Universitat de les Illes Balears

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Caracterització i diferenciació de la matèria orgànica de dos grups de càlculs d'oxalat càlcic monohidrat de cavitat amb característiques morfològiques clarament diferents.

Marc Adrià Oliver Nicolau

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 43205852F

Treball tutelat per Rafael Prieto Almirall

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

No S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Càlcul renal, Oxalat càlcic monohidrat, extracció matriu proteica

Índex

Resum 3

Abstract 3

1. Introducció 4

1.1 Litiasi renal 4

1.2 Litiasi renal d'oxalat càlcic monohidrat de cavitat 5

1.3 Matèria orgànica en la litiasi oxalo-càlcica 8

2. Objectiu 9

3. Materials i mètodes 9

3.1 Extracció i determinació del contingut proteic 9

3.2 Optimització del mètode d'extracció 12

4. Resultats 15

4.1 Avaluació de l'extracció del contingut proteic 15

4.3 Optimització del mètode 17

5. Discussió 21

5.1 Extracció i determinació del contingut proteic 21

5.2 Optimització del mètode 23

6. Conclusions 26

7. Bibliografia 27

Resum

La litiasi renal és una patologia caracteritzada per la formació de càlculs, que afecta entre l'1 i 10% de la població. Aquests càlculs es poden classificar en diferents grups, entre els que destaca el d'oxalat càlcic monohidrat (COM) de cavitat, que es pot subclassificar en típics i atípics, segons la seva morfologia. Els càlculs de COM de cavitat posseeixen una matriu orgànica amb un alt contingut proteic, que participa en la formació dels càlculs, i que podria ser la causant de la diferent morfologia entre els càlculs típics i atípics. Per tal de caracteritzar i diferenciar la matèria orgànica de la matriu d'aquests dos tipus de càlculs es va realitzar una extracció proteica seguint la metodologia de dos articles en què es realitzava aquest procés. Al no aconseguir dissoldre els càlculs ni obtenir resultats significatius, es va procedir a la recerca bibliogràfica d'altres medis d'extracció amb capacitat per dissoldre càlculs. Aquests es provaren en precipitats de cristalls d'oxalat càlcic, com a un model simplificat del càlcul. Un cop escollits els dos medis amb major grau de dissolució s'aplicaren a càlculs de COM aconseguint una dissolució de fins al 46% del càlcul. Mitjançant microscòpia electrònica s'observà que aquests medis dissolien el COM però no tenien la capacitat de redissoldre les proteïnes, per això s'aplicà un segon medi d'extracció més adequat al contingut proteic. Es proposa la metodologia a seguir per a una correcta caracterització i diferenciació de la matèria orgànica d'aquests càlculs.

Abstract

Renal lithiasis are a condition, affecting between 1 and 10% of the population, characterized by the formation of calculi. These can be classified into different groups, and the calcium oxalate monohydrate cavity (COM) group is one of the most important; this one can be sub classified according to their morphology into typical and atypical. COM calculi of cavity have an organic matrix with a high protein content, which is involved in the formation of calculi and could be the cause of the different morphology between typical and atypical calculi. To characterize and differentiate the organic matrix of these two types of kidney stones, the protein extraction was performed following the methodology of two articles in which this process was described. Not achieving to dissolve the calculi, no significant results were obtained. And other extraction mediums with capacity of calculi dissolution were searched into the bibliography. These other mediums were tested in crystal precipitates of calcium oxalate as a calculi simplified model. Two mediums with greater dissolution power were chosen to be applied to COM calculi of cavity, obtaining a dissolution of the calculi up to 46%. Using electronic microscopy we observed that these mediums dissolved the COM but they couldn't dissolve the proteins. A second extraction medium more appropriated to protein content was applied to solve the issue. An appropriate procedure for the characterization and differentiation of organic matter in the calculi was suggested.

1. Introducció

1.1 Litiasi renal

La litiasi renal és una malaltia caracteritzada per l'aparició de càlculs (pedres) en qualsevol estructura de l'aparell urinari com per exemple el parènquima renal, els calzes, la pelvis, l'urèter o la bufeta. Una de les característiques dels càlculs és que presenten una composició molt variada i a més les causes que indueixen la seva formació són molt diverses aquests dos fets principals fan que aquesta malaltia sigui multifactorial. Als països industrialitzats la prevalença de la litiasi renal oscil·la entre l'1 i el 10%. La majoria de litiasis (60-80%) estan compostes per sals de calci (oxalat càlcic, fosfat càlcic o ambdós) que són radioopaques. La resta són d'àcid úric (~ 8%), d'estruvita (~ 4%), cistina (~ 1%), o altres substàncies (~ 1%). La nefrolitiasi s'associa a la història familiar, estil de vida i a dietes no equilibrades (Grases *et al.* 2013).

La seva forma de presentació indicativa de la seva presència és el còlic nefrític. Aquest apareix quan un càlcul es desprèn o bé es trenca i se situa en l'estructura dels urèters i aquests presenta un diàmetre inferior al diàmetre del càlcul. Aquest fet produeix l'obstrucció total o parcial dels urèters i dificulta o fins i tot impedeix el flux constant d'orina. Aquesta orina s'acumula en zones superiors i augmenta la pressió que es produeix sobre les estructures del ronyó i els conductes urinaris de manera que s'activen els receptors nerviosos del teixit i provoquen el dolor característic. El còlic renal usualment es produeix en un sol costat, però a vegades pot passar en els dos costats de la part inferior de l'esquena. El dolor tant pot començar ràpidament, aparèixer i desaparèixer i fins i tot empitjorar amb el temps. Pot donar lloc a un dolor intens a la part inferior de l'esquena baixa o bé a l'engonal i dolor en orinar. També pot provocar nàusea i vòmit conjuntament o no amb una sensació de necessitat d'orinar freqüentment o immediatament. S'orina menys del que és normal o es produeix una anuresi. També es pot presentar febre.

La litiasi és conseqüència de dos factors principals, el primer correspon a les característiques de l'orina, ja que es pot alterar la seva capacitat de cristal·lització i el segon correspon a les característiques del lloc o estructura on s'inicia la formació del càlcul. D'acord a les diferents variants d'aquests dos grans factors poden donar lloc a una gran varietat de càlculs que han d'estudiar-se tant en la seva composició i estructura com en la seva microcomposició i microestructura. La morfologia i composició de la superfície i de la secció dels càlculs pot aportar informació no només de la composició urinària on s'han originat sinó també de les condicions anatòmiques existents en el seu origen, com la presència de dilatació pielocalicial o l'existència de cavitats causants d'estasi urinària, situacions al seu torn relacionades amb l'etiologia de la litiasi. L'anàlisi ha d'involucrar aquests aspectes i oferir informació útil per a la seva aplicació clínica. El procés utilitzat per analitzar i estudiar els càlculs renals requereix associar tècniques convencionals com l'observació macroscòpica i microscòpica amb tècniques físiques com l'espectrometria infraroja (IR) i el microscopi electrònic d'escombrat associat a la microanàlisi amb raigs X (Rx).

A partir de la informació obtinguda en els estudis dels diferents càlculs s'ha pogut establir diferents classificacions on es relaciona la composició i estructura del càlcul amb les alteracions fisiopatologiques tant de l'orina com del lloc on s'inicia la formació del càlcul. Una d'aquestes classificacions ha estat realitzada per Grases *et al.* (2001) i que es detalla a la Taula 1, en aquesta taula es presenta un sistema de calcificació útil pel clínic dels grans grups de litiasi d'acord a un tipus general de càlcul. Cal dir que cada un dels tipus es poden fer noves subclassificacions d'acord a les característiques més específiques del càlcul.

A la Taula 1 es mostra que el percentatge de càlculs d'oxalat càlcic monohidrat (COM) és similar a la d'oxalat càlcic dihidrat (33,8%). Però cal tenir en consideració que existeixen dos grups diferenciats de càlculs de COM; uns es formen en contacte amb la paret de la papil·la renal (12,9%), són els càlculs papil·lars, i uns altres es formen en les cavitats existents del ronyó (16,4 %), anomenats no papil·lars o de cavitat, que són els que s'estudiaran durant el treball.

1.2 Litiasi renal d'oxalat càlcic monohidrat de cavitat

Els càlculs de COM de cavitat es caracteritzen macroscòpicament per ser arrodonits i presentar diversos lòbuls (Figura 1) amb un diàmetre igual o superior a 1 cm, i no presenten cap punt d'unió amb l'uroepiteli.

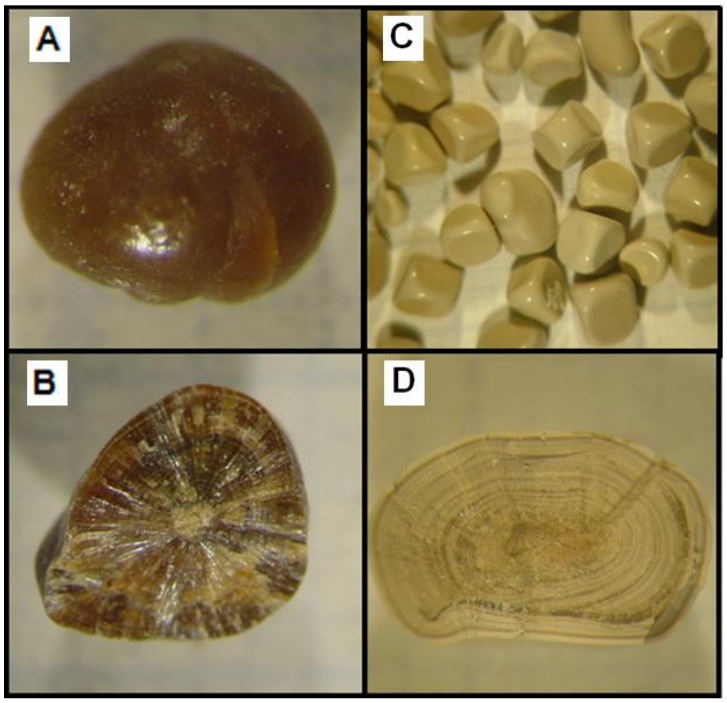

Figura 1. Imatges obtingudes mitjançant un microscopi binocular de diferents càlculs formats per oxalat càlcic monohidrat (COM). **A:** Càlcul de COM típic. **B:** Secció transversal del càlcul de COM típic. **C:** Càlculs de COM atípics. **D:** Secció transversal de càlcul de COM atípic.

Taula 1: Classificació dels tipus de càlcul segons la seva composició, característiques estructurals i la seva relació amb els factors etiològics segons Grases et. al. (2002)

Tipus de càlcul i component principal	%	Característiques estructurals	Factors etiològics
Papil·lar d'oxalat càlcic monohidrat	12,9	Nucli constituït per COM/OM (60,7%) o HAP/OM (39,2%) Mida: 2-7 mm	Dèficit d'inhibidors de la cristal·lització urinària (citrat, 36%) *** pH urinari> 6,0 (HAP quan era present, 50%) *
D'oxalat càlcic monohidrat (format a les cavitats renals)	16,4	Nucli constituït per OM (63,3%) o HAP (29,9%) o AU (6,7%) Mida: 2-15 mm	Dèficit d'inhibidors de la cristal·lització urinària (citrat, 47%)ǂ urinària pH> 6,0 quan era present HAP (58%)ǂ o pH <5,5 quan l'àcid úric era present (82%)
D'oxalat càlcic dihidrat	33,8	Contenint petites proporcions de HAP entre els cristalls de COD (55,2%) Sols COD i petites porcions de OM (44,8%) Mida: 2-15 mm	Hipercalciúria (60%)ǂ dèficit d'inhibidors de la cristal·lització urinària (citrat, 50%)ǂ pH urinari> 6,0 (HAP quan era present, 62%)ǂ
Mixt d'oxalat càlcic monohidrat i hidroxiapatita	11,2	Capes alternatives de COD/HAP (39,6%) dipòsits desordenats de COD/HAP (60,4%) Mida: 3-15 mm	Hipercalciúria (69%)ǂ pH urinari> 6,0 (68%)ǂ hipocitratúria (54%)ǂ
D'hidroxiapatita	7,1	Contenint petites proporcions de COD (54,9%) Sols HAP i OM (45,1%) Mida: 2-15 mm	pH urinari> 6.0 (75%)ǂ hipocitratúria (70%)ǂ
Infecciós de struvita	4,1	Amb altes proporcions d'HAP i OM Mida: 5-50 mm	Infecció urinària
De brushita	0,6	Normalment amb alta proporció d'HAP Mida 3-15 mm	pH urinari> 6.0c dèficit d'inhibidors de la cristal·lització
D'àcid úric	8,2	Principalment AU anhídrid (40,7%), principalment AU dihidrat (49,0%) amb AU/urats (8,8%) Mida: 1-20 mm	pH urinari <5,5 (80%) ** hiperuricuria (41%)ǂ
Mixt d'oxalat càlcic i àcid úric	2,6	Papil·lar (12,7%), no papil·lar (87,3%) Mida: 3-20 mm	Dèficit d'inhibidors de cristal·lització urinària (citrat, 54%) ** pH urinari <5,5 (46%) hiperuricuria (54%)ǂ
De cisteïna	1,1	També conté petites quantitats d'OM Mida: 3-20 mm	pH urinari hipercisteïna <5.5
Molt poc freqüent	1,9	Principal component OM (32.6%), medicaments (6,1%), residus post SWEL (10,2%), carbonat càlcic (14.3%), artefactes (36,7%)	

Els valors de la mida són aproximadament la longitud de la dimensió més llarga del càlcul. COM: Oxalat Càlcic Monohidrat, COD: Oxalat Càlcic Dihidrat, OM: Matèria Orgànica, HAP: Hidroxiapatita, AU: Àcid Úric, SWEL: "shock waves extracorporeal lithotripsy". El pH va ser mesurat en orina de 2 hores, la resta de paràmetres en orina de 24 hores. * $p<0.05$. ** $p<0.005$. *** $p<0.001$. ǂ $p<0.0001$.

Els càlculs, més característics, majoritaris o típics, són d'una coloració marró fosc. Aquests càlculs presenten una estructura cristal·lina interna diferent dels càlculs de COM papil·lars. Quan s'obren, és a dir quan es fa una secció dels mateixos, presenten una zona central ocupada pel que es denomina nucleant heterogeni que és el responsable de la seva formació. Hem de considerar que malgrat que totes les orines estan sobresaturada respecte al calci i a l'oxalat, les concentracions normals d'aquestes substàncies no són suficients per si mateixes per induir la formació de cristalls d'oxalat càlcic per nucleació homogènia de manera que necessiten un nucli de qualsevol altre substancia que sí que es pugui formar i que serà de composició diferent de la resta majoritària del càlcul. Aquest nucli, responsable de la formació, pot estar formar per matèria orgànica (proteïnes, detritus cel·lulars, etc.), hidroxiapatita, àcid úric, medicaments, etc.). Damunt aquest nucli o cor central creix l'oxalat monohidrat columnar que acabarà constituint el càlcul.

Com s'ha indicat, les concentracions de calci i oxalat són insuficients per justificar la formació dels cristalls de COM per cristal·lització homogènia i, per això, és imprescindible l'existència de promotors (nucleats heterogenis). Aquests promotors es formen en diferents circumstàncies: els nuclis de fosfat de calci (hidroxiapatita) es produeixen quan el pH urinari és superior a 6; els d'àcid úric quan el pH és inferior a 5.5; i els de matèria orgànica quan existeix proteïnúria o abundants detritus cel·lulars deguts a qualsevol patologia (Galán *et al.* 1996).

L'etapa inicial imprescindible en la gènesi d'una massa cristal·lina consisteix en la formació dels anomenats nuclis cristal·lins. La nucleació implica la formació d'una partícula d'una mida mínima però estable amb capacitat de seguir creixent.

En la nucleació homogènia, la formació d'aquesta partícula mínima es produeix per la unió d'espècies que constituiran els futurs cristalls, així la composició del nucli i del futur cristall és la mateixa. El procés és difícil i poc probable, ja que exigeix el xoc o trobada de forma simultània i successiva de les espècies que constituiran els nuclis. Aquest procés exigeix sobresaturacions molt elevades.

Per altra banda, la nucleació heterogènia que origina els càlculs de COM de cavitat és més senzilla, només és necessària la presència de qualsevol partícula sòlida ja existent amb capacitat d'atraure i retenir en la seva superfície les espècies químiques que constituiran el futur cristall a partir d'una fase que s'anomena de creixement cristal·lí. En aquests casos el nucli presenta una composició diferent de la resta del cristall. Al ser més senzilla, la nucleació heterogènia es pot produir amb sobresaturacions de les espècies químiques més baixes. Una vegada s'ha constituït un nucli, sigui homogeni o heterogeni, la massa cristal·lina es desenvolupa tant per fases de creixement cristal·lí com per processos d'agregació primària i/o secundària.

El creixement cristal·lí suposa la incorporació gradual de més unitats sobre les cares del cristall prèviament format, aquestes noves unitats cristal·lines es dipositen en llocs energèticament afavorits. Aquest fenomen es produeix fàcilment en dissolucions sobresaturades (Pak *et al.* 1971).

L'agregació primària, impulsada i afavorida pels cristalls ja constituïts o cristalls pares, implica la formació de nous cristalls, els anomenats cristalls fills. Les cares dels primers cristalls actuen afavorint el creixement dels nous cristalls. Aquest fenomen no es produeix amb la mateixa facilitat en tots els cristalls, però sí en els cristalls d'oxalat càlcic (Grases *et al.* 1998).

L'agregació secundària és el procés pel qual s'estableixen enllaços febles entre cristalls ja constituïts, que resulten en la formació d'un cristall major. La relació entre cristalls és afavorida per la presència de substàncies que actuen com a pont d'unió entre cristall i cristall. Aquest procés sols es pot produir quan en el medi hi ha una gran quantitat de cristalls. En el cas del COM l'agregació secundària és escassa o bé inexistent i, per tant, la contribució de l'agregació secundària és insignificant en la formació del càlcul (Grases *et al.* 1992).

A més dels càlculs de COM de cavitat típics, n'existeix un altre subgrup que anomenem atípics. Aquests presenten una coloració amb unes tonalitats grisenques/marró clar i amb una aparença més brillant (Figura 1C). També presenten una estructura interna clarament diferenciada. Ambdós tipus tenen un cor o nucli central des d'on sorgeixen capes de cristalls de COM; però els càlculs atípics presenten unes capes amb una estructura semblant a la secció transversal d'un tronc d'arbre, amb un seguit de capes concèntriques d'anells (Figura 1D). En canvi en els típics aquestes capes sorgeixen de forma radial i concèntrica però sense formar anells sinó que formen una estructura compacta i ordenada (Figura 1B).

1.3 Matèria orgànica en la litiasi oxalo-càlcica

Entre un 2 i un 6% del pes sec dels càlculs d'oxalat de calci és material orgànic no dialitzable de pes elevat (Boyce & Garvey, 1956), aquest material s'ha denominat matriu orgànica. Aquesta matriu està situada al llarg del càlcul en un patró aparentment ordenat de làmines concèntriques fibroses i que s'interrelacionen amb estries radials que envolten el material cristal·lí (Malek & Boyce 1977). Al voltant del 64% de la matriu està format per proteïna (Boyce & King 1959). La caracterització d'aquesta proteïna podria ajudar a aclarir el paper de la matriu en la gènesi del càlcul. Però s'ha determinat que només aproximadament un 25% de la matriu és soluble fàcilment (Boyce *et al.* 1962), cosa que dificulta la identificació de les proteïnes existents. La resta de la composició proteica (75%) és igualment difícil de determinar.

Aquesta proteïna pot tenir dos orígens diferents; un és el que permet la nucleació heterogènia i el creixement inicial de cristalls d'oxalat de calci. Aquests cristalls inicials contenen una matriu de components orgànics urinaris normals (Khan & Hackett 1987) que estan en proporció a la seva afinitat amb la superfície del cristall (Leal & Finlayson 1977). Existeix la hipòtesi de què la proteïna restant, la que no correspon als components orgànics urinaris normals, procedeix de quan aquests cristalls creixen provocant l'abrasió de l'uroteli renal que estimula la producció d'un segon tipus de proteïna. A partir d'aquesta abrasió, la nova composició proteínica de l'orina que banya els cristalls pot formar

una matriu distinta, amb un component químicament diferent del que presenta el càlcul durant la nucleació que s'absorbeix damunt les superfícies dels cristalls.

La formació de les primeres partícules cristal·lines per nucleació heterogènia així com la seva posterior retenció dins del sistema col·lector renal són essencials en la nefrolitiasi per a la patogènesi de la pedra, però podem considerar que el pas crític és el primer, perquè d'ell en depèn el segon.

L'estudi del material de la matriu ha estat realitzat per Morse i Resnick (1988) de forma in vitro a partir de la introducció de cristalls d'oxalat càlcic en l'orina i l'adsorció de proteïnes en ells i la posterior anàlisi del component proteic absorbit als cristalls d'oxalat de calci mitjançant l'electroforesi en gel. Els resultats de l'estudi indiquen que s'incorporen proteïnes urinàries normals en els cristalls de forma selectiva, pel fet que les quantitats de proteïnes individuals presents en els cristalls no reflecteixen les concentracions relatives de les diferents proteïnes que es troben en l'orina. Cal dir que aquesta és una conclusió obvia, ja que les proteïnes s'incorporaran sobre una determinada superfície en funció de les seves característiques i no totes les proteïnes presenten el mateix comportament de forma igual en tots els medis.

2. Objectiu

L'objectiu primari d'aquest treball és estudiar la metodologia per poder determinar les característiques de la matèria orgànica (proteïnes) de dos tipus de càlculs d'oxalat càlcic monohidrat no papil·lar que presenten una estructura interna un poc diferenciada i que hem subclassificat com a típics o majoritaris i atípics o minoritaris i d'aquesta forma determinar sí existeixen diferències en el contingut orgànic d'aquests càlculs, i sí aquest contingut diferent determina la seva diferent morfologia. L'objectiu secundari serà definir quins medis d'extracció tenen millor capacitat de dissoldre o descalcificar els càlculs i resolubilitzar la fracció proteica.

3. Materials i mètodes

3.1 Extracció i determinació del contingut proteic

Inicialment es va fer una recerca bibliogràfica dels mètodes i medis d'extracció usats per a l'extracció i determinació del contingut proteic en càlculs de litiasis per tal d'aplicar-los als càlculs.

3.1.1 Preparació de les mostres

Les mostres utilitzades procedien de pacients dels hospitals universitaris de Palma (Son Dureta i Son Espases) entre els anys 1986 i 2013. De la biblioteca de càlculs se n'escolliren dues mostres

diferents: la 3786SD que corresponia a un càlcul del grup de COM típic que anomenàrem Mostra 1; i la 4632SD, que corresponia a un càlcul del grup de COM atípic que anomenàrem Mostra 2.

Els càlculs es van netejar amb una solució de rentat (250 mL aigua destil·lada 0.9% de clorur sòdic i una gota de sabó líquid). Cada grup de càlculs va ser introduït dins un tub de 15 mL de plàstic amb 5 mL de la solució de rentat. Després es va aplicar 3 minuts de vòrtex seguit d'1 minut de sonicador i, finalment, es va descartar el sobrenedant. Aquest procés es va repetir 3 cops. Després es va aplicar 3 minuts de vòrtex als càlculs amb 5 mL d'acetona al 98.5% i es va deixar a temperatura ambient fins a la completa evaporació de l'acetona. Els càlculs van ser polvoritzats amb l'ajuda d'un morter d'àgata.

3.1.2 Recerca bibliogràfica

Es van buscar articles dels últims 10 anys a PubMed i Google Acadèmic, en els que s'utilitzessin medis d'extracció de proteïnes en mostres amb gran component càlcic, i que s'obtinguessin una concentració proteica final elevada. Es van seleccionar dos medis d'extracció: El Medi A, que contenia 0.5 mM EDTA a pH 7.4 (Toyoda *et al.* 2012) i el Medi B que contenia 10 mM EDTA i 4 M de clorhidrat de guanidina a pH 8 (Sáez-Torres *et al.* 2004), els dos suplementats amb inhibidors de proteases.

3.1.4 Extracció proteica

L'extracció començà preparant els diferents grups, en cada un d'ells el polvoritzat de càlcul es va dividir en dues alíquotes de 100 mg en tubs d'Eppendorf, els quals foren pesats abans, per tal de poder controlar el nivell de dissolució i d'extracció del càlcul. En una de les alíquotes es va afegir 1 mL del Medi A i en l'altre 1 mL del Medi B. Els Eppendorf es van deixar durant 96 hores a 4ºC en agitació constant; aquesta agitació s'aconseguí mitjançant un mesclador compacte horitzontal d'Eppendorf.

3.1.5 Diàlisi

Després de les 96 hores es van centrifugar les mostres a 10000xg durant 5 minuts a 4ºC. Els precipitats foren rentats dos cops mitjançant 1 mL d'aigua destil·lada, i un minut de vòrtex seguit d'una centrifugació a 10000xg durant 3 min, i finalment eliminar el sobrenedant. Els precipitats restants foren guardats en Eppendorf oberts durant 72 hores a 60 ºC per tal d'eliminar les restes d'aigua i posteriorment van ser pesats per saber el pes del càlcul no dissolt restant.

Es van agafar els sobrenedants i s'introduïren dins sacs de diàlisi prèviament activats mitjançant 10 minuts de bany maria. Les mostres del Medi A es van introduir dins un Erlenmeyer amb 1 L d' aigua destil·lada, i el del Medi B dins un altre Erlenmeyer de 500 mL amb PBS. Els dos Erlenmeyers es van mantenir a 4 ºC durant 48 hores i amb agitació constant, realitzant 4 canvis de medi.

Aquesta diàlisi abans del procés de quantificació de la proteïna, es realitzà per tal d'eliminar possibles components dels medis que poguessin interferir amb les reaccions futures, ja que la guanidina i els agents quelants com el EDTA poden interferir de manera important.

3.1.6 Precipitació de proteïnes

Per concentrar el contingut proteic de les mostres s'utilitzà el mètode per concentrar proteïnes mitjançant acetona, després de la diàlisi es van introduir 4 volums d' acetona a -4 ºC a cada mostra, i ràpidament s'incubaren 1 hora a -80ºC. Després es van centrifugar a 5000g durant 5 minuts, tal com s'ha vist en la bibliografia (Barritault *et al.* 1976). Els precipitats es van deixar reposar fins que tota l'acetona es va evaporar, i es van resuspendre en 120 µL de tampó de càrrega d'electroforesis.

3.1.7 Microscòpia electrònica

S'utilitzà la microscòpia electrònica de rastreig per tal de determinar l'estructura cristal·lina del polvoritzat abans i després del procés d'extracció, alhora que mitjançant una microanàlisi per energia dispersiva de rajos X (EDAX) per determinar la composició química de les mostres i determinar la seva diferencia durant el procés d'extracció.

3.1.7.1 Microscòpia electrònica de rastreig

L'estructura interna de les mostres es van observar amb un microscopi electrònic de rastreig Hitachi SJ530. El microscopi electrònic de rastreig mitjançant un camp magnètic permet enfocar els rajos catòdics (electrons) i obtenir una imatge tridimensional que permet l'examen de la superfície de les estructures i la seva caracterització. Això permet observar l'estructura cristal·lina amb augments situats entre 65x i 2000x per distingir les estructures cristal·lines realitzant diverses imatges de les mostres.

Algunes mostres es van recobrir d'or per augmentar la conductància de la seva superfície, fent que el feix d'electrons primaris xoquessin contra la mostra recoberta i obtenint imatges amb una major resolució. Aquest procediment es realitzà amb un ruixador o *sputter coater* que recobreix la mostra amb una finíssima capa d'or.

3.1.7.2 Microanàlisi per energia dispersiva de rajos X

La microanàlisi per EDAX és una tècnica utilitzada en microscòpia electrònica d'escombratge consistent en determinar l'emissió fluorescent generada a partir d'una font emissora de rajos X que es projecten sobre superfícies puntuals d'una mostra. Els rajos X incideixen sobre determinats àtoms i aquesta energia expulsa electrons de les capes interiors de l'àtom. En quedar lliures aquestes capes inferiors, els electrons de capes més externes els ocupen, i l'excés d'energia existent en aquesta transició es dissipa en forma de fotons corresponents a radiació X fluorescent; aquesta radiació és característica de cada element químic, possibilitant identificar els diferents elements de la mostra (Beckhoff, 2008).

3.1.8 Valoració de la proteïna extreta

Per tal d'analitzar el possible efecte del contingut proteic en la formació dels càlculs va ser necessari determinar tant els nivells de proteïna de cada tipus de càlcul, com la distribució d'aquestes proteïnes segons el seu pes molecular mitjançant un *western blot*. Aquesta informació ens dóna una mena d'empremta proteica de cada càlcul, permetent-nos realitzar una primera comparació entre elles. Per poder calcular la quantitat de proteïna que es va aconseguir extreure del polvoritzat de càlcul s'utilitzà el mètode del BCA (Walker, 2009).

Es va fer una quantificació proteica després de la diàlisi i abans del *westen blot*. La separació del contingut proteic es va realitzar amb una electroforesi en un gel d' acrilamida al 10%, on es van carregar 10 µg de mostra en 10 µL. El gel es va deixar córrer durant 40 minuts a 200 V, després es va tenyir durant 2 hores i es va deixar destenyir durant 48 hores.

3.2 Optimització del mètode d'extracció

En una segona part, com a conseqüència dels resultats obtinguts, es va optar per fer una recerca més amplia i determinar quins dels medis d'extracció produïa uns resultats més òptims intentant solucionar algunes de les deficiències observades durant la primera part.

3.2.1 Recerca bibliogràfica de mètodes d'extracció

Per tal d'escollir el medi d'extracció més eficient primer es va realitzar una nova recerca bibliogràfica a PubMed i Google Acadèmic. Per a la cerca s'utilitzaren els següents termes:

protein OR calcium oxalate monohydrate OR Stone OR kidney OR extraction method OR urinary.

El nombre d'articles que contenien aquests termes foren 6.387.197 en PubMed i 6.860.000 en el Google Acadèmic, a causa d'aquest major nombre de coincidències es va decidir seguir amb una recerca més precisa a Google Acadèmic, en la que es va cercar:

*(protein OR proteome) AND (calcium oxalate OR calcium) AND (extract OR extraction) AND (kidney stones OR renal calculi OR stones OR calculus) -dietary * i que fossin posteriors al 1970*

Aquesta recerca donà 5510 resultats, dels quals es van seleccionar els que realment realitzaven una extracció proteica a partir de càlculs de COM alhora que fossin reproduïbles en les instal·lacions disponibles. Es van ometre molts d'articles que eren repeticions o comprovacions d'articles més antics, o que usaven exactament el mateix medi d'extracció. Després d'aquest procés es van seleccionar els 5 medis d'extracció que es poden veure detallats en la Taula 2, on se'n pot observar la diferent composició.

Taula 2: Medis d'extracció seleccionats de la bibliografia. En cada medi se separen els components segons la seva funció.

Medi	Referència	pH	Quelant	*Buffer*	Agents reductors	Agent desnaturalitzant de proteïnes	Inhibidor de proteases
C	(Toyoda *et al.* 2012)	7,4	EDTA 5 mM	50 mM Tris-HCl		Clorhidrat de guanidina 4 M	1 mM PMSF
D	(Williams *et al.* 2006)	8	EDTA 250 mM				Clorhidrat de benzamidina 1 mM
E	(Lian *et al.* 1977)	8	EDTA 500 mM				
F	(Canales *et al.* 2010)	N.E		60 mM Tris-HCl	5 % BME	2 % SDS + 10% Glicerol	
G	(Okumura *et al.* 2013)	8	EDTA 50 mM	10 mM Tris-HCl	10 mM DDT	7 M Urea + 2 M Tiourea	

BME= β-Mercaptoetanol PMSF: fluorur de fenilmetanosulforil DDT: 1,1-Bis(4-chlorofenil)-2,2,2-tricloroetà N.E= No especificat

3.2.2 Formació de precipitats de cristalls d'oxalat càlcic

Una vegada seleccionats els 5 medis d'extracció es va procedir a determinar quins d'ells tenien una major capacitat de dissolució del càlcul. Amb aquest fi, es va procedir a realitzar un estudi comparatiu en què s'avaluà la capacitat de dissoldre cristalls *in vitro* de COM durant un període de 24 h. Es va escollir el sistema de formar cristalls d'oxalat càlcic *in vitro* per tal d'augmentar el control sobre la mostra a dissoldre, ja que permet controlar els tipus de cristalls que es formen així com la seva mida i aquest procediment és molt més fàcil que utilitzar els càlculs de COM de cavitat de la biblioteca del Laboratori d'Investigació en Litiasi Renal. Per això s'utilitzà el procediment descrit per formar dipòsits homogenis de petita mida d'oxalat càlcic (Saso *et al.* 1998).

Amb la finalitat d'identificar quin dels medis d'extracció tenia una major capacitat de dissolució del COM es van formar 60 precipitats *in vitro* de COM. Es van preparar 50 mL d'una dissolució d'oxalat sòdic 0.1 M a pH 6 i 50 mL de clorur de calci 0.1 M a pH 6, els pH van ser corregits amb l'ajuda d'un pHmetre i de dissolucions concentrades d'àcid clorhídric i hidròxid potàssic.

Per tal de poder saber el pes dels cristalls produïts, els 60 Eppendorf de 1.5 mL es van enumerar i pesar amb una balança de precisió de 4 decimals. Posteriorment, es van introduir 500 µL de cada solució dins cada un dels Eppendorf, i es van deixar reposar durant 30 min a temperatura ambient. Després es van centrifugar a 16000g durant 5 minuts, formant un precipitat compacte. El sobrenedant va ser descartat, i es va introduir 1 mL d'aigua destil·lada per netejar possibles restes no precipitades. Seguidament, es va fer una altra centrifugació amb les mateixes condicions i es va tornar a descartar el precipitat. Els Eppendorf es van deixar 24 hores a una estufa a 60 graus centígrads, per evaporar les restes d'aigua. Un cop transcorregudes les 24 hores es van tornar a pesar els Eppendorf.

3.2.3 Formació de precipitats de cristalls d'oxalat càlcic amb albúmina

Per altra banda es van preparar 30 precipitats de cristalls d'oxalat càlcic amb albúmina (COM+Alb) per poder simular una situació similar als càlculs de COM de cavitat, i així poder determinar la capacitat d'extracció del medi a estudiar. Per la formació dels cristalls es va seguir el mateix protocol que amb els cristalls sense albúmina, però introduint 8 mg/dL d'albúmina en les dissolucions d'oxalat sòdic i de clorur de calci perquè aquest valor correspon al límit superior del valor normal de contingut proteic en orina (Dugdale *et al.* 2013).

3.2.4 Interacció de dissolucions d'oxalat sòdic i clorur càlcic amb els medis d'extracció

Amb la finalitat de comprovar que durant el procés de formació dels cristalls d'oxalat càlcic no es produïa cap altra compost precipitat que produís una interferència, es va observar la interacció entre l'oxalat sòdic 0,1 M a pH 6 o el clorur de calci 0,1 M a pH 6 amb cada uns dels medis d'extracció i observar si es produïa algun compost precipitat. Per això es van introduir 500 µL de cada una de les dues dissolucions amb 1 mL de cada medi d'extracció dins un Eppendorf prèviament pesat.

3.2.5 Aplicació dels medis d'extracció als precipitats de cristalls d'oxalat càlcic i en les mostres dels càlculs

Primer de tot es van provar els 5 medis d'extracció seleccionats de la bibliografia amb els precipitats de cristalls de COM formats dins Eppendorf. Es van fer 5 grups, un per cada medi d'extracció, amb 10 precipitats cristalls per a cada grup, i es va introduir 1 mL del medi d'extracció corresponent a cada Eppendorf de precipitats de cristalls. Es van deixar els Eppendorf 24 hores amb agitació continua, utilitzant un agitador de plaques modificat, per tal d'evitar que es dipositès el precipitat en el fons de l'Eppendorf i no s'agites.

A les mostres de cristalls de COM+Alb només es van fer 2 grups de 10 Eppendorfs de precipitats de cristalls cada un, el primer es va tractar amb el Medi D i el segon amb el Medi E. Es va introduir 1 mL de medi d'extracció i es va deixar 24 hores amb el mateix tipus d'agitació.

Finalment es va estudiar els dos millors medis en els dos tipus de càlculs estudiats en la primera part del treball. Es va introduir 100 mg de polvoritzat de cada tipus de càlcul a un Eppendorf prèviament pesat per duplicat, a cada duplicat de cada grup es va introduir 1 mL de Medi D i a l'altre el Medi E. Es van deixar 48 hores amb el mateix tipus d'agitació. Transcorregut aquest temps, es va realitzar una centrifugació a 16000g durant 5 minuts, s'eliminà el sobrenedant i es va introduir 1 mL del Medi F que d'acord a la Taula 2 és el que té una major capacitat d'extraure proteïnes però no de dissoldre càlculs de COM, i es deixaren durant 24 hores en agitació.

3.2.6 Avaluació de l'extracció

Es va escollir com a paràmetre per determinar l'eficàcia de l'extracció la capacitat del medi d'extracció per dissoldre tant el COM així com de tornar les proteïnes que poguessin estar atrapades

al seu estat dissolt. S'utilitzà com a mesurant la diferència de pes del càlcul o cristall abans ($W_P - W_E$) i després ($W_R - W_E$) de l'extracció per tal de determinar la capacitat o percentatge de dissolució, obtenint el tant per cent de càlcul o cristall dissolt ($\%_{dissolt}$). On W_E és el pes de l'Eppendorf buit, W_P és el pes de l'Eppendorf amb el precipitat i W_R és el pes després de l'extracció, tal com descriu Saso, Valentini (1998) amb la següent fórmula:

$$\%\ \text{dissolt} = \left(\frac{(W_p - W_E) - (W_R - W_E)}{(W_P - W_E)} \right) * 100$$

Per tal d'obtenir els pesos dels Eppendorf després de l'extracció, els precipitats resultants d'aquesta es van centrifugar a 16000g durant 5 minuts, es va descartar el sobrenedant, es va netejar amb 1 mL d'aigua destil·lada i es va repetir la centrifugació. Abans de ser pesats es van deixar 8 hores a una estufa a 60 ºC.

3.2.7 Microscòpia electrònica

S'utilitzà la mateixa metodologia de microscòpia electrònica de rastreig que s'ha descrit a l'apartat 3.1.7.1 per comprovar l'estructura dels cristalls i càlculs abans i després de l'extracció.

3.2.8 Estadística

El programa Microsoft Office Excel 2010 es va emprar per a l'anàlisi estadística. Les diferències significatives entre valors medis van ser determinades mitjançant la prova *t* d'Student. Es considerà com a significança estadística un valor de $p < 0{,}05$.

4. Resultats

4.1 Avaluació de l'extracció del contingut proteic

4.1.1 Procés d'extracció

Després del procés d'extracció el precipitat resultant en tots els medis i tipus de càlcul no va ser significativament diferent del pes del polvoritzat introduït, i tots els sobrenadants tingueren la mateixa aparença, amb un color groc marronós fluix. Es van recuperar posteriorment a la diàlisi dels sobrenadants del Medi A 4 mL, 2,5 mL de les mostres 1, 2 respectivament. Per altra banda, del Medi B es van obtenir 1 mL, 1 mL de les mostres 1, 2 respectivament.

4.1.2 Quantificació de proteïnes

La determinació posterior a la diàlisi de la concentració de proteïna donà com a resultat que totes les mostres estaven situades per sota del valor de concentració inferior de la recta patró, impedint que es poguessin quantificar. Després de la concentració amb acetona les mostres tractades amb el Medi A van donar les següents concentracions (mg de proteïna per gram de càlcul): 1,07 mg/g la mostra 1 i 0,21 mg/g la mostra 2. D'altra banda, les tractades amb el Medi B: 0,31 mg/g la mostra 1 i 0,37 mg/g la mostra 2. Aquests resultats donaren valors entre la primera i la segona concentració de la recta patró.

4.1.3 Western Blot

La tinció del Western Blot va resultar insuficient i sols es van poder apreciar molt dèbilment algunes bandes (imatge no adjuntada).

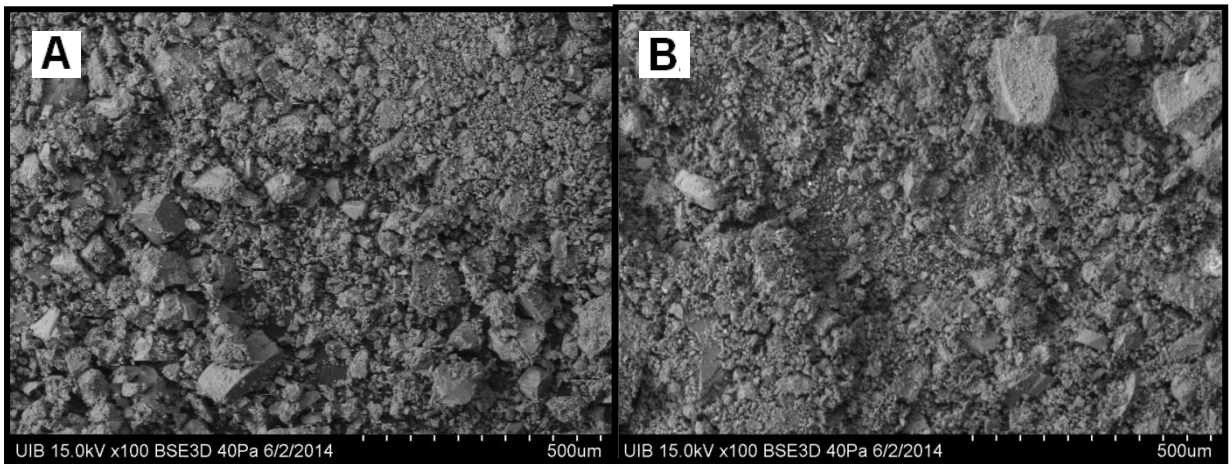

Figura 2: Imatges obtingudes mitjançant microscopi electrònic de rastreig (Hitachi SJ530) on s'observa l'estructura microscòpica de les mostres de càlculs renals d'oxalat càlcic monohidrat abans (A) i després de l'extracció proteica (B). Les condicions en que es van prendre les imatges es troben descrites en la part inferior de cada una d'elles.

4.1.4 Microscòpia electrònica

L'observació de les mostres abans i després de l'extracció amb la microscòpia electrònica de rastreig va corroborar que l'estructura no havia sofert pràcticament cap modificació en cap de les mostres després de l'extracció. Obtenint-ne en els dos casos cristalls amb estructures ben definides, com es pot observar a la Figura 2.

La microanàlisi per energia dispersiva de rajos X va determinar que la composició atòmica dels principals components dels polvoritzats abans de l'extracció era en tots els casos molt similars. El component que es trobà en un major percentatge respecte a el seu pes total en la mostra va ser

l'oxigen (54,10±0,29 %), seguit del calci (29,12±1,22 %), després del carboni (15,14±1,5%) i finalment del fòsfor (1,43±0,10 %).

L'anàlisi de les mostres després de l'extracció mostrà que totes tenien una composició similar, on el principal component també era l'oxigen (54,72±1,17 %), seguit del calci (32,13±2,06 %), després del carboni (12,69±1,15 %) i finalment del fòsfor (0,46±0,1%). En la Figura 3 es poden observar les diferències entre les mostres abans i després de l'extracció representades en el tant per cent de variació del pes relatiu de cada compost.

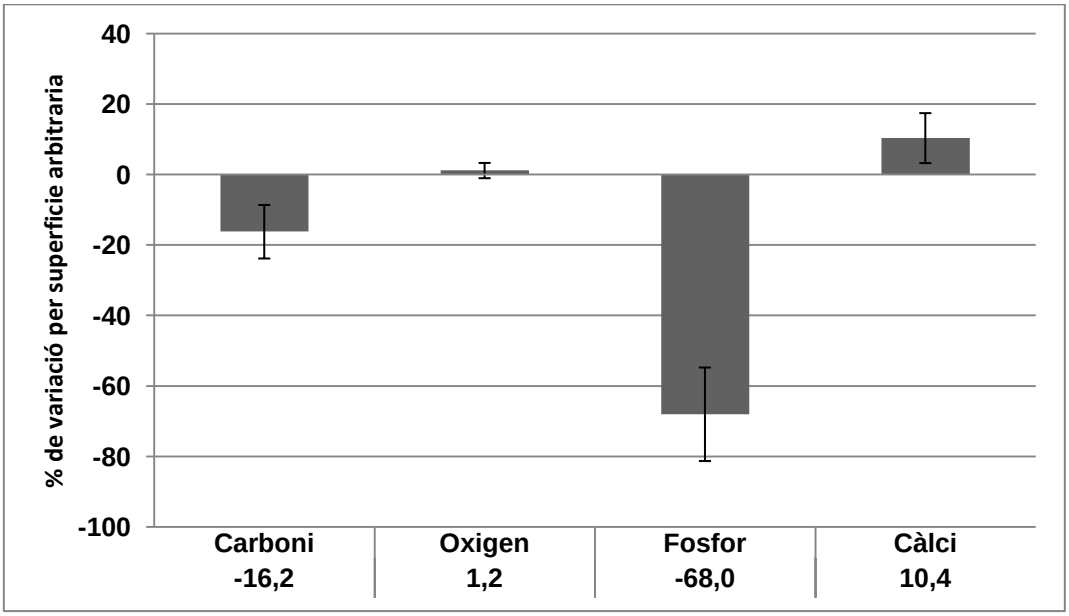

Figura 3: Efecte de l'extracció proteica sobre els polvoritzats de càlculs de COM de cavitat. Els valors es representen en % de variació en la quantitat de l'element en la superfície de la imatge de microscòpia de rastreig després de l'extracció respecte a la composició inicial. Les dades es van obtenir per EDAX mitjançant un microscopi electrònic Hitachi SJ530.

4.3 Optimització del mètode

4.3.1 Formació de cristalls d'oxalat càlcic

El resultat del procés de formació de cristalls de COM *in vitro* foren cristalls homogenis de 7±0.28 mg de mitjana. Dels cristalls de COM+Alb en resultaren cristalls de 6,5±0.28 mg de mitjana.

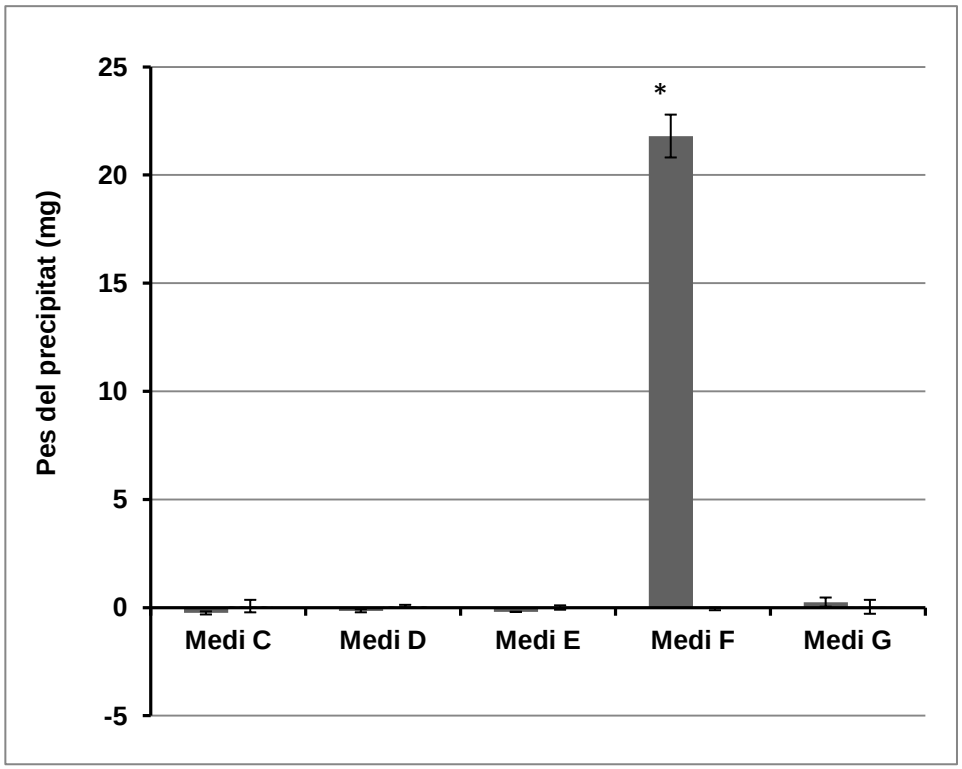

Figura 4: mg de precipitat format al interaccionar 500 µL de Ca_2Cl 0,1 M, sèrie llisa, o 500 µL d'oxalat sòdic 0,1M, sèrie retxada, amb 1 mL de cada un dels medis d'extracció durant 24 hores. * $p<0.05$ comparat amb la resta de grups.

En la determinació de l'existència d'interacció o precipitació entre la dissolució d'oxalat sòdic amb els medis d'extracció (C-G) observarem que pràcticament no existia cap interacció, ja que el pes del precipitat es situa dins dels límits de ±1 mg. De forma similar passa amb la dissolució de clorur de calci a excepció del Medi F que forma un precipitat de 21,80±0,99 mg tal com es pot observar a la Figura 4.

4.3.2 Aplicació del medi d'extracció

Després del procés d'extracció sobre els precipitats de cristalls de COM *in vitro*, i aplicant la fórmula de l'apartat 3.2.6, el resultat fou que el Medi D va dissoldre el 67,1±21,0 % i el Medi E el 63,9±17,4 del precipitat mentre que els altres medis no el van dissoldre sinó que van augmentar el pes del precipitat tal, obtenint valors negatius de dissolució, tal com s'observa en la Figura 5.

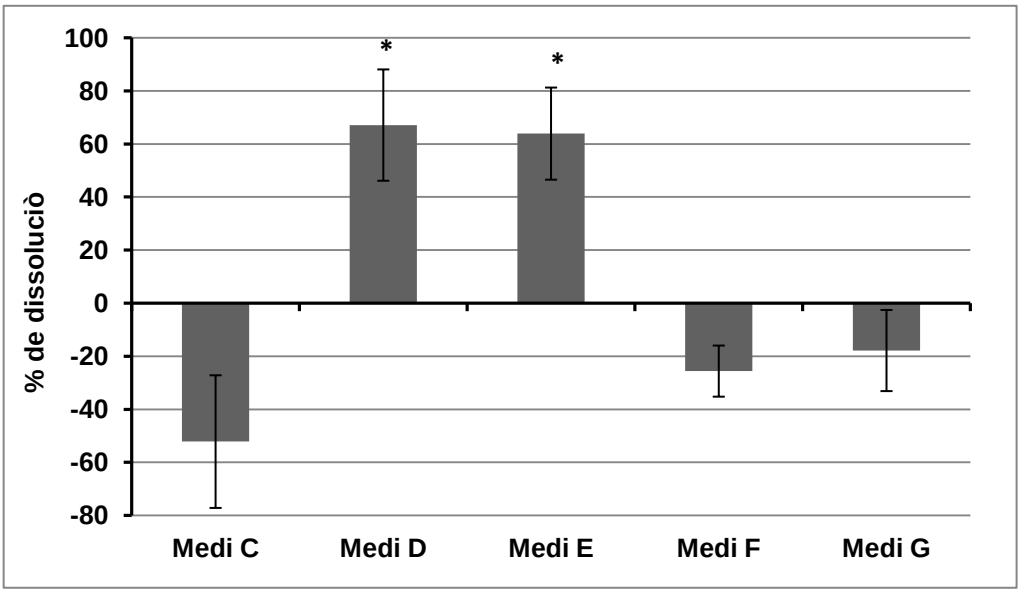

Figura 5: Percentatge de dissolució dels cristalls COM *in vitro* al ser tractats durant 24 hores amb agitació constant amb cada un dels medis d'extracció estudiats. Un augment del pes del precitat obtenim valors negatius de dissolució. *p< 0.05 entre els Medis D i E i la resta

En el cas dels precipitats de cristalls de COM+Alb el Medi D va dissoldre el 105,5 ±4,1% cristall i el Medi E el 96,8 ±12.7 % del precipitat com es pot observar en la Figura 6.

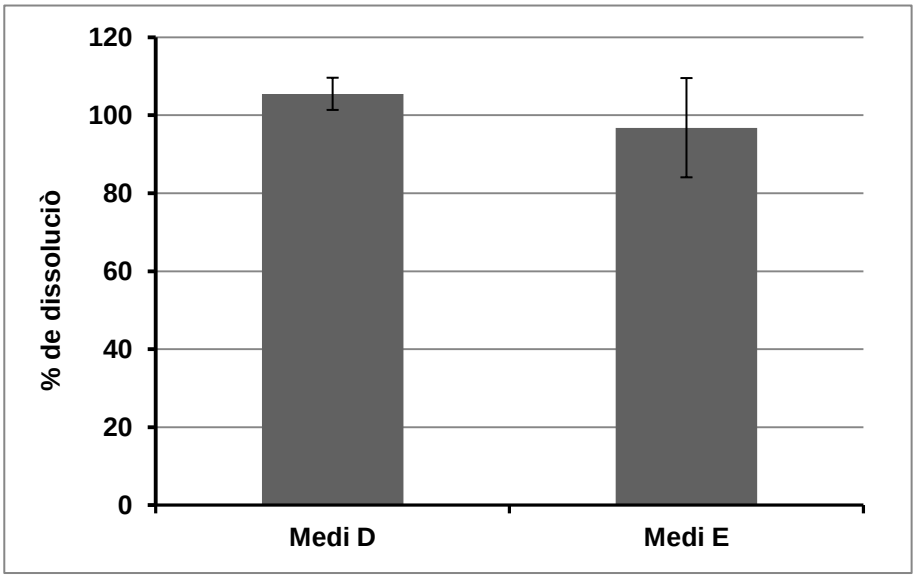

Figura 6: Percentatge de dissolució dels cristalls COM +Alb *in vitro* amb els medis d'extracció D i E. Després de 24 hores d'extracció amb agitació constant.

Finalment, es va avaluar l'extracció dels polvoritzats de càlcul tractats amb els medis d'extracció D o E i, posteriorment, amb l'F, utilitzant la mateixa fórmula que en els punts anteriors. En la Mostra 1 tractada amb el Medi D + F es va produir una dissolució del 41,7% del càlcul i la Mostra 2 del 46,2%, i quan van ser tractades amb el Medi E + F la Mostra 1 va ser del 43,9% i la Mostra 2 del 44,6% (Figura 7).

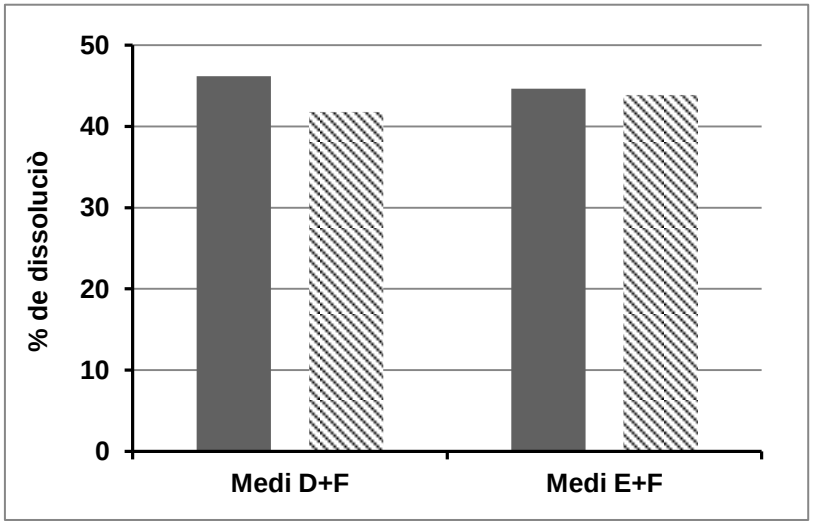

Figura 7: Percentatge de dissolució dels polvoritzats dels càlculs de COM típic (Mostra 1) representat per les barres solides i de COM atípic (Mostra 2) representat per les barres retxades amb extracció amb els medis D o E amb agitació constant després de 48 hores, i posteriorment amb el medi F durant 24 hores.

4.3.3 Microscòpia Electrònica

L'observació de les mostres mitjançant la microscòpia electrònica de rastreig va permetre observar com era l'estructura microscòpica del precipitat de cristalls *in vitro* de COM (Figura 8A) i del precipitat de cristalls *in vitro* COM+Alb (Figura 8B) abans del tractament. Podem observar una estructura amb agregats de cristalls de COM poc diferenciada, que és diferent a la dels càlculs urinaris.

També observem les mostres de càlculs de COM polvoritzats de la Mostra 1 un cop s'ha fet l'extracció mitjançant el Medi D, s'observa la quasi absència de cristall de COM i sols queda la matriu orgànica insolubilitzada (Figura 8C). El mateix ocorre amb la Mosta 1 tractada amb el medi E (Figura 8D).

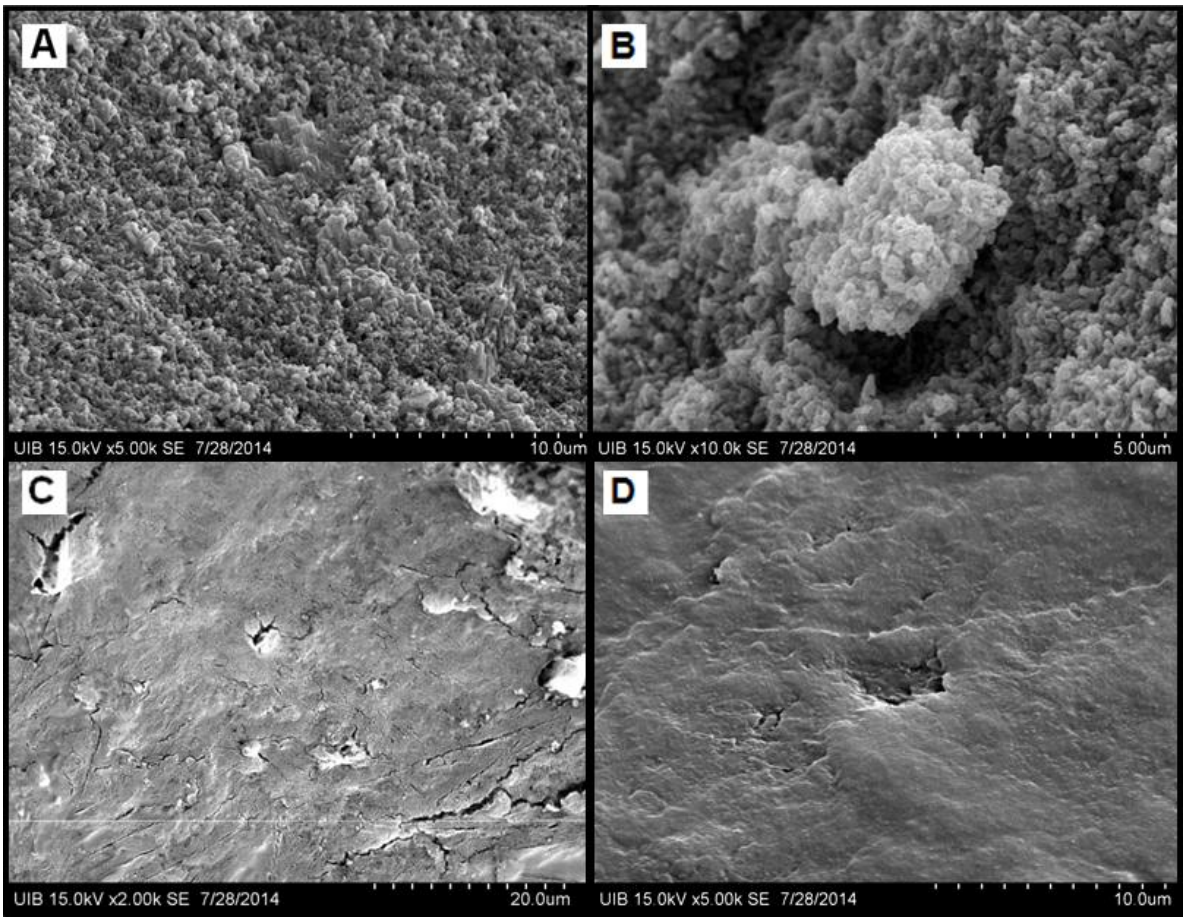

Figura 8: Imatges obtingudes mitjançant microscopi electrònic de rastreig (Hitachi SJ530) **A:** Estructura microscòpica de les mostres dels cristalls precipitats *in vitro* de COM. **B:** Estructura dels cristalls precipitats *in vitro* de COM+Alb. **C** Precipitat resultant de l'extracció mitjançant el Medi D del polvoritzat de la Mostra 1 del càlcul de COM .**D** Precipitat resultant de l'extracció amb el Medi E del polvoritzat de la Mostra 1 del càlcul de COM.

5. Discussió

5.1 Extracció i determinació del contingut proteic

L'objectiu principal del treball era caracteritzar i determinar les possibles diferències en el contingut de la matriu orgànic de dos subgrups de càlculs COM de cavitat amb característiques morfològiques clarament diferents, els típics i els atípics.

En la primera s'escolliren dos medis d'extracció que destacaven en la bibliografia per la seva facilitat d'elaboració i pel gran contingut aparent de proteïna extreta. En el cas del Medi A s'extreien

teòricament 153 mg de proteïna per litre (Toyoda *et al.* 2012), que segons la bibliografia es una xifra moderadament elevada. Per altra banda, s'escollí el Medi B, on s'obtenia una reducció del component mineral del 25%.

Els resultats obtinguts s'allunyaren molt dels indicats pels articles. Això podria ser causat, en el cas del Medi A, per una falta d'explicació concreta de tot el procés seguit per dissoldre el càlcul, ja que sols s'esmenta la utilització d'un Eppendorf de 1,5 mL on s'introdueix el medi d'extracció, però no especifica quina quantitat de medi emprat. Per altra banda, al resultat que expressa, els 153 mg/L, no ho refereix respecte a cap unitat de càlcul sinó a un volum del medi d'extracció. També cal destacar que no indica el percentatge de càlcul dissolt que ha aconseguit. Per altra part, el Medi B s'utilitza en un article per a l'extracció proteica en ossos, és a dir, per dissoldre principalment hidroxiapatita òssia que rep una acció prèvia amb àcid clorhídric diluït per a descalcificar la mostra. El medi, teòricament, també hauria de tenir la capacitat de dissoldre els cristalls de COM.

En el procés d'extracció proteica s'observà una falta de dissolució del polvoritzat del càlcul, a diferència del reportat en els articles d'on es van extreure els medis. Aquesta falta d'extracció podria haver estat causada per una deficiència en el procés d'agitació durant l'extracció. En els articles no es detallava el mètode d'agitació, per això, i causat al volum d'Eppendorfs a agitar i del temps, s'escollí un mesclador compacte horitzontal d'Eppendorf. El problema que s'observà al final del procés fou que, degut a la forma de l'Eppendorf, l'agitació sols provocava que la capa superior del polvoritzat es mantingués en dissolució, mentre que la part inferior es compactà, impedint possiblement el contacte amb el medi d'extracció.

Un altre punt important fou la poca capacitat dels medis en dissoldre el COM, en tots ells la concentració d'EDTA era menor a 10 mM. La capacitat de dissolució ve donada per l'EDTA, el qual teòricament té la capacitat de segrestar el calci en una proporció 1 mol:1 mol. Això significa que en una mostra de 100 mg, on teòricament el 95% de la mostra és COM, seria necessari 6,5 x 10^{-4} mols d'EDTA, que correspondrien aproximadament a 650 mL de medi d'extracció amb una concentració EDTA 10 mM. Però en els articles utilitzen volums de com a màxim d'1,5 mL, que pel volum de medi que pot contenir impediria la dissolució dels càlculs, a menys que és realitzes una perfusió constant de nou medi d'extracció, d'aquesta manera sí que s'aconseguiria la seva dissolució (Burns *et al.* 1987).

Durant el procés de diàlisi, per motiu d'espai i recursos, s'hagueren d'introduir les dues mostres de cada medi dins el mateix Erlenmeyer. Les dues mostres es penjaren d'un mateix fil a alçades diferents, per tal que no tinguessin contacte entre elles. Aquesta diferent alçada provocà que la mostra de la part inferior tingués un major moviment i, en conseqüència, segurament una major diàlisi que la situada a la part superior. En el cas del Medi A, el volum post diàlisi fou inversament proporcional a l'alçada, fent que la mostra més baixa (amb més agitació) tingués un volum de 4 mL, i la de la part superior només d'1,9 mL. Aquesta diferència podria haver provocat una falta d'eliminació dels components del medi d'extracció dins la bossa de diàlisi.

La quantificació de proteïnes abans i després de la precipitació proteica no mostraren les diferències esperades, perquè abans de la precipitació la determinació de proteïna per la tècnica de BCA donà per sota de la concentració més baixa del patró, però no molt allunyat del valor més baix. Després de la concentració per precipitació amb acetona el resultat la determinació de proteïna fou dues vegades superior a l'anterior determinació. Aquest augment no concordà amb l'augment de concentració, que en les mostres del Medi A va arribar a ser de 33 vegades. Aquests nivells baixos de proteïnes podrien ser causats per interferència per part de EDTA romanent que podria interferir en la detecció al tractar-se d'un quelant d'ions. (Walker, 2009).

Com a conseqüència de poca concentració proteica, introduirem sols 10 µg de proteïna en cada carril del *western blot*, ja que el volum màxim de mostra que es pot introduir no va permetre introduir el volum màxim de 50 µL, que era l'objectiu. Aquesta baixa quantitat de proteïna per carril va causar molt probablement la baixa tinció durant el revelat. Una altra possible causa de la baixa tinció seria la proteòlisi de les mostres, que podria estar originada tant pel temps en qué les mostres varen romandre guardades, la degradació de la proteïna absorbida en la superfície dels cristalls, com podria haver-se produït durant els processos d'extracció o diàlisi, tot i que tant els medis d'extracció com els de la diàlisi contenien inhibidors de proteases.

Amb el microscopi electrònic de rastreig s'observà que en les mostres dels polvoritzats de càlculs hi havia presencia de cristalls de mida gran i petita tant abans com després de l'extracció, però donant-se una lleugera reducció dels de mida més gran (Figura 2). Això podria ser provocat per una mescla entre l'acció dels medis d'extracció i de l'efecte mecànic de l'agitació. Aquesta reducció no mecànica podria ser principalment a la dissolució de cristalls de fosfat de calci (hidroxiapatita), que com s'indica en la Taula 1, poden estar present en aquests tipus de càlculs. En la microanàlisi per EDAX s'observà que, després de l'extracció, els nivells de fòsfor es reduïren un 68% a diferència dels de calci que forma el COM, el qual augmentà dèbilment com a compensació de la baixada del fòsfor i carboni. Aquesta baixada de carboni s'hauria produït per l'extracció de matèria orgànica, proteïnes, tot i que aquesta extracció no va ser confirmada en la quantificació proteica. El fet que només s'aconseguís un nivell important de dissolució de l'hidroxiapatita, que és un component minoritari, i no del COM, indica que el medi d'extracció no permet la correcta dissolució del càlcul perquè segurament encara queden moltes proteïnes entre els cristalls restants.

5.2 Optimització del mètode

Com s'ha explicat prèviament, es va optar per recórrer a una nova recerca bibliogràfica centrada en medis que tinguessin característiques clarament diferents per tal d'esbrinar quins tenen una major capacitat de dissolució del COM, tal com es pot veure a la Taula 2 . El mètode d'agitació es va

modificar per obtenir una clara millora respecte al mètode emprat en la primera part, aconseguint que tota la mostra estigués en constant contacte amb el medi d'extracció.

Amb la metodologia de Saso *et al.* (1998) s'aconseguiren cristalls molt homogenis, encara que al formar-se a partir de solucions sobresaturades (0,1 M) la precipitació és instantània. Aquest fet provocà que l'estructura microscòpica fos completament distinta de la dels càlculs de COM, com es pot observar en la Figura 2 i Figura 8 A i B. En el cas dels càlculs renals es formen en condicions molt diferents perquè les concentracions d'oxalat en l'orina solen ser inferiors a 0,002M i en el cas del calci menor de 0,04M. Això provoca una cristal·lització més lenta, formant uns cristalls més ordenats, i conferint l'estructura cristal·lina característica, amb cristalls més grans i més definits, el que pot influir en la major o menor facilitat de dissolució en els medis d'extracció utilitzats. (Grases *et al.* 2001).

Malgrat les diferències entre els cristalls precipitats *in vitro* i els càlculs, els primers permeteren comprovar que el Medi D i el Medi E tenen el percentatge més gran de dissolució dels cristalls precipitats *in vitro* de COM, com es pot observar en la Figura 5. Aquests medis comparteixen una alta concentració d'EDTA, que resulta crític per la correcta dissolució del COM (Burns *et al.*1987). Per altra banda, els nivells negatius de dissolució del Medi F es podrien explicar pel precipitat que es forma en contacte amb el clorur de calci, i per la probable incapacitat de dissolució dels cristalls precipitats *in vitro* de COM. En el cas dels altres medis amb resultats negatius (Medi C i Medi G) podrien ser el resultat d'una falta de capacitat de dissolució del cristall junt amb l'aparició d'algun tipus de precipitat en contacte directe amb els cristalls precipitats *in vitro* de COM.

En el cas dels cristalls precipitats *in vitro* de COM amb albúmina es pot abstreure que l'augment de l'efectivitat del Medi D i Medi E, 105% i 96.8% respectivament, és degut al fet que l'addició de l'albúmina produeix uns cristalls agregats però menys cohesionats en centrifugar-se, pel que serien més susceptibles a la seva dissolució.

Un cop seleccionats els medis d'extracció, el Medi D i E, que presenten una major capacitat d'extracció, es va procedir a aplicar al polvoritzat de càlculs renals (Mostres 1 i 2) el mateix procediment seguit amb els cristalls precipitats *in vitro* de COM. Les mostres van romandre 48 hores amb el medi d'extracció perquè es va observar que el precipitat a les 24 hores era elevat. Transcorregut aquest temps es va procedir a la quantificació proteica del medi d'extracció, el qual era d'un color groc dèbil molt transparent, però el BCA donà valors per sota del patró segurament degut algun problema d'interferència per la concentració elevada de EDTA del medi d'extracció. Malgrat la reducció del precipitat i la possible falta d'extracció proteica es clar que el medi dissolia el càlcul, però no tenia la capacitat de resuspendre les proteïnes. Aquesta sospita es confirmà mitjançant la microscòpia electrònica de rastreig, on s'observà que a diferència del polvoritzat anterior a l'extracció (Figura 2), on hi havia cristalls amb estructura definida, en els tractats amb els Medis D i E hi havia una capa homogènia amb una estructura molt llisa (Figura 8 C i D) que molt probablement corresponia a proteïna desnaturalitzada. Podem pensar que la proteïna de la matriu orgànica del càlcul podria trobar-se en forma d'agregats insolubles o bé desnaturalitzada. Per això es va procedir a aplicar durant 24 hores el Medi F, que com s'indica en la Taula 2, és el medi amb major components

encarregats de la solubilització de proteïnes. Aquesta segona extracció va reduir més el volum de precipitat, obtenint una reducció de fins al 46%, alhora que es va obtenir un medi d'extracció d'una coloració groga obscura.

A partir de tota la informació que s'ha anat establint podem determinar la possible metodologia a seguir en futurs treballs per tal de determinar i caracteritzar el contingut proteic d'aquests tipus de càlculs (Taula 3).

Taula 3: Mètode desenvolupat per a la determinació i caracterització del contingut proteic de càlculs de COM

Pas	Procediment
Pretractament	Cada grup de càlculs varen ser netejats amb 5 ml de solució de rentat (250 mL aigua destil·lada 0.9% de clorur sòdic i una gota de sabó líquid) amb 3 minuts de vòrtex i 1 minut de sonicador, es repetí 3 cops
Assecat	S'introduí 5 mL d'acetona al 98.5% , seguit de 3 minuts de vòrtex, i es va deixar evaporar naturalment
Polvorització	Els càlculs van ser polvoritzats amb l'ajuda d'un morter d'àgata.
Primera Extracció	Es van introduir 100 mg de polvoritzat juntament amb 1 ml del Medi D (0.25 M EDTA, 1 mM clorhidrat de benzamidina a pH 8.0) o de Medi E (0.5 M EDTA a pH 8.0) i es deixa amb agitació continua 48 hores. Després es centrifugà a 16000g 5 minuts i s'eliminà el sobrenedant
Segona Extracció	Es va introduir 1 ml del Medi F (2% SDS, 0.06 M Tris-HCl, 10% glicerol, 5% B-mercaptoeta) i es deixa amb agitació continua 24 hores. Després es centrifugà a 16000g 5 minuts o be altres medis de resuspensió de proteïnes agregades.
Diàlisis	El sobrenedant s'introduí dins un sac de diàlisis i es deixà 48 hores a 4ºC dialitzant enfront a 500 ml de PBS per eliminar intererencies

Segons els resultats obtinguts, i considerant els problemes ocorreguts en la primera part del treball, aquest procediment seria el necessari per obtenir nivells elevats de proteïna procedents de càlculs COM de cavitat, i així poder comparar els càlculs típics amb els atípics.

6. Conclusions

Les conclusions que es poden extreure d'aquest treball són:

1. La gran varietat de mètodes d'extracció de proteïnes en càlculs d'oxalat càlcic en la bibliografia, amb una gran diversitat de medis d'extracció, no són totalment efectius, ja que no tenen la capacitat de dissoldre els cristalls de COM i facilitar l'extracció de les proteïnes.
2. No hi ha un criteri comú sobre la composició dels medis d'extracció ni en les proporcions emprades en l'extracció.
3. Una gran part de la bibliografia explica de manera poc detallada la metodologia utilitzada.
4. Existeix en els medis d'extracció gran quantitat de substàncies que poden interferir en les determinacions analítiques, per la qual cosa sempre s'ha de realitzar estudis de les possibles interferències.
5. S'ha simulat l'estructura de precipitats de cristalls de COM similars als càlculs de COM per poder estudiar sistemes d'extracció de proteïna i la seva determinació.
6. Els medis amb més concentració d'EDTA son més efectius en la descalcificació i els medis amb més agents reductors i desagregats faciliten l'extracció de proteïnes. Per la qual cosa es preferible un pretractament en dues etapes.
7. Un cop descalcificada la mostra els precipitats de proteïnes s'haurien d'extreure d'acord a les seves característiques possiblement en medis d'extracció diferents.

7. Bibliografia

BARRITAULT, D., EXPERT- BEZANÇON, A., GUÉRIN, M. and HAYES, D., 1976. The use of acetone precipitation in the isolation of ribosomal proteins. *European Journal of Biochemistry,* **63**(1), pp. 131-135.

BECKHOFF, B., 2008. Reference-free X-ray spectrometry based on metrology using synchrotron radiation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry,* **23**(6), pp. 845-853.

BOYCE, W. H., & GARVEY, F. K. (1956). The amount and nature of the organic matrix in urinary calculi: a review. *The Journal of Urology*, *76*(3), pp 213-227

BOYCE, W. H., & KING JR, J. S. (1959). Crystal-matrix interrelations in calculi. *The Journal of Urology*, *81*(3), pp 351-365

BOYCE, W. H., KING JR, J. S., & FIELDEN, M. L. (1962). Total nondialyzable solids (TNDS) in human urine. XIII. Immunological detection of a component peculiar to renal calculous matrix and to urine of calculous patients. *Journal of Clinical Investigation*, *41*(5), pp 1180-1189.

BURNS, J.R. and CARGILL, J.G.,3rd, 1987. Kinetics of dissolution of calcium oxalate calculi with calcium-chelating irrigating solutions. *The Journal of Urology,* **137**(3), pp. 530-533.

CANALES, B.K., ANDERSON, L., HIGGINS, L., ENSRUD-BOWLIN, K., ROBERTS, K.P., WU, B., KIM, I.W. and MONGA, M., 2010. Proteome of human calcium kidney stones. *Urology,* **76**(4), pp. 1017. e13-1017. e20.

DAVID C. DUGDALE, DAVID ZIEVE, 08/20/2013, 2013-last update, Protein Urine Test [Homepage of Medline Plus], [Online]. Available: http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003580.htm [08/23, 2014].

GALÁN, J. A., CONTE, A., LLOBERA, A., COSTA-BAUZÁ, A., & GRASES, F. (1996). A comparative study between etiological factors of calcium oxalate monohydrate and calcium oxalate dihydrate urolithiasis. *Urologia Internationalis*, *56*(2) pp 79-85.

GRASES, F., GARCIA-FERRAGUT, L., COSTA-BAUZÁ, A. and MARCH, J., 1996. Study of the effects of different substances on the early stages of papillary stone formation. *Nephron,* **73**(4), pp. 561-568.

GRASES, F., GARCÍA-FERRAGUT, L., & COSTA-BAUZÁ, A. (1998). Analytical study of renal calculi. A new insight. *Recent Research Developments in Pure & Applied Analytical Chemistry*, *1*, pp 187-206.

GRASES, F., MASAROVA, L., SÖHNEL, O., & COSTA- BAUZÁ, A. (1992). Agglomeration of calcium oxalate monohydrate in synthetic urine. *British Journal of Urology*, 70(4), pp 240-246.

GRASES, F., CONTE, A., COSTA-BAUZÁ, A. and RAMIS, M., 2001. Tipos de cálculos renales. Relación con la bioquímica urinaria. *Archivos Españoles de Urologia* 54(9), pp. 861-871.

GRASES, F., COSTA-BAUZÁ, A. & PRIETO R.M., 2013. Cálculos renales Tipos y prevención. Edicions UIB. Palma de Mallorca

KHAN, S. R., & HACKETT, R. L. (1987). Crystal-matrix relationships in experimentally induced urinary calcium oxalate monohydrate crystals, an ultrastructural study. *Calcified Tssue International*, *41*(3), pp. 157-163.

LEAL, J. J., & FINLAYSON, B. (1977). Adsorption of naturally occurring polymers onto calcium oxalate crystal surfaces. *Investigative Urology*, *14*(4), pp. 278-283.

LIAN, J.B., PRIEN, E.L.,Jr, GLIMCHER, M.J. and GALLOP, P.M., 1977. The presence of protein-bound gamma-carboxyglutamic acid in calcium-containing renal calculi. *The Journal of Clinical Investigation,* 59(6), pp. 1151-1157.

MALEK, R. S., & BOYCE, W. H. (1977). Observations on the ultrastructure and genesis of urinary calculi. *The Journal of urology*, 117(3), pp. 336-341.

MORSE, R. M., & RESNICK, M. I. (1988). A new approach to the study of urinary macromolecules as a participant in calcium oxalate crystallization. *The Journal of Urology*, 139(4), pp. 869-873.

OKUMURA, N., TSUJIHATA, M., MOMOHARA, C., YOSHIOKA, I., SUTO, K., NONOMURA, N., OKUYAMA, A. and TAKAO, T., 2013. Diversity in protein profiles of individual calcium oxalate kidney stones. *PloS one,* 8(7), pp. e68624.

PAK, C. Y. C., WILLIAMS, H. E., & RUSKIN, B. (1971). Physicochemical basis for the formation of Ca-containing renal stones. *Clinical Research*, 19, pp.482.

SÁEZ-TORRES BARROSO, C. CALVO BENITO, J. MARTÍNEZ SERRA J. and GAYA PUIG A., 2004. Extraction of bone matrix protein: description of a feasible technique for BMP2 extraction from fresh frozen bone. *Patologia del Aparato Locomotor,* 2(3), pp. 167-175.

SASO, L., VALENTINI, G., LEONE, M.G., GRIPPA, E. and SILVESTRINI, B., 1998. Development of an in vitro assay for the screening of substances capable of dissolving calcium oxalate crystals. *Urologia Internationalis,* 61(4), pp. 210-214.

TOYODA, E., KAWAKAMI, Y., KUBOTA, R., SAKAI, N., KANAMORI, K., SHIMOMURA, H. and SHIBA, K., 2012. Development of protein extraction method from urinary calculus and identification of protein in calculus extract. *Journal of Analytical Bio-Science* 35(2) pp. 151-156

WALKER, J.M., 2009. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *The Protein Protocols Handbook.* Springer, pp. 11-15.

WILLIAMS JR, J.C., ZARSE, C.A., JACKSON, M.E., WITZMANN, F.A. and MCATEER, J.A., 2006. Variability of protein content in calcium oxalate monohydrate stones. *Journal of Endourology,* 20(8), pp. 560-564.