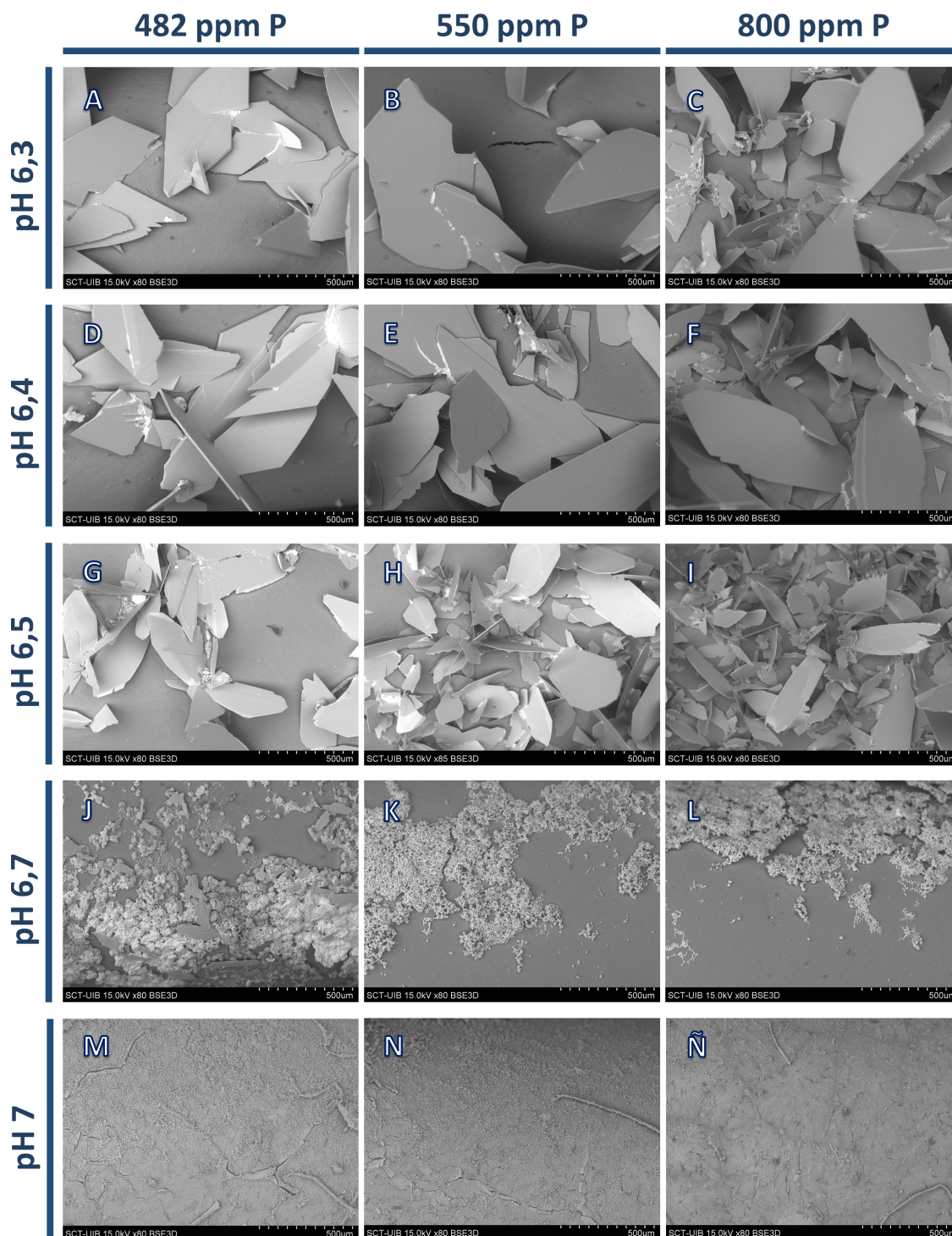


Figura 3.40 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las secciones tygon sin revestir incubadas en estático en orina artificial en ausencia de albúmina, a distintos pHs y con diferentes concentraciones de fósforo: 482, 550 y 800 ppm.

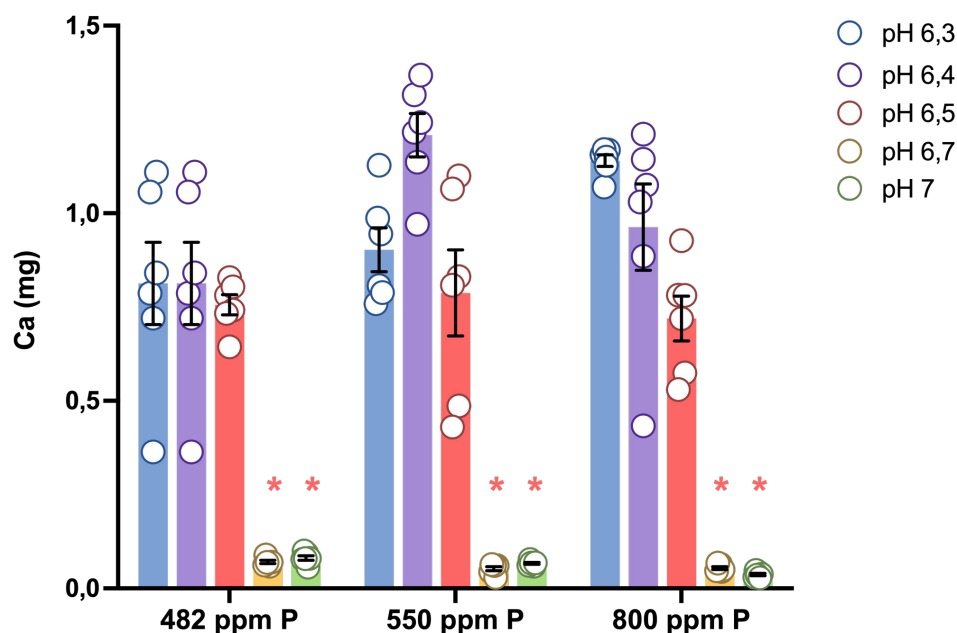


Figura 3.41 Cantidad de calcio determinada en las secciones sin revestir incubadas en OA sin albúmina con 482, 550 y 800 ppm de fósforo y distintos pHs. La incubación se llevó a cabo en estático, durante 24 horas a 37°C. * Para cada una de las concentraciones de fósforo, diferencias significativas con los pHs 6,3, 6,4 y 6,5, con un p-valor <0,001 mediante ANOVA de una vía con la prueba posthoc de Bonferroni.

Tras analizar los resultados obtenidos y observar que, al igual que ocurría con las cinéticas, se necesitaba un pH elevado para asegurar que se formara únicamente HAP, se decidió elegir la menor concentración probada de fósforo, 482 ppm, a un pH de 7.

2.4.1.2 Optimización de la formación de depósitos de hidroxiapatita: cristalizaciones mediante el sistema en flujo

Una vez estudiadas y elegidas las condiciones de cristalización de la HAP, estas se ajustaron también para los estudios en flujo, donde la duración del experimento era de 48 horas y el número muestral que podía utilizarse más limitado.

2.4.1.2.1 Condiciones experimentales: 482 ppm P, 170 ppm Ca y distintos pHs

Primeramente, se estudiaron las mismas concentraciones elegidas para llevar a cabo los experimentos en estático, 482 ppm de fósforo y 170 ppm de calcio. Con la OA sin albúmina ajustada a un pH de 6,3 los cristales formados en el sistema en flujo fueron mínimos, tanto en las secciones sin revestir (Figura 3.42 A) como en las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos (Figura 3.42 D). Se

encontró algún núcleo cristalino de BRU, pero en general la cantidad de calcio determinada en cada tipo de sección fue nula (Figura 3.43).

482 ppm P 170 ppm Ca 48 horas

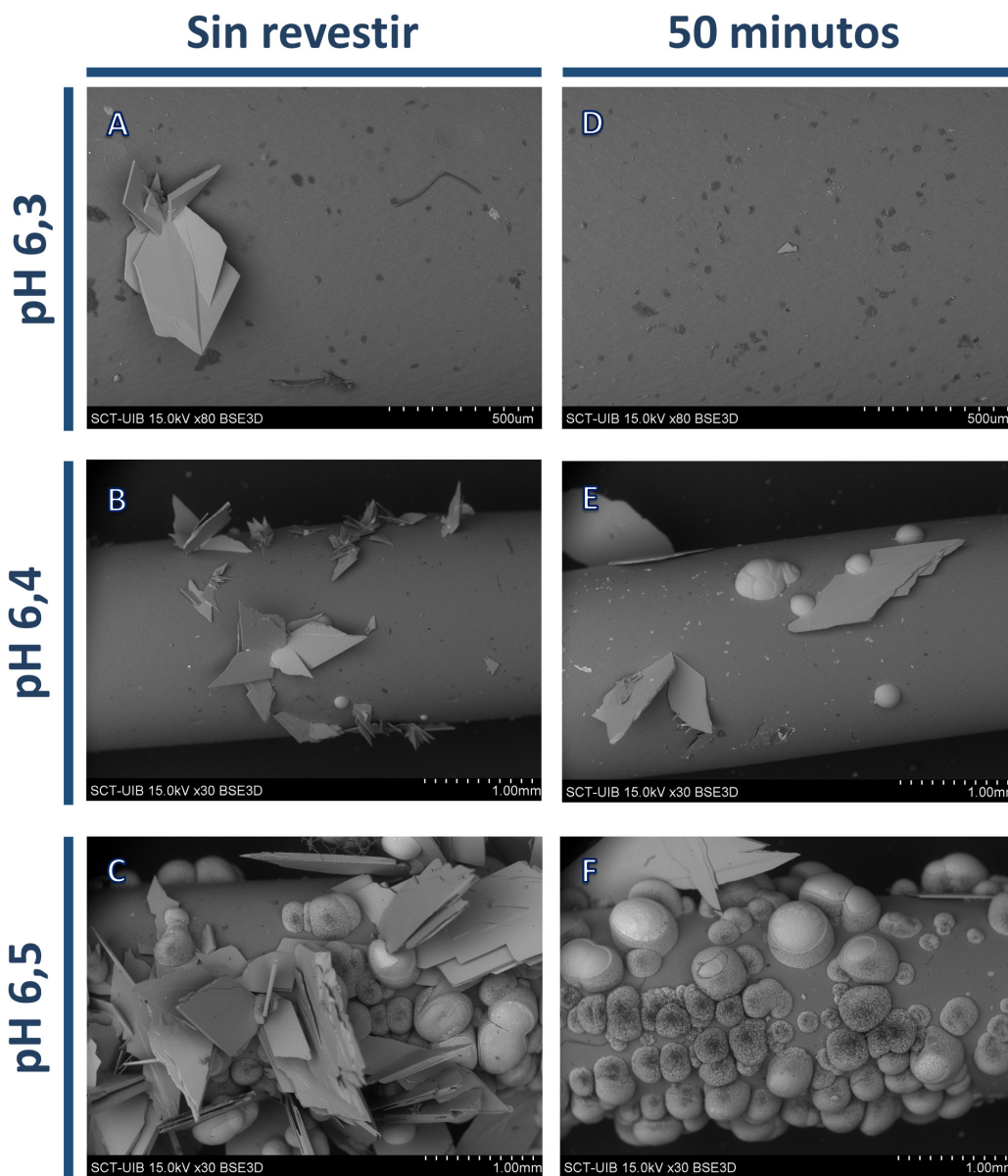


Figura 3.42 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las secciones tygon sin revestir (A-C) y revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos (D-F) incubadas en flujo durante 48 horas a 37 °C en OA sin albúmina a distintos pHs (6,3, 6,4 y 6,5). La orina artificial tenía una concentración 482 ppm de fósforo y 170 ppm de calcio.

Con la OA ajustada a un pH de 6,4, los principales cristales formados en las secciones sin revestir (Figura 3.42 B) fueron de BRU, con la presencia de algún esferulito de HAP, mientras que en las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos (Figura 3.42 E) la presencia de HAP fue mayor. La cantidad de calcio

determinada en cada tipo de sección fue baja y equivalente entre los dos grupos de secciones (Figura 3.43).

Finalmente, a un pH de 6,5 se produjo una cristalización cálcica excesiva que puso en compromiso el funcionamiento del sistema en flujo. En las secciones sin revestir (Figura 3.42 C) se formaron grandes cantidades de BRU juntamente con grandes esferulitos de HAP recubriendo la superficie. Por otro lado, en las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos (Figura 3.42 F) la presencia de BRU fue menor, pero con muchos más esferulitos de HAP recubriendo la superficie. La cantidad de calcio determinada en cada tipo de sección fue significativamente mayor que las comparadas a los anteriores pHs (6,3 y 6,4), mientras que las revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos la cantidad fue menor en comparación con las secciones sin revestir (Figura 3.43).

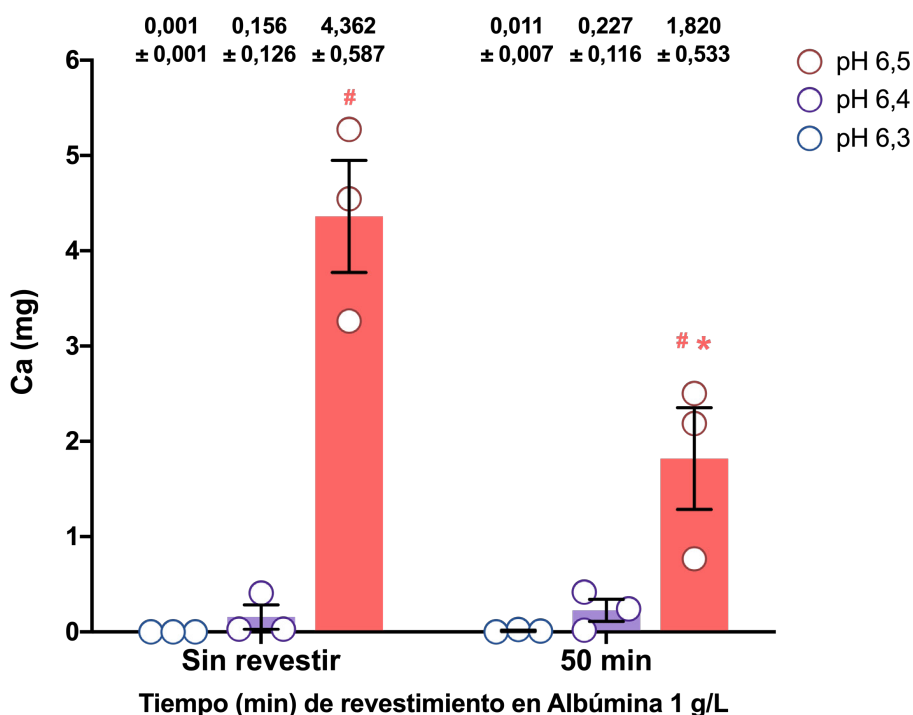


Figura 3.43 Cantidad de calcio determinada en las secciones tygon sin revestir y revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos incubadas en flujo durante 48 horas a 37 °C en OA sin albúmina a distintos pHs (6,3, 6,4 y 6,5). La orina artificial tenía una concentración 482 ppm de fósforo y 170 ppm de calcio. * Diferencias significativas entre las secciones incubadas a un pH de 6,5 con un p-valor <0,05 mediante la prueba T-student para muestras independientes. # Diferencias significativas entre los distintos pHs para las secciones de un mismo grupo (sin revestir o revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos), con un p-valor <0,05 mediante la ANOVA de una vía con prueba posthoc de Bonferroni.

2.4.1.2.2 Condiciones experimentales: 482 ppm P, pH 7 y distintas concentraciones de calcio

Al continuar formándose cristales de BRU en OA a un pH de 6,5, este se aumentó hasta 7, ya que en el estudio cinético (capítulo 2) y de formación de depósitos en estático se observó que solo mediante este pH elevado se aseguraba la cristalización exclusiva de la HAP.

Sin revestir pH 7 482 ppm P

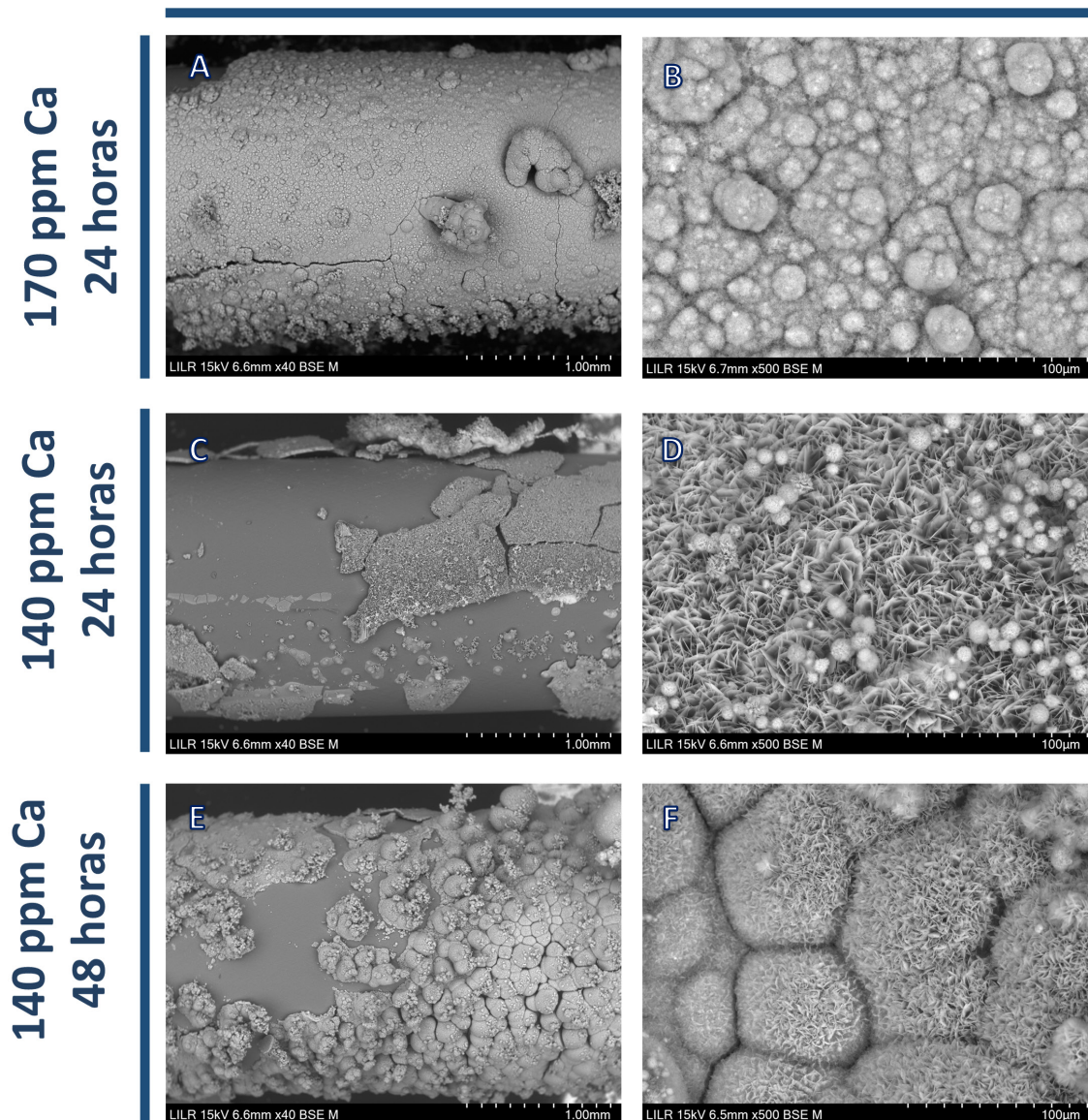


Figura 3.44 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las secciones tygon sin revestir incubadas en flujo 37 °C, a pH 7 y en OA sin albúmina con una concentración de fósforo de 482 ppm. Los experimentos se llevaron a cabo con A y B) una concentración de calcio de 170 ppm durante 24 horas, C y D) 140 ppm de calcio y una duración de 24 horas y E y F) 140 ppm de calcio y una duración de 48 horas.

Para las secciones incubadas en OA con una concentración de fósforo de 482 ppm a pH 7, una concentración de calcio de 170 ppm (Figura 3.44 A y B) resultó en una cristalización excesiva de la HAP, que obligó a parar el experimento en flujo después de sólo 24 horas. Se observó una gran capa compacta y muy gruesa de HAP que recubría enteramente la sección. En esta capa se pueden distinguir grandes esferulitos de HAP fusionados entre ellos.

Debido a esto se disminuyó la concentración de calcio de la OA a 140 ppm y se realizó un experimento en flujo de una duración menor, 24 horas, para ver si el sistema era capaz de soportar estas condiciones (Figura 3.44 C y D). Al cabo de 24 horas se observó sobre la formación de una capa de HAP más fina que también recubría enteramente la sección. En esta capa aún no se habían formado los esferulitos compactos de HAP, sino que se trató de una capa de HAP amorfo compacto con esferulitos de HAP muy pequeños esparcidos sobre esta.

Como a una concentración de calcio de 140 ppm el sistema aguantó las 24 horas, se repitió el experimento alargándolo hasta las 48 horas (Figura 3.44 E y F). La cristalización observada sobre las secciones volvió a ser muy elevada, observando una vez más una capa de HAP densa formada por grandes esferulitos compactos.

Finalmente, para evitar riesgos que comprometieran el buen funcionamiento del sistema en flujo al final se decidió disminuir la concentración de calcio hasta 120 ppm para los estudios de cristalización en flujo, que fueron las mismas condiciones utilizadas para el estudio cinético (482 ppm de fósforo, 120 ppm de calcio a pH 7).

2.4.2 Estudio del efecto de la albúmina en la formación de depósitos de hidroxiapatita sobre secciones tygon.

2.4.2.1 Experimentos mediante el sistema en estático (*Batch*)

Una vez establecidas las condiciones de la OA gracias al proceso de optimización descrito en el apartado anterior, se prosiguió al estudio del efecto de la albúmina en la formación de depósitos de hidroxiapatita sobre secciones tygon. Los primeros experimentos realizados fueron mediante el sistema en estático, con una OA ajustada a

pH 7, con albúmina 0,1 g/L y una concentración de fósforo y calcio de 482 ppm y 170 ppm respectivamente (Tabla 3.2).

Después de 24 horas de incubación en estático, los depósitos obtenidos se ilustran en la Figura 3.45. El análisis de las secciones mediante microscopia electrónica de barrido mostró que en todas las secciones se observó solamente HAP (Figura 3.45). En las secciones sin revestir incubadas tanto en OA sin albúmina como en OA con albúmina 0,1 g/L (Figura 3.45 A y B respectivamente) presentaron una capa densa de HAP recubriendo la superficie de la sección. Las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos incubadas tanto en OA sin albúmina como en OA con albúmina 0,1 g/L (Figura 3.45 C y D respectivamente) también presentaron una densa capa de HAP. En todas las secciones se encontraron también esferulitos de HAP individuales depositados sobre la capa.

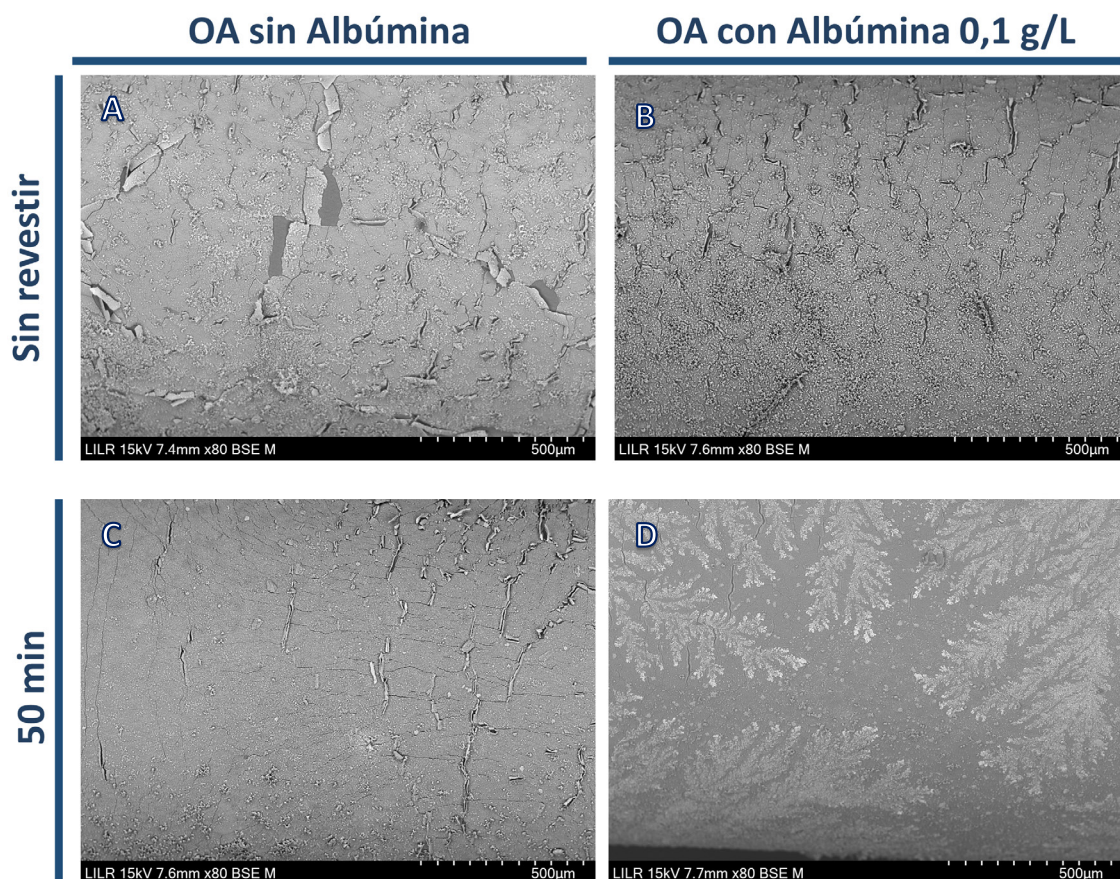


Figura 3.45 Imágenes de microscopia electrónica de las secciones tygon incubadas en ausencia o presencia de albúmina 0,1 g/L en orina artificial a un pH 7 en estático. Las secciones fueron previamente revestidas en albúmina 1 g/L durante A y B) 0 (sin revestir) y C y D) 50 minutos.

En la Figura 3.46 se ilustran a 500 aumentos las secciones sin revestir (Figura 3.46 A y B) y revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos (Figura 3,46 C y D) para cada una de las condiciones (OA sin o con albúmina 0,1 g/L). Se observa más detalladamente la presencia de la capa formada en cada una de las secciones debido a las grietas presentes, que confirman la formación de la capa. Además, también se puede observar la presencia de esferulitos agregados en la superficie de la capa de HAP en todas las secciones de las distintas condiciones.

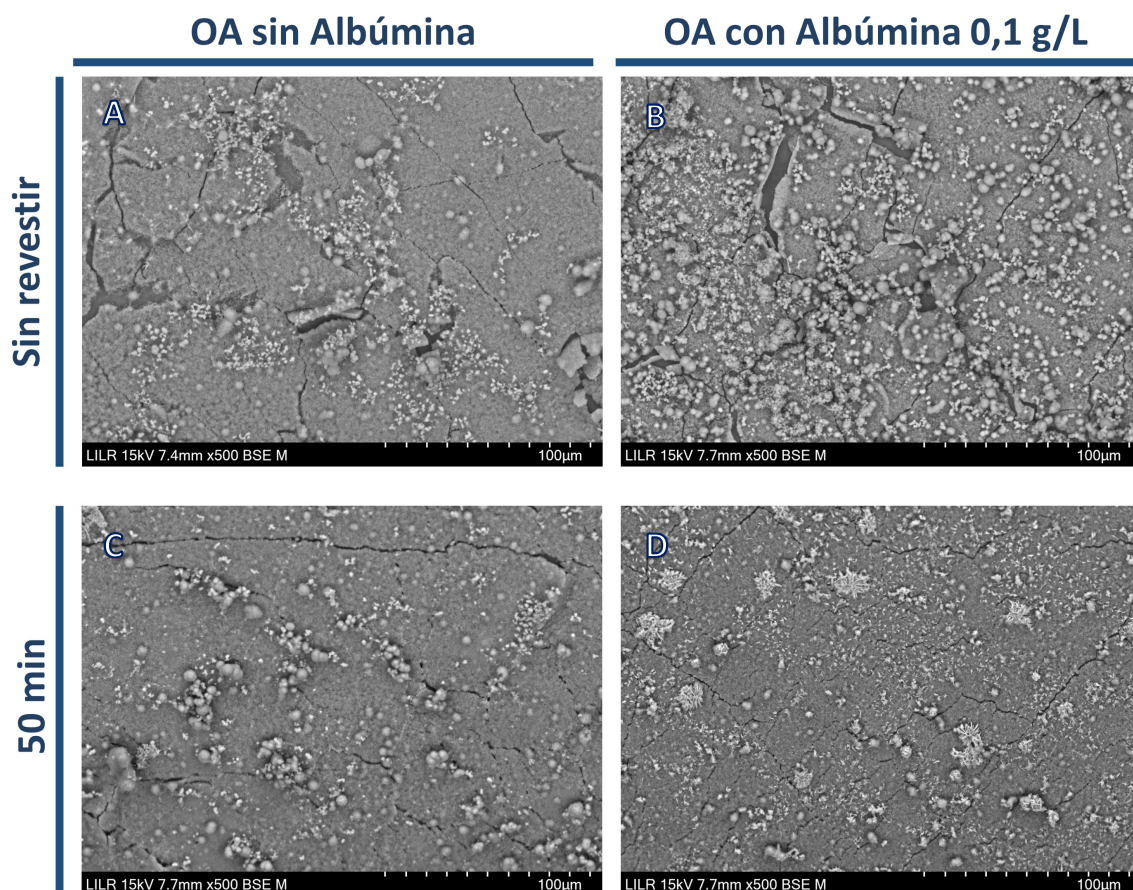


Figura 3.46 Imágenes de microscopía electrónica a 500 aumentos de las secciones tygon incubadas en ausencia o presencia de albúmina 0,1 g/L en orina artificial a un pH 7 en estático. Las secciones fueron previamente revestidas en albúmina 1 g/L durante A y B) 0 (sin revestir) y C y D) 50 minutos.

Al disolver los depósitos y realizar la cuantificación del calcio se observaron diferencias significativas entre las secciones sin revestir ($0,096 \pm 0,003$) y las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos ($0,081 \pm 0,003$) que fueron incubadas en OA sin albúmina (Figura 3.47). Para las secciones incubadas en OA con albúmina 0,1 g/L, también hubo diferencias significativas entre la sección sin revestir

($0,098 \pm 0,014$) y la sección revestida previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos ($0,057 \pm 0,004$). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las secciones sin revestir incubadas en distintas condiciones (OA en ausencia o presencia de albúmina 0,1 g/L), pero sí entre las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos, donde las incubadas en OA con albúmina 1 g/L presentaron una cantidad de calcio significativamente menor que las incubadas en OA sin albúmina.

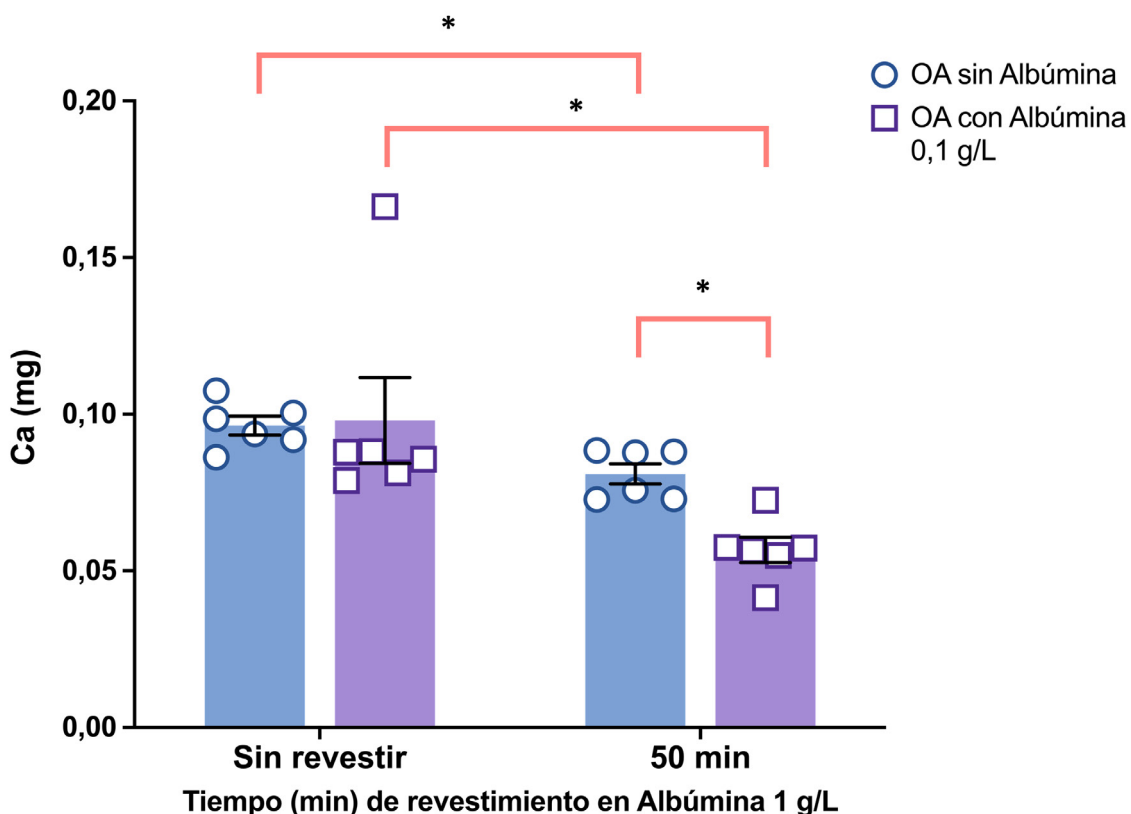


Figura 3.47 Concentración de calcio determinada en cada una de las secciones (sin revestir y revestidas previamente durante 50 minutos en albúmina 1 g/L) incubadas mediante dos condiciones diferentes: OA a pH 7 en presencia o ausencia de albúmina 0,1 g/L. La incubación se llevó a cabo en estático, durante 24h horas a 37°C. * Diferencias significativas con un p-valor <0,05 mediante la prueba T-student para muestras independientes.

2.4.2.2 Experimentos mediante el sistema en flujo

Una vez estudiado el efecto de la albúmina en la formación de depósitos de hidroxapatita sobre secciones tygon mediante el sistema en estático, se prosiguió a repetir la experimentación mediante el sistema en flujo. Para no comprometer la integridad del sistema, la concentración de calcio se rebajó hasta las 120 ppm (Tabla 3.2).

El estudio observacional mediante microscopia electrónica de barrido de la formación de cristales de HAP en flujo mostró que a un pH de 7 y con la OA descrita en la Tabla 3.5, se formó únicamente HAP en todas las secciones (Figura 3.48).

La sección sin revestir incubada en OA sin albúmina (Figura 3.48 A) presentó una mezcla de grandes esferulitos de HAP encontrados en un extremo de la sección, así como también otros depósitos también de HAP, pero más pequeños distribuidos sobre la superficie. Por otro lado, la sección revestida previamente en albúmina durante 50 minutos (Figura 3.48 C) presentó grandes esferulitos de HAP formando una capa gruesa en la superficie, en conjunción con otros depósitos de HAP más pequeños también repartidos por la superficie de la sección. Para la incubación en OA con albúmina 0,1g/L, tanto la sección sin revestir (Figura 3.48 B) como la sección revestida previamente en albúmina durante 50 minutos (Figura 3.48 D) presentaron mayoritariamente depósitos de HAP más pequeños distribuidos por toda la superficie de la sección.

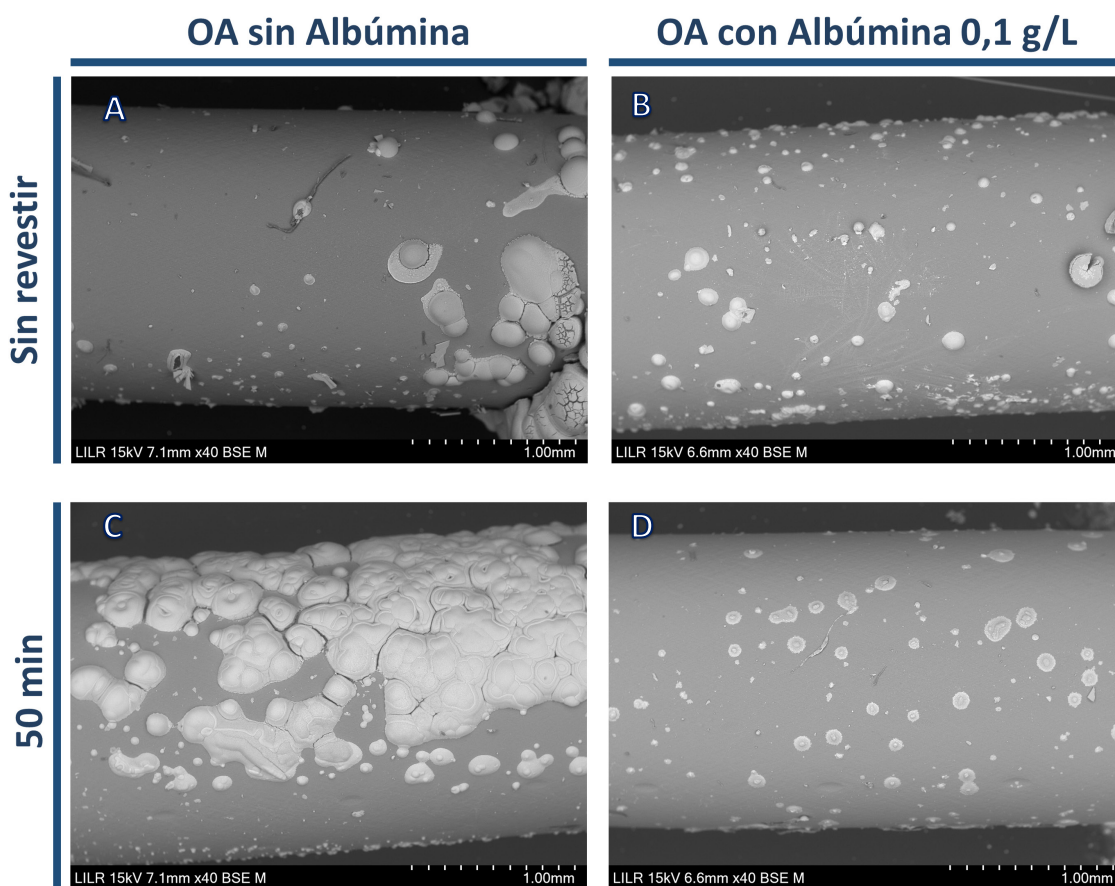


Figura 3.48 Imágenes de microscopia electrónica de las secciones tygon incubadas en ausencia o presencia de albúmina 0,1 g/L en orina artificial a un pH 7 en flujo. Las secciones fueron previamente revestidas en albúmina 1 g/L durante A y B) 0 (sin revestir) y C y D) 50 minutos.

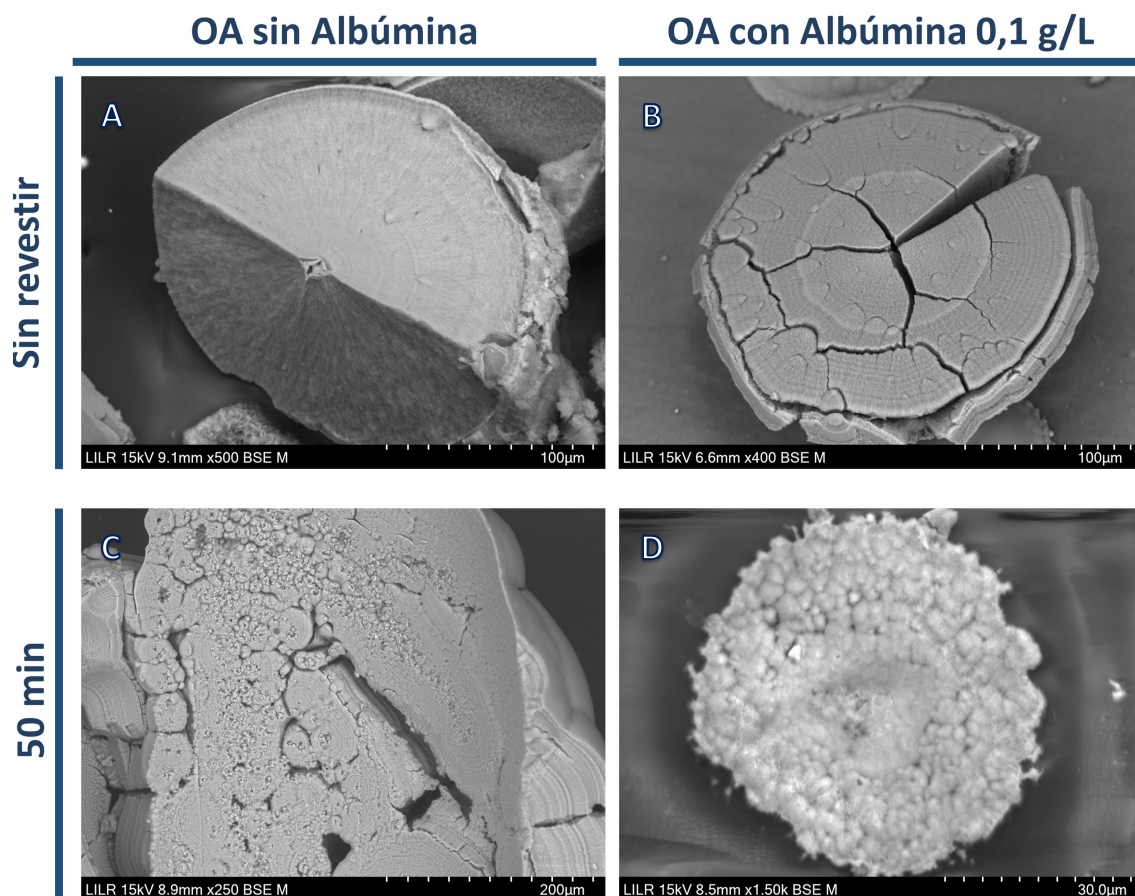


Figura 3.49 Imágenes de microscopía electrónica del reverso de los esferulitos de HAP encontrados en las secciones tygon incubadas en ausencia o presencia de albúmina 0,1 g/L en orina artificial a un pH 7 en flujo. Las secciones se revistieron previamente en albúmina 1 g/L durante A y B) 0 (sin revestir) y C y D) 50 minutos.

Para cada una de las secciones (tanto la sección revestida previamente en albúmina durante 50 minutos como la no revestida), en cada una de las condiciones estudiadas (OA con ausencia o presencia de albúmina 0,1 g/L) se fotografió la estructura del reverso de un esferulito de HAP (Figura 3.49).

Los esferulitos de las secciones sin revestir incubadas en OA sin albúmina (Figura 3.49 A) y OA con albúmina 0,1 g/L (Figura 3.49 B) tenían un tamaño y estructura parecida. En los dos se observa una morfología hemisférica monolítica y regular (aunque el de la sección revestida incubada en OA con albúmina 0,1g/L aparezca fracturado) con un radio aproximado de 100 µM. Estos hemisferios regulares consistían en varias capas concéntricas compuestas la aglomeración de pequeños esferulitos microscópicamente apenas distinguibles.

En la sección revestida previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos incubada en orina artificial sin albúmina (Figura 3.49 C) no se observa de un hemisferio individual, sino de una masa compacta de distintos hemisferios en la cual sí se puede ver una zona exterior formada por capas concéntricas y otra interior formada por la aglomeración de varios conjuntos de esferulitos. De la misma forma ocurre con el esferulito encontrado en la sección revestida incubada en OA con albúmina 0,1g/L (Figura 3.49 D): el desarrollo posterior del núcleo de la concreción procede de la agregación de los esferulitos que llegan desde la disolución y su acumulación en la superficie del sustrato, que se van compactando hasta formar el esferulito de mayor tamaño con morfología hemisférica.

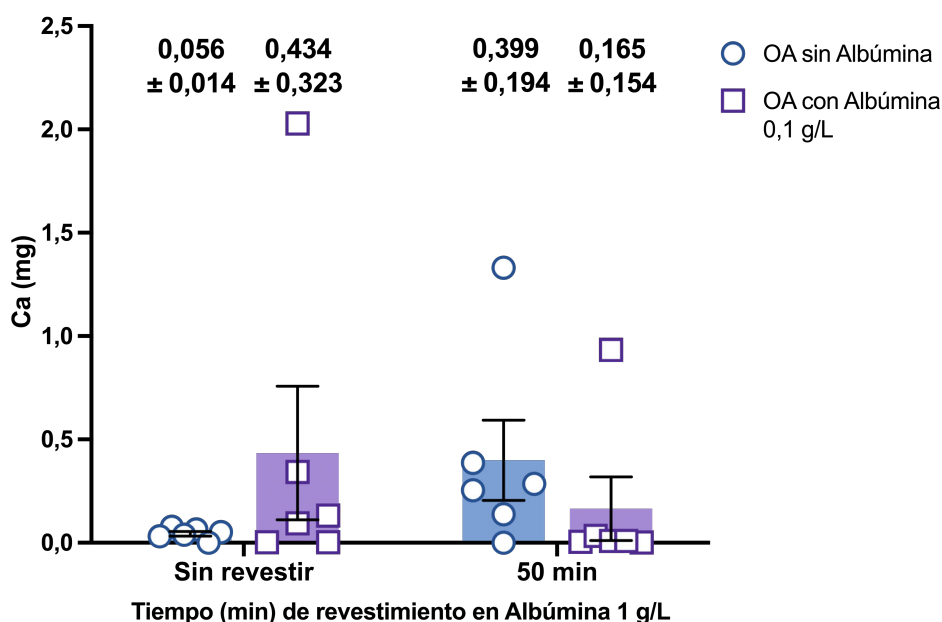


Figura 3.50 Concentración de calcio determinada en cada una de las secciones (sin revestir y revestidas previamente durante 50 minutos en albúmina 1 g/L) incubadas mediante dos condiciones diferentes: OA a pH 7 con presencia o ausencia de albúmina 0,1 g/L. La incubación se llevó a cabo en flujo, durante 48 horas a 37°C.

La disolución de los depósitos y su posterior cuantificación mediante la determinación del calcio mostraron que no observaron diferencias significativas entre las secciones sin revestir y las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos ($0,081 \pm 0,003$) que fueron incubadas tanto en OA sin albúmina como en OA con albúmina 0,1 g/L (Figura 3.50). Por otro lado, tampoco se observaron diferencias significativas entre las secciones sin revestir incubadas en distintas condiciones (OA en ausencia o presencia de albúmina 0,1 g/L), ni para las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos.

2.5 Efecto de la albúmina en la formación de depósitos de ácido úrico

2.5.1 Optimización de la formación de depósitos de ácido úrico sobre secciones tygon

2.5.1.1 Optimización de la formación de depósitos de ácido úrico: cristalizaciones mediante el sistema en estático (*Batch*)

Para conseguir una cristalización del AU estable, reproducible y con baja variabilidad entre réplicas se hicieron una serie de pruebas preliminares que conforman el proceso de optimización. Primeramente, se descartó preparar la orina artificial con dos disoluciones por separado (A y B) e igual que con los ensayos turbidimétricos (capítulo 2), también se utilizó orina artificial doble concentrada (OADC) ajustada a pH 5,4 (Tabla 3.4). La preparación de una disolución conjunta de la OA permite disponer de la disolución de AU 2 g/L sin integrar en una de las dos disoluciones (A o B), lo que posibilita probar diferentes concentraciones de AU utilizando siempre la misma disolución de OADC preparada desde el inicio.

Igual que con los ensayos turbidimétricos, también se preparó una disolución madre de AU 2 g/L ajustada a pH 10,7 con el objetivo de disolver bien todo el AU. A partir de aquí se mezclaron distintas cantidades de OADC, H₂O y AU 2 g/L para obtener disoluciones de orina artificial con distintas concentraciones de AU:

- **AU 400 ppm:** 40 mL de OADC + 40 mL de H₂O + 20 mL AU 2g/L
- **AU 300 ppm:** 42,5 mL de OADC + 42,5 mL de H₂O + 15 mL AU 2g/L
- **AU 250 ppm:** 43,75 mL de OADC + 43,75 mL de H₂O + 12,5 mL AU 2g/L
- **AU 200 ppm:** 45 mL de OADC + 45 mL de H₂O + 10 mL AU 2g/L

Las disoluciones de 400, 300 i 250 ppm de AU cristalizaron de manera instantánea al ajustarlas a pH 5, por lo que se descartaron. La disolución de 200 ppm de AU se consiguió ajustar a pH 5 y 4,7, pero con el primer pH la formación de cristales de AU fue muy reducida. A pH 4,7, aunque no cristalizó enseguida, sí que cristalizó dentro de los 30 minutos posteriores de ajustar la disolución a este pH, por lo que también se descartaron estas condiciones.

Continuando con la OA ajustada a pH 4,7, se hicieron pruebas de cristalización sobre secciones de tygon con concentraciones de 170, 165, 160, 150 y 140 ppm de AU,

en presencia de albúmina 0,1 g/L en la mezcla final. Sólo se observaron una cantidad significativa de cristales a 165 (Figura 3.51 B) y 170 ppm de AU (Figura 3.51 C). La cantidad de estos aumentó al incrementar la concentración de AU en disolución, siendo mayor a 165 ppm de AU y 170 ppm de AU. En la sección incubada en OA con 160 ppm de AU no se observó ningún cristal (Figura 3.51 A). El precipitado blanco que se observó en las secciones corresponde a la evaporación de NaCl y KCl.

A 160 ppm AU

B 165 ppm AU

C 170 ppm AU

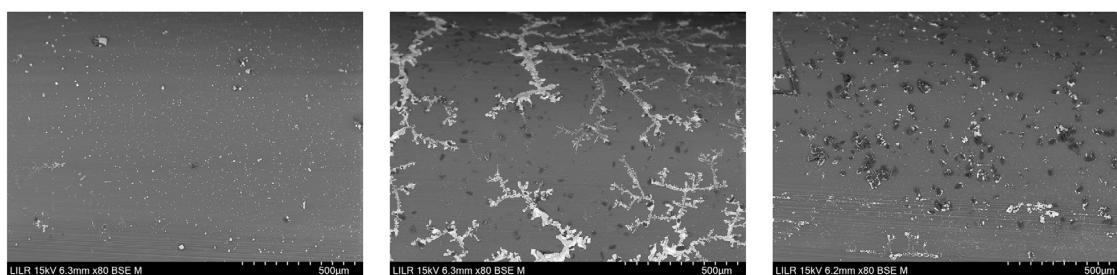


Figura 3.51 Imágenes de microscopia electrónica de barrido de los cristales de ácido úrico sobre la superficie de secciones tygon de 1,5 cm después del experimento en estático. Estas secciones fueron incubadas en OA con una concentración de albúmina 0,1 g/L ajustada a un pH de 4,7 y distintas concentraciones de AU A) 160, B) 165 y C) 170 ppm.

Aunque había un gran número de cristales de AU sobre las secciones incubadas en la OA ajustada a pH 4,7 con 165 i 170 ppm de AU (Figura 3.51 B y C, respectivamente), al determinar la cantidad de AU con el método colorimétrico, se observó una baja concentración (<8 ppm), muy variable entre réplicas.

De este modo, se intentó encontrar unas condiciones donde la SS del AU fuera parecida a la SS del AU en la OA con 170 ppm de AU a un pH de 4,7, pero con una la concentración de AU mayor para así aumentar el nivel de cristalización (Tabla 3.12).

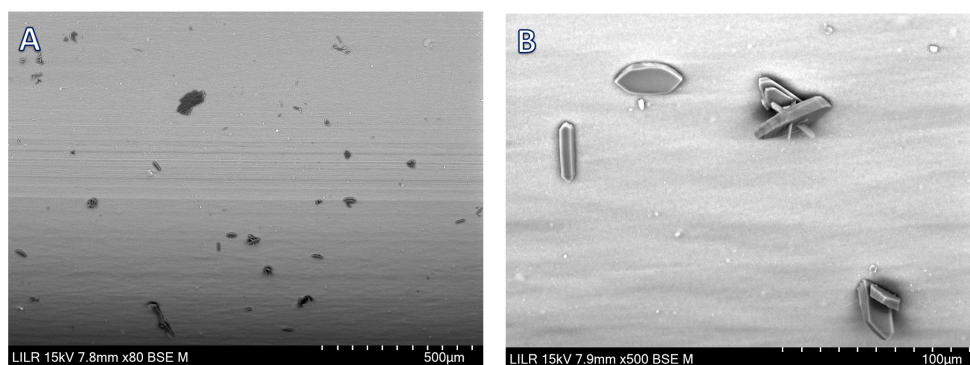
Tabla 3.12 Valores de sobresaturación del ácido úrico para distintas condiciones experimentales.

AU ppm	pH	SS _{AU}
170	4,7	1,473
165	4,7	1,430
200	5	1,423
200	4,92	1,514
192	4,87	1,506

Así, se probaron las condiciones de 200 i 192 ppm de AU a pH 4,92 i 4,87 respectivamente, con una concentración de albúmina 0,1 g/L en la OA final. Las imágenes de los cristales de AU obtenidos en ambas condiciones se recogen en la Figura 3.52. Se observó una mayor cantidad de depósitos de AU tanto con 192 ppm de AU (Figura 3.52 A y B) como con 200 ppm de AU (Figura 3.52 C y D). Los cristales observados en ambas condiciones presentaban tanto morfología hexagonal como una forma alargada acabada en punta.

Al disolver los cristales de AU de las secciones se observó una cristalización estable y reproducible en las dos condiciones probadas (Figura 3.53), pero al ser mayor la concentración de AU detectada en las secciones incubadas en OA con 200 ppm AU en a pH 4,92, estas fueron las condiciones finales que se eligieron para estudiar el efecto de la albúmina y de distintos compuestos en la formación de depósitos de ácido úrico en estático sobre secciones de 1,5 cm de tygon.

192 ppm AU pH 4,87



200 ppm AU pH 4,92

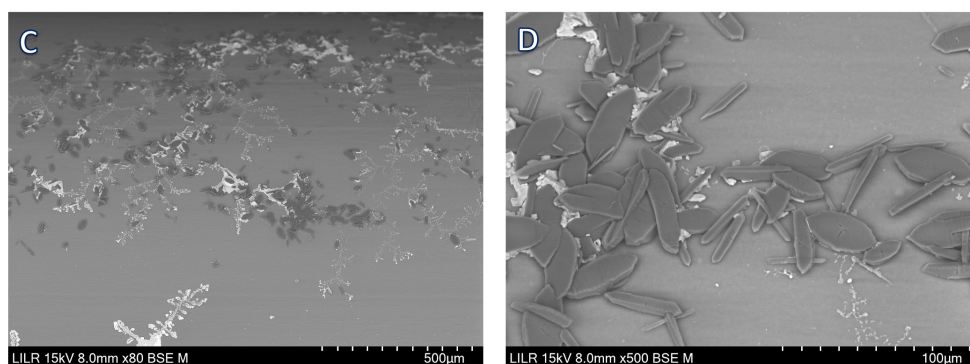


Figura 3.52 Imágenes de microscopia electrónica de barrido de los cristales de AU sobre la superficie de secciones tygon incubadas en A y B) OA con 192 ppm de AU a un pH de 4,87 y C y D) OA con 200 ppm de AU a un pH de 4,92. El experimento se llevó a cabo en estático, a 37°C durante 24 horas.

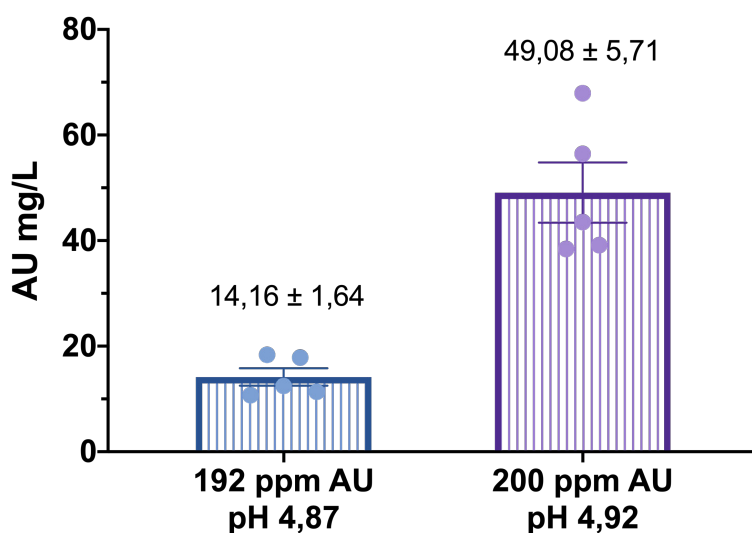


Figura 3.53 Concentración de AU determinada en la superficie de trozos tygon de 1,5 cm en las distintas condiciones de la OA en presencia de albúmina 0,1 g/L en disolución.

2.5.1.2. Optimización de la formación de depósitos de ácido úrico: cristalizaciones mediante el sistema en flujo

El sistema en flujo utilizado para el estudio de la cristalización del AU es el ilustrado en la Figura 3.11. Para estos experimentos se utilizaron las mismas concentraciones que las establecidas en el sistema en estático, con la OADC (Tabla 3.4) ajustada a pH 3,7 y una disolución de AU de 400 ppm ajustada a pH 6 después de disolver todo el AU con NaOH, para así obtener un pH final de 4,87 cuando las dos se mezclasen dentro de la cápsula.

Se intentó obtener siempre una n= 4 por grupo, teniendo en cuenta que uno de los catéteres por grupo se utilizaría para el estudio observacional de los cristales mediante microscopía electrónica de barrido.

La disolución de OA y la disolución de AU se encontraban doblemente concentradas de manera que cuando las dos confluyeran dentro de la cápsula la concentración pasara a ser la mitad. Al ser la duración del experimento de 48 horas era necesario preparar 4 litros de disolución de OADC y 4 litros de disolución de 400 ppm de AU, las cuales se tenían que renovar cada día debido a su consumo. Para estudiar los efectos de distintos compuestos en la formación de depósitos de ácido úrico, como la teobromina o la 7-metilxantina, la disolución de estos se preparó juntamente con la disolución de AU, de manera que en una misma disolución contuviera tanto el AU como

el compuesto a testar. Los experimentos se llevaron a cabo con una concentración final de albúmina de 0,1 g/L.

Lamentablemente y debido al escaso tiempo restante, sólo se pudieron hacer dos pruebas preliminares para este estudio: una primera prueba con un grupo control y con un grupo de secciones incubadas en presencia de teobromina, y una segunda prueba solo con controles (sin evaluar el efecto ningún compuesto).

En la primera prueba con las condiciones comentadas anteriormente (200 ppm de AU a un pH de 4,87), se destinaron cuatro cápsulas (y consecuentemente cuatro secciones de 1,5 cm de tygon) al grupo control y cuatro al grupo incubado con 0,2 mM de teobromina. En la segunda prueba todas las cápsulas contenían controles. Siempre se destinaba un catéter del grupo a extraer imágenes de los cristales con el microscopio electrónico de barrido.

En la Figura 3.54 se representan las concentraciones obtenidas de estas pruebas preliminares y se observa que ya de por sí las concentraciones del grupo control (n= 8, una sección descartada) son muy bajas en comparación a las obtenidas en el sistema en estático (Figura 3.53).

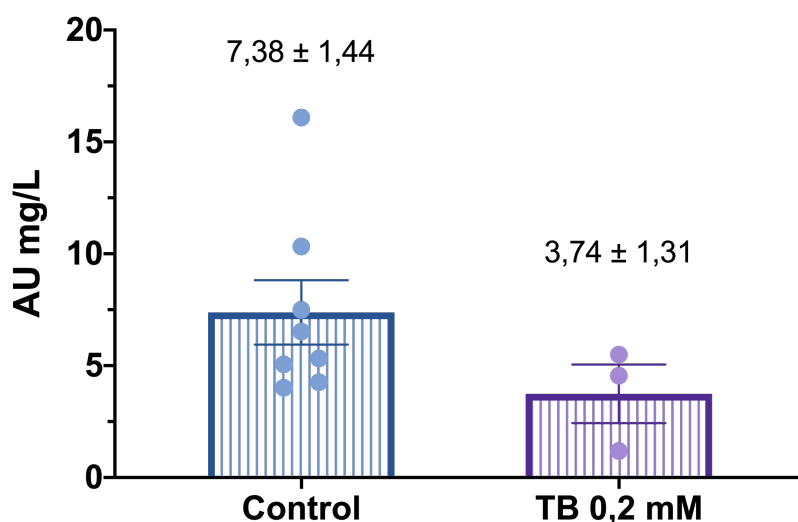


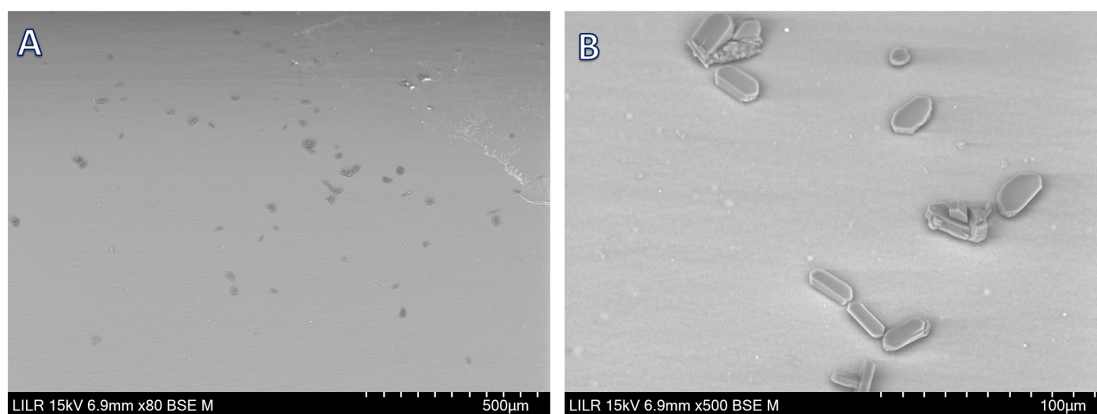
Figura 3.54 Concentraciones de AU de las secciones tygon incubadas en ausencia y presencia de 0,2 mM de teobromina. Las secciones se incubaron en OA con albúmina 0,1 g/L, con 200 ppm de AU y un pH de 4,87.

Además, la cantidad de cristales observados en las secciones incubadas en ausencia de teobromina fue escasa (Figura 3.55 A y B) y parecida a la encontrada en el grupo de secciones incubadas con teobromina (Figura 3.55 C y D).

De este modo, se tendrían que buscar unas condiciones específicas para llevar a cabo los experimentos mediante el sistema en flujo, de manera que se obtuvieran unas concentraciones de AU en las secciones del grupo control un poco más elevadas para así poder determinar los efectos de los posibles inhibidores en este sistema y en estas condiciones.

OA con Alb 0,1 g/L 200 ppm AU pH 4,87

Control



TB 0,2 mM

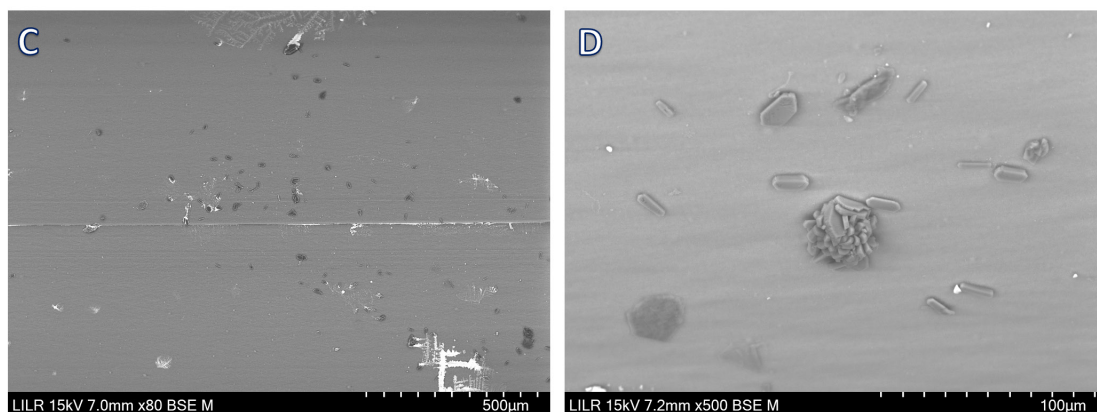


Figura 3.55 Imágenes de microscopía electrónica de los cristales de AU encontrados sobre la superficie de secciones tygon incubadas en OA con albúmina 0,1 g/L con 200 ppm de AU y un pH de 4,87. El experimento se llevó a cabo en flujo, a 37°C durante 48 horas. A y B) Cristales observados en el grupo control, C y D) Cristales del grupo incubado con 0,2 mM de teobromina.

2.5.2 Estudio del efecto de la presencia de albúmina en la formación de depósitos de ácido úrico en estático

Finalmente, y continuando con el estudio del efecto de la presencia de albúmina en la formación de depósitos cristalinos sobre secciones tygon, el último tipo de

depósito estudiado fue el AU. En este tipo de cristalización se estudió el efecto de la presencia de la albúmina como capa de revestimiento, así como su efecto en disolución, en la cristalización del AU en estático. Gracias al proceso de optimización descrito en los apartados anteriores, la concentración de AU establecida para la OA utilizada en este estudio fue de 200 ppm, a un pH de 4,92.

Mediante el análisis de los cristales con el microscopio electrónico de barrido se observó que las secciones tygon sin revestir presentaron una mayor cantidad de depósitos que las secciones revestidas previamente con albúmina 1 g/L durante 50 minutos.

En las secciones sin revestir incubadas con orina artificial sin albúmina (Figura 3.56 A y B) se encontraron una mayor cantidad de depósitos, los cuales presentaron una forma rectangular. Por otro lado, las secciones sin revestir incubadas en orina artificial que contenía albúmina 0,1 g/L (Figura 3.56 E y F) la cantidad de cristales fue menor y con una forma hexagonal redondeada. Finalmente, las secciones revestidas previamente con albúmina 1 g/L durante 50 minutos, independientemente de si fueron incubadas en OA con ausencia (Figura 3.56 C y D) o presencia de albúmina 0,1 g/L (Figura 3.56 G y H), presentaron tan pocos cristales que fueron difíciles de encontrar, observándose en su mayoría solo restos de MO proveniente de la albúmina.

Mediante la disolución de los depósitos y la posterior cuantificación del AU se observó que las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos que fueron incubadas tanto en OA sin albúmina ($3,65 \pm 0,24$) como en OA con albúmina 0,1 g/L ($5,80 \pm 0,42$) presentaron una disminución significativa de la cantidad de AU detectada en comparación con las secciones tygon sin revestir incubadas en OA en ausencia ($53,29 \pm 5,33$) o presencia de albúmina 0,1 g/L ($31,15 \pm 2,31$). Por otro lado, la presencia de albúmina a una concentración de 0,1 g/L en la disolución de orina artificial produjo una disminución significativa de la cantidad de depósitos encontrados en las secciones tygon sin revestir. En cambio, para las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos, no se observaron diferencias significativas entre las incubadas en OA sin albúmina y OA con albúmina 0,1 g/L (Figura 3.57).

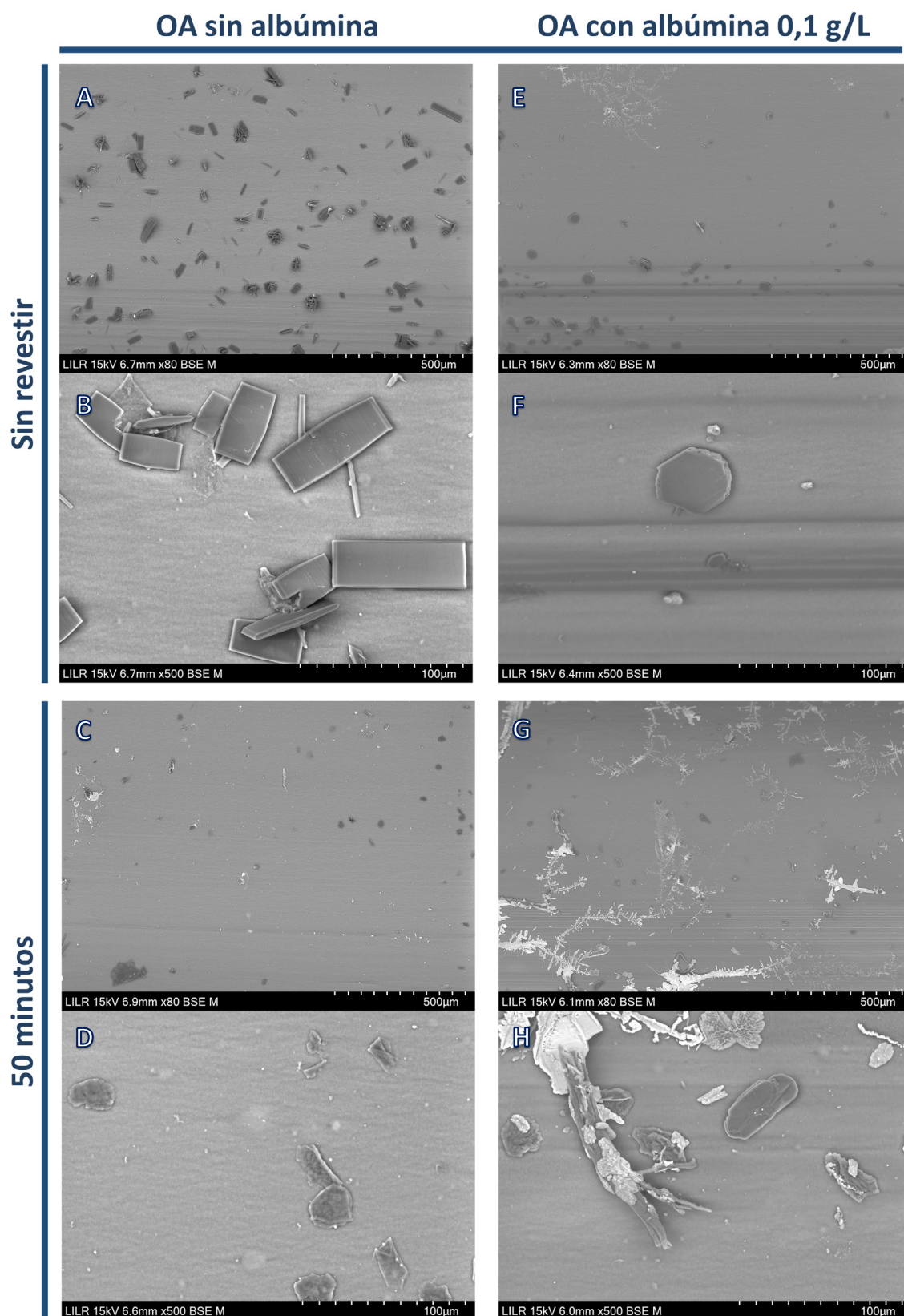


Figura 3.56 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cristales de AU formados en la superficie de las secciones de tygon sin revestir y revestidas previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos incubadas en ausencia (A-D) y presencia (E-H) de albúmina 0,1 g/L en la orina artificial.

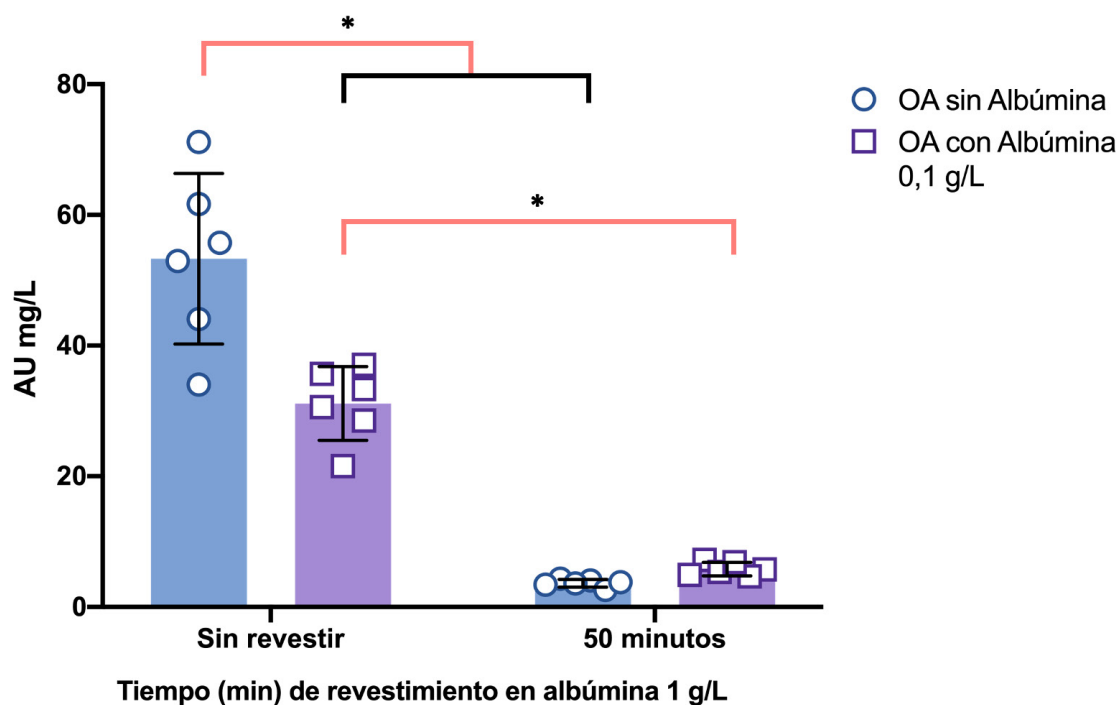


Figura 3. 57 Efecto de la albúmina en la cristalización del AU en la superficie de secciones tygon 1,5 cm. La concentración de AU fue determinada en cada una de las secciones (sin revestir y revestidas previamente durante 50 minutos en albúmina 1 g/L) incubadas en dos condiciones diferentes: OA a pH 4,92 con presencia o ausencia de albúmina 0,1 g/L. La incubación se llevó a cabo en estático, durante 24 horas a 37°C. * Diferencias significativas con un p-valor <0,005 mediante la prueba T-student para muestras independientes.

3. Estudio de los compuestos con efecto inhibitor en la formación de depósitos cálcicos (brushita, oxalato cálcico e hidroxiapatita) y del ácido úrico sobre secciones tygon

Una vez analizado el efecto de la albúmina mediante las dos vías utilizadas, tanto su presencia en la disolución de OA, como formando una capa de revestimiento sobre las secciones tygon, se eligieron una de las dos condiciones para llevar a cabo el estudio de los efectos de los compuestos que más efecto produjeron en las cinéticas de cristalización del capítulo 2. Así, se decidió realizar los siguientes experimentos en secciones tygon de 1,5 cm sin revestir incubándose en OA con albúmina 0,1 g/L. Para la cristalización cálcica, los compuestos testados fueron el InsP6, InsP6 hidrolizado durante 16 horas (cuyos resultados de la determinación de InsP e fosfato inorgánico se muestran en el anexo 3), el alendronato y el citrato. Los experimentos se realizaron en estático y en flujo. Para el ácido úrico, los experimentos se realizaron únicamente en estático y se estudiaron los compuestos que más efecto inhibitor presentaron en el estudio cinético: la teobromina y la 7-metilxantina, así como su presencia conjunta.

3.1 Efectos inhibidores en la formación de depósitos de brushita con COM minoritario sobre secciones tygon

3.1.1 Experimentos mediante el sistema en estático (*Batch*)

Los cristales encontrados en las secciones sin revestir incubadas en OA a pH 6,5 con 0,1 g/L de albúmina en estático en presencia de distintos compuestos fueron principalmente de BRU (Figura 3.58).

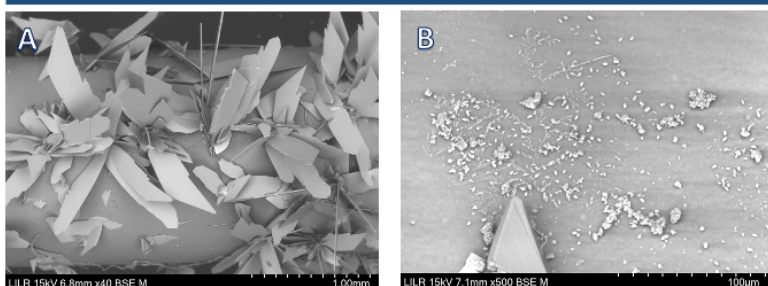
En la sección incubada sin aditivos (Figura 3.58 A) se observaron grandes cristales de BRU, planos con forma de sierra organizados en núcleos cristalinos. Estos se encontraban sobre una capa de cristales de COM pequeños y agregados que se encontraban a lo largo de la superficie de la sección (Figura 3.58 B). En presencia de InsP6 a una concentración de 2 μ M, no se encontró ningún tipo de cristal, ni de BRU ni de COM en la superficie (Figuras 3.58 C y 3.58 D).

Por otro lado, en presencia de InsP6 hidrolizado durante 16 horas a una concentración de 2 μ M volvieron a formarse depósitos de BRU (Figura 3.58 E). Los cristales fueron más pequeños, también con forma plana y de cuchilla, pero se observaron dos organizaciones distintas: una en núcleos cristalinos y otra en forma de capa plana recubriendo la superficie. No se observaron cristales de COM en la superficie de la sección (Figura 3.58 F).

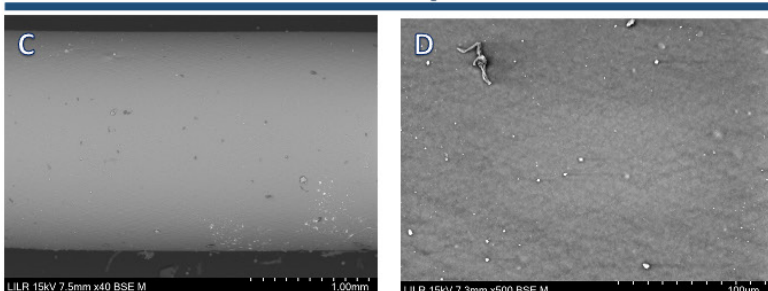
En presencia de alendronato 2 μ M (Figura 3.58 G) también cristalizó BRU, la cual continuaba siendo plana y en forma de sierra, pero menos alargada que los cristales observados en las condiciones anteriores. Aunque se encontraron algunos núcleos cristalinos, los depósitos se distribuían en forma de capa plana sobre la sección tygon (Figura 3.58 H). Finalmente, en presencia de 250 ppm de citrato también se formaron depósitos de BRU (Figura 3.58 I). Los cristales fueron más pequeños y con una morfología distinta a la observada anteriormente: presentaban una forma de aguja gruesa (Figura 3.58 J), y se distribuían mayoritariamente en forma de capa plana pero también en pequeños núcleos cristalinos en forma de flor sobre la superficie de la sección (Figura 3.58 I).

OA con Alb 0,1 g/L- Secciones sin revestir

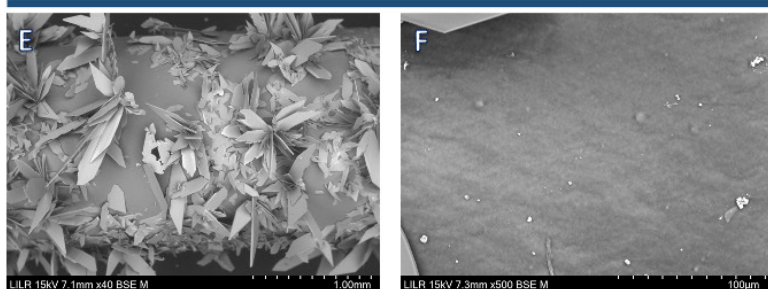
Control



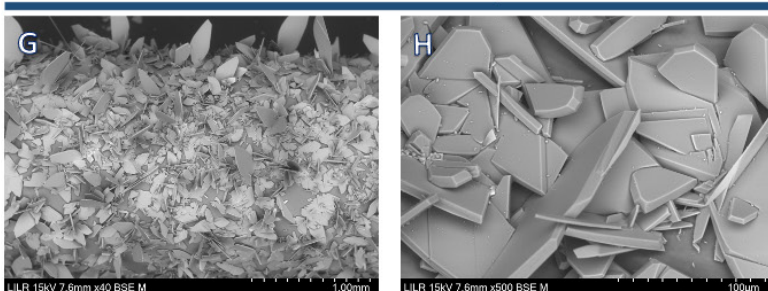
InsP6 2 μM



InsP6 hidrolizado 16 h 2 μM



Alendronato 2 μM



Citrato 250 ppm

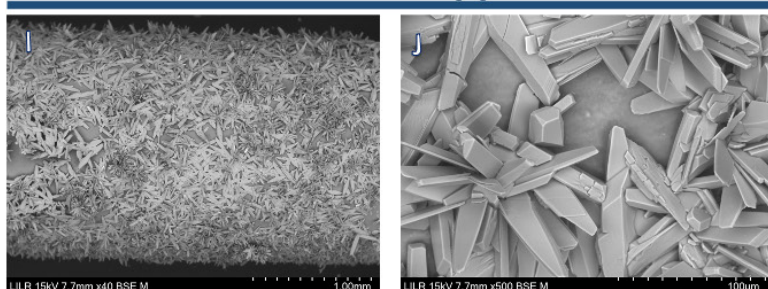


Figura 3.58 Imágenes de microscopia electrónica de las secciones tygon sin revestir incubadas en OA con albúmina 0,1 g/L a un pH 6,5. El experimento se llevó a cabo en estático, durante 24h a 37°C. A y B) Control (sin aditivos), C y D) con 2 μM de InsP6, E y F) con 2 μM de hidrolizado de 16 horas de InsP6, G y H) con 2 μM de alendronato y I y J) con 250 ppm de citrato.

3.1.2 Experimentos mediante el sistema en flujo

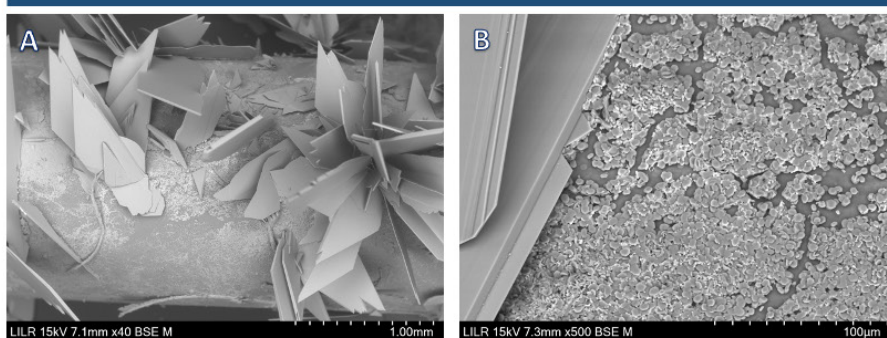
Para los experimentos en flujo, los cristales encontrados en las secciones sin revestir incubadas en OA a pH 6,5 con 0,1 g/L de albúmina durante 48 horas fueron principalmente de BRU y OxCa (Figura 3.59).

Las secciones incubadas sin adiciones (Control) presentaron grandes cristales de BRU planos (Figura 3.59 A), dispersos sobre una capa densa de COM que recubría la superficie de la sección (Figura 3.59 B). En presencia de Insp6 a una concentración 2 μ M no se observaron cristales de BRU (Figura 3.59 C), pero sí cristales de COD muy pequeños sobre la superficie de la sección (Figura 3.59 D). De la misma manera ocurrió en presencia de InsP6 hidrolizado durante 16 horas a una concentración de 2 μ M: no se observaron cristales de BRU pero sí una capa más densa de cristales de COD, más grandes que los anteriores (Figura 3.59 E y 3.59 F). Finalmente, en presencia de alendronato a una concentración 2 μ M aparecieron cristales de BRU gruesos, algunos con forma más plana distribuidos de manera individual y otros distribuidos en núcleos cristalinos en forma de flor donde presentaban una morfología de aguja gruesa con terminación plana (Figura 3.59 G). Estos cristales se encontraban distribuidos sobre una capa densa de COM (Figura 3.59 H).

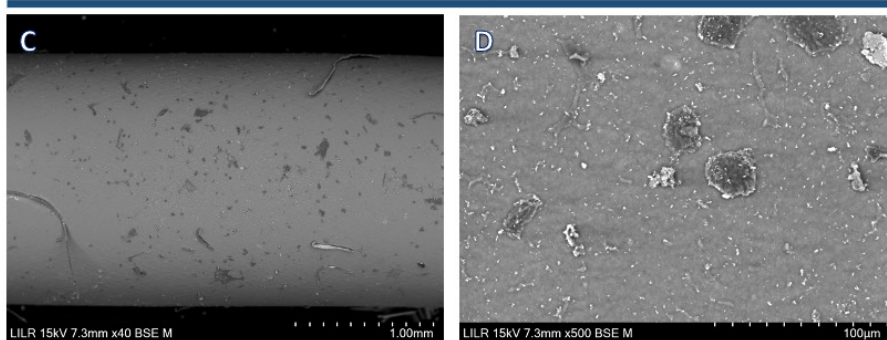
Para las secciones incubadas en estático durante 24 horas a 37 °C (Figura 3.60 A), mediante la disolución de los depósitos se determinó que el único grupo con una cantidad de calcio significativamente menor era el de las secciones incubadas con InsP6 2 μ M, donde no se obtuvo prácticamente señal. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los demás grupos (citrato, alendronato y InsP6 hidrolizado durante 16 horas) respecto al control. En cambio, para las secciones incubadas en flujo durante 48 horas a 37 °C (Figura 3.60 B), a parte del InsP6, el InsP6 hidrolizado durante 16 horas y el alendronato también presentaron una cantidad de calcio significativamente menor comparada con la del grupo control.

OA con Alb 0,1 g/L- Secciones sin revestir

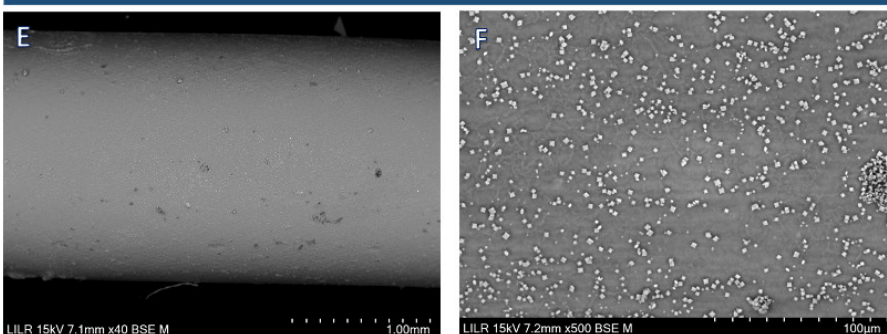
Control



InsP6 2 µM



InsP6 hidrolizado 16 h 2 µM



Alendronato 2 µM

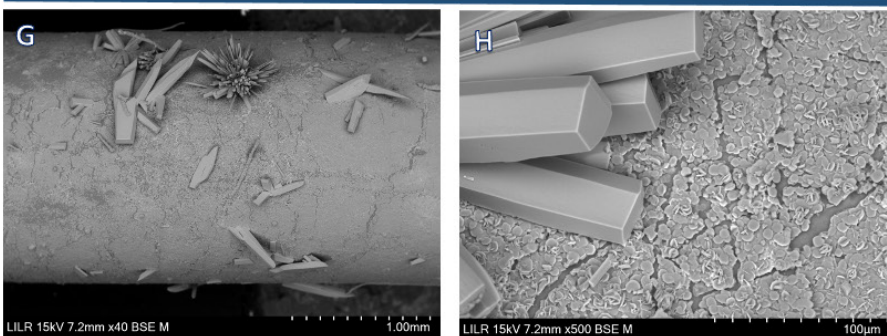


Figura 3.59 Imágenes de microscopía electrónica de las secciones tygon incubadas en OA a un pH 6,5 en presencia de albúmina 0,1 g/L. El experimento se llevó a cabo en flujo, durante 48h a 37°C. A y B) Control (sin aditivos), C y D) con 2 µM de InsP6, E y F) con 2 µM de hidrolizado de 16 horas de InsP6 y G y H) con 2 µM de alendronato.

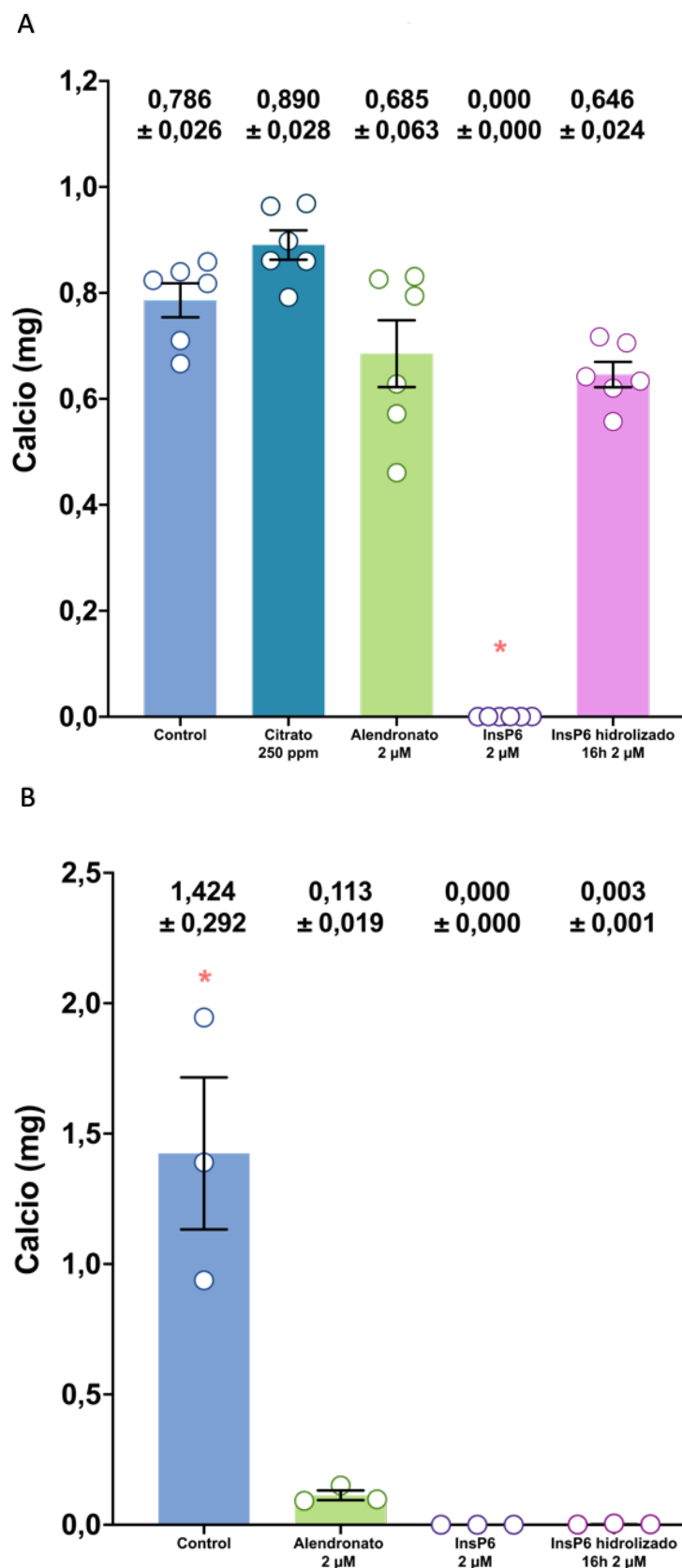


Figura 3.60 Concentración de calcio determinada en las secciones sin revestir incubadas con OA con albúmina 0,1 g/L a pH 6,5 durante A) 24 horas (estático) y B) 48 horas (en flujo) a 37 °C. * Diferencias significativas con un p-valor <0,001 mediante ANOVA de un factor con prueba posthoc de Bonferroni.

3.2 Efectos inhibidores en la formación de depósitos de oxalato cálcico sobre secciones tygon

3.2.1 Experimentos mediante el sistema en estático (*Batch*)

Los cristales encontrados las secciones sin revestir incubadas en OA con 0,1 g/L de albúmina a pH 5,7 en estático fueron exclusivamente de OxCa (Figura 3.61).

En la sección incubada sin aditivos se observó una capa de OxCa bastante densa distribuida a lo largo de la superficie de la sección (Figura 3.61 A). Estos se trataron de cristales de COM, organizados mayoritariamente en de manera individual y distribuidos unos encima de otros formado dicha capa. También se observaron algunos organizados en forma de agregados (Figura 3.61 B).

En presencia de InsP6 a una concentración de 2 μ M, se encontraron pequeños cristales repartidos por la superficie de la sección (Figura 3.61 C). Estos resultaron ser cristales de COD, distribuidos individualmente y en forma agregada por la superficie de la sección (Figura 3.61 D).

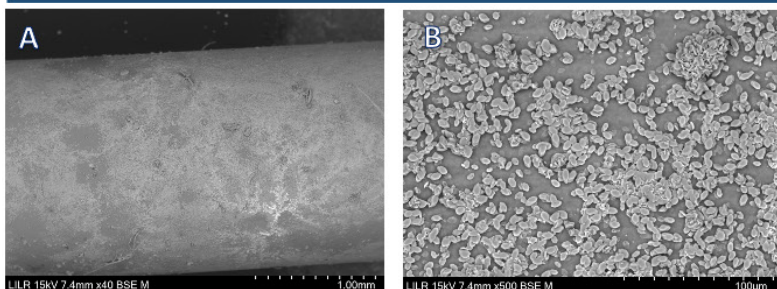
En presencia de InsP6 hidrolizado durante 16 horas a una concentración de 2 μ M, no se observaron cristales a 80 aumentos (Figura 3.61 E). En cambio, a 500 aumentos (Figura 3.61 F) se pudieron encontrar pequeños cristales de COD esparcidos sobre la superficie de la sección, aunque en menor cantidad que los encontrados en la sección incubada con InsP6.

En presencia de alendronato a una concentración de 2 μ M se vuelve a observar una capa cristalina de OxCa (Figura 3.61 G), compuesta por cristales de COM más pequeños que los observados en el control (Figura 3.61 H).

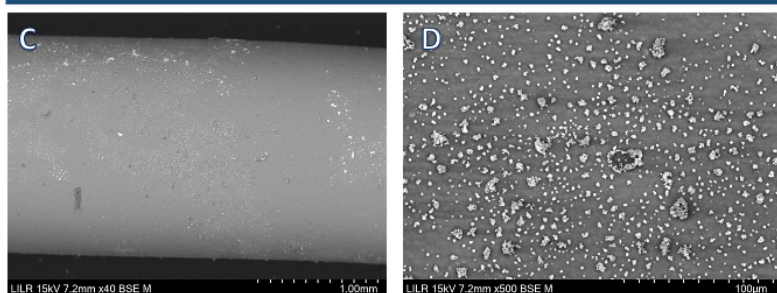
Finalmente, en presencia de citrato a una concentración de 250 ppm también se formó OxCa (Figura 3.61 I), siendo esta capa más densa y compacta que las observadas anteriormente: el COM perdió casi completamente su estructura individual para formar una capa muy compacta y totalmente uniforme sobre la superficie de la sección (Figura 3.61 J).

OA con Alb 0,1 g/L- Secciones sin revestir

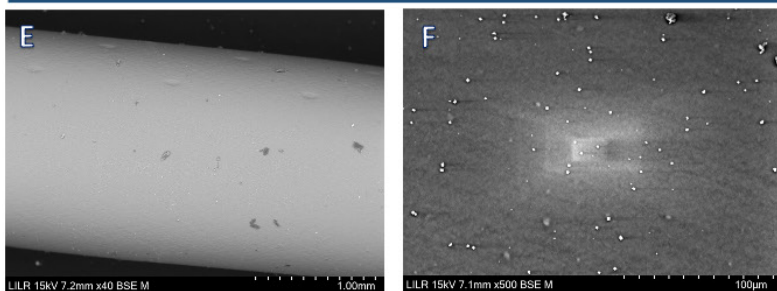
Control



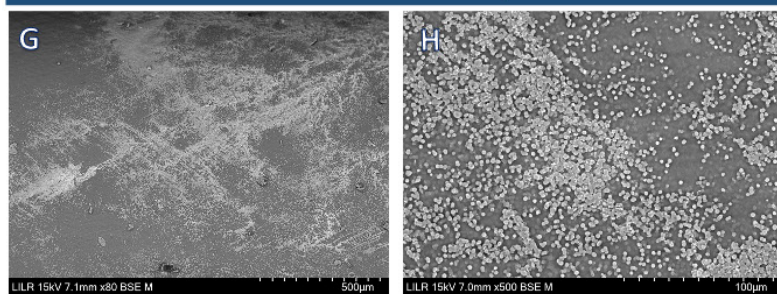
InsP6 2 µM



InsP6 hidrolizado 16 h 2µM



Alendronato 2 µM



Citrato 250 ppm

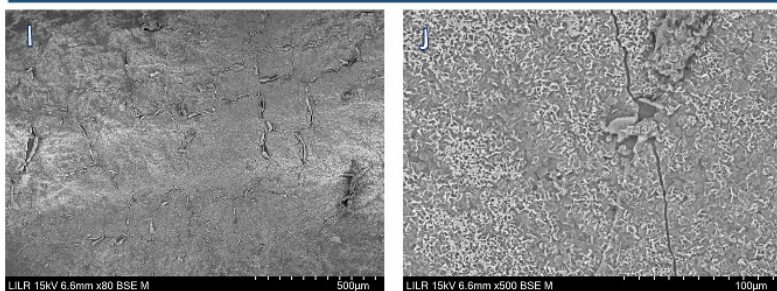


Figura 3.61 Imágenes de microscopía electrónica de las secciones tygon incubadas presencia de albúmina 0,1 g/L en orina artificial a un pH 5,7. El experimento se llevó a cabo en estático, durante 24h a 37°C. A y B) Control (sin aditivos), C y D) con 2 µM de InsP6, E y F) con 2 µM de hidrolizado de 16 horas de InsP6, G y H) con 2 µM de alendronato y I y J) con 250 ppm de citrato.

3.2.2 Experimentos mediante el sistema en flujo

Para los experimentos mediante el sistema en flujo, los cristales encontrados en las secciones sin revestir incubadas en OA a pH 5,7 con 0,1 g/L de albúmina durante 48 horas fueron únicamente de OxCa (Figura 3.62).

Las secciones incubadas sin adiciones (control) presentaron una gran capa de cristales de COM organizados de manera individual y apilados entre sí (Figura 3.62 A), aunque también se observaron algunos con morfología agregada (Figura 3.62 B).

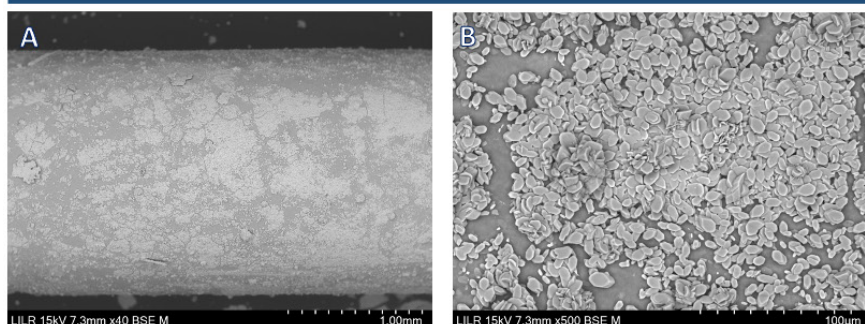
En presencia de InsP6 a una concentración 2 μ M se observaron pequeños cristales en la superficie de la sección (Figura 3.62 C), que resultaron ser cristales de COD muy pequeños repartidos de manera individual y agregada sobre la superficie de la sección (Figura 3.62 D). De la misma manera ocurrió en presencia de InsP6 hidrolizado durante 16 horas a una concentración de 2 μ M: se observó una capa de pequeños cristales que resultaron ser de COD, más grandes que los anteriores (Figuras 3.62 E y 3.62 F). Finalmente, en presencia de alendronato a una concentración 2 μ M aparecieron grandes cristales de COM repartidos de manera agregada sobre la superficie de la sección (Figuras 3.62 G y 3.62 H).

Para las secciones incubadas en estático durante 24 horas a 37 °C, mediante la disolución de los depósitos se determinó que el grupo control (sin aditivos) presentó una cantidad de calcio significativamente mayor que las secciones incubadas con el resto de compuestos (Figura 3.63 A). Por otro lado, las secciones incubadas con citrato y alendronato presentaron una cantidad de calcio significativamente mayor que las secciones incubadas con InsP6 sin hidrolizar e hidrolizado durante 16 horas. Por lo tanto, las secciones incubadas con estos dos últimos compuestos fueron las que presentaron menores niveles de calcio, siendo estos prácticamente 0.

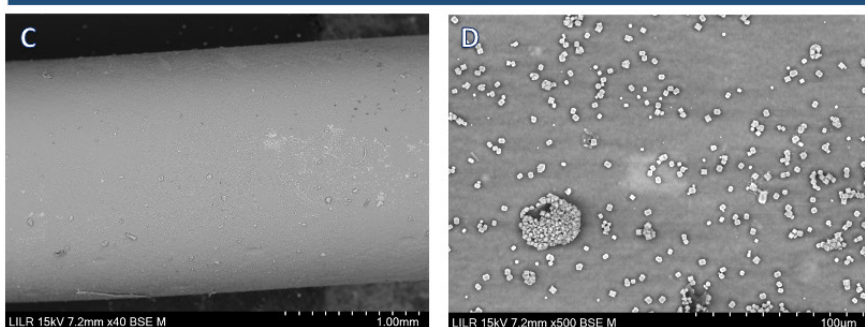
En cambio, para las secciones incubadas en flujo durante 48 horas a 37 °C (Figura 3.63 B), solo las secciones incubadas en presencia de InsP6 y el InsP6 hidrolizado durante 16 horas presentaron una cantidad de calcio significativamente menor, mientras que las incubadas con el alendronato presentaron niveles parecidos a las incubadas sin aditivos (control).

OA con Alb 0,1 g/L- Secciones sin revestir

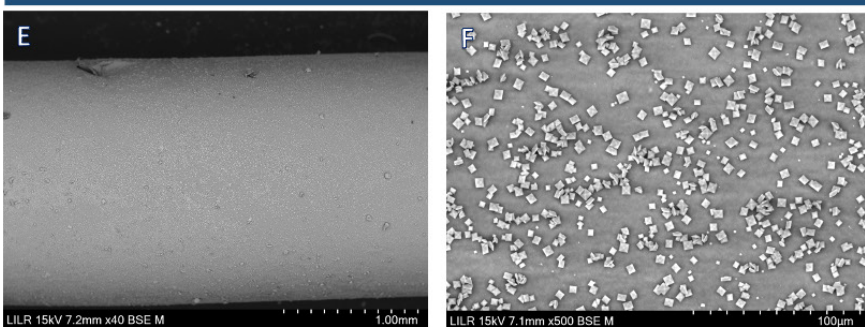
Control



InsP6 2 μ M



InsP6 hidrolizado 16 h 2 μ M



Alendronato 2 μ M

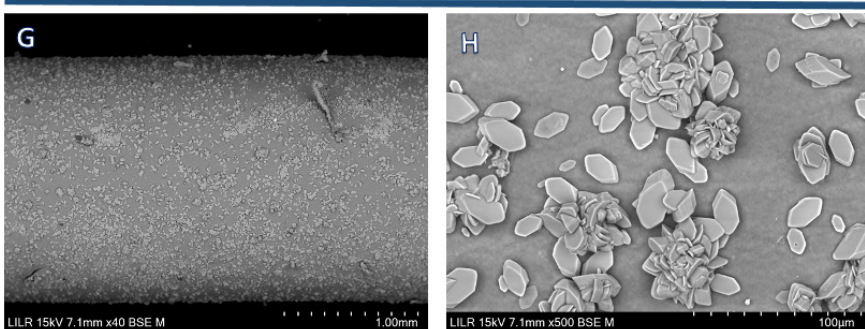


Figura 3.62 Imágenes de microscopía electrónica de las secciones tygon incubadas en presencia de albúmina 0,1 g/L en orina artificial a un pH 5,7. El experimento se llevó a cabo en flujo, durante 48 horas a 37°C. Superficie de las secciones incubadas con A y B) Control (sin aditivos), C y D) con 2 μ M de InsP6, E y F) con 2 μ M de hidrolizado de 16 horas de InsP6 y G y H) con 2 μ M de alendronato.

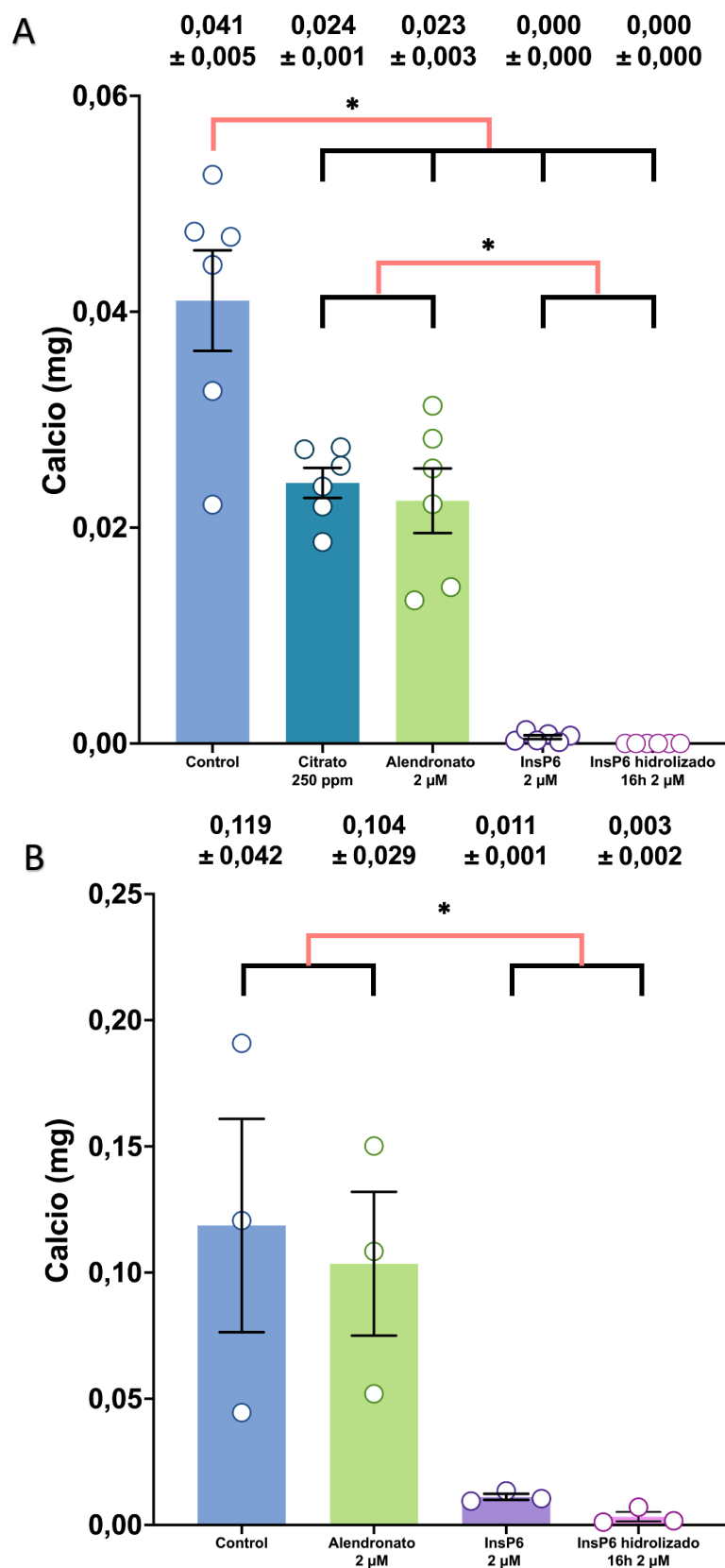


Figura 3.63 Concentración de calcio determinada en las secciones sin revestir incubadas con OA a pH 5,7 en presencia de albúmina 0,1 g/L durante A) 24 horas (estático) y B) 48 horas (en flujo) a 37 °C. * Diferencias significativas con un p-valor <0,001 mediante ANOVA de un factor con prueba posthoc de Bonferroni.

3.3 Efectos inhibidores en la formación de depósitos de hidroxiapatita

3.3.1 Experimentos mediante el sistema en estático (*Batch*)

Finalmente, el último tipo de depósito cálcico estudiado en presencia de compuestos con posible efecto inhibidor fue la HAP.

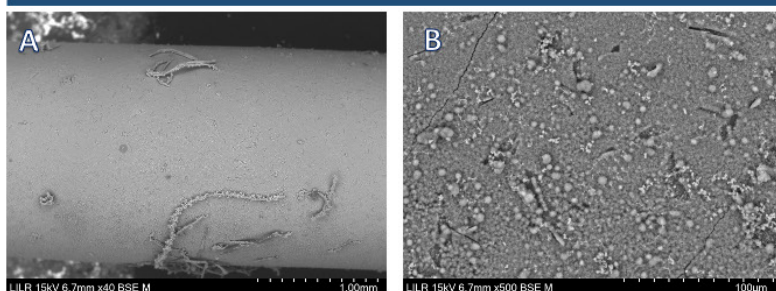
Los cristales encontrados en la sección sin revestir incubada en OA a pH 7 con 0,1 g/L de albúmina en estático fueron únicamente de HAP (Figura 3.64). En todas las secciones, tanto las incubadas en ausencia de aditivos (control, Figura 3.64 A), como las incubadas en presencia de InsP6 (Figura 3.64 C), InsP6 hidrolizado durante 16 horas (Figura 3.64 E), alendronato (Figura 3.64 G) y citrato (Figura 3.64 I) presentaron una capa densa de HAP recubría la superficie de la sección.

Al estudiar las secciones a más aumentos para cada una de las condiciones (Figura 3.64 B, D, F, H y J) se observó que también todas presentaron esferulitos de manera agregada distribuidos sobre la capa de HAP que recubría las secciones. Aun así, mediante el análisis observacional pareció que la capa formada en presencia de citrato era más densa y compacta que las demás.

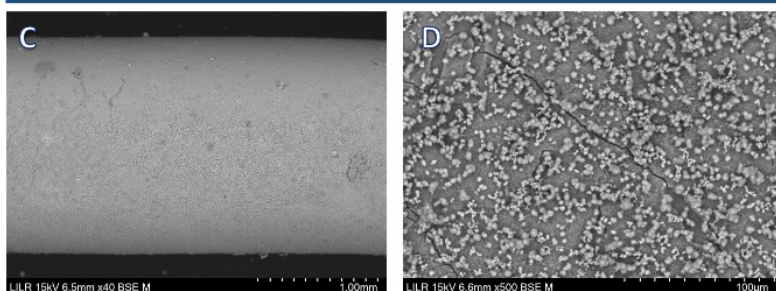
La disolución de los depósitos de las secciones y su consecuente análisis cuantitativo de la cantidad de calcio (Figura 3.65) confirmó que las secciones incubadas en presencia de citrato a 250 ppm presentaron una cantidad de calcio significativamente mayor que las secciones incubadas sin aditivos, InsP6, InsP6 hidrolizado durante 16 horas y alendronato, los cuales presentaron unos niveles equivalentes entre ellos.

OA con Alb 0,1 g/L- Secciones sin revestir

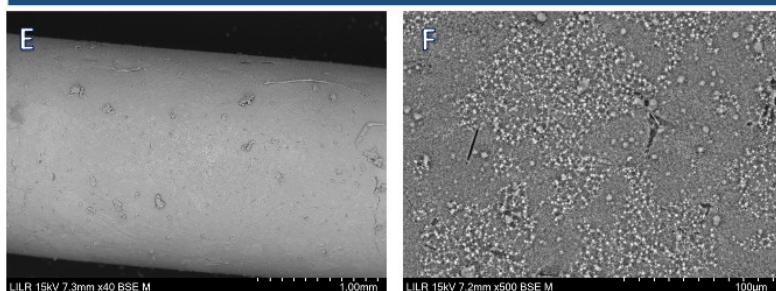
Control



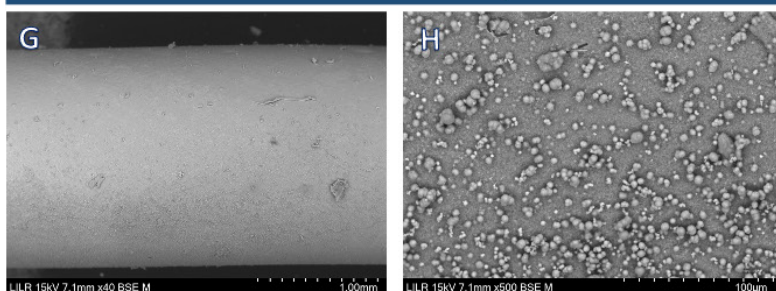
InsP6 2 μ M



InsP6 hidrolizado 16 h 2 μ M



Alendronato 2 μ M



Citrato 250 ppm

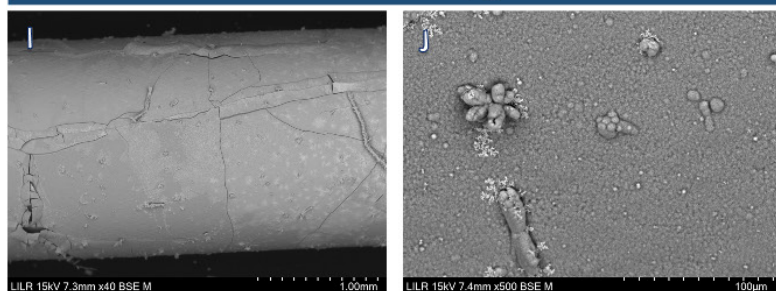


Figura 3.64 Imágenes de microscopía electrónica de las secciones tygon sin revestir incubadas en OA con albúmina 0,1 g/L a un pH 7. El experimento se llevó a cabo en estático, durante 24h a 37°C. A y B) Control (sin aditivos), C y D) con 2 μ M de InsP6, E y F) con 2 μ M de hidrolizado de 16 horas de InsP6, G y H) con 2 μ M de alendronato y I y J) con 250 ppm de citrato.

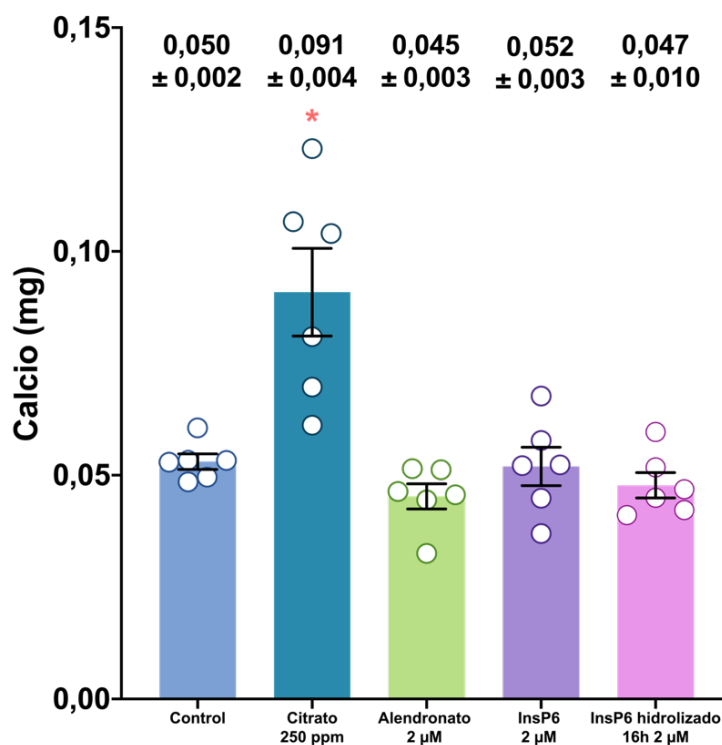


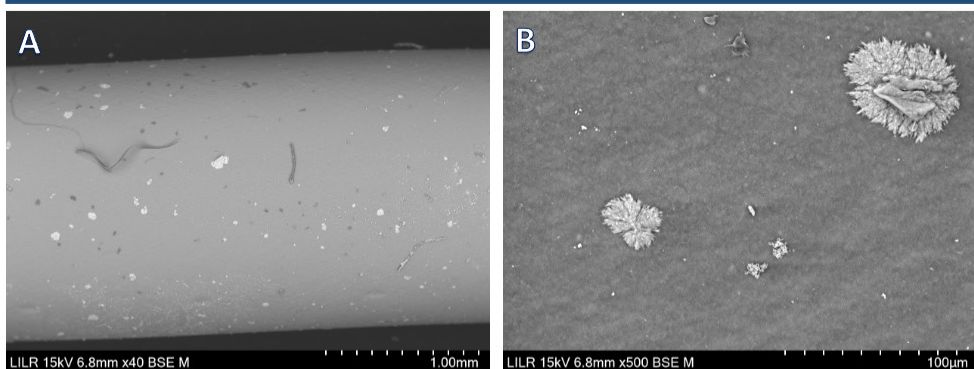
Figura 3.65 Concentración de calcio determinada en las secciones sin revestir incubadas en OA a pH 7 en presencia de albúmina 0,1 g/L durante 24 horas en estático, a 37 °C. * Diferencias significativas con un p-valor <0,001 mediante ANOVA de un factor con prueba posthoc de Bonferroni.

3.3.2 Experimentos mediante el sistema en flujo

Para los experimentos en flujo, los cristales encontrados en las secciones sin revestir incubadas en OA a pH 7 con 0,1 g/L de albúmina durante 48 horas también fueron únicamente de HAP (Figura 3.66). La sección incubada sin aditivos (Figura 3.66 A) presentó cristales de HAP en fases iniciales de formación repartidos sobre la superficie de la sección (Figura 3.66 B). El tamaño de los depósitos era realmente reducido. En cambio, en la sección incubada con InsP6 (Figura 3.66 C), se encontró una capa densa de HAP recubriendo la sección, así como grandes esferulitos de HAP depositados a lo largo de la capa (Figura 3.66 D). La disolución y análisis cuantitativo de calcio de los depósitos de las secciones incubadas sin aditivos (control) y en presencia de InsP6 a una concentración de 2 µM mostró que las secciones de ambos grupos presentaron niveles bajos de calcio, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 3.67).

OA con Alb 0,1 g/L- Secciones sin revestir

Control



InsP6 2 μM

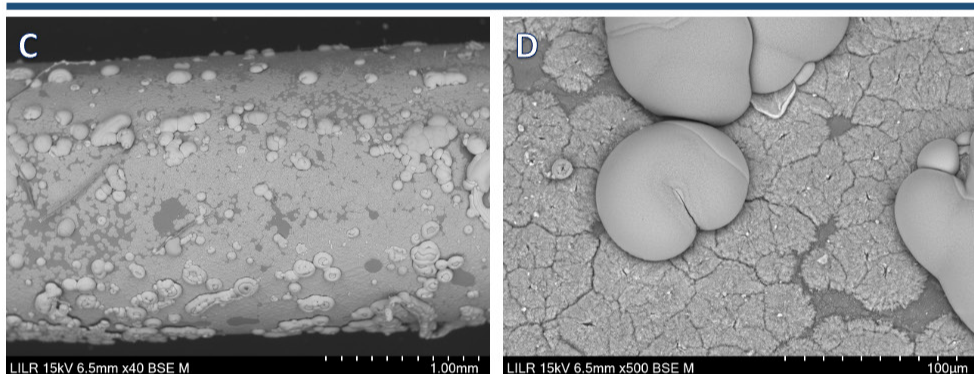


Figura 3.66 Imágenes de microscopía electrónica a 40 y 500 aumentos de las secciones tygon sin revestir incubadas en OA con albúmina 0,1 g/L a un pH 7. El experimento se llevó a cabo en flujo, durante 48h a 37°C. A y B) Control (sin aditivos) C y D) con 2 μM de InsP6.

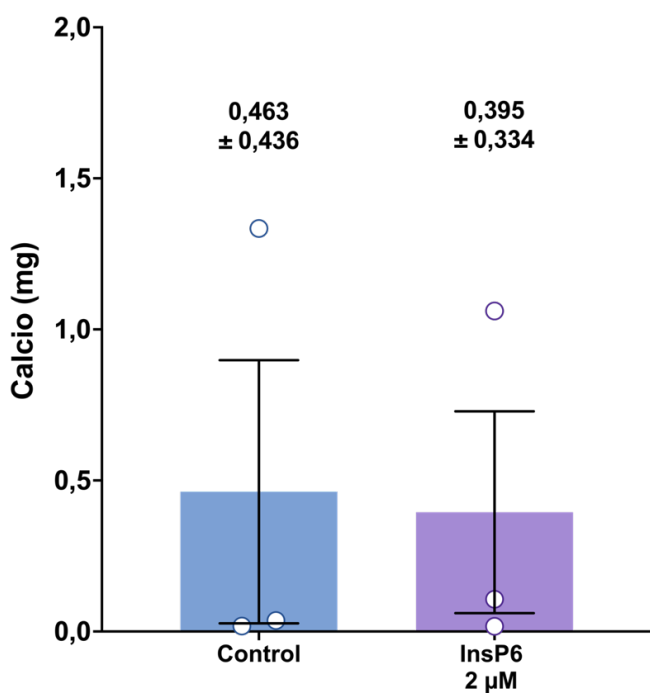


Figura 3.67 Concentración de calcio determinada en las secciones sin revestir incubadas con OA en presencia de albúmina 0,1 g/L a pH 7. El experimento se llevó a cabo en flujo, durante 48h a 37 °C. No se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados.

3.4 Efectos inhibidores en la formación de depósitos de ácido úrico

3.4.1 Experimentos mediante el sistema en estático (*Batch*)

Una vez seleccionadas las condiciones (secciones sin revestir incubadas en OA con albúmina 0,1 g/L) se procedió al estudio del efecto de los compuestos que más efecto inhibidor presentaron en el estudio cinético en la formación de ácido úrico: la teobromina y la 7-metilxantina, así como su mezcla.

En las imágenes de microscopia electrónica de barrido de la superficie de las secciones tygon sin revestir incubadas en orina artificial con albúmina 0,1 g/L se observó que prácticamente sólo se encontraron cristales de AU en las secciones incubadas en ausencia de metilxantinas (Figura 3.68 A y B) y en aquellas incubadas con 0,2 mM de teobromina (Figura 3.68 C y D). Aun así, la cantidad de cristales observada fue mayor en el grupo control, donde también se observaron algunos de gran tamaño.

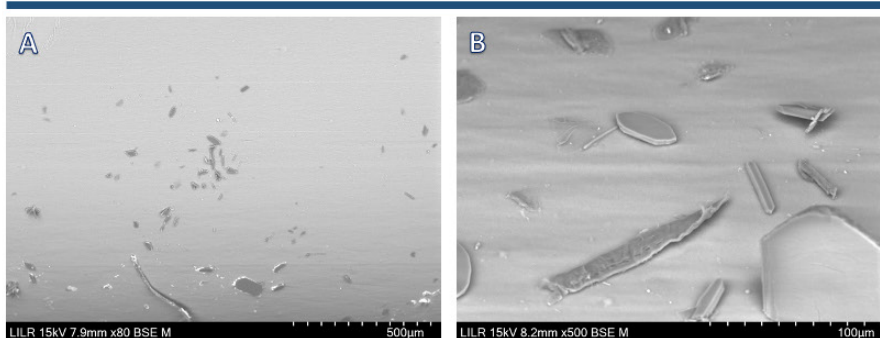
Por otro lado, no se hallaron cristales en la superficie de las secciones tygon incubadas con 0,4 mM de 7-metilxantina (Figura 3.68 E y F), mientras que en el grupo con teobromina 0,2 mM + 7-metilxantina 0,4 mM (Figura 3.68 G y H) los cristales fueron escasos y muy pequeños.

En las secciones tygon incubadas en presencia de 0,2 mM de teobromina se observó una disminución significativa de la concentración de AU ($13,51 \pm 2,18$) en comparación con el grupo control ($20,45 \pm 2,37$).

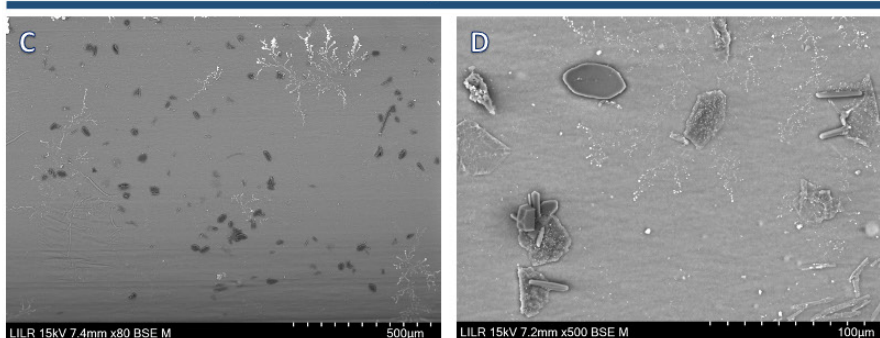
Por otro lado, las incubadas con 0,4 mM de 7-metilxantina ($4,28 \pm 0,36$) y teobromina 0,2 mM + 7-metilxantina 0,4 mM ($3,29 \pm 0,40$) presentaron una concentración de AU en la superficie parecida entre ellos, pero significativamente menor que la del grupo control y que las secciones incubadas solamente con 0,2 mM de teobromina (Figura 3.69).

OA con Alb 0,1 g/L- Secciones sin revestir

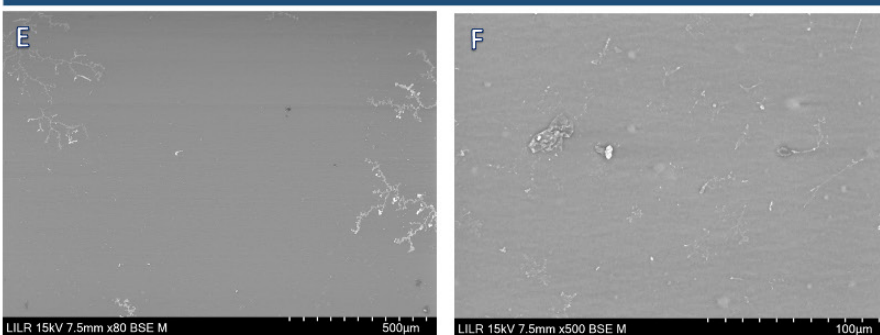
Control



TB 0,2 mM



7MX 0,4 mM



TB 0,2 mM + 7MX 0,4 mM

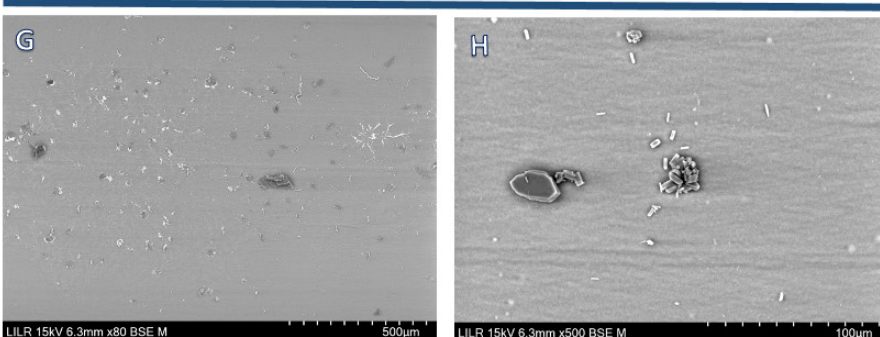


Figura 3.68 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cristales de AU formados en la superficie de las secciones tygon incubadas en A y B) Control (sin adiciones), C y D) Teobromina 0,2 mM, E y F) 7-metilxantina 0,4 mM y G y H) Teobromina 0,2 mM + 7-metilxantina 0,4 mM.

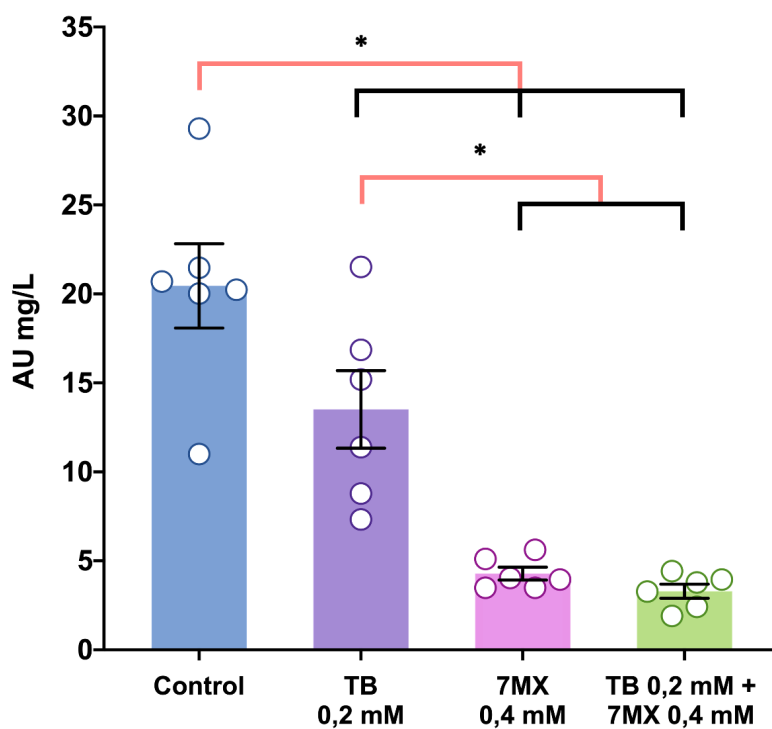


Figura 3. 69 Efecto de la teobromina y 7-metilxantina en la cristalización del AU en la superficie de secciones tygon sin revestimiento de albúmina. El experimento se realizó en estático durante 24 horas a 37 °C, en orina artificial con albúmina 0,1 g/L a pH 4,92.

Discusión

1. Estudio del efecto del fitato en la cristalización cálcica y la adhesión bacteriana

La formación del *biofilm* en el catéter ureteral es un proceso que involucra varios pasos y que aún no se comprende por completo[48]. Algunos investigadores ya observaron anteriormente que el desarrollo de *biofilm* en el catéter puede conducir a infecciones urinarias que elevan el pH urinario por encima de 6,2. Este elevado pH favorece la cristalización de estruvita y HAP, formando grandes incrustaciones que pueden producir bloqueos del catéter. Además, esta capa cristalina luego proporciona nidos para el establecimiento de aún más bacterias.

Sin embargo, también se puede producir la formación de una capa cristalina en la superficie del catéter en ausencia de infección[35,36], dependiendo de la composición y el pH de la orina. Esto es consistente con la observación de otros investigadores que encontraron que el primer paso en el desarrollo del *biofilm* bacteriano fue la formación de una capa cristalina[45,46]. Esta capa cristalina inicial permite la unión bacteriana y la formación del *biofilm*. La presencia de bacterias con actividad ureasa pueden aumentar el pH por encima de 6,2, favoreciendo la formación de depósitos adicionales, como la estruvita. Así, estas grandes masas cristalinas funcionan como nidos, lo que permite la unión de aún más bacterias[11]. Por lo tanto, parece haber un ciclo de retroalimentación positiva entre la cristalización del catéter y colonización bacteriana.

Aunque los detalles sobre la relación entre cristalización del catéter y la colonización bacteriana no están completamente dilucidados, parece importante prevenir la formación de depósitos cristalinos para prevenir la proliferación bacteriana, sin importar cual sea el proceso que ocurra primero. Debido a que un pH urinario alto favorece la formación de depósitos de calcio, realizamos los experimentos in vitro a un pH de 6,5 para promover la formación de cristales a base de calcio, como fosfato cálcico (BRU y HAP) y oxalato cálcico. En particular, se sabe que el fitato inhibe la formación de este tipo de depósitos y, por lo tanto, evaluamos el efecto del fitato sobre la cristalización en el catéter y la unión bacteriana.

Los resultados mostraron que el fitato previno la cristalización cálcica en ausencia de bacterias (Fig. 3.15 A–D) y en presencia de *P. aeruginosa* (Fig. 3.15 E–H), ya

que no se observaron depósitos de BRU, HAP y COM en las secciones que se incubaron con fitato a una concentración de 1,2 o 2,4 μM . Este hecho fue respaldado por la medición del nivel de calcio (Fig. 3.14 A), indicando cantidades mucho más bajas cuando las secciones se incubaron con fitato en ausencia de PAO1. Por otro lado, se formó una la capa de materia orgánica que fue más fina en ausencia de bacterias (Fig. 3.15 C y D) y más gruesa en presencia de PAO1 (Fig. 3.15 G y H). Esto podría deberse a que la capa formada es ausencia de bacterias contendría solo los compuestos orgánicos presentes en el medio (albúmina y glucosa), mientras que la presencia de bacterias produce la generación de todo un detritus celular y generación de exopolisacáridos que contribuiría en la densidad de la capa orgánica observada en su presencia.

También se observó una disminución de más de diez veces del número de bacterias en la superficie del catéter cuando la orina artificial contenía 1,2 o 2,4 μM de fitato (Fig. 3.14 B). Este hallazgo, junto con los resultados sobre la formación de cristales, indicó que el fitato redujo la cantidad de bacterias adheridas en la superficie del catéter al evitar la formación de la capa cristalina y así disminuir la superficie disponible para la adhesión de las bacterias. Por lo tanto, es importante prevenir la formación de nidos y masas cristalinas, ya que esto puede ocluir la luz del uréter y generar importantes complicaciones clínicas, así como infecciones persistentes del tracto urinario. Finalmente, la formación de cristales y la adherencia bacteriana sobre el catéter fueron similares a concentraciones de fitato de 1,2 y 2,4 μM . En ambas concentraciones se formaron muy pocos cristales y las pocas bacterias que estaban presentes se debieron adherir directamente a la superficie o al lumen interior del catéter.

Esto confirma que las bacterias se adhieren a la superficie de un catéter incluso en ausencia de una capa cristalina, formando una capa de *biofilm* inicial de materia orgánica. Por lo tanto, el fitato disminuyó con éxito la cantidad de bacterias que se adherieron a la superficie de un catéter al inhibir la formación de una capa cristalina a base de calcio, que funciona como nido para la colonización y el crecimiento bacteriano.

Así, la prevención temprana de la formación de depósitos cálcicos podría ser clave para prevenir infecciones persistentes posteriores del sistema urinario y sus muchas consecuencias adversas. Además, estos resultados indicaron que los cristales

grandes en un catéter pueden servir como lugar para el crecimiento bacteriano, porque hay muchas menos bacterias en la superficie del catéter cuando estos cristales no se desarrollan. De esta manera, es probable que la ausencia de depósitos en el catéter in vivo también pueda aumentar la exposición de las bacterias en la superficie del catéter a los antibióticos.

2. Estudio del efecto de la albúmina en la formación de depósitos cálcicos y de ácido úrico mediante el sistema en estático y en flujo

La enfermedad litiásica es una patología muy común, con una prevalencia que oscila entre el 1% y el 20%, siendo más frecuente en ciertas regiones[80]. En España ya cuenta con una prevalencia alrededor del 15% en la población de 40 a 65 años[81,82]. Además, estudios recientes demuestran que su prevalencia está en claro incremento[83]. Debido a sus altas tasas de recurrencia (entre el 50-60% de los pacientes que han generado un cálculo van a generar otro en un período de 3-5 años), puede considerarse una enfermedad crónica que genera un alto impacto en el ámbito socioeconómico debido a su tratamiento[84]. Los catéteres doble J han demostrado una alta eficacia en el drenaje del sistema colector renal obstruido, ya sea debido a litiasis o a otras causas no litiásicas[1,85]. Su utilización se ha expandido gracias al continuo desarrollo de nuevas técnicas endourológicas para el tratamiento de la litiasis renal y otras patologías que pueden ocasionar estenosis, lo que en algunos casos requiere la colocación de un catéter doble J para restaurar el flujo adecuado de la orina[86].

A pesar de que los catéteres doble J se han convertido en una herramienta indispensable en la urología moderna, pueden producir efectos secundarios adversos no deseados. Más del 80% de los pacientes que los utilizan experimentan algún tipo de complicación, aunque suelen ser leves y temporales, como malestar o hematuria[87]. Sin embargo, también pueden surgir complicaciones más graves, como infecciones del tracto urinario e incrustaciones y/o bloqueos en los catéteres. Si estas complicaciones no se diagnostican y tratan a tiempo, pueden conducir a la obstrucción crónica, la pérdida de la función renal e incluso poner en riesgo la vida del paciente[88,89].

La tasa de incrustación en los catéteres doble J no está completamente establecida debido a la falta de estudios específicos, pero se estima que se encuentra entre el 9% y el 26% de los catéteres doble J implantados se incrustan en un período inferior a las seis semanas[42,43]. La formación de estas incrustaciones es un proceso complejo y multifactorial en el que intervienen diversos factores, muchos de los cuales aún no se comprenden completamente. Si bien se sabe que los *biofilms* y la colonización bacteriana, especialmente por bacterias productoras de ureasa, desempeñan un papel importante en este proceso[48], también se ha observado la formación de incrustaciones en ausencia de colonización bacteriana o causada por la presencia de infección, lo que sugiere que otros factores también pueden estar involucrados, como la presencia de orina litogénica[34]. Este hecho también explica porque existe una correlación significativa entre la composición mineral de los catéteres ureterales y el análisis de cálculos en pacientes con cálculos urinarios[38,39].

Después de la implantación del catéter en el cuerpo humano ya se produce la formación del llamado *conditioning film*, considerado el primer paso de la formación del *biofilm*. El contacto entre el catéter y los fluidos corporales (orina, sangre y tejido urotelial) produce el primer depósito de moléculas de origen extracelular (como polisacáridos, iones y glicoproteínas), que formarán el *conditioning film*[2,11]. A día de hoy, aun es limitada la información que hay disponible sobre la composición del *conditioning film* debido a la variabilidad de la composición urinaria y se desconoce en gran medida hasta qué punto sus componentes desempeñan un papel en la facilitación de la adhesión bacteriana. Un estudio reciente ha mostrado que las bacterias se adhieren preferentemente en las zonas donde el *conditioning film* es mayor, respaldando la importancia del *conditioning film* para facilitar la adhesión bacteriana[13]. Aun así, esto demuestra que igualmente las bacterias también tienen capacidad de adherirse en las zonas de la superficie donde no haya *conditioning film*. El componente proteico del *conditioning film* es el más estudiado, observando que la albúmina, en conjunción con el fibrinógeno y la uromodulina (Tamm-Horsfall) son los constituyentes más predominantes de los *conditioning film* formados en catéteres ureterales extraídos de pacientes[12].

La albúmina, aparte de ser una de las proteínas mayoritarias del *conditioning film*, también es una de las proteínas más abundantes en la orina y en la matriz orgánica de los cálculos renales[62], observándose de manera más pronunciada en los cristales inducidos en orinas procedentes de formadores de cálculos[63,90]. Como ya se ha ido comentado a lo largo de la tesis, las proteínas presentan un papel dual en la cristalización patológica, ya que presentan tanto efecto inhibitor y como un efecto promotor de la cristalización.

Una tercera parte del capítulo se ha enfocado en el estudio del efecto de la albúmina en la formación de los distintos tipos de depósitos estudiados, tanto cálcicos (BRU, OxCa y HAP) como de ácido úrico. Este estudio se ha llevado a cabo mediante dos vías: una mimetizando la presencia de albúmina en orina, es decir, la presencia de albúmina en disolución; la segunda mimetizando la formación de una capa orgánica sobre las secciones previamente a su uso para los experimentos de cristalización.

Aunque no fue posible su cuantificación, sí que las imágenes por microscopia electrónica de barrido confirmaron la deposición de la albúmina después de la incubación de las secciones tygon en una disolución de 1 g/L de albúmina a distintos tiempos de revestimiento (Figura 3.19).

Los primeros experimentos de formación de depósitos que se realizaron fueron la cristalización de BRU con COM minoritario y la cristalización individual del OxCa en forma de COM en estático. Al no poder determinar si había diferencias en cuanto a la deposición de albúmina en los distintos tiempos de revestimiento de las secciones por el método de Lowry, los experimentos enumerados anteriormente incluyeron los grupos de secciones de todos los distintos tiempos de revestimiento en la albúmina 1g/L probados (0, 30, 40, 50 y 60 minutos).

2.1 Efecto de la presencia de albúmina en la formación de depósitos cálcicos: cristalización de la brushita

Para la cristalización de la BRU se observa que el mayor nivel de cristalización se produce en ausencia de albúmina tanto en disolución como en forma capa de revestimiento, en estático y en flujo. Así, la presencia de albúmina en disolución y como

capa de revestimiento produce una menor formación de depósitos de BRU, lo que se traduce en menor cantidades de calcio detectadas.

En los experimentos en estático donde las secciones incubadas con OA sin albúmina solo se produce la formación de un tipo cristalino, Brushita (Figura 3.20 A-E), una disminución de la cantidad de calcio detectada (Figura 3.22, barras azules) sí se traduce en una disminución del nivel de cristalización. En cambio, para las secciones incubadas en OA con albúmina 0,1 g/L (Figura 3.20 F-J) se observa que la sección sin revestir (Figura 3.20 F) aparte de grandes cristales de BRU presenta también una capa poco densa de HAP y COM. En cambio las secciones revestidas a distintos tiempos (Figura 3.20 G-J) presentan menores cantidades de BRU, pero una capa mucho más densa de HAP que seguramente se encuentra recubriendo pequeños cristales de COM, por lo que en este caso la detección de menores cantidades de calcio en las secciones revestidas incubadas en OA con albúmina 0,1 g/L (Figura 3.22, barras lilas) no es sinónimo de una menor cristalización, solo de una menor formación de depósitos de BRU, ya que como se observa más adelante, el COM y el HAP producen detecciones de calcio menores que la BRU.

En los experimentos realizados mediante el sistema en flujo también se produce la aparición de COM y HAP en la superficie de las secciones, siendo mayor la cantidad de HAP en la sección revestida previamente en albúmina 1 g/L durante 50 minutos incubada en orina artificial sin albumina (Figura 3.23 B). Para estos experimentos en flujo, la presencia de albúmina tanto en disolución como en capa de revestimiento produce una disminución de la cristalización de la BRU, lo que se traduce en unas cantidades de calcio detectadas menores (Figura 3.26). Aun así, hay que destacar que en los experimentos llevados a cabo en flujo el nivel de cristalización ha sido más elevado que en los experimentos en estático y que las diferencias en el nivel de cristalización entre las distintas secciones es más reducido, a excepción de las secciones revestidas con albúmina 1 g/L e incubada en OA con albúmina 0,1 g/L, cuyo nivel de cristalización continuó siendo bajo (Figura 3.26).

Este efecto de la albúmina sobre la formación de depósitos de BRU sobre las secciones podría deberse a que la presencia de esta macromolécula en el medio (OA)

como en forma de capa de revestimiento dificulta la adhesión de estos grandes cristales, como los que se forman en este caso de BRU, un efecto que también se ha observado con otras macromoléculas urinarias[62,91,92]. La albúmina presente en la disolución podría interactuar con los cristales, dificultando su agregación y la deposición sobre el medio inerte que representa la sección de tygon. Hubiera sido interesante también evaluar el efecto de la albúmina en las cinéticas de cristalización de la BRU y poder comparar los efectos resultantes con los experimentos de formación de depósitos sobre secciones tygon. Así se podría saber si la albúmina también presenta capacidad de retrasar el tiempo de inducción de la BRU, produciendo la inhibición de su cristalización, o por lo contrario si el efecto observado se debe al impedimento de interacción entre los mismos cristales y entre los cristales y la superficie de la sección.

Si observamos la morfología de los cristales de BRU obtenidos tanto en los experimentos llevados a cabo mediante el sistema en estático (Figura 3.20) como en flujo (Figura 3.23), no encontramos diferencias notables. Todos los cristales presentan una forma aplanada de cuchilla más o menos dentada que nace de un núcleo de cristalización compartido con otros cristales. Aunque se puedan encontrar cristales separados del núcleo de cristalización situados horizontalmente sobre la superficie de la sección tygon, parece que el crecimiento de los cristales se produce normalmente de manera radial al núcleo de cristalización, haciendo que la dirección de las puntas de los cristales siempre sea hacia fuera (Figura 3.72 A).

En el estudio realizado por J. L. Bauzà [93], de los 90 pacientes, y consecuentemente, de los noventa catéteres doble J analizados solo se observó la presencia de BRU en los depósitos los catéteres de cinco pacientes, por lo que se trata de un depósito poco común. Como se observa en la Figura 3.70, el crecimiento y por tanto la morfología resultante de la BRU in vivo es ligeramente distinta a la observada in vitro. En el catéter del paciente 50 encontramos una capa formada por cristales de BRU con crecimiento vertical muy compactados entre ellos. Este tipo de estructura se produce por la presencia de una elevada cantidad de cristales, que produce que estos se coloquen de manera vertical en vez de radial, formando la llamada estructura de empalizada (Figura 3.72 B).

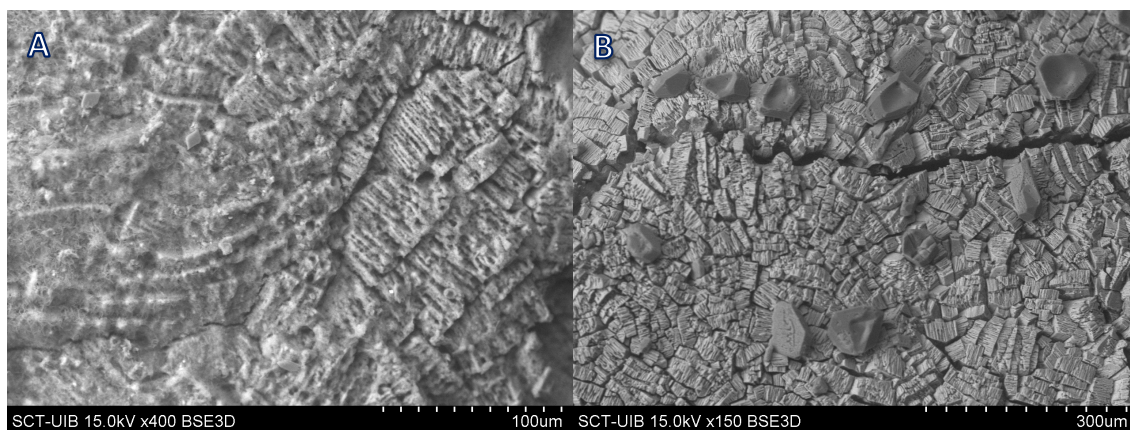


Figura 3.70 Depósitos encontrados en el extremo distal del catéter doble J del paciente 50. A) El bloque de depósito de color blanco está formado por cristales de brushita (BRU), sobre la cual también se encuentra hidroxapatita (HAP). En la parte izquierda de la segunda imagen se aprecia BRU y HAP, mientras que en la parte derecha solamente BRU. B) Detalle de cristales de FAM sobre una capa de Brushita. En algunas zonas, encima de la capa de BRU también se detectaron cristales de fosfato amónico magnésico (FAM).

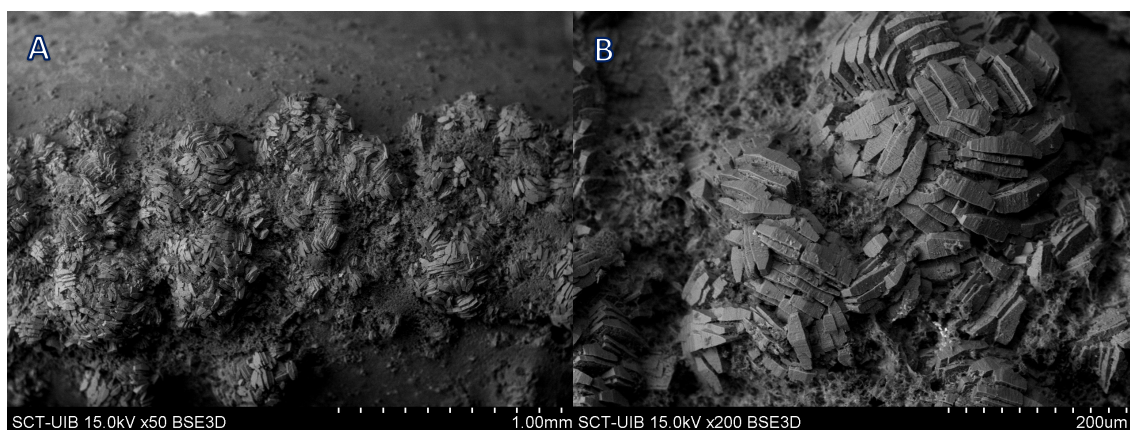


Figura 3.71 Depósitos encontrados en el extremo distal del catéter doble J del paciente 6. A) El bloque de depósito de color blanco está formado por cristales de brushita (BRU), sobre la cual también se encuentra hidroxapatita (HAP). En la parte izquierda de la segunda imagen se aprecia BRU y HAP, mientras que en la parte derecha solamente BRU. B) Detalle de cristales de FAM sobre una capa de BRU. En algunas zonas, encima de la capa de BRU también se detectaron cristales de fosfato amónico magnésico (FAM).

En el catéter del paciente 6 (Figura 3.71) se puede observar mejor como se produce el crecimiento de los cristales de BRU. La gran afluencia de cristales produce su crecimiento en vertical, en forma de empalizada, con una estructura más bien caótica debida a la colocación desigual de los cristales de BRU, que pese a tener un crecimiento vertical se encuentran orientados en diferentes direcciones. Por lo tanto, los cristales que encontrados in vivo son mucho más pequeños y abundantes que los encontrados in vitro y se organizan en forma de empalizada (Figura 3.72 B).

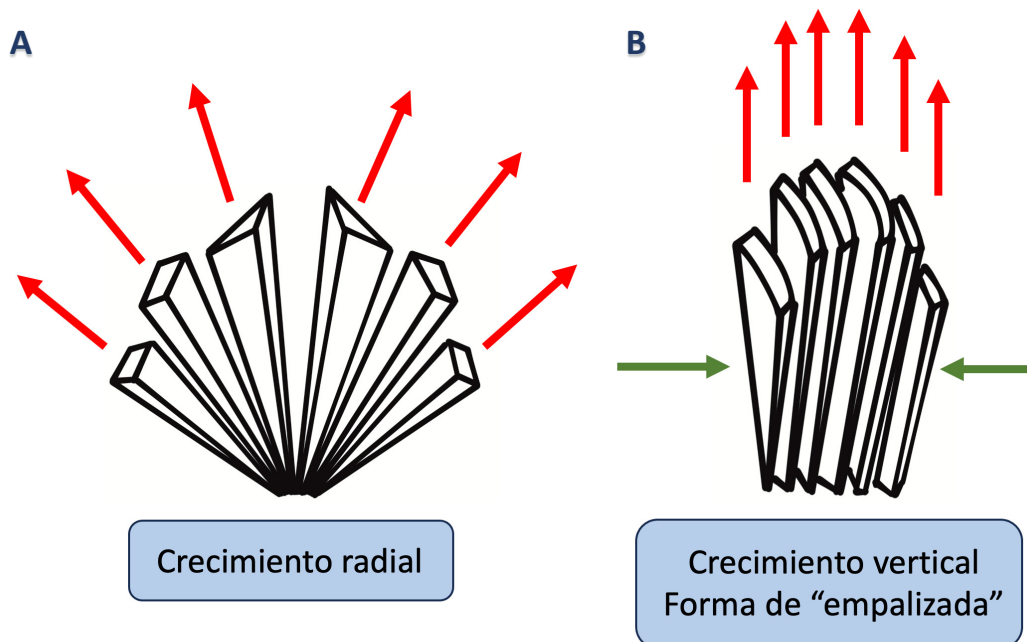


Figura 3.72 Formas de crecimiento de la Brushita.

2.2 Efecto de la presencia de albúmina en la formación de depósitos cálcicos: cristalización del oxalato cálcico

Para la formación de depósitos de oxalato cálcico mediante el sistema en estático, la cantidad de calcio determinada en las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L, fuera cual fuera el tiempo de incubación, es mucho menor que las secciones sin revestir, independientemente si la OA contenía albúmina o no (Figura 3.30), lo que se tradujo en una menor formación de depósitos de cristales COM en la superficie de estas secciones (Figura 3.27). Por lo contrario, la sección sin revestir pero incubada en OA con albúmina 0,1 g/L presenta un mayor nivel de deposición de COM al contener mayor cantidad de calcio que la sección sin revestir incubada en OA sin albúmina, aunque la diferencia no llegue a ser significativa (Figura 3.30).

Lo mismo ocurre en los experimentos llevados a cabo mediante el sistema en flujo (Figura 3.33), donde las secciones sin revestir incubadas con OA con albúmina 0,1 g/L presentan mayor cristalización que las secciones sin revestir incubadas con OA sin albúmina. Igual que en el caso de la cristalización de la BRU, en los experimentos en flujo las diferencias en el nivel de cristalización entre las secciones sin revestir y revestidas se reducen, equiparándose los valores entre ellos. Además, en este caso también se producen unos mayores niveles de cristalización de COM.

Este efecto observado en los experimentos en flujo, tanto en la cristalización de la BRU como en la del OxCa, podría deberse a dos hechos: por una parte, el aporte continuo de disolución y la renovación constante de sus componentes podría favorecer que se produzca una mayor cristalización; por otro lado, el flujo de la disolución sobre las secciones podría favorecer el desprendimiento parcial de la capa de revestimiento de albúmina, produciendo una mayor formación de depósitos cristalinos sobre las secciones.

En cuanto al efecto de la albúmina, se observa que su presencia revistiendo la sección también impediría la formación de depósitos o su adherencia en la sección, como ya se había observado con la cristalización de la BRU. Esta capa impediría la interacción de los cristales con la superficie, y, por lo tanto, produciría una menor cantidad de cristales sobre la sección. Por otro lado, experimentos anteriores mediante cinéticas de cristalización del OxCa mostraron que la albúmina, probada a una concentración de hasta de 1 g/L, ni retrasó ni favoreció su cristalización[68]. En cambio, contrario a lo que se esperaría según lo descrito en la bibliografía, donde algunos estudios observaron que la presencia de albúmina inhibía la agregación del OxCa de manera concentración dependiente, su presencia en la disolución de OA a una menor concentración (0,1 g/L) sí parece favorecer la formación de depósitos agregados en forma de flor sobre la superficie.

Por otro lado, la presencia de albúmina tanto en la OA como en forma de capa de revestimiento produce una diferente morfología y organización de los cristales de COM. En aquellas secciones sin revestir incubadas tanto en el sistema en estático (Figura 3.27 A y F) como en el de flujo (Figura 3.32 A y B), y donde la cristalización fue más elevada se observa una capa formada por COMs individuales bien delimitados que se organizan de manera continua. En algunas secciones sin revestir incubadas con OA con albúmina 0,1 g/L también presentaron sobre esta capa de COM algunos agregados con morfología distinta: los cristales presentaban una conformación en forma de flor, donde se ve nacer los cristales de COM desde el mismo punto (Figura 3.32 B). Así mismo pasa de una manera más clara para aquellas secciones revestidas previamente en albúmina, tanto si fueron incubadas en OA con albúmina o sin (Figuras 3.27 B-E y G-J; Figura 3.31

C y D). Al ser menor la cristalización se observa mejor esta cristalización conjunta de los cristales de COM en forma de flor y formando núcleos agregados independientes. En el experimento en estático, las imágenes a 1000 aumentos de las secciones revestidas e incubadas en OA sin albúmina (Figura 3.28 B-E) y OA con albúmina 0,1g/L (Figura 3.29 B-D) permiten ver como estos agregados se forman a partir de la unión de los cristales a restos de materia orgánica presentes en la superficie de las secciones, que corresponden mayoritariamente a la albúmina de la capa de revestimiento. A diferencia a de lo observado en la bibliografía, la presencia de albúmina en ningún caso produjo la aparición del OxCa en forma de cristales de COD.

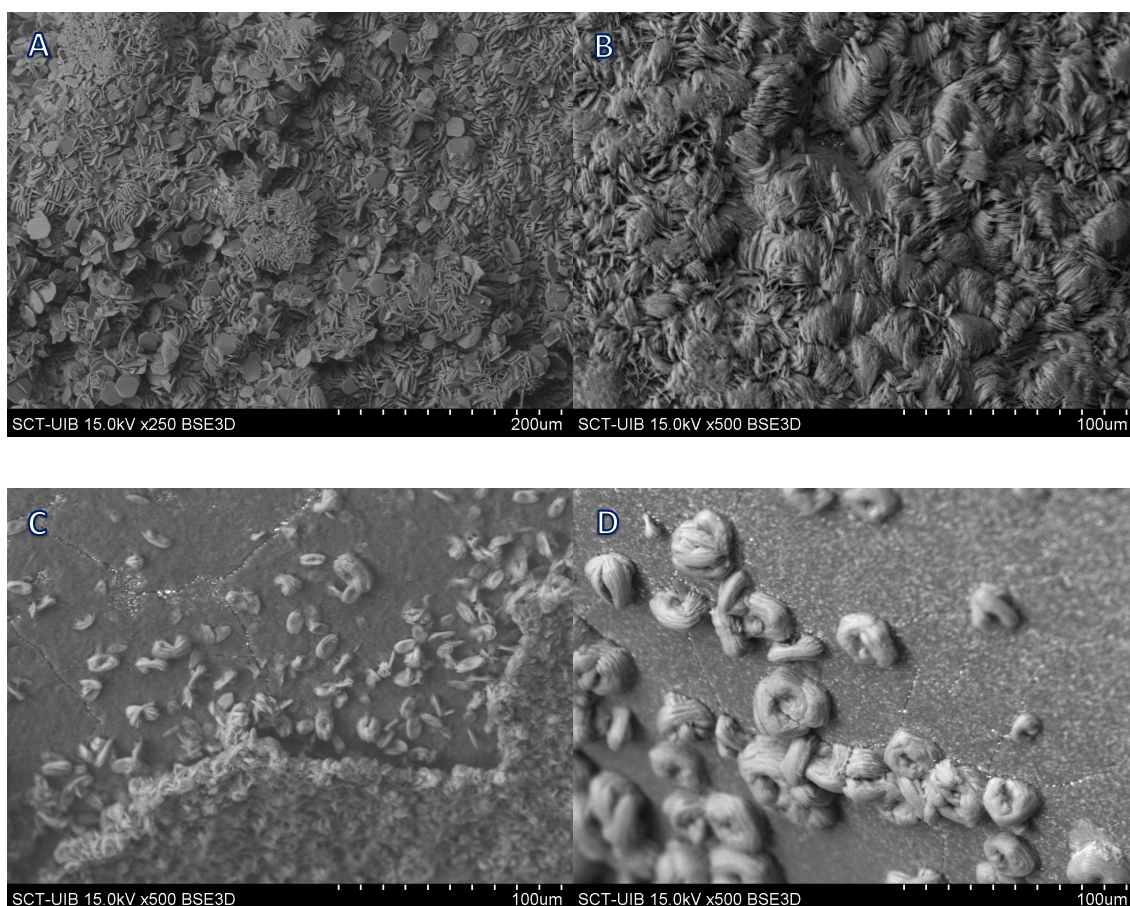


Figura 3. 73 Depósitos encontrados en los catéteres doble J de 4 pacientes. A) Extremo proximal del paciente 19. Se observa COM aglomerado en la superficie formando una capa. En esta foto se ve en detalle las formas hexagonales que adoptan en algunos casos. B) Extremo distal del paciente 40. Se observa una gran capa de aglomerados de COM. C) Extremo proximal paciente 23. Detalle de los cristales COM dispersos y agregados formando una capa. D) Extremo proximal paciente 27. Se observa que el catéter se encuentra recubierto por cristales de (COM) en forma de flor que se encuentran adheridos a una capa de materia orgánica.

En la tesis de J.L. Bauzà[93] se encontró que de los noventa catéteres doble J analizados, 42 presentaron COM en menor o mayor medida, siendo el COM el tipo de depósito más observado en los pacientes implantados con catéter doble J. En la Figura 3.73 se muestran las morfologías de los cristales de COM encontradas en los depósitos de catéteres de 4 pacientes distintos. En las dos primeras imágenes (Figura 3.73 A y B) encontramos una capa de abundante COM. En la Figura 3.73 A se puede llegar a observar los cristales individuales y su morfología hexagonal, también encontrada in vitro. En estas capas ya muy desarrolladas se observa como los cristales de COM se apilan entre ellos sobre las caras más anchas del cristal. En cambio, en la Figura 3.73 C y D se encuentran capas o zonas de ellas en fases más iniciales: se observa como estas se empiezan formando sobre una gran capa de materia orgánica, y los cristales se aglomeran entre ellos formando núcleos en flor, como los observados in vitro en aquellas secciones revestidas con albúmina.

2.3 Efecto de la presencia de albúmina en la formación de depósitos cálcicos: cristalización de la hidroxipatita

En cuanto a la cristalización de la HAP, en los experimentos in vitro en estático se ha observado que su cristalización es menor en las secciones revestidas con albúmina, tanto las incubadas en OA sin albúmina como las incubadas en albúmina 0,1g/L (Figura 3.47). Aun así, a simple vista es un descenso que no se notó visualmente, al presentar todas las secciones una capa compacta de HAP recubriendo la superficie (Figuras 3.45 y 3.46). Para los experimentos en flujo la cristalización fue bastante dispar entre las secciones del mismo grupo, habiendo mucha variabilidad, hecho que dificultó poder sacar conclusiones. Aun así, igual que en las cristalizaciones anteriores, en general la deposición en flujo ha sido mayor al detectar mayores cantidades de calcio que el experimento en estático. Por otro lado, parecería que también se reducen las diferencias en cuanto al nivel de deposición entre las secciones revestidas de albúmina y sin revestir (Figura 3.47).

En cuanto a la disposición de los cristales, en los experimentos llevados a cabo mediante el sistema en flujo encontramos algo totalmente diferente al experimento en estático. En estos se observan grandes esferulitos de HAP sobre las secciones, la mayoría

de forma hemisférica dispersos por la superficie de la sección (Figura 3.48). La presencia de los reversos de los hemisferios permite ver que estos contienen una pequeña depresión central a partir de la cual se inicia el esferulito (Figura 3.49). Esta estructura coincide con lo observado en los esferulitos formados in vitro de un estudio anterior[94], donde observaron que en estas zonas centrales se encuentran parcialmente rellenas de pequeñas partículas esféricas dispersas y sueltas (Figura 3.74).

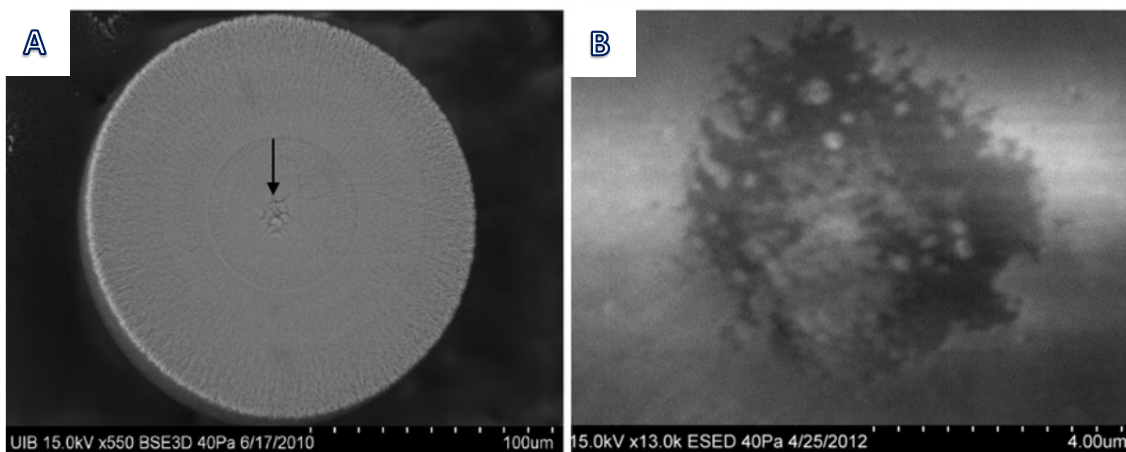


Figura 3.74 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de cristales de HAP formados in vitro. A) superficie del plano basal del hemisferio B) Detalle de la depresión central (flecha en a)[94].

Para las zonas donde la capa de esferulitos es continua y agregada (Figura 3.48 C), en su estructura interna (Figura 3.49 C) se observa una zona exterior en forma de capas compactas y estratificadas, así como también esferulitos diseminados por todo el volumen interior de la deposición o que se presentan en conjuntos más grandes y a menudo intercrecidos (llamada forma aspidinica). Estos conjuntos de esferulitos más grandes tienen diámetros de aproximadamente 20 μm y una estructura similar a una cebolla, consistente en capas concéntricas aparentemente amorfas de espesor variable con un centro formado por esferulitos más dispersos. Estas capas externas consisten en esferulitos muy pequeños que se encuentran densamente empaquetados. Estas estructuras se encuentran a menudo en los cálculos renales de hidroxiapatita.

El siguiente mecanismo de formación fue propuesto por Zelenková et. al[95] (Figura 3.75): la orina sobresaturada con respecto a la hidroxiapatita contiene grupos *Posner*, que consisten en cristales aproximadamente esféricos integrados por unidades

de 9 iones de calcio y 6 iones de fosfato. La agregación pericinética de los grupos *Posner* presentes en la orina da lugar a la formación de esferulitos, que teniendo en cuenta el corto tiempo de residencia de la orina en la nefrona (aproximadamente 3 minutos), sugiere que ocurre muy rápidamente en la orina. Los esferulitos de aproximadamente 10 nm de diámetro colisionarán con otros, de manera que cada colisión exitosa conducirá a un agrandamiento dando lugar a un aglomerado resultante. Estos aglomerados, después de alcanzar un cierto tamaño, se retienen en cavidades de baja eficiencia urodinámica, se asientan gradualmente y se incorporan a la concreción en desarrollo, ya sea de forma esférica como aspidínica.

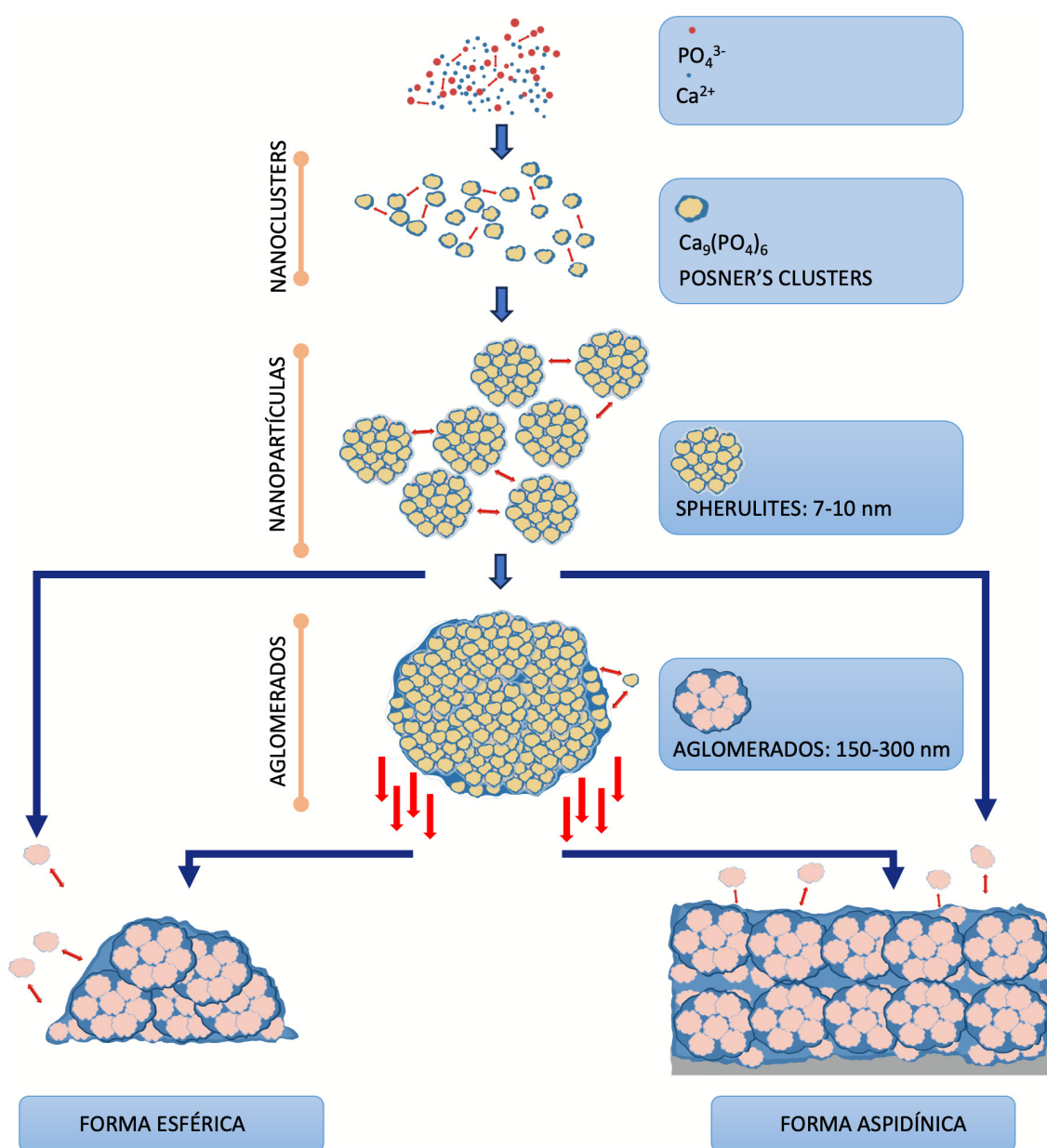


Figura 3.75 Diagrama esquemático del mecanismo de formación de la HAP.

De los noventa catéteres doble J analizados por J. L. Bauzá[93], 15 presentaron HAP en menor o mayor medida. En la Figura 3.76 se muestran los depósitos de HAP encontrados en catéteres de 4 pacientes distintos. En la primera imagen se encuentra una gran capa de HAP formada por aglomerados que se han ido compactando, así como también pequeños esferulitos individuales depositados sobre esta capa. Como se observa en estas imágenes, pocas veces in vivo, debido a las condiciones urinarias, se forma solamente HAP. Así en las imágenes de la Figura 3.76 A y B encontramos la HAP en conjunción con el FAM, también formado a pHs elevados; recubriendo una gran capa de BRU (Figura 3.76 C) y formando una capa amorfa que recubre una gran capa de cristales de COM (Figura 3.76 D).

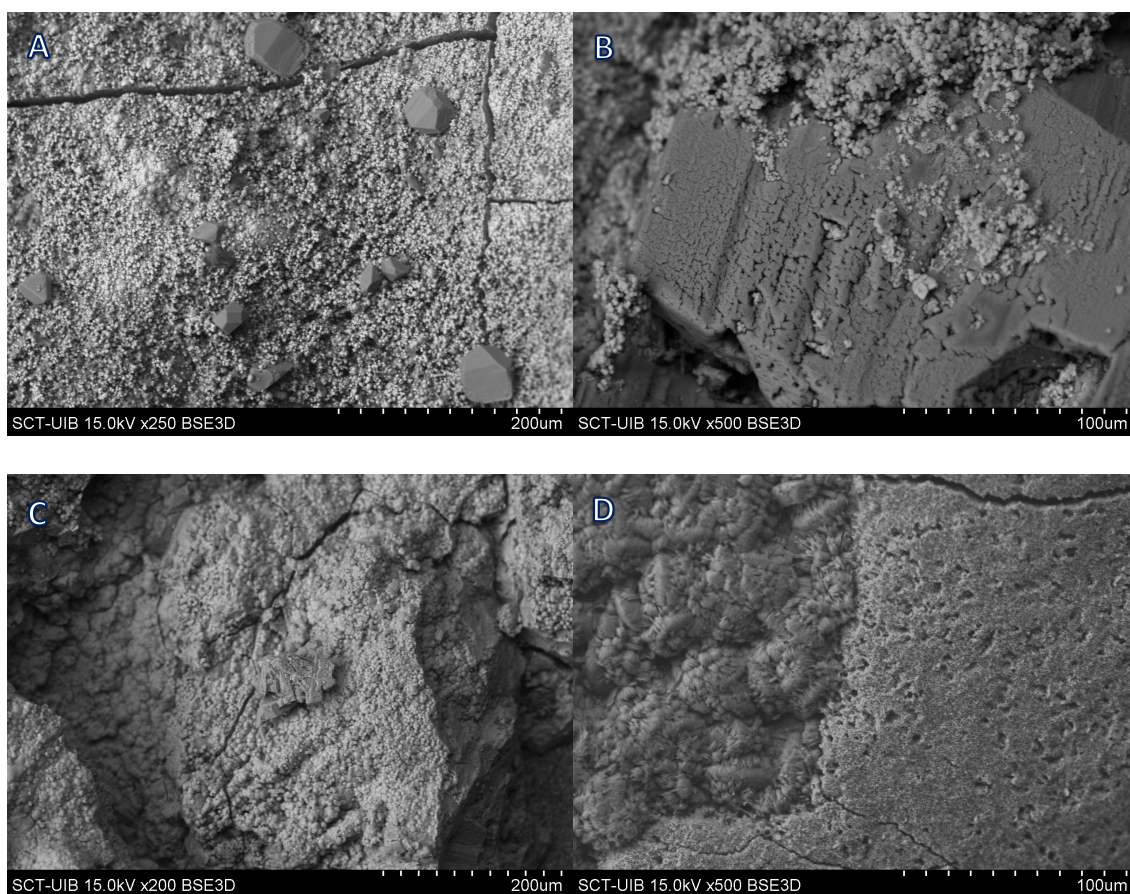


Figura 3. 76 Depósitos encontrados en los catéteres doble J de 4 pacientes. A) Extremo proximal del paciente 55. El catéter está recubierto por una gran cantidad de HAP formando una capa, sobre la cual se encuentran cristales de FAM. B) Extremo distal del paciente 60. Se encuentra recubierto por una gran capa de cristales de FAM, la cual a su vez se recubre de HAP. C) Extremo distal paciente 70. El catéter se encuentra recubierto por una gran capa de BRU sobre la cual se observan cristales de HAP. D) Extremo distal paciente 73. El catéter se encuentra recubierto por una primera capa de COM, encima de la cual se encuentra una segunda capa de HAP muy amorfa.

2.4 Efecto de la presencia de albúmina en la formación de depósitos de ácido úrico

Finalmente, el último tipo de depósito estudiado fue el AU. Este tipo cristalino solo se estudió en estático, observando que las secciones revestidas previamente en albúmina 1 g/L presentaban un nivel de cristalización sobre la sección mucho menor que las secciones sin revestir, independientemente de si la OA utilizada contenía albúmina disuelta o no (Figura 3.57). Para las secciones sin revestir, las incubadas en OA con albúmina 0,1 g/L contuvieron una menor cantidad de depósitos de AU.

Mediante las fotografías obtenidas por microscopia electrónica de barrido se observa que la sección sin revestir incubada en OA sin albúmina (Figura 3.56 A y B) presenta una gran cantidad de cristales de AU rectangulares, de más o menos anchura, llegando a encontrar algunos muy delgados. En cambio, en la sección sin revestir pero incubada en OA con albúmina 0,1 g/L (Figura 3.56 E y F), los cristales presentan formas más redondeadas debido a la presencia de bordes irregulares. Lo mismo ocurre en las secciones revestidas previamente en albúmina 1g/L (Figura 3.56 C-D y G-H): se hallan escasos cristales de AU, y los pocos que se encuentran muestran una morfología con bordes irregulares que ocasiona la pérdida de su estructura rectangular.

El primer estudio donde se analizó un depósito de AU formado sobre el extremo del *loop* de un catéter doble J fue el llevado a cabo por Grases et. al en 1997[96]. En este estudio, el depósito estaba compuesto mayoritariamente de ácido úrico anhidro, < 5% en peso de ácido úrico dihidrato y partículas individuales de oxalato de calcio monohidratado. En estos depósitos de AU se observaron dos morfologías: por un lado, una primera capa formada por un estrato continuo denso compuesto principalmente por cristales columnares; por otro lado, en la mayoría del cálculo predominaba una estructura porosa, formada por ramas gruesas de material cristalino que luego se fusionaron dando lugar a diversas cavidades.

En el estudio realizado por J. L. Bauzá [93], de los noventa catéteres doble J analizados, 8 presentaron AU en menor o mayor medida. En la Figura 3.77 se observan formas cristalinas encontradas en tres pacientes distintos. Observamos en la Figura 3.77 A cristales de AU agregados con formas parecidas a los cristales obtenidos in vitro en

presencia de albúmina, con contornos más redondeados e irregulares. Cuando forman una capa compacta (Figura 3.77 B) forman grandes bloques agregados sin ninguna orientación. En capas menos compactas (Figura 3.77 C) aún se puede observar los cristales individuales y como se van amontonando para terminar formando lo que será una capa más compacta (Figura 3.77 D).

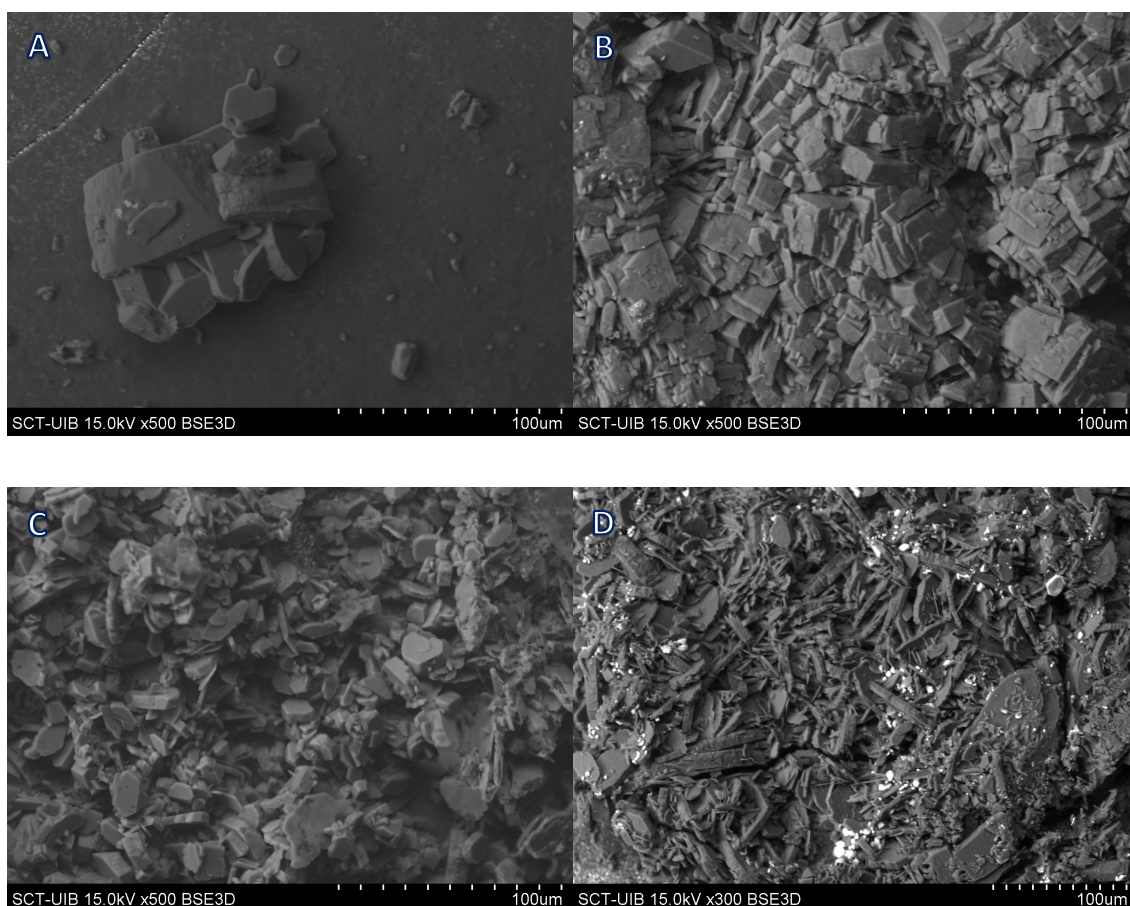


Figura 3.77 Depósitos encontrados en los catéteres doble J de 3 pacientes. A) Extremo proximal del paciente 63. El catéter está recubierto por ácido úrico anhidro (AUA), la forma termodinámica más estable. B) Extremo distal del paciente 63. La cantidad de AU que recubre la parte es muy superior que la del proximal, presentando un bloque de gran tamaño. C) Extremo distal paciente 76. El catéter se encuentra recubierto por una capa de cristales de AUA de poco grosor. D) Extremo distal paciente 3. El catéter se encuentra recubierto por una capa compacta de cristales de AU.

2.5 Comentarios finales

La presencia de albúmina en el medio ya sea disuelta en la OA o en forma de capa de revestimiento, disminuye significativamente la cantidad de depósitos de BRU y AU sobre la sección del catéter. Este efecto es menor en el caso de la cristalización de la

HAP. Además, estas reducciones son menos notorias cuando los experimentos se llevan a cabo en flujo, donde las reducciones disminuyen.

Vale la pena comentar que, en el caso de la HAP, aunque la presencia de albúmina como de capa de revestimiento produzca una pequeña disminución de la formación de depósitos sobre secciones tygon donde la única forma cristalina es HAP (Figura 3.47), en condiciones de cristalización de la BRU (pH 6,5), la presencia de albúmina en disolución y como capa de revestimiento favoreció la aparición de HAP en la superficie de los tygon (Figura 3.20 F-J). Este efecto también se observó durante el proceso de optimización de la cristalización de la HAP sobre secciones tygon. En este proceso, cuando se utilizó OA sin magnesio y sin albúmina a un pH de 6,3 y 6,4, las secciones revestidas presentaron grandes esferulitos de HAP con cristales de BRU (Figuras 3.34 y 3.36, respectivamente). Además, cuando se utilizó OA sin magnesio y con albúmina 0,1 g/L a pH 6,5 las secciones sin revestir también presentaron HAP, frente las secciones sin revestir incubadas en OA sin albúmina que solo presentaron BRU (Figura 3.38). Este efecto podría relacionarse con los resultados observados en el estudio del **efecto del fitato en la cristalización cálcica y la adhesión bacteriana**: en las mismas condiciones de cristalización usadas para la BRU, la presencia de bacterias en el medio produjo una gran deposición de HAP en forma de capa sobre la sección del catéter (Figura 3.15 E-H). Así la presencia de componente orgánico en el medio, siendo mucho más complejo y variado el que puede producir una colonia bacteriana en forma de *biofilm*, favorecería la aparición de HAP.

Para el COM, el efecto de la albúmina es más confuso, ya que el experimento en estático la presencia de albúmina como cama de revestimiento disminuyó la deposición de COM, pero las secciones sin revestir incubadas con OA con albúmina presentaron una mayor deposición de COM que las secciones sin revestir incubadas en OA sin albúmina. Las diferencias de deposición entre las secciones revestidas y sin revestir disminuyen en los experimentos en flujo, donde se observa una mayor deposición en las secciones sin revestir y revestidas incubadas con albúmina (Figura 3.33). Por lo tanto, la presencia de albúmina podría favorecer la deposición de COM sobre las secciones tygon. Este efecto concuerda con el hecho de que la mayoría de los catéteres del estudio

de J. L. Bauzà que presentaron depósitos de COM o una gran capa de este tipo cristalino se encontraban sobre una gran capa de materia orgánica.

3. Estudio de los compuestos con efecto inhibitor en la formación de depósitos cálcicos (brushita, oxalato cálcico e hidroxiapatita) y del ácido úrico sobre secciones tygon

3.1 Inhibición de la formación de depósitos cálcicos (brushita, oxalato cálcico e hidroxiapatita)

El InsP6, su hidrolizado de 16 horas, el alendronato y el citrato fueron los compuestos elegidos para probar sus efectos en la formación de depósitos cálcicos tanto en estático como en flujo. Esto se debe a que estos compuestos fueron los que presentaron un mayor efecto inhibitor en el grueso de los experimentos de cristalización cinética para la BRU, OxCa y HAP. Las concentraciones testadas de InsP6 se corresponden con los niveles urinarios encontrados en individuos sanos[97]. Al ser la absorción de los bifosfonatos parecida a la del fitato, alrededor de un 5%, las concentraciones testadas fueron las mismas. Para poder comparar los efectos del InsP6 con las de sus contrapartidas hidrolizadas, la concentración testada fue la más alta (2 μ M). En cambio, los InsPs de menor fosforilación testados de manera individual (InsP5, InsP4, InsP3 y InsP2) se probaron a una concentración más baja, 1 μ M, ya que al provenir de la degradación del InsP6 su concentración sería menor. Finalmente, la concentración testada de citrato (250 ppm) se encuentra dentro del rango de normalidad urinario.

3.1.1 Inhibición de la formación de depósitos de brushita

Para la cristalización BRU sobre secciones tygon mediante el sistema estático se observa que en los experimentos control se forman grandes cristales de BRU que dan una elevada señal de calcio, con presencia de pequeños cristales de COM repartidos en la superficie (Figuras 3.58 A y 3.58 B) que se hacen más abundantes en el experimento en flujo (Figuras 3.59 A y 3.59 B).

En presencia de fitato 2 μ M la cristalización es nula, tanto en los experimentos en estático como en flujo, lo que confirma la capacidad del fitato de reducir la formación depósitos de BRU y de COM sobre las secciones. Aunque en las cinéticas de cristalización el InsP6 a la misma concentración solo lograra incrementar el tiempo de inducción

aproximadamente 5 minutos, en estos ensayos de formación de depósitos sobre secciones tygon sí logra disminuir completamente la cantidad de depósitos BRU formados en la sección. Esto podría explicarse comparando las condiciones experimentales de los dos estudios, ya que, aunque la concentración de calcio tanto para las cinéticas de cristalización como para los ensayos de formación de depósitos sobre secciones fue de 170 ppm, la concentración de fósforo fue mucho más elevada en las cinéticas (800 ppm) que en el estudio de la formación de depósitos de BRU sobre secciones tygon (482 ppm).

Por otro lado, para el hidrolizado de InsP6 durante 16 horas, aunque en estático se ve una tendencia a una menor cristalización, esta es solo significativa en los experimentos en flujo, donde solo se encuentran pequeños cristales de COD. Se hubiera esperado que sus efectos fueran más claros (o al menos tan efectivos como el InsP6) teniendo en cuenta que en las cinéticas de cristalización de la BRU presentadas en el segundo capítulo el InsP6 hidrolizado durante 16h produjo un incremento del tiempo de inducción mucho más elevado que el InsP6 individual. Por lo tanto, la mezcla de InsPs que se encuentra en la disolución de InsP6 después de hidrolizarse durante 16 horas y en la que habría un elevado contenido de InsP5 e InsP4 también es capaz de inhibir la formación de depósitos de BRU. Este efecto es más claro en flujo, cuyo experimento es más largo y las dosis de hidrolizado continuadas. Las diferencias observadas con los resultados obtenidos mediante las cinéticas de cristalización también podrían deberse al proceso de hidrolizado, que podría dar lugar a diferentes isómeros de los InsPs, los cuales podrían presentar distinto efecto inhibitorio.

Con el alendronato sucede lo mismo que con el InsP6 hidrolizado durante 16 horas: es capaz de inhibir la formación de depósitos de BRU sobre las secciones, aunque su efecto es más claro en flujo. En cambio, el citrato, el cual en el capítulo anterior había mostrado una gran capacidad de incrementar el tiempo de inducción de la BRU, en presencia de una sección de tygon en el medio no es capaz de evitar el desarrollo de cristales de BRU en su superficie. Esto podría atribuirse a que el citrato ejerce gran parte de su efecto inhibitorio debido a su capacidad para formar complejos con el calcio. En consecuencia, en experimentos con cinéticas de cristalización de duración limitada

(máximo de 60 minutos), su impacto es más evidente y observable. En cambio, en el estudio de formación de depósitos sobre las secciones tygon, cuando la duración del experimento se extiende a 24 y 48 horas en condiciones estáticas y de flujo respectivamente, el tiempo disponible es suficiente para que, a medida que los precipitados se forman y la sobresaturación de calcio en la disolución disminuye, el equilibrio químico lleve a que el citrato deje de formar complejos con el calcio. Esto resulta en una pérdida significativa de su influencia sobre el proceso de cristalización. Cabe mencionar que la morfología cristalina en presencia de citrato es más parecida a la que se encuentra en los catéteres in vivo (Figura 3.71), al ser los cristales de BRU formados en presencia de citrato más pequeños, gruesos y no tan aplanados como los encontrados en el control (Figura 3.58 I y A respectivamente), ya que en la orina humana también encontramos citrato.

3.1.2 Inhibición de la formación de depósitos de oxalato cálcico

Para la cristalización del OxCa, el InsP6 y su hidrolizado de 16 horas consiguen inhibir completamente su formación, tanto en estático como en flujo, observando solo la presencia de cristales muy pequeños de COD. Estos efectos confirman los resultados obtenidos en las cinéticas de cristalización, donde el InsP6 y su hidrolizado ya mostraron una gran capacidad de inhibir la cristalización del OxCa con unas concentraciones de calcio y oxalato un poco mayores (200 ppm y 50 ppm, respectivamente) que los experimentos del estudio de formación de depósitos sobre secciones tygon (170 ppm y 40 ppm, respectivamente).

En cambio, el alendronato y citrato, los cuales en los experimentos cinéticos no mostraron capacidad de inhibir la cristalización el OxCa, aunque en estático la cristalización fuera un poco más baja que el experimento control, en flujo se observa el mismo nivel de deposición para el control y el alendronato. Así, el alendronato y el citrato, los cuales en las cinéticas de cristalización no fueron capaces de incrementar el tiempo de inducción del OxCa, tampoco impiden la formación de depósitos sobre las secciones. Además, en presencia de citrato, se forma una capa más compacta de COM (Figura 3.61 I y J), parecida a las que se observan en los catéteres in vivo (Figura 3.73 C y D).

3.1.3 Inhibición de la formación de depósitos de hidroxiapatita

Para la HAP, ninguno de los compuestos testados consiguió evitar que se formara una capa compacta de esferulitos sobre las secciones tygon (Figura 3.64), ni siquiera el alendronato, que fue el único compuesto de los testados en este estudio capaz de aumentar un poco el tiempo de inducción de la cristalización de la HAP en los estudios tubidimétricos (Capítulo 2). Como ya se ha comentado en el anterior capítulo, llama la atención que el fitato, cuyos efectos inhibidores de la calcificación vascular están comprobados[98–102], no sea capaz de inhibir la cristalización de la HAP. Aun así, en el primer estudio sí que se observó que, en presencia de bacterias, donde se produce una gran cantidad de depósitos HAP sobre las secciones de los catéteres, el fitato sí consigue inhibir su formación. Por lo tanto, y corroborando las explicaciones del capítulo anterior, parece ser que el fitato, dentro de un contexto celular donde intervienen más compuestos macromoleculares distintos, sí es capaz de inhibir la formación y deposición de la HAP.

Así, tanto el fitato como sus hidrolizados previenen de la formación de depósitos de BRU y COM en las secciones *in vitro*, por lo que estos efectos podrían trasladarse *in vivo*, pudiendo también inhibir la cristalización de la HAP. Así, tal y como se había observado en el estudio de Torrecilla *et al.*[36], una composición oral formada por fitato y acidificantes podría convertirse en un tratamiento preventivo de las incrustaciones y bloqueos cálcicos que se producen en los pacientes cateterizados.

3.2 Inhibición de la formación de depósitos de ácido úrico

La teobromina y la 7-metilxantina, uno de sus principales metabolitos, fueron los compuestos elegidos para probar sus efectos en la formación de depósitos de AU. Su efecto se estudió tanto individualmente como mezclados, ya que estos compuestos fueron los que presentaron un mayor efecto inhibidor en el grueso de los experimentos de cristalización cinética para el AU (Capítulo 2). A pesar de que el 3,7-dimetilúrico demostró una gran capacidad para inhibir la formación de AU en las cinéticas de cristalización, se excluyó su uso en el estudio de formación de depósitos en las secciones de tygon debido a la baja concentración de este compuesto en la orina[103], que no

compensa el coste del producto. Las concentraciones testadas de teobromina se corresponden con los niveles urinarios encontrados en individuos sanos. Teniendo en cuenta que el 36% de la teobromina se excreta en forma de 7-metilxantina, y que el 21% permanece en la orina inalterada[103], la concentración testada de esta en los experimentos fue el doble que el de la teobromina.

Así, se pudo observar que tanto la teobromina como la 7-metilxantina, así como su combinación, lograron reducir la cantidad de cristales de AU depositados en las secciones de tygon (Figura 3.69). Además, estas reducciones se produjeron a concentraciones que podrían encontrarse en la orina si se consumen productos que contienen teobromina, como las que se registraron en la orina de los voluntarios sanos que ingirieron 40 gramos de cacao soluble el día anterior (véase Capítulo 2). Teniendo en cuenta que la teobromina se ha descrito como un inhibidor de la cristalización del ácido úrico[104], que su toma junto al citrato consigue disminuir el riesgo de cristalización del ácido úrico[105] y que recientemente se han observado que también presenta capacidad de redisolución de los cálculos de AU[106], no sería extraño encontrar que, debido a las similitudes estructurales y a que gran parte de la teobromina se metaboliza en 7-metilxantina[103], esta presentara los mismos efectos o más elevados. Además, con los resultados obtenidos, se demuestra que el uso de la teobromina estaría indicado para los pacientes cateterizados. Así, sería muy interesante plantear un tratamiento oral para los pacientes implantados con sondas que consistiera en inhibidores de las cristalizaciones que se producen a pH ácidos (la teobromina para los depósitos de AU) en conjunción con inhibidores de la cristalización que se producen a pHs básicos (como el fitato para los depósitos cálcicos) y reguladores del pH.

Estos tratamientos basados en composiciones orales conteniendo reguladores del pH e inhibidores de la cristalización, juntamente con la indicación de un menor tiempo de implantación de los catéteres, podría ser el tratamiento recomendado en un futuro no muy lejano.

Conclusiones

1. Estudio del efecto del fitato en la cristalización cálcica y la adhesión bacteriana

- El fitato redujo la cantidad de bacterias adheridas en la superficie del catéter al evitar la formación de los cristales de BRU, HAP y COM. La ausencia de cristales comporta una disminución de la superficie disponible para la adhesión de las bacterias, ya que estos pueden servir de nidos para el crecimiento bacteriano.
- Es posible, además de necesario, prevenir la formación de nidos y masas cristalinas, ya que esto puede ocluir la luz del uréter y generar importantes complicaciones clínicas, así como infecciones persistentes del tracto urinario o bloqueos.
- En presencia de fitato a las distintas concentraciones estudiadas se produce una adherencia bacteriana sobre el catéter similar, por lo que se debieron adherir directamente a la superficie o al lumen interior del catéter. Esto confirma que las bacterias se adhieren a la superficie de un catéter incluso en ausencia de una capa cristalina, formando una capa de *biofilm* inicial de materia orgánica.

2. Estudio del efecto de la albúmina en la formación de depósitos cálcicos y de ácido úrico en estático y flujo

- La presencia de albúmina, tanto como capa de revestimiento como en la disolución de OA, produce una menor cristalización de la BRU y el AU. En el caso de la BRU, las diferencias entre grupos son más claras en los experimentos en estático y se reducen en los experimentos en flujo.
- In vitro se obtienen cristales de BRU con una forma aplanada de cuchilla más o menos dentada colocada de manera radial a partir de un núcleo de cristalización. In vivo, debido al mayor nivel de cristalización, se observa una capa de cristales de BRU en forma de empalizada compacta. Para el AU, las morfologías obtenidas in vitro, tanto rectangulares como con bordes más irregulares son parecidas a las encontradas in vivo.
- La presencia de albúmina en la OA produce un aumento de la cristalización del COM en estático y en flujo. La morfología de los cristales COM in vitro son más parecidas a las in vivo cuando la albúmina está presente. Estos se caracterizan por presentar una conformación en forma de flor, donde se ve nacer los cristales de COM desde el mismo punto sobre una capa de materia orgánica.

- La presencia de albúmina produjo un ligero descenso de la cantidad de HAP determinada en estático que no tuvo un impacto visual. La morfología de la HAP observada in vitro sigue los mismos mecanismos que los observados in vivo. Por otro lado, en condiciones de cristalización de la BRU (pH 6,5), la presencia de albúmina favoreció la aparición de HAP en la superficie de los tygon.

3. Estudio de los compuestos con efecto inhibitor en la formación de depósitos cálcicos (brushita, oxalato cálcico e hidroxiapatita) y del ácido úrico sobre secciones tygon

- Tanto el InsP6 como el InsP6 hidrolizado durante 16 inhiben la formación de depósitos de BRU y COM. En el caso del OxCa, se observa solo la presencia de cristales muy pequeños de COD. En cambio, el alendronato parece tener un menor efecto. En cuanto el citrato, en los experimentos en estático donde la duración de la incubación es de 24 horas, no es capaz de evitar el desarrollo de cristales de BRU y COM en la superficie de las secciones.
- Para la HAP, igual que en los experimentos cinéticos de cristalización, ninguno de los compuestos testados consiguió evitar que se formara una capa compacta de esferulitos sobre las secciones tygon. Tampoco el alendronato, que fue el único capaz de aumentar un poco el tiempo de inducción de la cristalización de la HAP en los estudios cinéticos de cristalización.
- Para el AU, tanto la teobromina como la 7-metilxantina como su combinación consiguen disminuir la cantidad de depósitos formados sobre las secciones tygon. Además, estas reducciones se producen a unas concentraciones que pueden encontrarse en orina.
- Tanto el fitato como sus hidrolizados previenen de la formación de depósitos de BRU y COM en las secciones in vitro, lo que sugiere la posibilidad de que estos efectos se traduzcan también in vivo, pudiendo también inhibir la cristalización de la HAP. Del mismo modo, los efectos observados in vitro de la teobromina y la 7-metilxantina en la cristalización del AU podrían tener aplicaciones clínicas. En este sentido, una composición oral que contenga inhibidores de la cristalización podría considerarse como un tratamiento preventivo para evitar la formación de incrustaciones, obstrucciones y bloqueos que se producen en los pacientes cateterizados.

Bibliografía

1. Beysens, M.; Tailly, T.O. Ureteral Stents in Urolithiasis. *Asian J Urol* **2018**, *5*, 274–286, doi:10.1016/j.ajur.2018.07.002.
2. Lo, J.; Lange, D.; Chew, B.H. Ureteral Stents and Foley Catheters-Associated Urinary Tract Infections: The Role of Coatings and Materials in Infection Prevention. *Antibiotics* **2014**, *3*, 87–97, doi:10.3390/ANTIBIOTICS3010087.
3. Morris, N.S.; Stickler, D.J. Encrustation of Indwelling Urethral Catheters by *Proteus Mirabilis* Biofilms Growing in Human Urine. *J Hosp Infect* **1998**, *39*, 227–234, doi:10.1016/S0195-6701(98)90262-6.
4. Tenke, P.; Kovacs, B.; Jäckel, M.; Nagy, E. The Role of Biofilm Infection in Urology. *World J Urol* **2006**, *24*, 13–20, doi:10.1007/S00345-005-0050-2.
5. Tenke, P.; Kovacs, B.; Bjerklund Johansen, T.E.; Matsumoto, T.; Tambyah, P.A.; Naber, K.G. European and Asian Guidelines on Management and Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infections. *Int J Antimicrob Agents* **2008**, *31*, 68–78, doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2007.07.033.
6. Stickler, D. Bacterial Biofilms in Patients with Indwelling Urinary Catheters. *Nat Clin Pract Urol* **2008**, *5*, 598–608, doi:10.1038/ncpuro1231.
7. Moltzahn, F.; Haeni, K.; Birkhäuser, F.D.; Roth, B.; Thalmann, G.N.; Zehnder, P. Peri-Interventional Antibiotic Prophylaxis Only vs Continuous Low-Dose Antibiotic Treatment in Patients with JJ Stents: A Prospective Randomised Trial Analysing the Effect on Urinary Tract Infections and Stent-Related Symptoms. *BJU Int* **2013**, *111*, 289–295, doi:10.1111/J.1464-410X.2012.11592.X.
8. Zumstein, V.; Betschart, P.; Albrich, W.C.; Buhmann, M.T.; Ren, Q.; Schmid, H.P.; Abt, D. Biofilm Formation on Ureteral Stents - Incidence, Clinical Impact and Prevention. *Swiss Med Wkly* **2017**, *147*, doi:10.4414/SMW.2017.14408.
9. Tenke, P.; Köves, B.; Nagy, K.; Hultgren, S.J.; Mendling, W.; Wullt, B.; Grabe, M.; Wagenlehner, F.M.E.; Cek, M.; Pickard, R.; et al. Update on Biofilm Infections in the Urinary Tract. *World J Urol* **2012**, *30*, 51–57, doi:10.1007/S00345-011-0689-9.
10. Stewart, P.S.; Costerton, J.W. Antibiotic Resistance of Bacteria in Biofilms. *Lancet* **2001**, *358*, 135–138, doi:10.1016/S0140-6736(01)05321-1.
11. TIESZER, C.; REID, G.; DENSTEDT, J. CONDITIONING FILM DEPOSITION ON URETERAL STENTS AFTER IMPLANTATION. *J Urol* **1998**, *160*, 876–881, doi:10.1097/00005392-199809010-00081.
12. Elwood, C.N.; Lo, J.; Chou, E.; Crowe, A.; Arsovska, O.; Adomat, H.; Miyaoka, R.; Tomlinson-Guns, E.; Monga, M.; Chew, B.H.; et al. Understanding Urinary Conditioning Film Components on Ureteral Stents: Profiling Protein Components and Evaluating Their Role in Bacterial Colonization. *Biofouling* **2013**, *29*, 1115–1122, doi:10.1080/08927014.2013.829049.
13. Scotland, K.B.; Kung, S.H.Y.; Chew, B.H.; Lange, D. Uropathogens Preferentially Interact with Conditioning Film Components on the Surface of Indwelling Ureteral Stents Rather than Stent Material. *Pathogens* **2020**, *9*, 1–12, doi:10.3390/PATHOGENS9090764.
14. Ong, C.L.Y.; Ulett, G.C.; Mabbett, A.N.; Beatson, S.A.; Webb, R.I.; Monaghan, W.; Nimmo, G.R.; Looke, D.F.; McEwan, A.G.; Schembri, M.A. Identification of Type 3 Fimbriae in Uropathogenic *Escherichia Coli* Reveals a Role in Biofilm Formation. *J Bacteriol* **2008**, *190*, 1054–1063, doi:10.1128/JB.01523-07.

15. Petrova, O.E.; Sauer, K. Sticky Situations: Key Components That Control Bacterial Surface Attachment. *J Bacteriol* **2012**, *194*, 2413–2425, doi:10.1128/JB.00003-12/ASSET/696D4603-CE01-443B-950E-E4AC0CE2118C/ASSETS/GRAPHIC/ZJB9990914460002.JPEG.
16. Højby, N.; Ciofu, O.; Johansen, H.K.; Song, Z.J.; Moser, C.; Jensen, P.Ø.; Molin, S.; Givskov, M.; Tolker-Nielsen, T.; Bjarnsholt, T. The Clinical Impact of Bacterial Biofilms. *Int J Oral Sci* **2011**, *3*, 55–65, doi:10.4248/IJOS11026.
17. Arciola, C.R.; Campoccia, D.; Speziale, P.; Montanaro, L.; Costerton, J.W. Biofilm Formation in Staphylococcus Implant Infections. A Review of Molecular Mechanisms and Implications for Biofilm-Resistant Materials. *Biomaterials* **2012**, *33*, 5967–5982, doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.05.031.
18. Holá, V.; Ruzicka, F.; Horka, M. Microbial Diversity in Biofilm Infections of the Urinary Tract with the Use of Sonication Techniques. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2010**, *59*, 525–528, doi:10.1111/J.1574-695X.2010.00703.X.
19. Macleod, S.M.; Stickler, D.J. Species Interactions in Mixed-Community Crystalline Biofilms on Urinary Catheters. *J Med Microbiol* **2007**, *56*, 1549–1557, doi:10.1099/JMM.0.47395-0.
20. Lojanapiwat, B. Colonization of Internal Ureteral Stent and Bacteriuria. *World J Urol* **2006**, *24*, 681–683, doi:10.1007/S00345-006-0135-6.
21. Kehinde, E.O.; Rotimi, V.O.; Al-Hunayan, A.; Abdul-Halim, H.; Boland, F.; Al-Awadi, K.A. Bacteriology of Urinary Tract Infection Associated with Indwelling J Ureteral Stents. *J Endourol* **2004**, *18*, 891–896, doi:10.1089/END.2004.18.891.
22. Reid, G.; Denstedt, J.D.; Yun Suk Kang; Lam, D.; Nause, C. Microbial Adhesion and Biofilm Formation on Ureteral Stents in Vitro and in Vivo. *Journal of Urology* **1992**, *148*, 1592–1594, doi:10.1016/S0022-5347(17)36976-8.
23. Kar, M.; Dubey, A.; Patel, S.S.; Siddiqui, T.; Ghoshal, U.; Sahu, C. Characteristics of Bacterial Colonization and Urinary Tract Infection after Indwelling of Double-J Ureteral Stent and Percutaneous Nephrostomy Tube. *J Glob Infect Dis* **2022**, *14*, 75–80, doi:10.4103/JGID.JGID_276_21.
24. Rahman, M.A.; Alam, M.M.; Shamsuzzaman, S.M.; Haque, M.E. Evaluation of Bacterial Colonization and Bacteriuria Secondary to Internal Ureteral Stent. **2010**, *19*, 366–371.
25. Riedl, C.R.; Plas, E.; Hubner, W.A.; Zimmerl, H.; Ulrich, W.; Pfluger, H. Bacterial Colonization of Ureteral Stents. *Eur Urol* **1999**, *36*, 53–59, doi:10.1159/000019927.
26. Kehinde, E.O.; Rotimi, V.O.; Al-Awadi, K.A.; Abdul-Halim, H.; Boland, F.; Al-Hunayan, A.; Pazhoor, A. Factors Predisposing to Urinary Tract Infection after J Ureteral Stent Insertion. *Journal of Urology* **2002**, *167*, 1334–1337, doi:10.1016/S0022-5347(05)65294-9.
27. Morris, N.S.; Stickler, D.J.; McLean, R.J.C. The Development of Bacterial Biofilms on Indwelling Urethral Catheters. *World J Urol* **1999**, *17*, 345–350, doi:10.1007/S003450050159.
28. Jones, B.D.; Mobley, H.L.T. Genetic and Biochemical Diversity of Ureasases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* Species Isolated from Urinary Tract Infection. *Infect Immun* **1987**, *55*, 2198–2203, doi:10.1128/IAI.55.9.2198-2203.1987.

29. HEDELIN, H.; EDDELAND, A.; LARSSON, L.; PETERSSON, S.; ÖHMAN, S. The Composition of Catheter Encrustations, Including the Effects of Allopurinol Treatment. *Br J Urol* **1984**, *56*, 250–254, doi:10.1111/j.1464-410X.1984.tb05382.x.
30. Cox, A.J.; Hukins, D.W.L. Morphology of Mineral Deposits on Encrusted Urinary Catheters Investigated by Scanning Electron Microscopy. *Journal of Urology* **1989**, *142*, 1347–1350, doi:10.1016/S0022-5347(17)39095-X.
31. Mobley, H.L.T.; Warren, J.W. Urease-Positive Bacteriuria and Obstruction of Long-Term Urinary Catheters. *J Clin Microbiol* **1987**, *25*, 2216–2217, doi:10.1128/JCM.25.11.2216-2217.1987.
32. Kunin, C.N.M. Blockage of Urinary Catheters: Role of Microorganisms and Constituents of the Urine on Formation of Encrustations. *J Clin Epidemiol* **1989**, *42*, 835–842, doi:10.1016/0895-4356(89)90096-6.
33. Stickler, D.; Ganderton, L.; King, J.; Nettleton, J.; Winters, C. Proteus Mirabilis Biofilms and the Encrustation of Urethral Catheters. *Urol Res* **1993**, *21*, 407–411, doi:10.1007/BF00300077.
34. Wollin, T.A.; Tieszer, C.; Riddell, J. V.; Denstedt, J.D.; Reid, G. Bacterial Biofilm Formation, Encrustation, and Antibiotic Adsorption to Ureteral Stents Indwelling in Humans. *J Endourol* **1998**, *12*, 101–111, doi:10.1089/end.1998.12.101.
35. Bouzidi, H.; Traxer, O.; Doré, B.; Amiel, J.; Hadjadj, H.; Conort, P.; Daudon, M. Caractéristiques Des Incrustations Des Endoprothèses Urétérales Chez Les Patients Lithiasiques. *Progres en Urologie* **2008**, *18*, 230–237, doi:10.1016/j.purol.2008.02.004.
36. Torrecilla, C.; Fernández-Concha, J.; Cansino, J.R.; Mainez, J.A.; Amón, J.H.; Costas, S.; Angerri, O.; Emiliani, E.; Arrabal Martín, M.A.; Arrabal Polo, M.A.; et al. Reduction of Ureteral Stent Encrustation by Modulating the Urine PH and Inhibiting the Crystal Film with a New Oral Composition: A Multicenter, Placebo Controlled, Double Blind, Randomized Clinical Trial. *BMC Urol* **2020**, doi:10.1186/s12894-020-00633-2.
37. Dyer, R.B.; Chen, M.Y.; Zagoria, R.J.; Regan, J.D.; Hood, C.G.; Kavanagh, P. V. Complications of Ureteral Stent Placement. *Radiographics* **2002**, *22*, 1005–1022, doi:10.1148/RADIOGRAPHICS.22.5.G02SE081005.
38. Sighinolfi, M.C.; Sighinolfi, G.P.; Galli, E.; Micali, S.; Ferrari, N.; Mofferdin, A.; Bianchi, G. Chemical and Mineralogical Analysis of Ureteral Stent Encrustation and Associated Risk Factors. *Urology* **2015**, *86*, 703–706, doi:10.1016/J.UROLOGY.2015.05.015.
39. Rouprêt, M.; Daudon, M.; Hupertan, V.; Gattegno, B.; Thibault, P.; Traxer, O. Can Ureteral Stent Encrustation Analysis Predict Urinary Stone Composition? *Urology* **2005**, *66*, 246–251, doi:10.1016/J.UROLOGY.2005.03.054.
40. Calvó, P.; Bauza, J.L.; Julià, F.; Guimerà, J.; Pieras, E.C.; Costa-Bauzá, A.; Grases, F. Characterization of Deposits on Double J Stents. *Comptes Rendus Chimie* **2021**, *24*, doi:10.5802/CRCHIM.107.
41. Bauzá, J.L.; Calvó, P.; Julià, F.; Guimerà, J.; Martínez, A.I.; Tienza, A.; Costa-Bauzá, A.; Sanchís, P.; Grases, F.; Pieras, E. Relationship between Urinary Parameters and Double-J Stent Encrustation. *J Clin Med* **2023**, *12*, doi:10.3390/JCM12155149.

42. el-Faqih SR, Shamsuddin AB, Chakrabarti A, Atassi R, Kardar AH, Osman MK, H.I. Polyurethane Internal Ureteral Stents in Treatment of Stone Patients: Morbidity Related to Indwelling Times. *J Urol* **1991**, *146*, 1487–1491, doi:doi:10.1016/s0022-5347(17)38146-6.
43. Kawahara, T.; Ito, H.; Terao, H.; Yoshida, M.; Matsuzaki, J. Ureteral Stent Encrustation, Incrustation, and Coloring: Morbidity Related to Indwelling Times. *J Endourol* **2012**, *26*, 178–182, doi:10.1089/end.2011.0385.
44. Tieszer, C.; Reid, G.; Denstedt, J. XPS and SEM Detection of Surface Changes on 64 Ureteral Stents after Human Usage. *J Biomed Mater Res* **1998**, *43*, 321–330, doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199823)43:3<321::AID-JBM14>3.0.CO;2-I.
45. Stickler, D.J.; Morgan, S.D. Observations on the Development of the Crystalline Bacterial Biofilms That Encrust and Block Foley Catheters. *Journal of Hospital Infection* **2008**, *69*, 350–360, doi:10.1016/j.jhin.2008.04.031.
46. Winters, C.; Stickler, D.J.; Howe, N.S.; Williams, T.J.; Wilkinson, N.; Buckley, C.J. Some Observations on the Structure of Encrusting Biofilms of *Proteus Mirabilis* on Urethral Catheters. *Cells and Materials* **1995**, *5*, 245–253.
47. Acosta-Miranda, A.M.; Milner, J.; Turk, T.M.T. The FECal Double-J: A Simplified Approach in the Management of Encrusted and Retained Ureteral Stents. *J Endourol* **2009**, *23*, 409–415, doi:10.1089/end.2008.0214.
48. Tomer, N.; Garden, E.; Small, A.; Palese, M. Ureteral Stent Encrustation: Epidemiology, Pathophysiology, Management and Current Technology. *J Urol* **2021**, *205*, 68–77, doi:10.1097/JU.0000000000001343.
49. Stickler, D.; Morris, N.; Moreno, M.C.; Sabbuba, N. Studies on the Formation of Crystalline Bacterial Biofilms on Urethral Catheters. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **1998**, *17*, 649–652, doi:10.1007/S100960050150.
50. Ll Jones, G.; Muller, C.T.; Stickler, D.J. Effect of Triclosan on the Development of Bacterial Biofilms by Urinary Tract Pathogens on Urinary Catheters. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2006**, *57*, 266–272, doi:10.1093/jac/dki447.
51. Lewis, K. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, *45*, 999–1007, doi:10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001.
52. Tenney, J.H.; Warren, J.W. Bacteriuria in Women with Long-Term Catheters: Indwelling and Replacement Catheters. *Journal of Infectious Diseases* **1988**, *157*, 199–202, doi:10.1093/INFDIS/157.1.199.
53. Raz, R.; Schiller, D.; Nicolle, L.E. Chronic Indwelling Catheter Replacement before Antimicrobial Therapy for Symptomatic Urinary Tract Infection. *Journal of Urology* **2000**, *164*, 1254–1258, doi:10.1016/S0022-5347(05)67150-9.
54. Norberg, B.; Norberg, A.; Parkhede, U. The Spontaneous Variation of Catheter Life in Long-Stay Geriatric Inpatients with Indwelling Catheters. *Gerontology* **1983**, *29*, 332–335, doi:10.1159/000213135.
55. Mathur, S.; Suller, M.T.E.; Stickler, D.J.; Feneley, R.C.L. Prospective Study of Individuals with Long-Term Urinary Catheters Colonized with *Proteus* Species. *BJU Int* **2006**, *97*, 121–128, doi:10.1111/J.1464-410X.2006.05868.X.
56. RG, B.; IM, N. Urinary Catheter Blockage Depends on Urine PH, Calcium and Rate of Flow. **1997**, *35*, undefined-undefined.
57. HEDELIN, H.; BRATT, C. -G; ECKERDAL, G.; LINCOLN, K. Relationship between Urease-producing Bacteria, Urinary PH and Encrustation on Indwelling Urinary

- Catheters. *Br J Urol* **1991**, *67*, 527–531, doi:10.1111/J.1464-410X.1991.TB15200.X.
58. López, J.M.; Mainez, J.A.; Christian, J.M.; Gil, J.; Garganta, R. Usefulness and Acceptability of a Smart PH Meter and Mobile Medical App as a Monitoring Tool in Patients with Urolithiasis: Short-Term Prospective Study. *Arch Esp Urol* **2022**, *75*, 1–12.
 59. Bultitude, M.F.; Tiptaft, R.C.; Glass, J.M.; Dasgupta, P. Management of Encrusted Ureteral Stents Impacted in Upper Tract. *Urology* **2003**, *62*, 622–626, doi:10.1016/S0090-4295(03)00506-5.
 60. Ahallal, Y.; Khallouk, A.; Jamal, M.; Fassi, E.; Farih, H. Risk Factor Analysis and Management of Ureteral Double-J Stent Complications. *Rev Urol* **2010**, *12*, e147, doi:10.3909/riu0447.
 61. Singh, I.; Gupta, N.P.; Hemal, A.K.; Aron, M.; Seth, A.; Dogra, P.N. Severely Encrusted Polyurethane Ureteral Stents: Management and Analysis of Potential Risk Factors. *Urology* **2001**, *58*, 526–531, doi:10.1016/S0090-4295(01)01317-6.
 62. Khan, S.R.; Kok, D.J. Modulators of Urinary Stone Formation. *Frontiers in Bioscience* **2004**, *9*, 1450–1482, doi:10.2741/1347.
 63. Atmani, F.; Glenton, P.A.; Khan, S.R. Identification of Proteins Extracted from Calcium Oxalate and Calcium Phosphate Crystals Induced in the Urine of Healthy and Stone Forming Subjects. *Urol Res* **1998**, *26*, 201–207, doi:10.1007/S002400050047.
 64. Priyadarshini; Raizada, D.; Kumar, P.; Singh, T.; Pruthi, T.; Negi, A.; Nigam, L.; Subbarao, N. Exploring the Modulatory Effect of Albumin on Calcium Phosphate Crystallization. *Curr Sci* **2019**, *117*, 1083–1089, doi:10.18520/CS/V117/I6/1083-1089.
 65. Cerini, C.; Geider, S.; Dussol, B.; Hennequin, C.; Daudon, M.; Veessler, S.; Nitsche, S.; Boistelle, R.; Berthézène, P.; Dupuy, P.; et al. Nucleation of Calcium Oxalate Crystals by Albumin: Involvement in the Prevention of Stone Formation. *Kidney Int* **1999**, *55*, 1776–1786, doi:10.1046/J.1523-1755.1999.00426.X.
 66. Chen, W.C.; Lin, H.S.; Chen, H.Y.; Shih, C.H.; Li, C.W. Effects of Tamm-Horsfall Protein and Albumin on Calcium Oxalate Crystallization and Importance of Sialic Acids. *Mol Urol* **2001**, *5*, 1–5, doi:10.1089/109153601750124186.
 67. Liu, J.; Jiang, H.; Liu, X.Y. How Does Bovine Serum Albumin Prevent the Formation of Kidney Stone? A Kinetics Study. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 9085–9089, doi:10.1021/JP057403B.
 68. Isern, B. Estudios Sobre Factores Cinéticos Implicados En La Litiasis Renal Oxalocálcica: Nucleación Heterogénea e Inhibidores de La Cristalización, Universidad de las Islas baleares: Palm de Mallorca, 2007.
 69. Ryall, R.L.; Harnett, R.M.; Hibberd, C.M.; Edyvane, K.A.; Marshall, V.R. Effects of Chondroitin Sulphate, Human Serum Albumin and Tamm-Horsfall Mucoprotein on Calcium Oxalate Crystallization in Undiluted Human Urine. *Urol Res* **1991**, *19*, 181–188, doi:10.1007/BF00303747.
 70. Edyvane, K.A.; Ryall, R.L.; Marshall, V.R. The Influence of Serum and Serum Proteins on Calcium Oxalate Crystal Growth and Aggregation. *Clinica Chimica Acta* **1986**, *157*, 81–87, doi:10.1016/0009-8981(86)90320-7.

71. Hess, B.; Meinhardt, U.; Zipperle, L.; Giovanoli, R.; Jaeger, P. Simultaneous Measurements of Calcium Oxalate Crystal Nucleation and Aggregation: Impact of Various Modifiers. *Urol Res* **1995**, *23*, 231–238, doi:10.1007/BF00393304.
72. Rodgers, A.L.; Mensah, P.D.; Schwager, S.L.; Sturrock, E.D. Inhibition of Calcium Oxalate Crystallization by Commercial Human Serum Albumin and Human Urinary Albumin Isolated from Two Different Race Groups: Evidence for Possible Molecular Differences. *Urol Res* **2006**, *34*, 373–380, doi:10.1007/S00240-006-0070-4.
73. Priyadarshini; Negi, A.; Faujdar, C.; Nigam, L.; Subbarao, N. Exploring the Molecular Level Interaction of Human Serum Albumin with Calcium Oxalate Monohydrate Crystals. *Protein Pept Lett* **2021**, *28*, 1281–1289, doi:10.2174/0929866528666210930165426.
74. Khan, S.R.; Finlayson, B.; Hackett, R.L. STONE MATRIX AS PROTEINS ADSORBED ON CRYSTAL SURFACES: A MICROSCOPIC STUDY. *Scan Electron Microsc* **1983**, *v*, 379–385.
75. Baumann, J.M.; Affolter, B.; Casella, R. Aggregation of Freshly Precipitated Calcium Oxalate Crystals in Urine of Calcium Stone Patients and Controls. *Urol Res* **2011**, *39*, 421–427, doi:10.1007/S00240-011-0382-X.
76. Baumann, J.M.; Affolter, B. The Paradoxical Role of Urinary Macromolecules in the Aggregation of Calcium Oxalate: A Further Plea to Increase Diuresis in Stone Metaphylaxis. *Urolithiasis* **2016**, *44*, 311–317, doi:10.1007/S00240-016-0863-Z.
77. HOLLOWAY, B.W. Genetic Recombination in *Pseudomonas Aeruginosa*. *J Gen Microbiol* **1955**, *13*, 572–581, doi:10.1099/00221287-13-3-572.
78. Michaylova, V.; Ilkova, P. Photometric Determination of Micro Amounts of Calcium with Arsenazo III. *Anal Chim Acta* **1971**, *53*, 194–198, doi:10.1016/S0003-2670(01)80088-X.
79. Carroll, J.J.; Coburn, H.; Douglass, R.; Babson, A.L. A Simplified Alkaline Phosphotungstate Assay for Uric Acid in Serum. *Clin Chem* **1971**, *17*, 158–160, doi:10.1093/CLINCHEM/17.3.158.
80. Trinchieri, A. Epidemiology of Urolithiasis: An Update. **2008**, *5*, 101–106.
81. Arias Vega, R.; Pérula de Torres, L.A.; Jiménez García, C.; Carrasco Valiente, J.; Requena Tapia, M.J.; Cano Castiñeira, R.; Silva Ayçaguer, L.C. Comorbidity and Socio-Demographic Factors Associated with Renal Lithiasis in Persons Aged 40 to 65: A Cross-Sectional Study. *Medicina Clínica (English Edition)* **2017**, *149*, 383–390, doi:10.1016/J.MEDCLE.2017.09.017.
82. Grases, F.; Conte, A.; March, J.G.; Genestar, C.; Costa-Bauzá, A.; Martin, M.; Vallescar, R. Epidemiology of Urinary Stone Disease in the Balearic Islands Community. *Int Urol Nephrol* **1994**, *26*, 145–150, doi:10.1007/BF02768277.
83. Sorokin, I.; Mamoulakis, C.; Miyazawa, K.; Rodgers, A.; Talati, J.; Lotan, Y. Epidemiology of Stone Disease across the World. *World J Urol* **2017**, *35*, 1301–1320, doi:10.1007/S00345-017-2008-6.
84. Leusmann, D.B.; Niggemann, H.; Roth, S.; von Ahlen, H. Recurrence Rates and Severity of Urinary Calculi. *Scand J Urol Nephrol* **1995**, *29*, 279–283, doi:10.3109/00365599509180576.
85. Cepeda, M.; Mainez, J.A.; de la Cruz, B.; Amón, J.H. Indications and Morbidity Associated with Double J Catheters. *Arch Esp Urol* **2016**, *69*.

86. Sali, G.M.; Joshi, H.B. Ureteric Stents: Overview of Current Clinical Applications and Economic Implications. *International Journal of Urology* **2020**, *27*, 7–15, doi:10.1111/IJU.14119.
87. Joshi, H.B.; News, N.; Stainthorpe, A.; MacDonagh, R.P.; Keeley, F.X.; Timoney, A.G. Ureteral Stent Symptom Questionnaire: Development and Validation of a Multidimensional Quality of Life Measure. *Journal of Urology* **2003**, *169*, 1060–1064, doi:10.1097/01.JU.0000049198.53424.1D.
88. Pérez-Fentes, D. [Complications of Double j Catheters and Their Endourological Management]. *Arch Esp Urol* **2016**, *69*.
89. Singh, V.; Srinivastava, A.; Kapoor, R.; Kumar, A. Can the Complicated Forgotten Indwelling Ureteric Stents Be Lethal? *Int Urol Nephrol* **2005**, *37*, 541–546, doi:10.1007/S11255-004-4704-6.
90. Atmani, F.; Khan, S.R. Quantification of Proteins Extracted from Calcium Oxalate and Calcium Phosphate Crystals Induced in Vitro in the Urine of Healthy Controls and Stone-Forming Patients. *Urol Int* **2002**, *68*, 54–59, doi:10.1159/000048418.
91. Lieske, J.C.; Leonard, R.; Toback, F.G. Adhesion of Calcium Oxalate Monohydrate Crystals to Renal Epithelial Cells Is Inhibited by Specific Anions. *American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology* **1995**, *268*, doi:10.1152/AJPRENAL.1995.268.4.F604.
92. Ryall, R.L. The Possible Roles of Inhibitors, Promoters, and Macromolecules in the Formation of Calcium Kidney Stones. *Urinary Tract Stone Disease* **2011**, 31–60, doi:10.1007/978-1-84800-362-0_4.
93. José Luis Bauzá Quetglas Estudio de Factores de Riesgo Relacionados Con Las Calcificaciones de Los Catéteres Doble j, Universidad de las Islas Baleares, 2022.
94. Grases, F.; Zelenková, M.; Söhnle, O. Structure and Formation Mechanism of Calcium Phosphate Concretions Formed in Simulated Body Fluid. *Urolithiasis* **2014**, *42*, 9–16, doi:10.1007/S00240-013-0611-6.
95. Zelenkov, M.; Söhnle, O.; Grases, F. Ultrafine Structure of the Hydroxyapatite Amorphous Phase in Noninfectious Phosphate Renal Calculi. *Urology* **2012**, *79*, doi:10.1016/J.UROLOGY.2011.11.020.
96. Grases, F.; Costa-Bauza, A.; Villacampa, A.I.; Söhnle, O. Structure of Uric Acid Concretion Developed around a Catheter. *Scand J Urol Nephrol* **1997**, *31*, 439–443, doi:10.3109/00365599709030638.
97. Berga, F.; Rodriguez, A.; Costa-Bauzá, A.; Grases, F. Novel Colorimetric Determination of Phytate in Urine. *Anal Lett* **2016**, *49*, 307–318, doi:10.1080/00032719.2015.1060599.
98. Perelló J.; Salcedo C.; Neven E.; Behets G.J.; Joubert P.H.; D’Haese, P.C.; Ferrer, M.D. SNF472 Inhibits Cardiovascular Calcification in Uremic Rats (Poster). *ASN Kidney Week: San Diego, US* **2015**.
99. Ketteler M.; Ferrer M.D.; Tur F.; Isern B.; Salcedo C.; Perelló J.; Joubert P.H. Snf472 Inhibits Vitamin D Induced Cardiovascular Calcification in Rats (Poster). *ASN Kidney Week: Atlanta, GA, US* **2013**.
100. Raggi, P.; Bellasi, A.; Bushinsky, D.; Bover, J.; Rodriguez, M.; Ketteler, M.; Sinha, S.; Salcedo, C.; Gillotti, K.; Padgett, C.; et al. Slowing Progression of Cardiovascular Calcification With SNF472 in Patients on Hemodialysis. *Circulation* **2020**, 728–739, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044195.

101. Perelló, J.; Gómez, M.; Ferrer, M.D.; Rodríguez, N.Y.; Salcedo, C.; Buades, J.M.; Pérez, M.M.; Torregrosa, J. V.; Martín, E.; Maduell, F. SNF472, a Novel Inhibitor of Vascular Calcification, Could Be Administered during Hemodialysis to Attain Potentially Therapeutic Phytate Levels. *J Nephrol* **2018**, *31*, 287–296, doi:10.1007/S40620-018-0471-9/FIGURES/5.
102. Correspondence, C.; Salcedo, L.; Sanifit, P.; Bit, E.; Europa, P.; Perelló, J.; Joubert, P.H.; Ferrer, M.D.; Canals, A.Z.; Sinha, S.; et al. First-Time-in-Human Randomized Clinical Trial in Healthy Volunteers and Haemodialysis Patients with SNF472, a Novel Inhibitor of Vascular Calcification. *Br J Clin Pharmacol* **2018**, *84*, 2867–2876, doi:10.1111/BCP.13752.
103. Rodopoulos, N.; Höjvall, L.; Norman, A. Elimination of Theobromine Metabolites in Healthy Adults. *Scand J Clin Lab Invest* **1996**, doi:10.3109/00365519609090590.
104. Grases, F.; Rodriguez, A.; Costa-Bauza, A. Theobromine Inhibits Uric Acid Crystallization. A Potential Application in the Treatment of Uric Acid Nephrolithiasis. *PLoS One* **2014**, doi:10.1371/journal.pone.0111184.
105. Hernandez, Y.; Costa-Bauza, A.; Calvó, P.; Benejam, J.; Sanchis, P.; Grases, F. Comparison of Two Dietary Supplements for Treatment of Uric Acid Renal Lithiasis: Citrate vs. Citrate + Theobromine. *Nutrients* **2020**, *12*, 1–8, doi:10.3390/nu12072012.
106. Julià, F.; Costa-Bauza, A.; Berga, F.; Grases, F. Effect of Theobromine on Dissolution of Uric Acid Kidney Stones. *World J Urol* **2022**, *40*, 2105–2111, doi:10.1007/S00345-022-04059-3.

Anexos

Anexo 1. Adaptación del método de Lowry para placas de 96 pocillos

1. Adaptación del protocolo de la determinación de Lowry en placas de 96 pocillos: Resultados del calibrado preparado en tampón de homogenización y en agua Milli-Q

Los resultados presentaron una mayor regresión lineal y así como una mejor reproducibilidad si se preparan los puntos del patrón con tampón de homogenización en vez de agua Milli-Q (Figura 3.78).

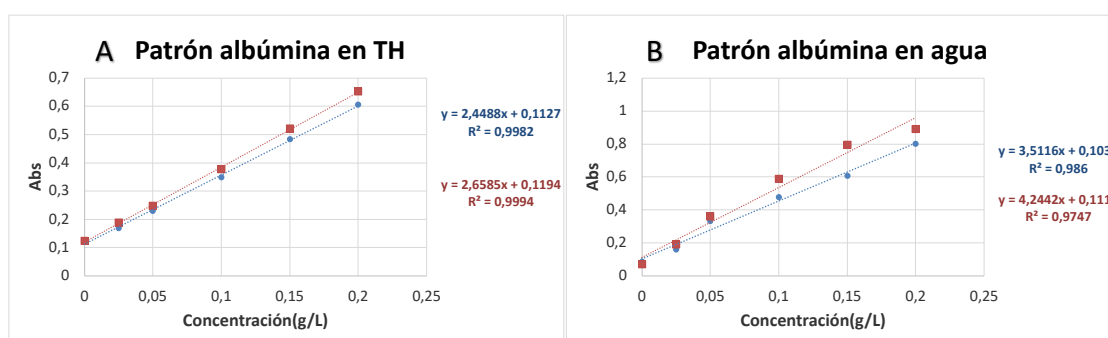


Figura 3.78 Duplicado del calibrado de albúmina. Los diferentes puntos fueron preparados por duplicado en A) tampón de homogenización (TH) y en B) Agua Milli-Q.

2. Evaluación del proceso de sonicación en una concentración conocida de BSA

El proceso de sonicación no influyó en la cantidad de albúmina determinada de concentración conocida, por lo que se concluye que este proceso no degrada la proteína (Figura 3.79).

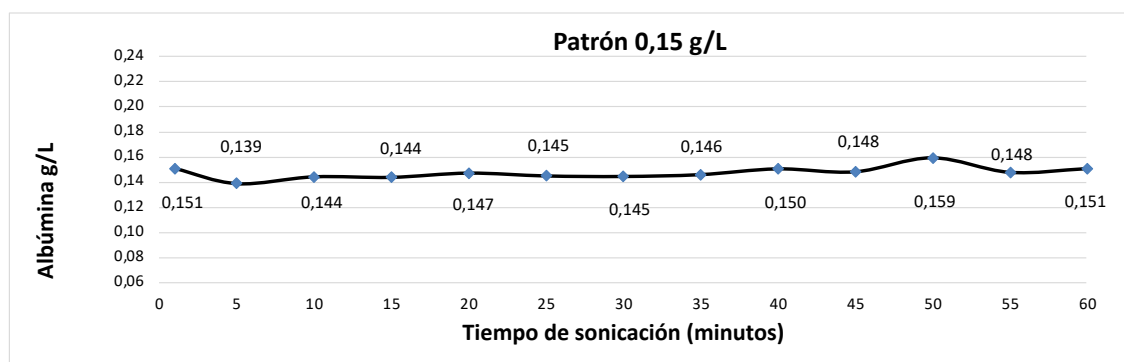


Figura 3.79 Evolución de la concentración determinada del punto de patrón de una concentración de 0,15 g/L a distintos tiempos de sonicación.

3. Resultados de la determinación de lowry de tygon revestido con albumina 1 g/L a diferentes tiempos

Tiempo de revestimiento	Réplica	Abs 700 nm	Concentración (ppm)	Media (ppm)	SEM
30 min	1	0,14	10,67	11,67	1,51
	2	0,13	8,00		
	3	0,14	13,00		
	4	0,15	15,00		
40 min	1	0,15	17,00	15,17	2,30
	2	0,15	18,33		
	3	0,15	17,00		
	4	0,13	8,33		
50 min	1	0,16	23,00	15,42	4,69
	2	0,17	24,00		
	3	0,13	8,33		
	4	0,13	6,33		
60 min	1	0,14	13,33	9,58	2,26
	2	0,14	13,67		
	3	0,13	5,67		
	4	0,13	5,67		

4. Resultados de la determinación de lowry para muestras liofilizadas de tygon revestido con Albumina 1 g/l a diferentes tiempos

Tiempo de revestimiento	Abs 700 nm	Conc. g/L	Conc. ppm
30 min	0,148	0,015	15
	0,153	0,018	18
40 min	0,168	0,025	25
	0,169	0,026	26
50 min	0,154	0,018	18
	0,156	0,019	19
60 min	0,146	0,014	14
	0,144	0,013	13

***Anexo 2. Optimización de la
determinación de ácido úrico en
tygon 3350***

Resultados

Se llevaron a cabo distintas pruebas que se recogen en la Tabla 3.13 y Figura 3.80:

- Tiempo de espera de la placa después de su agitación: 10 minutos vs. 20 minutos
- Longitud de onda: 690 vs. 700 nm
- Reactivo de Folin: dilución 1/5 vs. dilución 1/10

Tabla 3.13 Absorbancias de los puntos de patrón obtenidas para las diferentes condiciones

	10 min 690 nm	10 min 700 nm	10 min 690 nm	10 min 700 nm	20 min 690 nm	20 min 700 nm	20 min 690 nm	20 min 700 nm
Patrón (ppm)	Folin 1/10	Folin 1/10	Folin 1/5	Folin 1/5	Folin 1/10	Folin 1/10	Folin 1/5	Folin 1/5
0	0,065	0,062	0,044	0,044	0,06	0,065	0,045	0,045
10	0,284	0,291	0,27	0,281	0,306	0,312	0,303	0,314
20	0,54	0,548	0,508	0,522	0,578	0,586	0,565	0,578
30	0,794	0,791	0,76	0,784	0,848	0,851	0,838	0,858
40	1,062	1,07	1,013	1,031	1,12	1,124	1,116	1,133
50	1,304	1,303	1,195	1,213	1,352	1,35	1,358	1,36
60	1,473	1,456	1,437	1,458	1,49	1,481	1,616	1,623
70	1,547	1,543	1,734	1,751	1,57	1,561	1,922	1,926
80	1,482	1,494	1,883	1,881	1,559	1,545	2,106	2,091

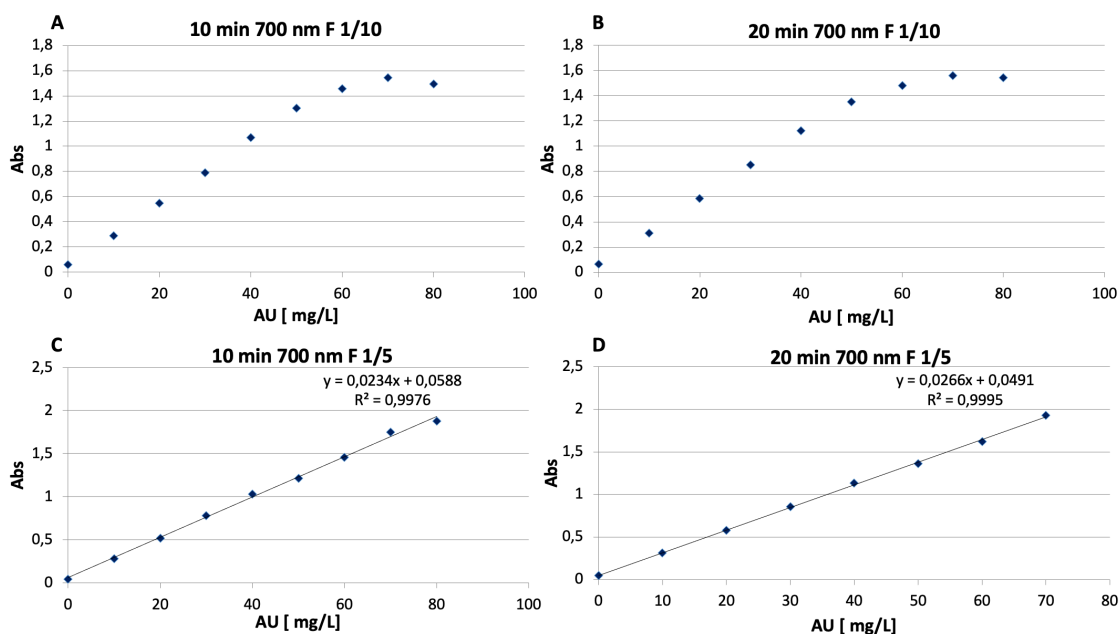


Figura 3.80 Rectas patrón para las distintas condiciones. A) Tiempo de espera 10 minutos, absorbancia de la lectura 700 nm y Folin diluido 1/10. B) Tiempo de espera 20 minutos, absorbancia de la lectura 700 nm y Folin diluido 1/10. C) Tiempo de espera 10 minutos, absorbancia de la lectura 700 nm y Folin diluido 1/5. D) Tiempo de espera 20 minutos, absorbancia de la lectura 700 nm y Folin diluido 1/5.

Se observa que las diferencias entre los resultados de la lectura entre 690 nm y 700 nm son mínimas (Tabla 3.13), por lo que se escoge a 700 nm. La linealidad a una mayor concentración del patrón de ácido úrico se mantiene al usar una mayor concentración de Folin, por lo que se elige la dilución 1/5 para este reactivo (Figura 3.80). Finalmente, se eligen los 20 minutos de espera ya que se observa que la absorbancia ha continuado aumentando transcurrido este tiempo, por lo que es más alta en comparación a los 10 minutos, ya que el ácido úrico sigue reaccionando (Figura 3.80 D). El punto 80 ppm del patrón es eliminado.

***Anexo 3. Determinación de InsP y
fosfato inorgánico de la muestra de
InsP6 hidrolizada durante 16 horas***

Resultados

La concentración de InsPs (Tabla 3.14) y PPI (Tabla 3.15) de la muestra de InsP6 hidrolizada durante 16 horas utilizada en el estudio de los compuestos con efecto inhibidor en la formación de depósitos cálcicos (brushita, oxalato cálcico e hidroxiapatita) se corresponde con la concentración observada para el mismo hidrolizado utilizado en el estudio cinético (véase Capítulo 2, Figura 2.9)

Tabla 3. 14 Concentración de InsPs determinada en la muestra de InsP6 hidrolizada durante 16 utilizada en el estudio de los compuestos con efecto inhibidor en la formación de depósitos cálcicos (brushita, oxalato cálcico e hidroxiapatita).

Código de la muestra	Abs 550 nm	Conc μM	Conc* FD μM	Conc mM	Media conc. por réplica mM	Media total mM
InsP6 2 mM ph 2 H16h 15.02.23 1	1,215	4,087	817,4	0,817	0,844	0,824
	1,183	4,38	876	0,876		
	1,203	4,196	839,2	0,839		
InsP6 2 mM ph 2 H16h 15.02.23 2	1,231	3,944	788,8	0,789	0,804	
	1,215	4,087	817,4	0,817		
	1,221	4,033	806,6	0,807		

Tabla 3. 15 Concentración de PPI determinada en la muestra de InsP6 hidrolizada durante 16 utilizada en el estudio de los compuestos con efecto inhibidor en la formación de depósitos cálcicos (brushita, oxalato cálcico e hidroxiapatita).

Código de la muestra	Abs 880 nm	Conc μM	Conc* FD μM	Media Conc μM	Media Conc mM
InsP6 2 mM ph 2 H16h 1/80	0,552	29,611	2368,88	2376,80	2,3768
	0,554	29,73	2378,4		
	0,555	29,789	2383,12		

Anexo 4. Artículos científicos originales



Effect of phytate on crystallization on ureteral stents and bacterial attachment: an in vitro study

Paula Calvó¹ · Margalida Mateu-Borras² · Antonia Costa-Bauza¹ · Sebastián Alberti² · Fèlix Grases¹

Received: 24 May 2022 / Accepted: 5 August 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

The use of double J ureteral stents can lead to several adverse effects, as urinary infection. Bacteria tend to colonize the stent surface, leading to the formation of bacterial biofilms. The presence of urease-producing bacteria increase the urine pH leading to the incrustation and blockage of the stent. On the other hand, these large crystalline masses function as niduses, allowing the attachment of even more bacteria and decreasing its exposure to antibiotics. The aim of this in vitro study was to assess the effect of phytate on the attachment of bacteria to the catheter surface under conditions that favor crystallization. Catheter sections were incubated in a synthetic urine medium (pH 6.5) in the presence or absence of *Pseudomonas aeruginosa* and phytate. Amount of calcium deposits was measured using an Arsenazo III colorimetric method and the number of attached bacteria to the stent was determined. Differences were assessed using an ANOVA with a Bonferroni post hoc test. The formation of calcium phosphate deposits (brushite and hydroxyapatite) and oxalate crystals (COM), as were as the amount of bacteria decreased when phytate was present. Thus, phytate successfully decreased bacterial adhesion by inhibiting the formation of crystalline deposits.

Keywords Bacteria · Phytate · Catheter · Crystallization · Calcium phosphate · Deposits

Introduction

A ureteral stent is an important medical device that can restore the normal flow of urine from the kidney to the bladder when there is an obstruction. These stents promote lumen dilatation and restore normal flow [1–3]. Although

they typically resolve the problem of obstruction, the introduction of a stent can lead to adverse effects, such as an infection in the urinary system, and the stent can also become encrusted and obstructed over time [2].

The risk of a urinary tract infection (UTI) is linearly related to the duration of stent indwelling, and use of these stents for 30 days or more often leads to bacteriuria. Microorganisms tend to colonize the stent surface, leading to the formation of bacterial biofilms [4]. The presence of urease producing bacteria increase the urine pH due to their hydrolysis of urea into ammonia. When the urine pH is greater than 6.2, deposits of hydroxyapatite (HAP, $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$) and struvite ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) can form on the stent, leading to incrustation and blockage [5–7]. Incrustation may also occur without bacterial infection, because the stent can function as a heterogeneous nucleant for substances that are supersaturated in the urine [8–10].

The duration of catheter indwelling increases the risk of stent encrustation and blockage [11–13], and can lead to a rigid catheter with reduced tensile strength [14]. This increases the risk of ureter trauma or injury during stent removal, and the leakage of the urine within the body.

✉ Paula Calvó
paula.calvo@uib.es

Margalida Mateu-Borras
m.mateu@uib.cat

Antonia Costa-Bauza
antonia.costa@uib.es

Sebastián Alberti
sebastian.alberti@uib.es

Fèlix Grases
fgrases@uib.es

¹ Laboratory of Renal Lithiasis Research, University Institute of Health Sciences Research (IUNICS-IdISBa), University of Balearic Islands, 07122 Palma, Spain

² Laboratory of Infection and Immunity, University Institute of Health Sciences Research (IUNICS-IdISBa), University of Balearic Islands, 07122 Palma, Spain

The relationship between biofilm formation and catheter encrustation is unclear, although some studies of urethral and ureteral stents have shown a clear feedback during the process. On the one hand, bacterial adhesion and biofilm formation on the catheter surface can promote crystal deposition and encrustation [4, 15, 16]; on the other hand, encrustation may provide niduses for the colonization of bacteria and the formation of a bacterial crystal biofilm [17–19].

Previous research reported that consumption of myo-inositol hexaphosphate (InsP6, phytate) can inhibit the formation of renal calculi [20] and reduce the encrustation of ureteral stents [10]. The aim of the present in vitro study is to assess the effect of phytate on the attachment of bacteria and the formation of niduses on the catheter surface when conditions are favorable for the formation of calcium phosphate crystals.

Materials and methods

Solutions and batch system

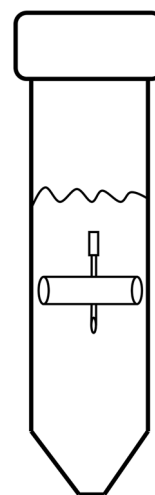
Synthetic urine was prepared by a making fresh mixture of equal volumes of two solutions, with solution A containing CaCl_2 and solution B containing $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (Table 1). The pH of each solution was adjusted to 6.5, a condition that promotes crystallization of calcium phosphate and calcium oxalate monohydrate (COM). Glucose and albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) were added to solution B. Glucose was the carbon source for bacterial growth, and albumin was a mimic of the proteinaceous debris present in infected urine. Different amounts of phytic acid sodium salt (P8810, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) were also added to solution B. The synthetic urine components were obtained from PanReac (Barcelona, Spain).

Experiments were performed in sterile 50 mL Falcon tubes. Each tube contained a hydro-coated silicon catheter section that was 1.5 cm long (BCHG64, Coloplast, Humlebaek, Denmark) and attached to a needle for support (Fig. 1). Each Falcon tube was filled with 20 mL of solution A and 20 mL of solution B, and maintained for 24 h at 37 °C.

Table 1 Composition of synthetic urine

Solution A		Solution B	
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	19.34 mM	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15.45 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.92 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	15.64 mM
NH_4Cl	86.75 mM	NaCl	223.31 mM
KCl	162.69 mM	$\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	0.6 mM
CaCl_2	8.5 mM	Glucose	20 g/L
		Albumin	2 g/L
		Phytate	0, 2.4, or 4.8 μM

Fig. 1 Experimental system. A 1.5 cm section of a hydro-coated silicon catheter was attached to a needle inside a 50 mL Falcon tube that was incubated with 40 mL of synthetic urine (pH 6.5) at 37 °C for 24 h



Calcium analysis

After 24 h, each catheter deposit was dissolved with 0.5 M HCl, and resulting solution was adjusted to pH 3.0 for analysis. Calcium was determined using an Arsenazo III colorimetric method [21]. All measurements were performed in triplicate.

Bacterial attachment assays

Bacterial attachment assays were performed using *P. aeruginosa* reference strain PAO1, which was originally isolated from an infected wound [22]. For these assays, the strain was grown 18 h at 37 °C in artificial urine without phytic acid.

Catheter sections of 1.5 cm were placed into sterile tubes containing 40 mL of artificial urine (20 mL solution A + 20 mL solution B) without or with phytate (0, 1.2, or 2.4 μM). Tubes were inoculated with bacterial cells of *P. aeruginosa* PAO1 that were grown overnight in synthetic urine without phytate to a final concentration of 10^8 viable bacterial cells/mL and incubated 24 h at 37 °C without shaking. After this incubation, catheter sections were transferred to new sterile microfuge tubes using sterile forceps and rinsed with 4 mL of sterile phosphate buffered saline (PBS) to remove unattached bacteria. Next, catheter sections were placed in new microfuge tubes containing 1 mL of PBS that were centrifuged at $13,000 \times g$ for 30 min to harvest the bacterial cells. Finally, the catheter sections were discarded, and the pellet of bacteria detached from the catheters was resuspended in 1 mL of PBS. Bacterial cells were quantified by plating appropriate dilutions of the bacterial suspension on Luria Bertani agar plates. Results were expressed as Colony Forming Units (CFU)

per mL of PBS. A negative control, consisting in catheter without bacteria, was processed in parallel.

Scanning electron microscopy

The morphological and structural characteristics of the deposits that formed on the surface of the stent in absence and presence of InsP6 and *P. aeruginosa* were examined using scanning electron microscopy (SEM, Hitachi S-3400N) coupled with RX energy dispersive microanalysis (Bruker AXS XFlash Detector 4010). Stents were washed with Mili-Q water to remove artificial urine residues to avoid the formation of NaCl and KCl crystals. After washing them, they were left to dry for 1 day at room temperature. Afterwards, stents were stuck on a sample holder with adhesive tape to avoid their displacement and observed with SEM without any other preparation.

Statistics

Normality graphs were used to assess data distributions. Data were presented as means and standard errors of the means (SEMs). The amounts of calcium and attached bacteria in the different groups were compared using an ANOVA with a Bonferroni post hoc test. A two-tailed p value less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS version 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Effect of phytate on formation of calcium crystals

We first determined the amount of calcium deposited on the catheters after 24 h of incubation with different concentrations of phytate (Fig. 2A). The results indicated that the formation of calcium phosphate deposits (brushite and hydroxyapatite) and oxalate crystals (COM) decreased when phytate was added. Scanning electron microscopy of catheter sections confirmed that phytate inhibited the formation of brushite and COM crystals. The presence of phytate led to only a thin layer of organic matter on the catheter surface (Fig. 3C, D, G and H).

Effect of phytate on attachment of bacteria

We also measured the levels of bacteria that were attached to the catheters after 24 h of incubation with different concentrations of phytate (Fig. 2B). Similar to the crystallization experiments, the amount of bacteria decreased by more than tenfold when phytate was added. Scanning electron microscopy of the catheter sections indicated that brushite, HAP, and COM crystals formed when the solution contained no phytate (Fig. 3E, F). However, only a thin layer of organic matter was detected when phytate was present in the solution (Fig. 3G, H). To confirm that the layer observed was organic

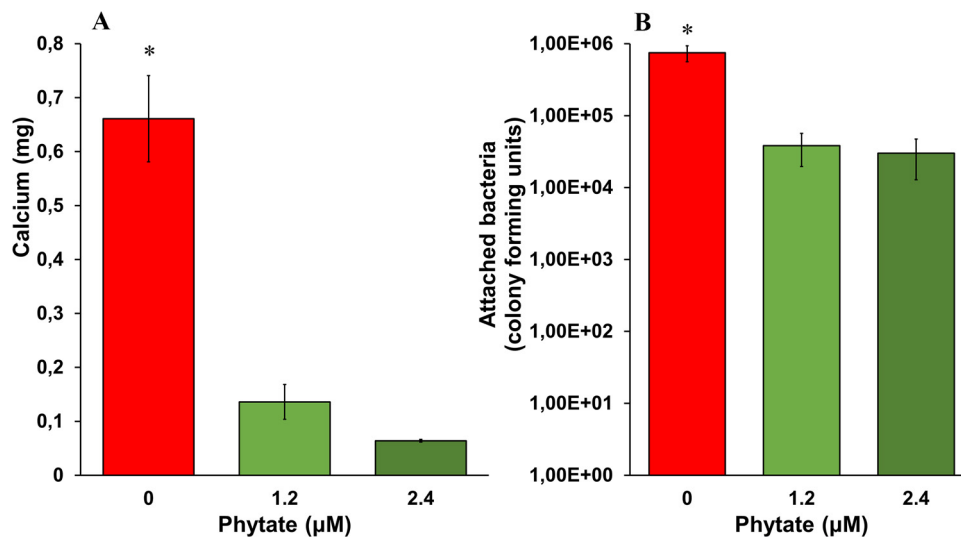
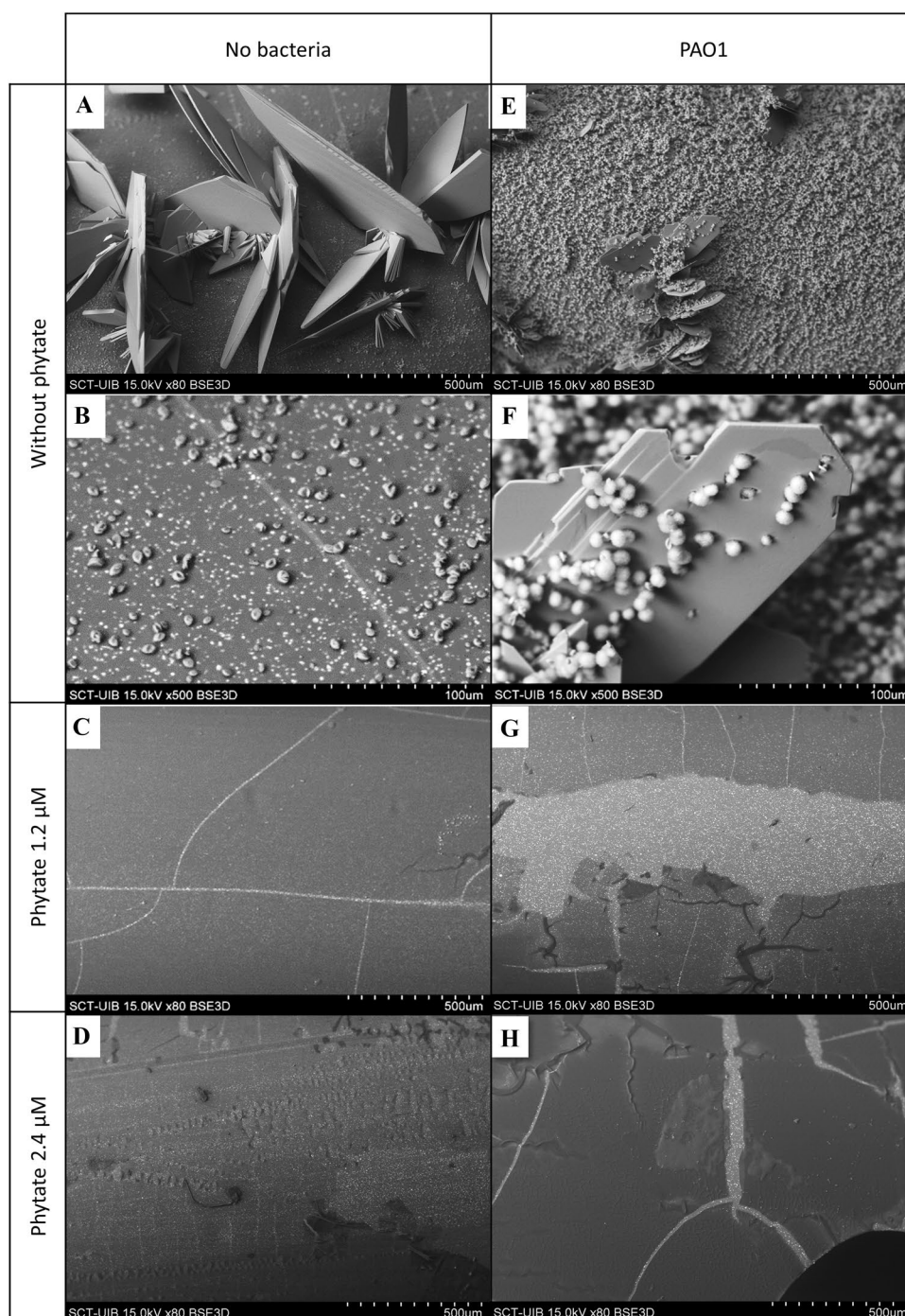


Fig. 2 **A** Effect of phytate on the formation of calcium deposits on catheter sections. Means and SEMs are indicated. *An ANOVA and a Bonferroni post-hoc test indicated the control group (0 µM phytate) had a greater level of calcium (p value < 0.05) than the phytate groups, but there was no significant difference in the phytate groups. **B** Effect of phytate on the attachment of bacteria (*P. aerugi-*

nosa PAO1) to catheter sections. Means and SEMs are indicated. *An ANOVA and a Bonferroni post-hoc test indicated the control group (0 µM phytate) had more attached bacteria (p value < 0.05) than the phytate groups, but there was no significant difference in the phytate groups

Fig. 3 Scanning electron microscopy of catheter sections after incubation in synthetic urine with different concentrations of phytate and PAO1. The magnifications at which the photographs were taken are indicated after the “x” symbol on the black band, in which the scale bar also appears. **A** Without phytate and bacteria, brushite crystals and a thin layer of COM deposits were uniformly distributed on the catheter surface. **B** Higher magnification shows that COM deposits covered the organic matter on the catheter surface, and the catheter surface appeared as a “crack” from top-left to bottom-right. **C** When the phytate level was 1.2 μM , there were no evident crystals, but “cracks” were present on the thin layer of organic matter on the catheter surface. **D** When the phytate level was 2.4 μM , there were no evident crystals, but “cracks” were present on the thin layer of organic matter on the catheter surface due to dehydration processes. **E** Without phytate but with PAO1, there were large and uniformly distributed brushite crystals with a layer of HAP. **F** Higher magnification shows evidence of HAP coating of the brushite crystals. **G** When the phytate level was 1.2 μM , there were no evident crystals, but a layer of organic matter with “cracks” was evident. **H** When the phytate level was 2.4 μM , there were also no evident crystals, but a layer of organic matter with “cracks” was evident



matter and not only the hydro coating of the catheter, a picture of a catheter section before use was taken (Fig. 4A).

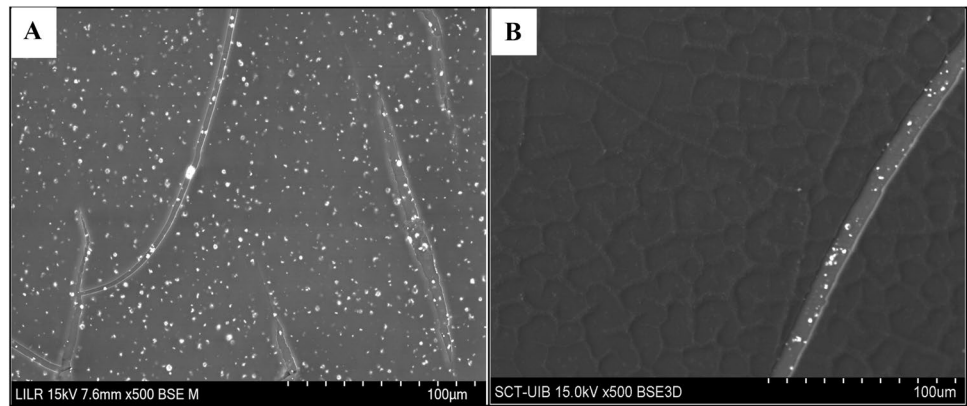
Discussion

The formation of biofilm on a ureteral stent is a multistep process that is not yet completely understood [14]. Some researchers found that UTIs lead to the development of

catheter biofilms and raise the urinary pH above 6.2. This elevated pH favors the crystallization of struvite and HAP. This crystalline layer then provides niduses for the establishment of even more bacteria.

However, a crystalline layer can also form on the catheter surface in the absence of infection [9, 10], depending on urine composition and pH. This is consistent with the observation of other researchers who found that the first step in the development of bacterial biofilms was the

Fig. 4 Scanning electron microscopy of a catheter section before use compared with a section after incubation in synthetic urine. **A** Catheter section before use presents a thin broken layer that corresponds with the hydro coating of commercial catheters. **B** On the other hand, the layer formed after incubation of the catheter with artificial urine containing albumin and glucose is thicker and coats the original surface of the catheter before use



formation of a crystalline layer [18, 19]. This initial calcium-based crystalline layer allows bacterial attachment and biofilm formation, and these bacteria can increase the pH to above 6.2. This elevated pH then favors the formation of additional deposits, such as struvite. These large crystalline masses function as niduses, allowing the attachment of even more bacteria [17]. Thus, there appears to be a positive feedback loop of stent crystallization and bacterial colonization.

Although the details of stent crystallization and bacterial colonization are not completely elucidated, it seems important to prevent the formation of crystalline deposits to prevent bacterial proliferation, whichever process occurs first. Because a high urine pH favors the formation of calcium deposits, we performed our *in vitro* experiments at a pH of 6.5 to promote the formation of calcium-based crystals, such as calcium phosphate (brushite and HAP) and calcium oxalate. Notably, phytate is well-known to inhibit the formation of these types of deposits, and we, therefore, evaluated the effect of phytate on crystallization and bacterial attachment.

The results showed that phytate was effective in preventing the formation of a calcium-based crystalline layer in the absence of bacteria (Fig. 3A–D) and in the presence of *P. aeruginosa* (Fig. 3E–H). Thus, brushite, HAP and calcium oxalate deposits were minimal on stents that were incubated with 1.2 or 2.4 μM phytate. This was supported by our measurements of the level of calcium concentration (Fig. 2A), which indicated much lower levels when the stents were incubated with phytate. Moreover, the layer of organic matter that formed in the absence of bacteria (Fig. 3C, D) and in presence of bacteria (Fig. 3G, H) had a similar morphology.

A more than tenfold decrease in the number of bacteria on the catheter surface when the artificial urine included 1.2 or 2.4 μM phytate (Fig. 2B) was also observed. This finding, together with our results on crystal formation, indicated that phytate reduced the number of bacteria attached on a stent surface by preventing the formation of the crystalline layer. It is important to prevent niduses and

crystalline mass formation, because this can occlude the lumen of the ureter and generate significant clinical complications, as well as persistent urinary tract infections.

Finally, crystal formation and bacterial adherence on the stent were each similar at phytate concentrations of 1.2 and 2.4 μM . At both concentrations, very few crystals formed, and the few bacteria that were present adhered directly to the surface or the interior lumen of the catheter. This confirms that bacteria adhere to a catheter surface even in the absence of a crystalline layer, forming an initial biofilm layer with the organic matter. Therefore, from the results of this research it was concluded that phytate successfully decreased the number of bacteria that adhered to a catheter surface by inhibiting the formation of a calcium-based crystalline layer, which functions as locus for bacterial colonization and growth.

Early prevention of the formation of calcium-based deposits could be a key to preventing subsequent persistent urinary system infections and their many adverse consequences. In addition, our results indicated that the large crystals on a catheter can serve as a locus for bacterial growth, because there are far fewer bacteria on the catheter surface when these crystals do not develop. It is likely that the absence of catheter deposits *in vivo* may also increase exposure of bacteria on the catheter surface to antibiotics.

Acknowledgements Financial support from Agencia Estatal de Investigación (Spain) (PID2019-104331RB-I00/AEI/10.13039/501100011033) is acknowledged. P. Calvo is grateful to the Conselleria d'Educació, Universitat i Recerca of the Government of the Balearic Islands for the fellowship FPI_003_2020. M. Mateu is the recipient of a FPI fellowship from Comunitat Autònoma de les Illes Balears (CAIB).

Author contributions PC: formal analysis, investigation, methodology, writing—original draft preparation. MM-B: formal analysis, investigation. AC: conceptualization, methodology, project administration, supervision, writing—review and editing. SA: project administration, resources, supervision. FG: conceptualization, project administration, supervision, writing—review and editing.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

Animal studies Not applicable.

Approval of the research protocol by an Institutional Reviewer Board Not applicable.

Informed consent Not applicable.

Registry and the registration no. of the study/trial Not applicable.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Mosayyebi A, Vijayakumar A, Yue QY et al (2017) Engineering solutions to ureteral stents: material, coating and design. *Cent Eur J Urol* 70:270–274. <https://doi.org/10.5173/cej.2017.1520>
- Beysens M, Tailly TO (2018) Ureteral stents in urolithiasis. *Asian J Urol* 5:274–286. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2018.07.002>
- Dyer RB, Chen MY, Zagoria RJ et al (2002) Complications of ureteral stent placement. *Radiographics* 22:1005–1022. <https://doi.org/10.1148/radiographics.22.5.g02se081005>
- Stickler DJ (2008) Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nat Clin Pract Urol* 5:598–608. <https://doi.org/10.1038/ncpuro1231>
- Hedelin H, Eddeland A, Larsson L et al (1984) The composition of catheter encrustations, including the effects of allopurinol treatment. *Br J Urol* 56:250–254. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.1984.tb05382.x>
- Cox AJ, Hukins DWL (1989) Morphology of mineral deposits on encrusted urinary catheters investigated by scanning electron microscopy. *J Urol* 142:1347–1350. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)39095-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)39095-X)
- Tian S, Hu N, Lou J et al (2020) Characteristics of COVID-19 infection in Beijing. *J Infect*. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.02.018>
- Wollin TA, Tieszer C, Riddell JV et al (1998) Bacterial biofilm formation, encrustation, and antibiotic adsorption to ureteral stents indwelling in humans. *J Endourol* 12:101–111. <https://doi.org/10.1089/end.1998.12.101>
- Bouzidi H, Traxer O, Doré B et al (2008) Caractéristiques des incrustations des endoprothèses urétérales chez les patients lithiasiques. *Prog en Urol* 18:230–237. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2008.02.004>
- Torrecilla C, Fernández-Concha J, Cansino JR et al (2020) Reduction of ureteral stent encrustation by modulating the urine pH and inhibiting the crystal film with a new oral composition: a multicenter, placebo controlled, double blind, randomized clinical trial. *BMC Urol* 20:65. <https://doi.org/10.1186/s12894-020-00633-2>
- Acosta-Miranda AM, Milner J, Turk TMT (2009) The FECal double-J: a simplified approach in the management of encrusted and retained ureteral stents. *J Endourol* 23:409–415. <https://doi.org/10.1089/end.2008.0214>
- El-Faqih SR, Shamsuddin AB, Chakrabarti A, Atassi R, Kardar AH, Osman MKHI (1991) Polyurethane internal ureteral stents in treatment of stone patients: morbidity related to indwelling times. *J Urol* 146:1487–1491. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)38146-6](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)38146-6)
- Kawahara T, Ito H, Terao H et al (2012) Ureteral stent encrustation, incrustation, and coloring: morbidity related to indwelling times. *J Endourol* 26:178–182. <https://doi.org/10.1089/end.2011.0385>
- Tomer N, Garden E, Small A, Palese M (2021) Ureteral stent encrustation: epidemiology, pathophysiology, management and current technology. *J Urol* 205:68–77. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000001343>
- Wilks SA, Fader MJ, Keevil CW (2015) Novel insights into the proteus mirabilis crystalline biofilm using real-time imaging. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141711>
- Zumstein V, Betschart P, Albrich WC et al (2017) Biofilm formation on ureteral stents—incidence, clinical impact and prevention. *Swiss Med Wkly* 147:w14408. <https://doi.org/10.4414/smw.2017.14408>
- Tieszer C, Reid G, Denstedt J (1998) XPS and SEM detection of surface changes on 64 ureteral stents after human usage. *J Biomed Mater Res* 43:321–330. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199823\)43:3%3c321::AID-JBM14%3e3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199823)43:3%3c321::AID-JBM14%3e3.0.CO;2-I)
- Stickler DJ, Morgan SD (2008) Observations on the development of the crystalline bacterial biofilms that encrust and block Foley catheters. *J Hosp Infect* 69:350–360. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.04.031>
- Winters C, Stickler DJ, Howe NS et al (1995) Some observations on the structure of encrusting biofilms of *Proteus mirabilis* on urethral catheters. *Cells Mater* 5:245–253
- Grases F, Isern B, Sanchis P et al (2007) Phytate acts as an inhibitor in formation of renal calculi. *Front Biosci* 12:2580–2587
- Michaylova V, Ilkova P (1971) Photometric determination of micro amounts of calcium with arsenazo III. *Anal Chim Acta* 53:194–198. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)80088-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)80088-X)
- Holloway BW (1955) Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 13:572–581. <https://doi.org/10.1099/00221287-13-3-572>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Conclusiones generales

CONCLUSIONES GENERALES

1. Tanto el fitato como sus productos hidrolizados aumentan el tiempo de inducción de la cristalización de la BRU y el OxCa. Además, logran reducir de manera significativa la cantidad de depósitos de BRU y COM que se forman en las secciones de la marca tygon, que simulan el catéter doble J. El alendronato también disminuye la cantidad de depósitos formados de BRU, así como el tiempo de inducción de su cristalización, mientras que el citrato presenta efectos nulos en ambos experimentos. Para la formación de depósitos de COM, el alendronato y citrato presentan efectos débiles, siendo estos efectos nulos en las cinéticas de cristalización del OxCa.
2. Para la cristalización de la HAP, ni el fitato ni sus hidrolizados ni el citrato presentaron ningún efecto tanto en las cinéticas de cristalización como en la formación de depósitos. El alendronato, uno de los bifosfonatos que lograron aumentar el tiempo de inducción de la cristalización de la HAP, tampoco disminuyó la cantidad de depósitos formados sobre las secciones tygon.
3. La teobromina y sus metabolitos (3-metilxantina, 3,7-dimetilúrico y 7-metilxantina) inhiben la cristalización del AU in vitro, tanto en las cinéticas de cristalización como en la formación de depósitos sobre secciones tygon. Los efectos de la 7-metilxantina son parecidos a los de la teobromina, observando efectos sinérgicos entre estos dos compuestos. Los individuos con riesgo litógeno úrico que son negativos en el test de riesgo de cristalización del AU simplificado (RCAU-S) presentan mayor concentración urinaria de teobromina y sus metabolitos.
4. El fitato reduce la adherencia bacteriana en catéteres al evitar la formación de cristales como BRU, HAP y COM, disminuyendo la superficie disponible para la adhesión bacteriana. En ausencia de cristales, las bacterias se adhieren en menor cantidad al catéter, resaltando que incluso sin una capa cristalina, pueden formar una capa inicial de *biofilm* orgánico.
5. La presencia de albúmina en disolución de OA y en forma de capa de revestimiento disminuye la formación de depósitos de BRU, HAP y AU sobre secciones tygon. Los cristales de BRU in vitro tienen una forma aplanada y

dentada con una disposición radial que nace de un núcleo compartido, mientras que in vivo forman capas compactas en forma de empalizada debido a la gran cantidad de núcleos compactos. La morfología de la HAP observada in vitro parece seguir los mismos patrones que los observados in vivo. Para el AU, las morfologías in vitro, que varían entre rectangulares y con bordes irregulares, son comparables a las formas observadas in vivo.

6. En la cristalización de HAP, la presencia de albúmina en la disolución de OA y en forma de capa de revestimiento favorece la aparición de este tipo cristalino en la superficie de los tygon. En presencia de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* se observó una deposición significativa de HAP sobre la sección de catéter. Esto sugiere que la presencia de componentes orgánicos en el medio facilita la formación de HAP.
7. La presencia de albúmina en la OA aumenta la cristalización de COM en secciones sin revestir, tanto en experimentos llevados a cabo mediante el sistema estático como en flujo. Su presencia en la OA o como capa de revestimiento en las secciones produce que la morfología de los cristales COM formados en experimentación in vitro se asemejen más a los cristales encontrados in vivo, tomando una forma de flor y emergiendo de un punto común sobre una capa de materia orgánica.

