Arch. Esp. de Urol., 54, 9 (855-860), 2001

Microinfecciones y litiasis renal.

ANTONIO CONTE VISÚS[1], FÉLIX GRASES FREIXEDAS, ANTONIA COSTA-BAUZÁ Y PEDRO PIZÁ REUS[1].

Laboratorio de Investigación en Litiasis Renal. Facultad de Ciencias. Universidad de las Islas Baleares. Palma de Mallorca.
[1]Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca. España.

Resumen.- *Un factor de riesgo que podría estar relacionado con la calculogénesis sería la existencia de microinfecciones causadas por bacterias de muy pequeño tamaño (nanobacterias). En este trabajo se presentan los resultados del estudio de la presencia de nanobacterias en 1000 cálculos renales (se han excluído los cálculos de estruvita) detectándose microorganismos sólamente en 5 de ellos (0,5%). Todos estos cálculos se han desarrollado en cavidades de baja eficacia urodinámica (no son papilares), los microorganismos aparecieron localizados en el centro del cálculo y el componente mayoritario del cálculo ha sido siempre oxalato cálcico monohidrato y/o ácido úrico. El urato amónico/urato sódico se ha encontrado frecuentemente como componente minoritario en la parte central del cálculo. La única alteración bioquímica urinaria común de estos pacientes ha sido presentar valores de pH urinario inferiores a 5.5, siendo los urocultivos convencionales siempre negativos. Estos hechos demuestran que estas bacterias pueden jugar un papel importante en el desarrollo del cálculo al inducir la formación de nucleantes heterogéneos del oxalato cálcico y ácido úrico, aunque este mecanismo no estaría muy extendido de acuerdo con nuestros resultados, y además también estaría asociado a otros factores de riesgo litógeno. Es importante destacar que la mayoría de estos pacientes padecían ulcus de estómago y/o gingivitis, que son patologías que podrían estar desencadenadas por microorganismos del mismo tipo y que por tanto permitiría deducir que factores bacterianos similares podrían estar implicados en patologías que hasta el momento no habían sido relacionadas, aunque este último aspecto obviamente precisa de estudios en mayor profundidad que identifiquen inequívocamente las mencionadas bacterias.*

Palabras clave: *Litiasis renal. Litogénesis. Microinfecciones.*

Summary.- *OBJECTIVE: The existence of microinfections produced by bacteria of a very small size (nanobacteria) could be a risk factor for stone formation. The results of a study to detect the presence of nanobacteria in calculi are presented.*

METHODS: 1,000 calculi (excluding struvite calculi) were analyzed by macroscopic and microscopic techniques.

RESULTS: Microorganisms were detected in only 5 calculi (0.5%). All these calculi had developed in cavities with low urodynamic efficacy. The microorganisms were located in the center of the calculus and the main component was calcium oxalate monohydrate or uric acid. Ammonium urate / sodium urate were frequently found to be a minor component in the center of the calculus. The only common biochemical urinary alteration observed in these patients was a urinary pH below 5.5; conventional urine cultures were always negative.

CONCLUSIONS: Our findings demonstrate that these bacteria can play an important role in the development of calculus by inducing the formation of heterogeneous nucleants of calcium oxalate and uric acid. According to our results, however, this mechanisms is not common and would also be associated to other lithogenic risk factors.

Correspondencia
A. Conte Visús
C/ Albo, 11 (Chalet B)
07014 Palma de Mallorca.
España.

It is important to underscore that the majority of patients suffered from stomach ulcers and/or gingivitis which are conditions that could be induced by the same type of microorganisms. Therefore, it can be deduced that similar bacterial factors might be involved in pathologies that have as yet not been related. Further studies are warranted to clearly identifty these bacteria.

Keywords: *Renal lithiasis. Lithogenesis. Microinfections.*

INTRODUCCIÓN

Todos los fluidos biológicos que constituyen el medio líquido del cuerpo humano son sistemas metaestables que acabarían generando cristales si permanecieran de manera indefinida confinados en sus respectivas cavidades. Ello es debido a que estan sobresaturados (contienen más soluto del que pueden admitir) respecto de alguna sustancia; así, por ejemplo la sangre y el líquido intersticial están sobresaturados con respecto a los fosfatos cálcicos, y la orina está permanentemente sobresaturada con respecto al oxalato cálcico, respecto al ácido úrico si el pH es inferior a 5,5 o a los fosfatos cálcicos si el pH es superior a 6 (1). Ahora bien, la formación de cristales no es un proceso fácil, por lo que siempre tarda un cierto tiempo (es cinéticamente poco favorable) que puede oscilar entre segundos y años y que en medios puros depende de la sobresaturación, de manera que si el fluido se renueva en un tiempo suficientemente breve los cristales no se desarrollarán (2). Precisamente, los organismos vivos para generar sus estructuras duras (huesos, dientes, conchas, etc...) utilizan aceleradores de la cristalización (generalmente núcleos heterogéneos) o bien aumentan la sobresaturación (3-4). Para evitar la precipitación cuando ésta no es deseada, la Naturaleza ha desarrollado diferentes estrategias, siendo una de las más interesantes aquella que implica la presencia de sustancias naturales que impiden o retrasan el desarrollo de los cristales (los llamados inhibidores de la cristalización) (5-6). Otras estrategias implican el control de la sobresaturación y de los nucleantes heterogéneos así como la rápida renovación del correspondiente fluido.

La litiasis renal es un proceso patológico que se da como consecuencia de la desgraciada combinación de diversos factores que aceleran la formación de cristales en la orina antes de que ésta abandone el sistema urinario. Cualquier circunstancia que aumente la sobresaturación, disminuya los inhibidores de la cristalización o facilite los procesos de nucleación cristalina, puede favorecer el desarrollo de cálculos renales. Precisamente, debido a esta diversidad de posibilidades, la litiasis renal es una patología multifactorial, ya que generalmente son varios los factores alterados que la generan, de manera que en muchas ocasiones basta con eliminar uno de ellos para evitar la recidiva. En la actualidad se conocen muchos factores de riesgo litógeno, de tal manera que pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- relacionados con la orina (hipercalciuria, déficit de inhibidores, pH alterado,...) (7-8)
- relacionados con la morfoanatomía renal (cavidades de baja eficacia urodinámica, alteraciones del uroepitelio papilar,...) (9-10)

Ahora bién, es evidente que, por una parte todavía no están identificados todos los factores de riesgo litógeno que existen y por otra pueden aparecer otros nuevos consecuencia de nuevos hábitos de vida, etc. Así, recientemente se ha señalado que un factor de riesgo que podría estar relacionado con la calculogénesis sería la existencia de microinfecciones causadas por bacterias de muy pequeño tamaño (nanobacterias) (11-13). Precisamente, el objetivo de este trabajo es presentar los resultados de los hallazgos de las mencionadas nanobacterias detectadas en el interior de los cálculos renales (expulsados espontáneamente o post LEOC) recolectados en nuestra comunidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Instrumentación

Se han utilizado los siguientes instrumentos:

- Lupa binocular Optomic (Varsovia, Polonia)
- Espectroscopio infrarrojo Brucker IFS 66 (Karlsruhe, Alemania)
- Microscopio electrónico de barrido Hitachi S-530 (Tokyo, Japón) acoplado a un equipo de microanálisis por dispersión de energía de rayos X Oxford Link Isis (High Wycombe (Reino Unido).

El procedimiento utilizado para el análisis y estudio del cálculo requiere una combinación apropiada de

observación mediante técnicas macroscópicas y microscopicas convencionales con técnicas físicas tales como espectroscopía infrarroja y microscopía electrónica de barrido con microanálisis por rayos X (14).

El estudio del cálculo se inicia mediante la observación directa con lupa binocular del aspecto externo del mismo; posteriormente se secciona en 2 mitades a lo largo de un plano lo más cercano posible a su centro geométrico, para así determinar su estructura macroscópica interna. Este paso indicará, en la mayoría de casos, cuál es el proceso posterior más adecuado a aplicar. Este puede implicar:

a) Análisis por espectroscopía infrarroja de cualquier zona del cálculo o de varias zonas del mismo. Si en la fractura se observan capas de diferente aspecto, procede realizar un estudio infrarrojo de cada una de ellas. La técnica utilizada para este análisis es el de las pastillas de bromuro potásico. En su preparación se parte de 1 mg o menos de muestra y unos 100 mg de

TABLA I

CARACTERÍSTICAS DE LOS CÁLCULOS EN LOS QUE SE HA DETECTADO MICROINFECCIONES Y DATOS DE LA HISTORIA CLÍNICA DE LOS RESPECTIVOS PACIENTES

Cálculo	Componente mayoritario	Componentes minoritarios	Situación de las bacterias	Principales alteraciones bioquímicas urinarias	Urocultivo	Otras patologías
1	COM y ácido úrico en capas alternadas	urato amónico en el centro del cálculo	centro del cálculo	pH < 5.5	negativo	ulcus duodenal HTA, HDA
2	Ácido úrico	urato amónico y materia orgánica	—-	—-	negativo	ulcus duodenal
3 (Fig. 1)	COM	urato amónico y urato sódico	centro del cálculo	pH < 5.5, hiperuricuria, hiperoxaluria	negativo	gingivitis frecuente HTA, HDA
4 (Fig. 2)	COM	HAP, BRU	centro del cálculo	—-	—-	—-
5	COM	materia orgánica	centro del cálculo	pH < 5.5, hipomagnesiuria, hipocitraturia	negativo	ulcus duodenal, gingivitis frecuente, HTA, HDA

(a) Este paciente también ha formado cálculos de ácido úrico anhidro y de hidroxiapatita en los que no se ha detectado microinfecciones.
(b) Por fallecimiento del paciente no se pudo disponer de más datos.
(c) COM: oxalato cálcico monohidrato, HAP: hidroxiapatita, BRU: brushita.
(d) cálculo obtenido post litotricia extracorpórea por ondas de choque (LEOC) en forma fragmentada.
(e) HTA: Hipertensión arterial.
(f) HDA: Hemorragia digestiva alta.

bromuro potásico, que se muelen y mezclan en un mortero de ágata. Luego la mezcla se comprime en un molde, a suficiente presión (10-15 Tn) para producir un disco transparente que se coloca en el correspondiente portamuestras para la obtención del espectro infrarrojo en el rango 4000-400 cm^{-1}.

b) El estudio en profundidad de la microestructura del cálculo y la detección e identificación de compuestos en cantidades muy minoritarias, requiere el uso de la microscopía electrónica de barrido con microanálisis por energía dispersiva de rayos X. Debe tenerse en cuenta que la presencia de sustancias en muy pequeñas cantidades, que incluso pueden ser indetectables mediante la espectroscopía infrarroja convencional, pueden ser decisivas en el momento de establecer la etiología del cálculo. Precisamente, para poder determinar la importancia de un microcomponente es imprescindible el conocimiento de la estructura cristalina íntima del cálculo, de tal manera que pueda establecerse con claridad la zona de inicio del desarrollo del cálculo, ya que en esta zona están las claves de su formación.

La metodología seguida para este estudio consiste, una vez ya se dispone del cálculo seccionado, en su colocación sobre una platina a la que se fija con pintura de plata, seguidamente se recubre durante 2 minutos con una capa de oro de espesor final 300 Å en un spattering (Polaron) en corriente de argón, con un voltaje de 1.4 kV y a 16-18 mA de intensidad. Esta platina se coloca en el portamuestras del microscopio, se lleva la cámara del portamuetras al vacío, se eleva el voltaje a 15 kV y se ajusta el filamento. La observación de la sección del cálculo se efectúa entre 30 y 20000 aumentos, lo que permite identificar las fases cristalinas presentes en función de su hábito cristalino, así como evaluar el tamaño de los cristales y su estado de agregación. Por otra parte, es posible detectar la presencia de materia orgánica.

Especímenes

Se han revisado los estudios de 1000 cálculos renales, efectuados de acuerdo con la procedimiento arriba indicado. En aquellos casos en los que se ha detectado la presencia de nanobacterias en el cálculo renal, se ha obtenido la información clínica disponible de cada paciente así como los correspondientes estudios analíticos de orina (orina de 2 h recogida en ayunas por la mañana y orina de 24 h), efectuados de acuerdo con los métodos convencionales utilizados para este fin, estando los pacientes con dieta libre y sin tomar medicación alguna.

RESULTADOS

De los 1000 cálculos evaluados se han detectado la presencia de bacterias atípicas (tamaño < 5 µm) en 5 de ellos (0,5%). La morfología de estos microorganismos es muy característica y aparece en las Figuras 1-2. Los 5 casos corresponden a cálculos desarrollados en cavi-

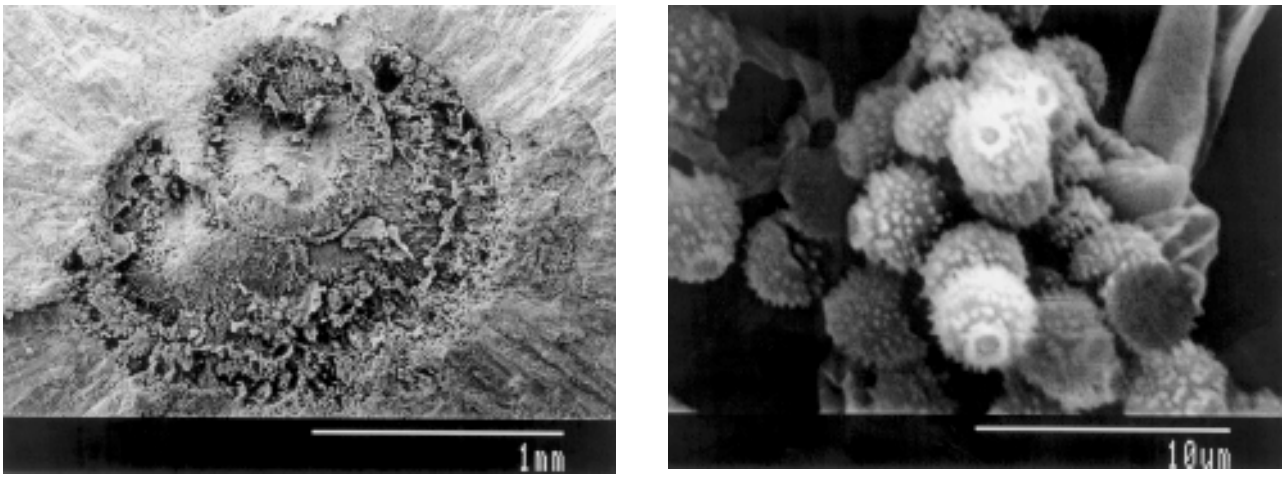


Fig. 1: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de (a) la zona central de un cálculo renal (nº 3 en Tabla 1) de oxalato cálcico monohidrato en el que se detectó la presencia de bacterias de pequeño tamaño. (b) Detalle de las bacterias detectadas, donde puede observarse que su diámetro es de unas 4 µm.

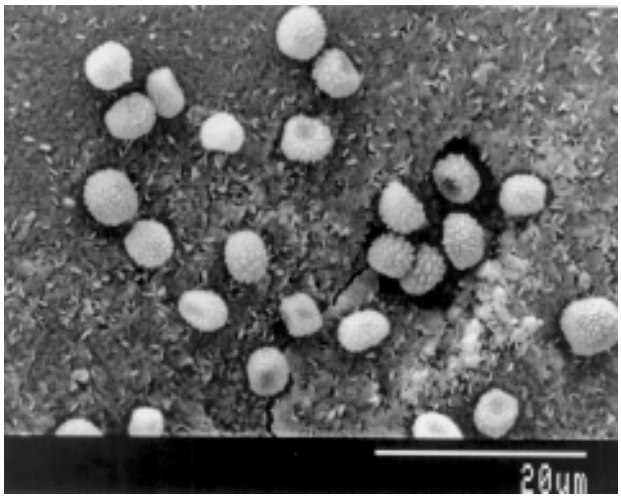


Fig. 2: Imagen de microscopía electrónica de barrido de la sección un cálculo renal (nº 4 en Tabla I) de oxalato cálcico monohidrato en el que se detectó la presencia de bacterias de pequeño tamaño (diámetro aproximado < 5 µm).

dades de baja eficacia urodinámica (cálculos no papilares). La composición (componentes mayoritarios y minoritarios), situación de los microorganismos en el cálculo y principales alteraciones bioquímicas urinarias de estos pacientes se resumen en la Tabla I. Resulta interesante observar como presentan una serie de aspectos comunes. Así, las bacterias siempre se han detectado en el centro del cálculo. El componente mayoritario del cálculo ha sido siempre COM y/o ácido úrico. El urato amónico / urato sódico se ha encontrado frecuentemente como componente minoritario. La única alteración bioquímica urinaria común de estos pacientes ha sido la de presentar valores de pH urinario inferiores a 5,5, siendo los urocultivos siempre negativos en todos los casos. Finalmente, el ulcus duodenal con sangrado agudo (HDA), gingivitis e hipertensión arterial (HTA) fueron patologías bastante comunes entre estos pacientes.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio permiten deducir que en algunos casos el desarrollo del cálculo renal puede estar asociado a microinfecciones por bacterias de pequeño tamaño (nanobacterias), no detectadas mediante urocultivos convencionales. Estas microinfecciones no son sin embargo muy comunes, de acuerdo con nuestros hallazgos (sólo el 0,5 % de todos los cálculos), y por tanto serían mucho menos frecuentes de lo que postulan otros autores (11-12). El hecho según el cual todos estos cálculos se desarrollan en cavidades de baja eficacia urodinámica, y el que los microorganismos aparezcan en el centro del cálculo, demuestra que estas bacterias pueden jugar un papel importante en el desarrollo del cálculo al favorecer un entorno de pH elevado (siempre aparecen uratos y/o hidroxiapatita) que induce la formación de nucleantes heterogéneos del oxalato cálcico monohidrato (COM) y del ácido úrico anhidro (AUA). En este sentido resulta muy interesante observar una serie de analogías tanto en la estructura y composición de estos cálculos (componentes mayoritarios: COM y/o UAU, minoritarios: uratos), como en el historial clínico de estos pacientes, en los que aparece frecuentemente ulcus duodenal con hemorragia aguda y/o gingivitis, que como es sabido pueden estar desencadendas por microorganismos similares y que por tanto permitiría deducir que factores bacterianos estuvieran implicados en patologías que hasta el momento jamás habían sido relacionadas, aunque este último aspecto obviamente precisa de estudios en mayor profundidad que identifiquen inequívocamente las mencionadas bacterias en tales casos (no se dispone en ningún caso del test de Helicobacter pylori). Por tanto, podemos concluir que, de acuerdo con otros autores (11-13), las microinfecciones pueden inducir la formación de cálculos renales, aunque este no sería un mecanismo muy extendido que además estaría asociado con otros factores de riesgo litógeno, de acuerdo con nuestros resultados. Por otra parte, sería importante establecer la relación que pueda existir con otras patologías inducidas por el mismo tipo de bacterias.

AGRADADECIMIENTOS

Se agradace a la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Proyecto Nº PM97-0040) la ayuda económica prestada.

BIBLIOGRAFÍA Y LECTURAS RECOMENDADAS (*lectura de interés y **lectura fundamental)

**1. FINLAYSON, B.: "Physicochemical aspects of urolithiasis." Kidney Int., 13: 344, 1978.

*2. GRASES, F.; COSTA-BAUZÁ, A.; SÖHNEL, O.: "Cristalización en disolución. Conceptos básicos." Ed. Reverté S.A., Barcelona, 2000.
*3. MANN, S.: "Crystalochemical strategies in biomineralization." En: Biomineralization. Chemical and Biochemical Perspectives. Eds. Mann S, Webb J, Williams RJP. pp. 35-62. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (Germany) 1989.
*4. AMORÓS, J.L.; GARCÍA-RUÍZ, J.M.: "Agregados cristalinos de morfología inducida." Investigación y Ciencia, 6: 15, 1983.
*5. WHEELER, A.P.; SIKES, C.S.: "Matrix-crystal interactions in $CaCO_3$ biomineralization." En: Biomineralization. Chemical and Biochemical Perspectives. Eds. Mann S, Webb J, Williams RJP. pp. 95-131. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (Germany), 1989.
*6. GRASES, F.; COSTA-BAUZÁ, A.; CONTE, A. y cols.: "Inhibidores de la cristalización y urolitiasis." Urol. Integr. Invest., 2: 463, 1997.
*7. MANDEL, N.: "Mechanism of stone formation." Seminars in Nephrology 16: 364, 1996.
*8. BALAJI, K.C.; MENON, M.: "Mechanism of stone formation." Urol. Clin. North Am., 24: 1, 1997.
*9. CHANDHOKE, P.S.; FAN, J.; MAY, D.J. y cols.: "Role of the renal collecting system in initial kidney stone formation." J. Endourol., 13: 601, 1999.
*10. GRASES, F.; COSTA-BAUZÁ, A.; GARCÍA-FERRAGUT, L.: "Biopathological crystallization: a general view about the mechanisms of renal stone formation." Adv. Colloid Interface Sci., 74: 169, 1998.
**11. ÇIFTÇIOGLU, N.; BJÖRKLUND, M.; KUORIKOSKI, K. y cols.: "Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation." Kidney Int. 56: 1983, 1999.
**12. KAJANDER, E.O.; ÇIFTÇIOGLU, N.: "Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 8274, 1998.
*13. KRAMER, G.; KLINGLER, H.C.; STEINER, G.E.: "Role of bacteria in the development of kidney stones." Curr. Opin. Urol., 10: 35, 2000.
*14. GRASES, F.; CONTE, A.; COSTA-BAUZÁ, A.: "Análisis y estudio de los cálculos renales." Urol. Integr. Invest., 2: 477, 1997.