

Introducció.

Les pedres de ronyó són molt comunes en països industrialitzats, en els que aproximadament un 12% de la població desenvoluparà un càlcul renal al llarg de la seva vida, encara que aquestes xifres varien molt en funció de diferents factors, com ara la zona geogràfica, el clima o l'alimentació.

S’ha vist una correlació en l’augment de la freqüència de pedres en països desenvolupats i l’increment de la riquesa i de la despesa d'aliments per càpita. En el present estudi, es vol investigar si hi ha una correlació entre els metalls pesants i la formació de pedres de ronyó. Els metalls pesants que s’investiguen són: zinc (Zn), plom (Pb), i coure (Cu). Tots ells poden introduir-se al cos humà per la ingesta d'aliments, els quals poden incorporar-los a través de l’aigua o del sòl.

Aquests metalls poden ser alliberats per fonts naturals, encara que l’alliberació principal són les fonts antropogèniques. Els tres metalls s’alliberen, sobretot, per l’activitat minera i foneries de metalls. El zinc s’allibera en grans quantitats per les incineradores, mentre que el plom i coure poden entrar al medi ambient per les fàbriques d’aquests elements. Els tres metalls no es troben en la seva forma metàl·lica, sinó que formen compostos que poden arribar a ser tòxics. Aquests poden viatjar llargues distàncies per l’aire fins que són dipositats per efectes de la gravetat, com la pluja o la neu. Poden quedar fortament units al material orgànic del sòl i altres components, com argiles o sorres. Per tant, trobem concentracions dels metalls a les capes superiors del sòl, encara que la seva acumulació depèn de les característiques del sòl i forma química del metall. Una petita part es pot lixiviar fins a capes inferiors, fins arribar a l’aigua subterrània. Quan el Zn, el Pb i el Cu entren

a l’aigua, la majoria es complexen amb els materials en suspensió o units amb els sediments.

Un fet important és que aquests metalls tendeixen a acumular-se als fangs provinents de les aigües residuals, que són tractades per diferents processos fisicoquímics i biològics als EDARs. Aquests fangs tenen un gran interès per l’agricultura, però es poden arribar a trobar concentracions de metalls més altes als fangs que al sòl, els quals poden arribar a nivells tòxics.

És molt important conèixer la forma química del metall, ja que en depèn la mobilitat, la biodisponibilitat i fitotoxicitat. Pel que fa a aquestes dues últimes, l’absorció de metalls per les plantes suposa l’entrada d’aquests en la cadena alimentària.

D’aquesta manera podem trobar tots els metalls en tots els aliments, el zinc sobretot en marisc i el coure pot ser molt perillós quan es troben en fungicides. El plom també es pot ingerir fàcilment, i depèn de l’estat fisiològic de l’humà i del caràcter fisicoquímic de la ingesta. Els metalls poden arribar a ser molt perillosos per inhalació. Depèn del tipus de compost, i de la mida de les partícules, sobretot si són fums i pols. Sobretot en un sòl que ha estat recentment tractat amb fangs, l’equilibri bioquímic del sòl canvia i la biodisponibilitat dels metalls també pot canviar.

S’han trobat altes concentracions de metalls pesants als fangs de l’embassament de Flix. Com que a aquesta zona possiblement s’han utilitzat fangs de depuradores i s’ha regat amb aigua residual, es poden haver acumulat metalls pesants a les zones agràries de la regió i, en conseqüència, hi ha hagut una major absorció de les verdures que la població

ingereix, produint així l'entrada d'aquests metalls als humans. Donat el fet que la generació d'orina és el mecanisme animal bàsic per eliminar substàncies tòxiques solubles en aigua, es pot deduir que una ingesta elevada de metalls pesants provoca un augment de la seva concentració en l'orina. És per aquest motiu que s'ha estudiat si aquesta absorció pot influenciar el risc urolitiàtic.

La generació de càlculs en el tracte urinari es denomina urolitiasi. Un càlcul és una estructura sòlida que s'origina com a conseqüència d'alteracions en el balanç fisicoquímic i/o urodinàmic de l'aparell urinari (per exemple, estancament de l'orina). La principal explicació de la formació d'un cristall i el seu creixement és el fenomen de sobresaturació de diverses substàncies en l'orina (promotors de la litiasi). L'excreció d'una quantitat excessiva d'aquestes espècies químiques o bé una diuresi insuficient, poden fer que l'orina es trobi en condicions físiques de saturació. Aquest fet, unit a un pH determinat, permet la seva cristal·lització. Cal remarcar que la formació de concrecions sòlides està fortament influïda per l'absència d'inhibidors de la cristal·lització (p.e. citrat, glicosaminoglicans i diverses proteïnes com la proteïna Tamm Horsfall), per la presència de substàncies promotores (p.e. ió calci, oxalat, àcid úric) i per factors relacionats amb la morfoanatomia renal. En condicions normals, tot i que l'orina es troba en un estat metastable (sobresaturat però estable temporalment), existeix un equilibri entre totes les substàncies i no es formen càlculs, però l'alteració d'aquest estat metastable pot portar a un episodi litiàtic.

Hi ha diferents tipus de pedres d'acord amb la composició química principal del càlcul. En aquest estudi es treballarà amb la litiasis d'oxalat càlcic, que constitueix més del 70% dels càlculs generats en països

industrialitzats. L'oxalat de calci es pot trobar en dues formes hidratades, que es diferencien pel nombre de molècules d'aigua d'hydratació de l'estructura: l'oxalat càlcic monohidratat (COM), normalment amb una morfologia hexagonal, i l'oxalat càlcic dihidratat (COD), que precipita en forma de cristalls bipiramidals. També s'estudiaran els càlculs de fosfats càlcics, que representen aproximadament un 5% dels casos.

Fonamentalment hi ha interès a investigar la relació entre aquests metalls i els càlculs de calci (en forma d'oxalats o fosfats), ja que els elements a analitzar a aquest treball (Zn^{2+} , Pb^{2+} i Cu^{2+}) són tots ions divalents que tenen una carga iònica semblant a la del calci, i pot afavorir la substitució del calci per ions metàl·lics.

Per tant, aquest treball se centra en l'estudi de la influència dels metalls esmentats sobre la litiasi renal càlcica. D'aquesta manera, aquest estudi cobreix aproximadament el 80% de casos de litiasi renal.

Per tant els objectius principals de l'estudi són :

- Determinar la influència de la presència de metalls pesants en el creixement cristal·lí de substàncies litògenes in vitro.
- Determinar la presència de metalls pesants com Zn, Cu i Pb en orina i la seva influència en el risc litogènic.
- Realitzar un estudi per observar i analitzar la quantitat de metalls pesants en l'orina dels habitants de l'àrea exposada de Flix (casos), i comparar-la amb els habitants de fora de l'àrea de Flix que en representaran els controls, per tal de determinar si la diferència en la composició

de l'orina és significativament diferent a les dues zones esmentades.

Material i mètodes.

Definició dels criteris de mostreig d'orines reals

Treballarem en dues zones: els controls, que són els no exposats, i els casos, que sí que són exposats. El criteris d'inclusió són el següents:

- Criteris d'inclusió dels Casos: Edat entre 30-65 anys i residència dintre l'àrea de Flix
- Criteris d'inclusió dels Controls: Edat entre 30-65 anys i residència fora de l'àrea de Flix
- Criteris d'exclusió: Incapacitat física per participar en l'estudi.

Les mostres de Flix s'han aconseguit a partir del seu Centre d'Atenció Primària (CAP) i, per tant, ha estat necessari contactar amb el CAP per demanar la seva col·laboració en l'estudi. Aquest procediment requereix el certificat del Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC) de l'IDIAP Jordi Gol (Institut Universitari d'Investigació en Atenció Primària). L'estudi proposat va ser avaluat el 19/12/2012 i aprovat el dia 07/01/2013 (documents a l'Annex 6.1.). D'altra banda, els controls han estat realitzat per voluntaris de l'àrea metropolitana de Barcelona.

Tant pels casos com pels controls, s'ha agafat una mostra d'orina nocturna, que és la més adequada per aquest tipus de diagnòstic, ja que es troba molt concentrada i assegura detectar alguns elements químics i compostos formats que en forma diluïda no serien detectables. De

fet, el risc litògen augmenta durant la nit, de manera que es pot assumir que aquestes són les condicions més extremes a les que l'orina d'un pacient es pot veure sotmesa.

Estudis in vitro amb orines artificials i reals sobre la influència dels metalls pesants sobre l'oxalat càlcic i la hidroxiapatita

S'ha estudiat la influència d'aquests metalls pesants sobre el risc urolitiàtic en mostres in vitro i mostres amb orines reals. Les mostres artificials tenen propietats de sobresaturació, mesclant volums iguals de 10ml de les solucions A i B descrits en la taula 1.

Taula 1 **Composició de les dues solucions usades per formar l'orina artificial**

Solució A (g/l)		Solució B (g/l)	
Na ₂ SO ₄	4.86	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	2.40
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.02	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	3.00
NH ₄ Cl	4.65	NaCl	13.12
KCl	12.2	Na ₂ C ₂ O ₄	0.075
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	2.24		

S'hi ha afegit un punt de nucleació de HAP o COM (0,150g), 176 ppm de citrat que actua com un inhibidor normalment present a l'orina. Finalment, s'hi ha afegit 500 ppb de Zn, 20 ppb de Pb i 27 ppb de Cu, els quals es troben dins de les concentracions habituals en l'orina. Per cada metall s'ha fet una incubació per duplicat. També s'ha fet una incubació per duplicat amb els 3 metalls junts per determinar si els metalls poden tenir una interacció sinèrgica o si actuen individualment.

Amb les orines reals només s'ha treballat amb el zinc, que és el metall que es troba en una concentració més gran en comparació amb els altres, de manera que pot ser que afecti més a la cristal·lització en orines reals. L'única diferència en

aquestes incubacions és que al tenir un volum limitat, es treballa amb només 10ml d'orina per cada incubació, s'afegeix tan sols 0,075g d'oxalat de calci o hidroxiapatita i 500ppb de zinc, però no s'afegeix citrat.

Totes les incubacions s'agiten amb un agitador magnètic durant 24h a 37°C, que és aproximadament la temperatura del nostre cos, per tal que l'experiment tingui les condicions més properes a la realitat. L'agitació es fa per afavorir la interacció entre la "llavor", els metalls pesants i l'orina. Un cop passades les 24h s'agafen uns 10 ml de cada incubació mitjançant una xeringa (BD Discardit 10ml) i es filtren (filtres Millipore 0,22µm) per tal d'eliminar els possibles cristalls que podrien alterar l'anàlisi al ICP-MS.

Tècniques analítiques. Anàlisi de metalls: ICP-MS

Per determinar els metalls pesants en aquest estudi, es treballa amb un equip d'Espectrometria de Masses amb Plasma d'Acoblament Inductiu (sigles en anglès: Inductively coupled plasma - mass spectrometry, ICP-MS).

La tècnica ICP-MS consisteix en la nebulització d'una mostra líquida per aconseguir la posterior atomització, que permet transformar la composició de la mostra en un flux d'ions. Aquest flux és separat segons la relació massa/càrrega mitjançant un analitzador de ions (en el nostre cas, un quadrupol). Un cop separats, els ions incideixen en el detector en què es recompta el nombre d'ions o es mesura la corrent iònica produïda quan els ions formats hi incideixen.

Anàlisi de creatinina: espectrofotometria d'UV-Vis.

D'altra banda la creatinina, que és un producte de la degradació del fosfat de creatina en el múscul, s'analitza emprant un espectrofotòmetre d'UV-Vis. Es calcula amb l'objectiu d'eliminar la influència de les diferències individuals en la dilució d'orina.

La tècnica espectrofotomètrica es basa en el fenomen d'absorció de radiació de certs compostos. Aquest fet té una relació lineal amb la concentració de l'espècie absorbent a la solució i la distància que travessa la llum a través d'aquesta.

Expressió dels resultats

Després de mesurar les concentracions de Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , i Ca^{2+} , es comença a treballar amb les dades. Pel que fa al calci, es mesura la quantitat d'aquest precipitat en cadascuna de les mostres, calculant el percentatge d'inhibició, que fa referència a la precipitació de calci en absència dels metalls.

$$\% \text{ influència del metall} = \left(\frac{[Ca](blanc) - [Ca](mostra)}{[Ca](blanc)} \right) \times 100$$

Equació 1: L'equació per calcular el % de l'efecte promotor de la cristallització.

On:

- [Ca] (blanc)= és la concentració de calci en ppm en el blanc amb la llavor però sense haver afegit el metall

- [Ca] (mostra)= és la concentració de calci en ppm després de la incubació amb la llavor i afegint una concentració de metall

- 0% = els metalls no afecten al procés litiàsic.
- >0% = els metalls faciliten la formació de cristalls de sals de calci
- <0% = els metalls inhibeixen la formació de cristalls de calci

D'altra banda, pel que fa als metalls es calcula el percentatge de pèrdua del metall de la solució per determinar si els metalls

romanen dissolts a l'orina o s'adhereixen als cristalls:

$$\% \text{ de pèrdua del metall} = \left(\frac{Me(afegit) - Me(mostra)}{Me(afegit)} \right) \times 100$$

Equació 2: L'equació per calcular el % de pèrdua del metall en les incubacions.

A on:

- $Me(afegit)$ = és la concentració del metall en ppb que s'afegeix abans de començar l'incubació.
- $Me(mostra)$ = és la concentració del metall en ppb després de la incubació.

- 0% = metalls es queden en solució
- >0% = el metall ha precipitat amb l'oxalat de calci o la hidroxiapatita

D'altra banda, les orines reals contenen zinc, però es vol comprovar l'efecte inhibidor de la cristal·lització només del zinc afegit:

$$\% \text{ influència del zinc} = \left(\frac{[Ca]_{amb Zn i amb llavor} - [Ca]_{només llavor}}{[Ca]_{només llavor}} \right) \times 100$$

Equació 3: L'equació per calcular el % de l'influència del zinc sobre la cristal·lització de calci

A on:

- $[Ca]_{amb Zn i amb llavor}$ = vol dir la concentració de calci en ppm trobat després d'incubar l'orina afegint la llavor i el 500ppb de zinc.
- $[Ca]_{només llavor}$ = vol dir la concentració de calci en ppm trobat després d'incubar l'orina afegint la llavor però no el metall

- 0% = el zinc no afecta al procés litàsic.
- <0% = el zinc facilita la formació de cristalls de sals de calci
- >0% = el zinc inhibeixen la formació de cristalls de calci

$$\% \text{ de pèrdua del zinc} = \left(\frac{[Zn](afegit) + [Zn](natural) - [Zn](mostra)}{[Zn](afegit) + [Zn](natural)} \right) \times 100$$

Equació 4 L'equació per calcular el % de pèrdua del zinc en les incubacions reals.

On:

- $[Zn](afegit)$ = la concentració de zinc (ppb)afegit abans d'incubar
- $[Zn](natural)$ = la concentració de zinc natural (ppb) present en l'orina
- $[Zn](mostra)$ = la concentració restant de zinc (ppb) després d'incubar

Per tant, com més positiu, més zinc ha precipitat amb l'oxalat de calci o la hidroxiapatita.

Finalment també s'ha fet un percentatge per tal d'observar l'efecte de posar un punt de nucleació de HAP o COM a l'orina sense afegir zinc:

$$\% \text{ influència amb llavor} = \left(\frac{[Ca]_{llavor} - [Ca]_{blanc}}{[Ca]_{blanc}} \right) \times 100$$

Equació 5: L'equació per calcular el % de l'influència de la presència d'una llavor sobre la cristal·lització de calci

A on:

- $[Ca]_{llavor}$ = vol dir la concentració de calci en ppm trobat després d'incubar l'orina afegint la llavor
- $[Ca]_{blanc}$ = vol dir la concentració de calci en ppm trobat després d'incubar l'orina sense llavor.

D'aquesta manera si hi ha un percentatge negatiu, significa que el calci precipita amb la presència d'una llavor. Això pot ser interessant per la gent que ja contè càlculs per veure que pot passar amb el calci quan ja tens un càlcul.

Resultats i discussió

Determinació de la influència de metalls sobre l'oxalat càlcic i la hidroxiapatita.

Pel que fa els percentatges de pèrdua en COM i HAP hi ha resultats semblants en

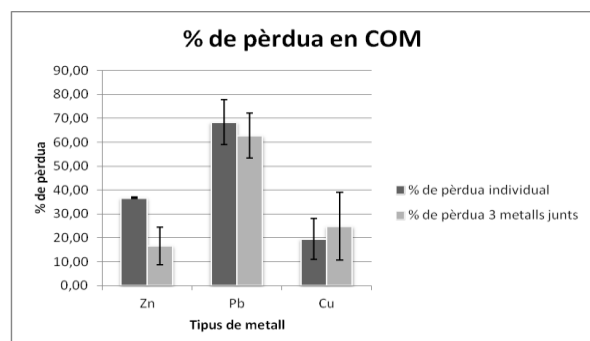


Figura 1: % de pèrdua dels metalls en cristal·lització en COM

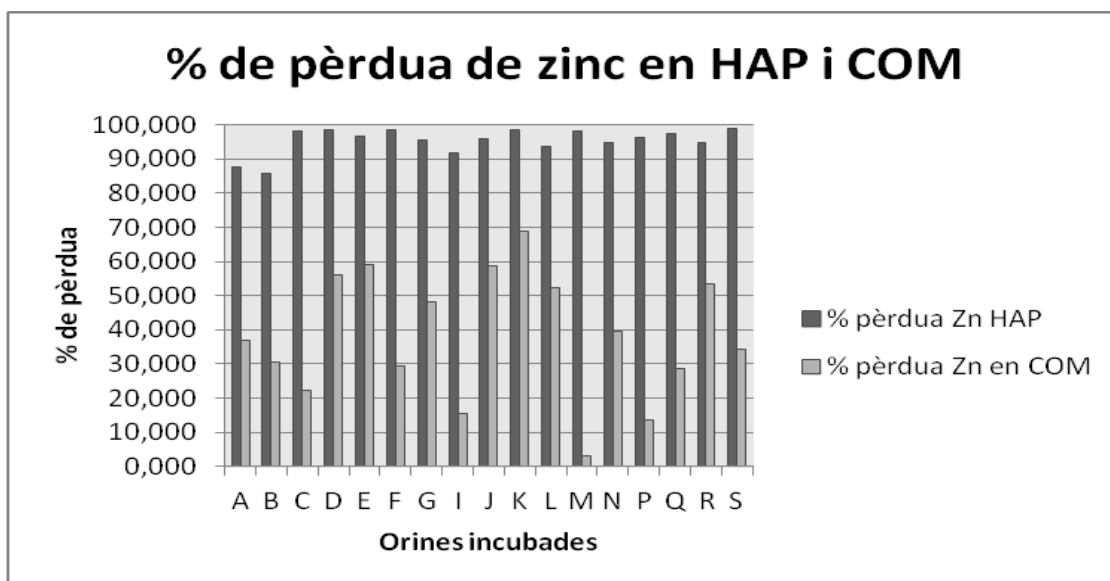


Figura 2: % de pèrdua de zinc en hidroxiapatita i oxalat de calci en orines reals. Cada parella de columnes representa una mostra.

les orines reals i artificials (figura 1 i 2). Les pèrdues de metall en HAP en les orines artificials eren del 100%. En cas de l'oxalat de calci, s'observa que els metalls analitzats precipiten tan individualment com quan es troben conjuntament en solució, tot i que el percentatge de pèrdua del Zn és molt més alt quan es troba individualment. Per la hidroxiapatita, s'observa que tots els metalls precipiten totalment dintre del rang de concentracions estudiat, diferència clara amb l'oxalat de calci. Per tant el COM no té la mateixa capacitat d'absorbir els metalls que la HAP

Pel que fa l'efecte inhibidor o promotor de la precipitació de sals de calci que tenen els metalls és diferent al cas de l'oxalat de calci i de la hidroxiapatita.

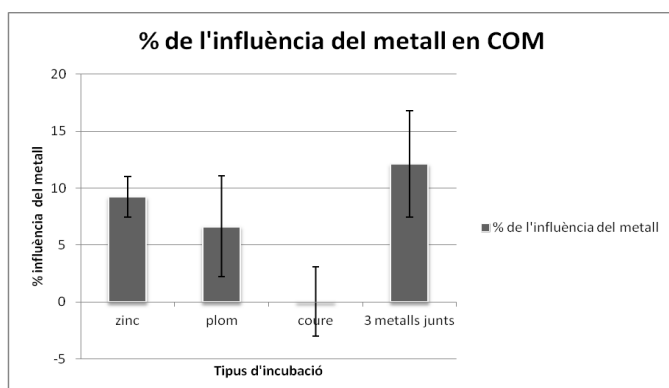


Figura 3: % de la influència del metall sobre la cristal·lització en COM

S'observa que zinc i plom tenen un efecte promotor en la precipitació de COM. Un fet destacable és que quan es troben els tres metalls junts es produeix un efecte sinèrgic, ja que l'efecte promotor es més fort.

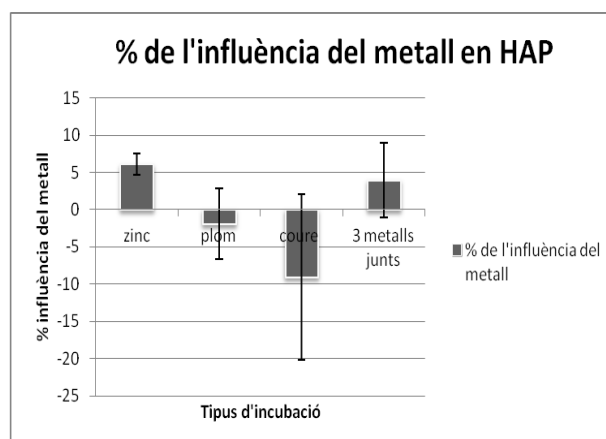


Figura 4. % de l'influència del metall sobre la cristal·lització en HAP

Al cas de la hidroxiapatita (figura 4), s'observa clarament que el zinc té una influència positiva sobre cristal·lització, és a dir, afavoreix la formació de cristalls, mentre que els dos restants no tenen un efecte significatiu. La influència dels tres metalls junts té un efecte sobre la precipitació més discret.

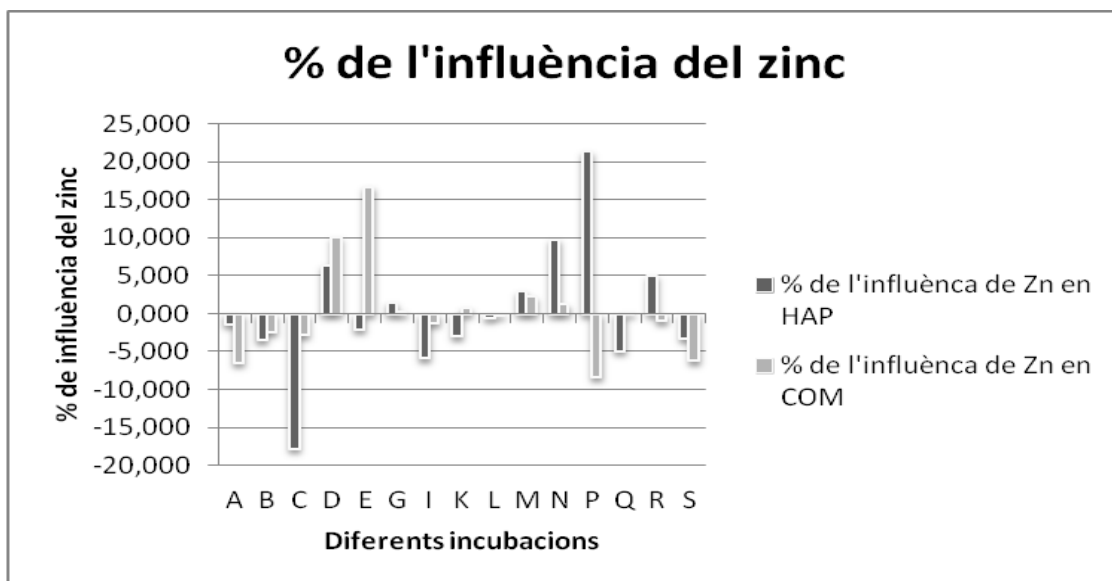


Figura 5: % de l'influència del zinc a l'oxalat de calci i hidroxiapatita

Com s'ha comentat anteriorment, el zinc s'absorbeix completament en HAP i parcialment en COM en les orines reals.

Però cal comparar si aquesta absorció de zinc als dos tipus de càlculs afavoreix la cristal·lització de calci, el que implicaria un augment del risc litiàsic. Els resultats es mostren a la figura 5.

Observant la figura, no s'observa cap relació entre els resultats. Per tant, no podem confirmar que el zinc influeix sobre la cristal·lització en les mostres reals. Aquests resultats són totalment diferents que les incubacions artificials, ja que s'observava que el zinc facilitava la formació de cristalls. La justificació d'aquest comportament es pot basar en el fet que l'orina és una matriu molt més complexa i conté tota una sèrie d'agents inhibidors com el citrat, els glicosaminoglicans i diverses proteïnes, que poden disminuir l'efecte del zinc.

També s'han analitzat les dades del % de l'influència amb COM i HAP sense haver afegit zinc en la majoria de casos, tant per les incubacions amb HAP com per les incubacions amb COM, hi ha una inhibició negativa i, per tant, el calci ha precipitat.

Això és un resultat esperat ja que l'orina es troba sobresaturada i tendeix a produir precipitats si es modifica l'activitat hidrodinàmica natural del cos. Si a més es troba en presència de llavors o nuclis de precipitació la cristal·lització es fa encara més important.

Explicació dels resultats de l'estudi de Flix

En el present estudi es volia determinar, mitjançant l'orina, si a la zona de Flix les persones contenen concentracions més altes de metalls pesants que a la zona de control.

S'han pogut quantificar els tres metalls pesants en les dues zones però no hi ha diferències significatives entre les concentracions trobades, excepte el coure que té una concentració estadísticament major en els controls que els casos.

Per tant, encara que s'hagin trobat altes concentracions de metalls als fangs de l'embassament, aparentment no influeixen en l'entrada d'aquests elements al nostre cos, si més no, pels metalls analitzats: Cu, Zn i Pb. Pot ser si es analitza mercuri o cadmi, metalls pesants que s'han trobat també als fangs de l'embassament, podríem trobar diferències. Segons els metalls analitzats a les orines dels casos i

controls, no podem confirmar que al contenir aquests metalls tenen més risc de patir càlculs renals.

D'altra banda, s'han agrupat les dades dels voluntaris que han patit episodis de càlculs renals al llarg de la seva vida, per observar si les concentracions de metalls són diferents en cada àrea. Només s'ha detectat que la concentració de calci és superior per aquests que per al grup control, un resultat independent de la concentració de metalls pesants.

Conclusions:

En aquest estudi s'han pogut analitzar diferents aspectes de la litiasi renal, i també s'ha pogut fer una relació entre dues zones de Catalunya per observar la exposició d'aquests metalls sobre la salut humana.

En les incubacions s'han obtingut diferents resultats :

- Pel que fa l'absorció de metalls, el COM no té la mateixa capacitat d'absorbir els metalls que la HAP, ja que aquest absorbeix els mateix quasi un 100%. A més, amb les orines artificials s'ha pogut obtenir un resultat similar al de les orines reals, referint al zinc.

- El zinc afavoreix la formació de cristalls en els dos casos, el plom i coure tenen un efecte diferent en cada cas. En les incubacions de COM s'ha observat que la presència dels tres metalls afavoreix clarament la cristallització. D'altra banda, a les incubacions de HAP la influència dels tres metalls té un efecte sobre la precipitació més discret.

- Amb les orines reals s'ha aconseguit uns resultats completament diferents pel que fa la influència del zinc

sobre la precipitació del calci. Això es causa de que l'orina es una matriu molt més complexa que les orines artificials.

Per acabar, s'ha relacionat una zona contaminada com la de Flix amb altre, suposadament, menys contaminada. Les concentracions dels metalls no són estadísticament diferents entre les dues zones. També, s'ha relacionat els valors dels metalls entre els voluntaris que han patit algun episodi litiàsic i l'única diferència que hi ha entre les dues zones, es que la zona de Flix té més concentració de calci.