

Estudio del cálculo renal. Potencial del uso del microscopio electrónico de barrido de sobremesa. Consecuencias prácticas

F. Grases, A. Costa-Bauzá y F. Julià

Laboratorio de Investigación en Litiasis Renal, Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS-IdISBa), Universidad de las Islas Baleares, Palma de Mallorca, España.

RESUMEN

El objetivo de este artículo es demostrar el gran potencial de la inclusión del microscopio electrónico de barrido en el protocolo de estudio de rutina de los cálculos renales, haciendo patente que ello permite determinar de manera fiable la etiología de todos los tipos de litiasis renal. El protocolo consiste en la combinación de microscopía estereoscópica, microscopía electrónica de barrido y espectroscopía infrarroja. La utilidad de este procedimiento queda de manifiesto mediante su aplicación a varios ejemplos ilustrativos. El protocolo aplicado procura la identificación de componentes que están presentes en muy baja proporción, así como las características de las estructuras internas y externas del cálculo, y también facilita información sobre áreas que presentan restos de estructuras orgánicas, tales como túbulos renales. Cabe destacar que los resultados se obtienen en un tiempo relativamente corto y con alta fiabilidad. Este tipo de estudio, conocido como estudio morfocomposicional del cálculo urinario, es fundamental para establecer su diagnóstico y etiología, y por tanto para iniciar el tratamiento de un paciente con litiasis, ya que existe una relación directa entre las características específicas de un determinado cálculo y las causas que lo han generado. El creciente número de tratamientos disponibles en la actualidad para pacientes con diferentes tipos de cálculos renales justifica que se deba identificar con claridad su etiología, por lo que la aplicación del procedimiento que se describe aquí está totalmente justificada en los protocolos rutinarios de estudio del cálculo renal.

Palabras clave:

Cálculos renales, estudio morfocomposicional, microscopía estereoscópica, microscopía electrónica de barrido, espectroscopía infrarroja.

Correspondencia:

Email: fgrases@uib.es

Recibido: 13/9/2023. Aceptado: 6/10/2023

Abreviaturas:

ME: Microscopio estereoscópico / microscopía estereoscópica

SEM: Microscopio electrónico de barrido / microscopía electrónica de barrido

EDS: Espectrometría por dispersión de rayos X

IR: Infrarrojo/a

FTIR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

COM: Oxalato cálcico monohidrato

COD: Oxalato cálcico dihidrato

INTRODUCCIÓN

Es un hecho ampliamente aceptado que el estudio morfocomposicional del cálculo renal es capaz de aportar información muy relevante acerca de su etiología. De hecho, es el único estudio que puede proporcionar dicha información, ya que aun cuando se disponga de analíticas urinarias previas a su expulsión, estas corresponderán al último periodo de formación del cálculo, pero no dispondremos de datos para conocer qué ha ocurrido previamente. Es decir, no contaremos con la cronología de los posibles cambios de composición de la orina durante el periodo de formación del cálculo. Así, el estudio morfocomposicional del cálculo identifica:

- la existencia o ausencia de un punto o zona de unión a la papila renal (lesión epitelial, obstrucción tubular);
- el o los componentes mayoritarios, que pueden relacionarse con la composición urinaria en el momento de su formación o en etapas previas;
- el o los componentes minoritarios, de especial importancia si se localizan en la zona de inicio de formación del cálculo;
- los cambios de composición (estructura en capas con distintos componentes), que se asocian a cambios es-

tacionales o de rutinas dietéticas, farmacológicas y/o de estilo de vida;

- los cambios en la composición del cálculo debido al tiempo de permanencia en el interior del sistema urinario, en contacto con la orina (cambios de fase por razones termodinámicas).

En ocasiones, se ha puesto en duda la utilidad del estudio morfocomposicional, ya que también es cierto que no siempre se confirman las condiciones que habrían sido las responsables de la formación del cálculo en el posterior análisis bioquímico de la orina de 24 horas. Precisamente, este hecho confiere aún más valor a los resultados de este estudio, puesto que pone en evidencia que es el único que puede desvelar las alteraciones previas que posibilitaron la génesis del cálculo renal.

Así, el estudio morfocomposicional del cálculo urinario es esencial para establecer las pruebas diagnósticas complementarias que se deben realizar y determinar el tratamiento inicial del paciente aquejado de litiasis renal. Como se ha indicado, la composición y estructura del cálculo renal proporcionan una información fundamental relativa a la patogénesis de la enfermedad, incluyendo anomalías metabólicas.

Por otra parte, la necesidad de un estudio y análisis detallado de los cálculos renales aumenta a medida que se progresa en el tratamiento específico de las distintas formas de urolitiasis y a medida que se evidencia la relación entre los distintos factores que predisponen a esta enfermedad y la tipología del cálculo generado¹⁻⁵.

El estudio de los cálculos renales, con fines de investigación, se ha realizado aplicando técnicas muy variadas, desde la simple observación con microscopio estereoscópico (ME) hasta técnicas sofisticadas, tales como microtomografía computarizada (micro-CT) y microscopía electrónica de barrido (SEM) acoplada con microanálisis por dispersión de rayos X (EDS), entre otras⁶⁻⁹. Sin embargo, cuando se reduce al ámbito del análisis de rutina en laboratorios clínicos, los métodos tradicionalmente usados hasta fechas recientes han sido el análisis químico por vía húmeda y la espectroscopía infrarroja (IR).

El uso del análisis químico por vía húmeda para establecer la composición de los cálculos renales responde a varios motivos: es relativamente fácil, económico y se dispone de kits comerciales preparados para su realización. Sin embargo, este método no es capaz de conseguir toda la información que contiene el cálculo renal, y sus resultados son ambiguos e incluso dudosos; únicamente se obtiene alrededor del 50 % de resultados correctos en el caso de muestras con un único componente^{6,10}. Por ello, los expertos en litiasis renal coinciden en clasificar este método como ineficaz para obtener un buen resultado.

Actualmente, la gran mayoría de los laboratorios clínicos de rutina realizan un análisis cualitativo o semicuantitativo de los cálculos renales mediante espectroscopía IR de una parte pulverizada del cálculo, lo que no permite determinar componentes minoritarios presentes en proporciones

inferiores al 5 % o la estructura interna. La información obtenida con espectroscopía IR es valiosa para establecer un consejo terapéutico general, pero no puede por sí sola proporcionar toda la información contenida en el cálculo para orientar sobre las causas etiológicas concretas de la litiasis^{1,3,5}. Por ello, en la actualidad se acepta que ningún método único proporciona información global sobre la estructura y composición del cálculo renal, y que es necesaria la combinación de varias técnicas, entre ellas la ME y la espectroscopía IR, para obtener la máxima información, precisa y clínicamente relevante^{3,8,11}.

Otro aspecto que hay que considerar es que, en la actualidad, muchos cálculos llegan fragmentados al laboratorio, debido al tratamiento quirúrgico que ha recibido el enfermo litiasico (litotricia extracorpórea por ondas de choque o técnicas endourológicas). Estos hechos han fomentado, a lo largo de las últimas décadas, el uso del SEM para estudiar la estructura interna tridimensional de los cálculos y establecer la morfología de los pequeños cristales que conforman los cálculos^{5,12-14}.

El objetivo de este artículo es demostrar el gran potencial de la inclusión del SEM en el protocolo de estudio de rutina de los cálculos renales, y que la combinación de ME, SEM y espectroscopía IR supone una metodología simple y útil para orientar sobre la etiología de todo tipo de cálculos renales.

PROTOCOLO RECOMENDADO PARA EL ESTUDIO DE LOS CÁLCULOS RENALES

La composición superficial e interna y la morfología de los cálculos aportan información no solo sobre la composición urinaria existente durante el periodo en el que se desarrolló el cálculo, sino también sobre otros factores etiológicos de la patología, que incluyen condiciones anatómicas tales como la existencia de cavidades renales que favorecen la estasis urinaria^{3,5,15}, o del punto de anclaje a la papila renal⁵. El análisis de rutina debe ser capaz de unir todos estos aspectos y brindar información completa para fines clínicos.

Las técnicas que hay que aplicar deben permitir el estudio de muestras sólidas, sin que sea necesaria su disolución, ya que en el caso de los cálculos renales no solo es importante conocer las especies o sustancias que constituyen ese sólido (oxalato, fosfato, calcio, magnesio, carbonato, etc.), sino la fase sólida concreta (por ejemplo, los fosfatos cálcicos pueden precipitar en más de 4 fases distintas), porque cada una de ellas se forma en unas condiciones de pH, sobresaturación, hidrodinámica, etc. concretas y, por tanto, su hallazgo nos ofrecerá indicaciones sobre las posibles alteraciones que han conducido a su formación. Por otra parte, como se ha comentado previamente, es muy importante el conocimiento de su microestructura cristalina global, que permite establecer la cronología de su formación y, consecuentemente, las causas que lo han iniciado.

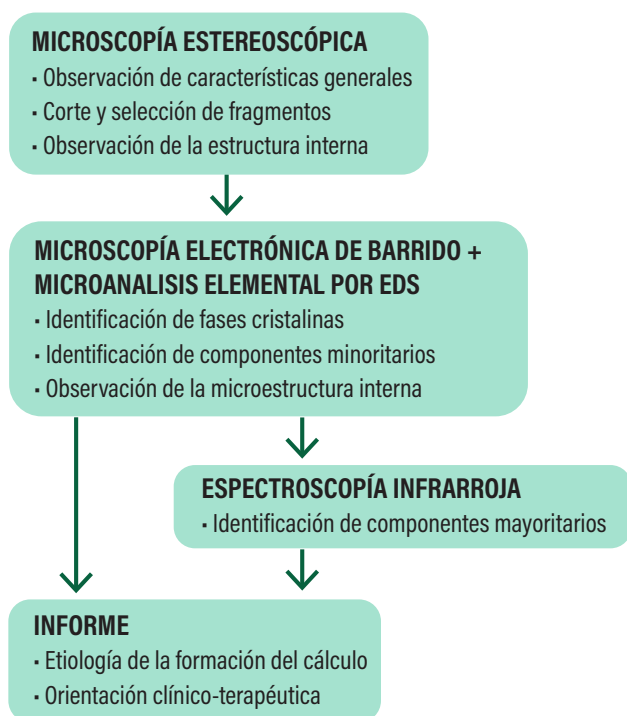
Así, resulta evidente que, en la evaluación y el estudio de un cálculo renal, es fundamental establecer:

- el punto o zona de origen;
- las fases cristalinas presentes y el orden de aparición;
- la relación con la morfoanatomía renal y la composición de la orina.

Precisamente, esta información es la que se consigue con el denominado «estudio morfocomposicional del cálculo renal».

El procedimiento recomendado para analizar y estudiar los cálculos renales de forma rutinaria consiste en una combinación adecuada de su observación mediante técnicas convencionales (lupa binocular), junto con técnicas físicas como SEM acoplada con EDS y FTIR. En la Figura I se presenta un esquema del protocolo propuesto para el estudio de los cálculos renales.

Figura I. Protocolo recomendado para el estudio de cálculos renales.



El estudio del cálculo comienza a través de la observación directa de su aspecto externo mediante ME. Posteriormente, si el cálculo no está fragmentado, se secciona en dos partes a lo largo de un plano lo más cercano posible a su centro geométrico para poder establecer la estructura interna. Este paso indicará, en la mayoría de los casos, cuál es el proceso más adecuado que habrá que seguir aplicando.

El estudio detallado de la estructura interna del cálculo, y la detección e identificación de microcomponentes, requieren el uso de SEM acoplada a EDS.

El análisis por espectroscopía IR de una o varias partes del cálculo solo será necesario si el estudio del cálculo con SEM + EDS no permite establecer inequívocamente su composición y estructura.

Si no se dispone de SEM + EDS, el estudio se puede realizar obteniendo el espectro IR de varias zonas del cálculo

que incluyan la zona de inicio o corazón, la zona intermedia y la capa superficial, o cualquier zona con apariencia diferente al resto del cálculo. Evidentemente, en esos casos hay varios inconvenientes: el estudio requerirá una inversión mayor de tiempo, no se podrán detectar componentes en proporciones inferiores al 5 % cuando su presencia no se detecte por ME, y el proceso conducirá a la destrucción de la muestra.

Cabe destacar que, en todos los casos, es necesario que el personal dedicado a este tipo de estudios posea una preparación y experiencia específicas en el manejo de estas muestras y en las técnicas analíticas a fin de obtener el mayor número de datos etiológicos del estudio del cálculo. Esta experiencia es aún más necesaria cuando tenemos en cuenta que, como ya se ha indicado, muchos de los cálculos que se van a someter a estudio se encuentran fragmentados debido al tratamiento quirúrgico aplicado para conseguir su extracción del paciente. El análisis de los fragmentos, y la relación con el tipo de cálculo al que pertenecen, requieren de una gran formación en el estudio de cálculos enteros, ya que de ahí se obtienen los conocimientos necesarios para establecer tal asociación.

INFORMACIÓN QUE APORTA CADA TÉCNICA

I. MICROSCOPIA ESTEREOSCOPICA (LUPA BINOCULAR)

La mayoría de los autores coincide en que el primer paso en el análisis de un cálculo consiste en el examen de la muestra con un ME o lupa binocular^{2-3,7,11}.

El ME permite la observación de muestras de diverso tamaño utilizando luz visible y proporcionando una imagen ampliada de la muestra sin preparación ni destrucción. Se pueden usar entre 4x y 100x aumentos. Estos instrumentos son muy asequibles; los más útiles son los que están equipados con cámara fotográfica.

En la práctica, primero se observan externamente los cálculos intactos para establecer sus características superficiales, como forma y dimensiones, color, existencia de un área del cálculo que haya estado en contacto con las paredes del riñón, presencia de depósitos superficiales, etc. Esta caracterización externa permite realizar algunas hipótesis sobre la composición y posible disposición estructural del cálculo y sobre las características renales y urinarias. Por ejemplo, la presencia de depósitos superficiales con composición diferente de la mayor parte del cálculo puede indicar un crecimiento final del cálculo debido a un cambio en la composición química de la orina, como se observa en algunos cálculos renales de oxalato de calcio monohidrato (COM), que presentan depósitos superficiales de cristales de oxalato de calcio dihidrato (COD).

Por otro lado, este examen externo permite seleccionar el plano de fractura óptimo para obtener la máxima información de la disposición interna del cálculo. El corte de una muestra litiasica debe realizarse con cuidado para evitar alteraciones o destrucción de la estructura de interés.

Muchos constituyentes de los cálculos renales pueden reconocerse a simple vista cuando se examinan sus sec-

ciones con un ME, lo que permite establecer con elevada probabilidad el componente o componentes mayoritarios del cálculo. En la práctica, el método permite distinguir, por ejemplo, entre cálculos de oxalato cálcico y de fosfato cálcico. Además, es aún más importante el hecho de que la inspección interna de dichas secciones proporciona información sobre características estructurales, tales como el grado de organización interna, la ubicación y el tamaño del núcleo del cálculo, la presencia de capas y/o estructura radial, el orden de deposición de los componentes y otros detalles estructurales, si los hay. Si el cálculo ya se encuentra fragmentado, se deben observar detenidamente todos los fragmentos para establecer el máximo número de detalles estructurales y composicionales.

En conclusión, la observación del exterior e interior del cálculo con el ME revela información que permite seleccionar las regiones de la muestra que interesa estudiar, con la siguiente técnica que se vaya a aplicar, a fin de obtener la máxima información para establecer la historia del cálculo y, por lo tanto, orientar sobre la causa y/o causas de su formación^{3-5,16-18}.

Estas incluyen:

- morfología externa y color;
- existencia o ausencia de depósitos superficiales, cristalinos o amorfos;
- presencia o ausencia de un punto de unión a la pila;
- plano/s óptimo/s de fractura que permita/n obtener mayor cantidad de información (en cálculos no fragmentados);
- presencia o ausencia de uno o varios corazones;
- estructura interna, que puede ser ordenada (con un patrón estructural radial o en capas), desordenada (sin que se observen estructuras cristalinas), o una mezcla de ambas;
- zonas del cálculo con distinta composición, al presentar distinta coloración, textura o morfología cristalina;
- orden de deposición de los distintos componentes.

La ME es una técnica orientativa que nos indica el camino más adecuado que debemos seguir en el estudio posterior del cálculo, ya que en muchas ocasiones, aun cuando detectemos la presencia de un corazón o de capas de distinta composición, el estudio con ME no permitirá determinar las diferentes fases que integran el cálculo, por lo que hay que recurrir a otras técnicas de identificación. En estos casos, la identificación puede efectuarse mediante SEM, acoplada a EDS (que proporciona el análisis elemental de la zona seleccionada), o mediante espectroscopía IR, aunque con esta última técnica no será posible identificar compuestos cuya proporción sea menor del 5 % de la porción analizada.

II. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La SEM, al igual que la ME, es una técnica no destructiva que permite la observación de la estructura del cálculo re-

nal, aunque con mucho mayor detalle, ya que puede llegar a 20 000 aumentos o más.

Además, las imágenes obtenidas en el modo electrones retrodispersados poseen relieve, lo que proporciona una visión muy clara de la morfología de los cristales.

Debe tenerse en cuenta que la presencia de una sustancia en cantidades ínfimas, no detectables mediante espectrometría IR, podría ser determinante para establecer la etiología de la formación del cálculo. Precisamente, para poder determinar la importancia de un determinado microcomponente, es fundamental el conocimiento exacto de la estructura fina del cálculo, de tal forma que se debe establecer la zona inicial de su desarrollo, ya que contiene las claves de su origen.

En la actualidad, la metodología utilizada para llevar a cabo dicho estudio consiste en situar la muestra de cálculo en un portaobjetos de microscopio fijada con cinta conductora adhesiva, sin que sea necesario metalizar la muestra, que después de su observación y análisis se recupera en el mismo estado en que se introdujo en el SEM.

Además, el SEM permite el acoplamiento de técnicas auxiliares. Entre ellas, una de las más importantes es el microanálisis por EDS, de gran utilidad en el estudio de la microestructura y los componentes muy minoritarios de los cálculos renales^{13-14,19-20}.

Este tipo de accesorio proporciona datos de la composición elemental del punto o la zona que se analiza. De ese modo se puede determinar la composición del material observado. Hay que indicar que, en la actualidad, no es posible detectar los 4 primeros elementos, es decir, del H al Be, aunque ello no afecta significativamente a los componentes de los cálculos urinarios (Tabla I).

Así, con el SEM se puede:

- observar la morfología de los cristales presentes en el cálculo, que en muchos casos implica la identificación inequívoca de estos;

Tabla I. Elementos detectables mediante análisis por EDS en los distintos componentes de cálculos renales.

COMPUESTO	ELEMENTOS DETECTABLES POR EDS	RELACIÓN MOLAR
Oxalato cálcico monohidrato	Ca	
Oxalato cálcico dihidrato	Ca	
Brushita	Ca, P	Ca/P = 1
Hidroxiapatita	Ca, P	4/3 < Ca/P < 5/3
Carbonato apatita	Ca, P	5/3 < Ca/P < 8/3
Estruvita	Mg, P	Mg/P = 1
Ácido úrico (anhidro o dihidrato)	N	
Urato sódico	N, Na	
Urato potásico	N, K	
Urato amónico	N	
Urato cálcico	N, Ca	
Cistina	S	

* Ca: calcio; P: fósforo; Mg: magnesio; N: nitrógeno; Na: sodio; K: potasio; S: azufre

- detectar, identificar y localizar fases cristalinas o componentes minoritarios;
- identificar el punto o puntos de inicio de formación del cálculo;
- observar cambios en el hábito cristalino o composición, en relación con el crecimiento (aumento de tamaño) del cálculo;
- completar de manera concluyente las observaciones realizadas con lupa binocular sobre la estructura interna.

En la actualidad, como ya se ha comentado, es frecuente que los cálculos que se van a analizar lleguen ya fragmentados, lo que puede suponer una pérdida parcial de información. Sin embargo, con experiencia previa y suficientemente amplia de la estructura de los cálculos renales, es posible, haciendo uso de la ME, seleccionar una serie de fragmentos representativos tales que permitan averiguar, mediante SEM + EDS, todos aquellos aspectos que son fundamentales para conseguir datos suficientes acerca de su etiología.

Por tanto, junto con la ME y la espectroscopía IR, el SEM + EDS constituye una herramienta fundamental en el estudio del cálculo renal, tanto para aportar información de interés clínico relevante para el urólogo práctico como para justificar su uso rutinario. Esta posibilidad se ve actualmente potenciada, ya que podemos disponer de modelos de sobremesa de fácil manejo, económicamente asequibles y que proporcionan las mismas prestaciones que modelos más grandes y a la vez más costosos.

III. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA

La espectroscopía IR es una de las técnicas que se utilizan para el análisis rutinario de sólidos sin su disolución, incluyendo cálculos renales¹⁹⁻²⁴.

Es una técnica útil para identificar compuestos orgánicos e inorgánicos. De hecho, es particularmente útil para determinar los grupos funcionales presentes en una molécula, ya que vibran casi a las mismas frecuencias, independientemente de su entorno molecular. La espectroscopía IR proporciona el espectro de compuestos que se ha denominado «la huella dactilar», ya que es único y específico de cada sustancia. El espectro de una muestra real permite la identificación de los componentes presentes en ella, con la ventaja adicional de ser capaz de identificar compuestos no cristalinos, incluyendo el grado de hidratación. Además, los avances en la espectroscopía IR computarizada, en particular la espectroscopía IR por transformada de Fourier (FTIR), han permitido obtener espectros IR en menos de un minuto.

La técnica recomendada para realizar dicho análisis consiste en el conocido método de la pastilla de bromuro potásico (KBr), que solo requiere 1 mg, o incluso menos, de muestra. Cuando se trata de muestras sólidas, como cálculos renales, la preparación requiere dispersar de 0,4 a 1,0 mg de la muestra en una matriz de KBr y presionar hasta obtener una pastilla transparente.

Cuando no se logre la identificación de la composición del cálculo con el SEM + EDS, si este presenta una apariencia homogénea, se puede pulverizar cualquier zona del cálculo para la obtención del espectro IR. Pero si la muestra es heterogénea, con áreas de diferentes colores o texturas, capas u otros detalles estructurales, la identificación de las diferentes fases debe efectuarse obteniendo el espectro IR de cada zona con distinta apariencia, separando cuidadosamente material del cálculo de las diferentes regiones con el uso de un estilete o bisturí.

Además, cuando se trate de cálculos de origen medicamentoso o de composición muy poco común, también se deberá recurrir a la espectroscopía IR para su identificación.

El análisis por espectroscopía IR proporciona el espectro de los componentes presentes en el fragmento de muestra (cálculo) que se analiza, que puede corresponder a un compuesto puro o a una mezcla de varios. En los cálculos urinarios se han identificado hasta 65 moléculas diferentes, incluidas varias de origen exógeno, aunque solo 12 de ellas son las más frecuentes, por lo que, si se dispone de una colección de patrones de estos, es posible identificar fácilmente el componente presente en el cálculo, algo que resulta más problemático cuando el cálculo es mixto.

Finalmente, hay que resaltar que todos aquellos compuestos presentes en la muestra en proporciones inferiores al 5 % no se podrán detectar mediante esta técnica; en esos casos, se deberá recurrir a técnicas más sensibles, como el SEM + EDS.

EJEMPLOS

A modo de ejemplo, se presentan 5 casos ilustrativos de cálculos renales infantiles con aplicación del procedimiento recomendado para su estudio, así como los resultados obtenidos. Debe destacarse que el estudio morfocomposicional de los cálculos renales expuestos, realizado siguiendo el protocolo indicado en la Figura I, permite la obtención de los resultados en un tiempo relativamente corto y con gran fiabilidad para la mayoría de las muestras.

El tiempo necesario para dicho estudio no supera el que se dedica al estudio de muestras de anatomía patológica, para el que también se requiere una observación detallada que en muchas ocasiones se realiza con microscopía electrónica de transmisión²⁵.

Se ha usado un microscopio estereoscópico MOTIC SMZ-161 (MoticEurope®, Barcelona, Spain), un SEM de sobremesa Hitachi TM4000 Plus II (Hitachi®, Tokyo, Japan) acoplado con microanálisis por EDS Quantax 75 (Bruker®, Berlin, Germany) y un espectrómetro IR Bruker Hyperion (Bruker®, Berlin, Germany).

Los cálculos renales utilizados para ilustrar la aplicación del procedimiento de estudio recomendado son muestras de litiasis infantil analizadas en el Laboratorio

de Investigación en Litiasis Renal del Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS), de la Universidad de las Islas Baleares.

Muestra 1 (varón 5 años)

Se trata de un cálculo renal de COD. La formación de cálculos renales con esta composición se asocia normalmente con hipercalciuria. Aunque el SEM-EDS permite detectar claramente la presencia de pequeñas cantidades de hidroxiapatita (AP) (Figura II), esta no era detectable ni por ME ni por espectroscopía IR. Identificar la presencia de AP es muy importante, porque indica la existencia de valores de pH urinario superiores a 6,2, por lo menos durante algunos periodos de tiempo. También debe considerarse que la AP es un nucleante heterogéneo (inductor) muy efectivo de los cristales de COD.

Muestra 2 (mujer 13 años)

Consiste en un cálculo de COD, transformado en su mayoría en COM, en el que mediante SEM-EDS se detecta la presencia de urato potásico y pequeñas cantidades de hidroxiapatita (AP) (Figura III). Estos hallazgos demuestran que la paciente presentaba concentraciones elevadas de calcio en orina (posible hipercalciuria) y pH urinario superior a 6,2, que indujo a la formación de AP. Además, la presencia de urato potásico indica que, junto al pH elevado, presentaba una concentración elevada de ácido úrico o urato en la orina.

Muestra 3 (varón 15 años)

Cálculo renal de COM como componente mayoritario. No se detecta la presencia de puntos de unión con la papila renal y, además, el corazón del cálculo está situado en la zona central de este (Figura IV). Por tanto, se trata claramente de un cálculo de COM de cavidad, que se ha desarrollado en una cavidad de baja eficacia termodinámica. Mediante la observación con el ME, se detecta la presencia del corazón del cálculo, aunque no se puede identificar su composición. La observación con SEM-EDS permite identificar con claridad la presencia de pequeños cristales de COM y materia orgánica en el corazón del cálculo, indicando que la materia orgánica ha actuado como nucleante heterogéneo (inductor) de la formación de los cristales de COM.

Muestra 4 (varón 8 años)

Cálculo de COM de cavidad (no se detecta punto de unión con la papila renal, Figura V) en el que se puede identificar una zona central amplia (corazón del cálculo) de composición poco definida. El estudio con SEM-EDS identifica con claridad la presencia de urato potásico e hidroxiapatita en el corazón (Figura V(D)). Estos hallazgos demuestran que el cálculo se ha generado a consecuencia de la existencia de valores de pH urinario elevados, superiores a 6,2 (formación de AP), junto con la presencia de concentraciones elevadas de ácido úrico que, debido a los valores elevados de pH y a las posibles concentraciones elevadas de potasio, ha cristalizado en forma de urato potásico.

Muestra 5 (varón 15 años)

Este cálculo está constituido mayoritariamente por COD (Figura VI). No se identifican otros componentes mediante ME ni espectroscopía IR. Sin embargo, mediante SEM-EDS, se detecta presencia de hidroxiapatita (AP) y urato potásico (Figura VI(B)). Por tanto, se evidencia que la presencia mayoritaria de cristales de COD indica que la elevada concentración de calcio en la orina

Figura II. (A) Vista general del cálculo obtenida mediante ME en la que se observan cristales de COD con la típica forma en punta de lanza. (B) Imagen obtenida mediante SEM con un cristal de COD, parcialmente transformado en COM, y con una pequeña cantidad de hidroxiapatita (zona blanquecina en el centro de la imagen).

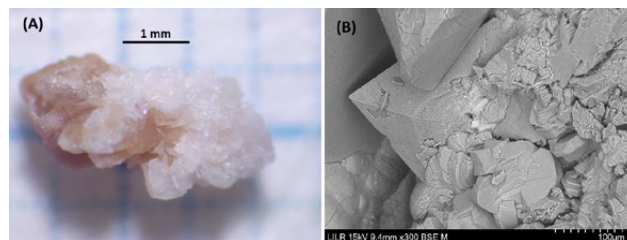


Figura III. (A) Imagen de una sección del cálculo obtenida mediante ME en la que se observa una zona central de aspecto amorfo, rodeada por una gran capa de cristales de COD, con la típica forma en punta de lanza. (B) Imagen de dicha sección obtenida mediante SEM en la que se evidencia la existencia de zonas con distinta composición (zona oscura y zona más clara). (C) Detalle de la zona oscura en la que se observan grandes esferulitos de urato potásico (el microanálisis por EDS detecta N y K). (D) Detalle de la zona más clara en la que se observan estructuras en forma de punta de lanza, correspondientes a las zonas ocupadas por cristales de COD.

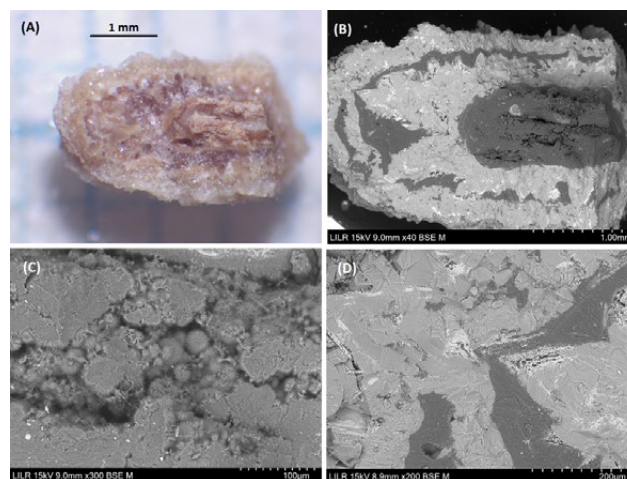
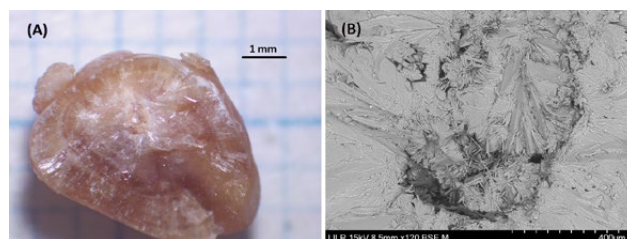


Figura IV. (A) Vista general de una sección del cálculo obtenida mediante ME en la que se observa una estructura columnar que se origina en el centro del cálculo. (B) Imagen obtenida mediante SEM de la zona de inicio del cálculo (centro de este) en la que se observan típicos cristales de COM formados en presencia de materia orgánica.



(probable hipercalcemia) es uno de los factores etiológicos importantes que están implicados en la formación de este cálculo, aunque la presencia de AP y urato potásico demuestran que durante su formación también han concurrido valores elevados de pH urinario ($\text{pH} > 6,2$), así como de ácido úrico.

CONCLUSIONES

El análisis detallado de los cálculos urinarios es fundamental para establecer su etiología y diagnóstico, y para que se pueda iniciar el tratamiento del paciente con litiasis renal, ya que existe una relación directa entre las características específicas de un cálculo y su etiología¹⁻⁵. La identificación de los componentes mayoritarios de los cálculos renales (COM, COD, ácido úrico, fosfatos cálcicos, fosfato amónico magnésico, cistina) se puede conseguir directamente mediante espectroscopía IR (el método analítico más comúnmente utilizado en la actualidad); sin embargo, en muchas ocasiones la información obtenida exclusivamente por medio de espectroscopía IR no es suficiente para determinar la etiología de los cálculos renales, en particular cuando contienen varios componentes o componentes muy minoritarios. El estudio detallado de los cálculos renales debe incluir ME, SEM-EDS y, a menudo, espectroscopía IR (Figura I, Tabla II). Las técnicas utilizadas para el estudio morfocomposicional de los cálculos renales descritas en el presente artículo son fiables y rápidas, y no requieren múltiples análisis mediante espectroscopía IR. Estas técnicas también permiten la identificación de componentes que se encuentran en proporciones muy minoritarias (indetectables por FTIR), las características de las estructuras internas y externas, e información sobre áreas con estructuras biológicas, como túbulos renales. El uso combinado de espectroscopía IR y ME es una opción útil, aunque este protocolo alternativo requiere más tiempo y no proporciona información sobre componentes muy minoritarios.

Es importante considerar que hasta épocas recientes la SEM acoplada a EDS era una técnica que precisaba de equipos complejos y de elevado coste económico, que, además, para su correcto funcionamiento y mantenimiento, requerían de personal técnico específico, por lo que solo se encontraban en universidades y centros de investigación. El desarrollo instrumental actual de equipos de SEM-EDS de sobremesa, más económicos, de fácil manejo y que no precisan de personal técnico para su uso (como el que se ha utilizado para los estudios que se presentan en este artículo), posibilita un empleo mucho más amplio, así como su implementación en hospitales y centros de análisis clínicos especializados.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Financiación

Esta publicación es parte del proyecto de I+D+i PID2019-104331RB-I00, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/

Figura V. (A) Vista general del cálculo y (B) de una sección de este, obtenidas mediante ME; en la sección se observa una zona central de aspecto amorfo rodeada por una zona cristalina compacta. (C) Detalle de la zona compacta en la que se observan cristales de COM. (D) Detalle de la zona central en la que se observan cristales alargados de urato potásico (el microanálisis por EDS detecta N y K), junto con pequeños esferulitos de hidroxiapatita (zonas blancas).

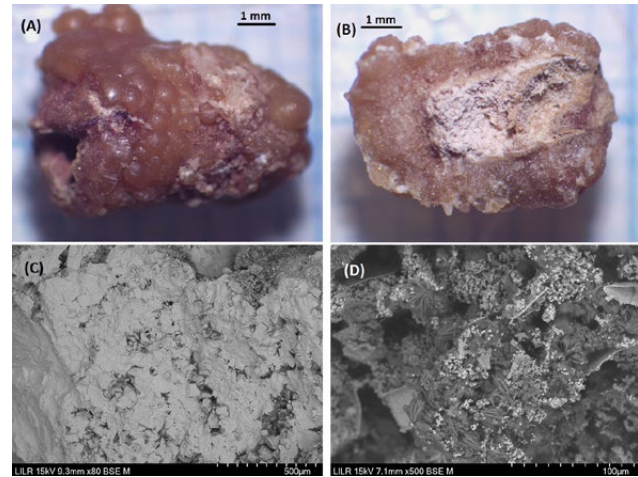
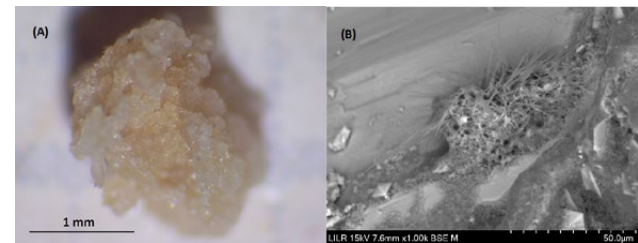


Figura VI. (A) Vista general del cálculo obtenida mediante ME en la que se observa una estructura formada por cristales de COD. (B) Imagen obtenida mediante SEM de una zona del cálculo en la que se detecta hidroxiapatita y cristales alargados de urato potásico.



Bibliografía

1. 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.
2. Cloutier J, Villa L, Traxer O, Daudon M. Kidney stone analysis: "Give me your stone, I will tell you who you are". *World J Urol*. 2015;33:157-169.
3. Daudon M, Dessombz A, Frochot V, Letavernier E, Haymann J-P, Jungers P, Bazin D. Comprehensive morpho-constitutional analysis of urinary stones improves etiological diagnosis and therapeutic strategy of nephrolithiasis. *C. R. Chimie*. 2016;19:1470-1491.
4. Mandel NS, Mandel IC, Kolbach-Mandel AM. Accurate stone analysis: the impact on disease diagnosis and treatment. *Urolithiasis*. 2017;45:3-9.
5. Grases F, Costa-Bauzá A. Diagnóstico de la litiasis renal a través del cálculo. Estudio morfocomposicional. *Arch Esp Urol*. 2021;74:35-48.
6. Kasidas GP, Samuell CT, Weir TB. Renal stone analysis: why and how? *Ann Clin Biochem*. 2004;41:91-97.
7. Gràcia-García S, Millán-Rodríguez F, Rousaud-Barón F, Montañés-Bermúdez R, Angerri-Feu O, Sánchez-Martín F, Villavicencio-Mavrich H, Oliver-Samper A. Why and how we must analyse urinary calculi. *Actas Urol Esp*. 2011;35:354-362
8. Basiri A, Taheri M, Taheri F. What is the state of the stone analysis techniques in urolithiasis? *Urol J*. 2012;9:445-454.
9. Singh VK, Rai PK. Kidney stone analysis techniques and the role of major and trace elements on their pathogenesis: a review. *Biophys Rev*. 2014;6:291-310.
10. Siener R, Buchholz N, Daudon M, Hess B, Knoll T, Osther PJ, Ris-Santos J, Sarica K, Traxer O, Trinchieri A. Quality assessment of urinary stone analysis: results of a multicenter study of laboratories in Europe. *Plos One*. 2016;11:e0156606.
11. Gervarsoni J, Primiano A, Ferraro PM, Urbani A, Gambaro G, Persichilli S. Improvement of urinary stones analysis combining morphological analysis and infrared spectroscopy. *J Chem* 2018; id:4621256
12. Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A. Analytical study of renal calculi. A new insight. *Recent Res Devel. Pure & Applied Anal Chem*. 1998;1:187-206.
13. Racek M, Racek J, Hupáková I. Scanning electron microscopy in analysis of urinary stones. *Scand J Clin Lab Invest*. 2019;79:208-217.
14. Bazin D, Boudierlique E, Daudon M, Frochot V, Haymann JP, Letavernier E, Tielens F, Weil R. Scanning electron microscopy-a powerful imaging technique for the clinician. *C. R. Chimie*. 2022;25:37-60.
15. Grases F, Costa-Bauzá A, García-Ferragut L. Biopathological crystallization: a general view about the mechanism of renal stone formation. *Adv Colloid Interface Sci*. 1998;74:169-194.
16. Elliot JS. Structure and composition of urinary calculi. *J Urol*. 1973;109:82-83.
17. Pinto B. Litiasis renal. 2.ª ed. Barcelona: Ediciones Científicas y Técnicas. 1993:3.
18. Cifuentes Delatte L. Composición y estructura de los cálculos renales. Barcelona: Salvat Editores S.A. 1984:3.
19. Marickar YMF, Lekshmi PR, Varma L, Koshy P. EDAX versus FTIR in mixed stones. *Urol Res*. 2009;37:271-276.
20. Ma R, Luo X, Li Q, Zhong H. The systematic classification of urinary stones combine-using FTIR and SEM-EDAX.
21. Khalid A, Ahmed J, Khalid N. Infrared spectroscopic studies of renal stones. *Brit J Urol*. 1984;56:135-41.
22. Hidalgo A, Carmona P, Bellanato J, Santos M, García Ramos JV, Cifuentes Delatte L. Análisis de cálculos urinarios por espectroscopia infrarroja y Raman. Madrid: Instituto de Óptica "Daza de Valdés" CSIC. 1983.
23. Oliver LK, Sweet RV. A system of interpretation of infrared spectra of calculi for routine use in the clinical laboratory. *Clin Chim Acta*. 1976;72:17-32.
24. Kravdal G, Helgo D, Moe MK. Infrared spectroscopy is the gold standard for kidney stone analysis. *Tidsskr Nor Legeforen*. 2015;135:313-314.
25. Erlandson RA. Role of electron microscopy in modern diagnostic surgical pathology. *Modern Surgical Pathology*. 2009:71-84.