



REGISTRO DE LA
PROPIEDAD INDUSTRIAL
ESPAÑA

11 N.º de publicación: ES 2 003 686
21 Número de solicitud: 8700409
51 Int. Cl.⁴: G01N 33/52
C07C 55/06

12

PATENTE DE INVENCION

A6

22 Fecha de presentación: **18.02.87**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.11.88**

46 Fecha de publicación del folleto de patente:
01.11.88

73 Titular/es: **Universidad de las Illes Balears e
Instituto Nacional de la Salud (Insalud)
Delegación en Baleares
Facultad de Ciencias
07071-Baleares, ES**

72 Inventor/es: **Grases Freixedas, F.;
March Mascaró, P.;
Gil Martínez, J.J. y
Conte Visus, A.**

74 Agente: **Ungria Goiburu, Bernardo**

54 Título: **Método para detectar la formación de cristales de oxalato cálcico en una muestra de orina en presencia de un inhibidor de la litiasis renal.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un método para detectar la formación de cristales de oxalato cálcico en una muestra de orina en presencia de un inhibidor de la litiasis renal.

Mediante el procedimiento de la invención es posible conocer y determinar de entre diversas sustancias que potencialmente pueden inhibir el crecimiento cristalino de un cálculo aquella que manifiesta un efecto inhibitorio adecuado en el individuo al que se le va a suministrar. El procedimiento está fundamentado en el estudio y evaluación de la formación de cristales de oxalato cálcico en una muestra de orina del individuo aquejado de urolitiasis.

DESCRIPCION

La presente invención se inserta dentro del campo del estudio de la inhibición de la urolitiasis renal, concretándose a un método para detectar la formación de cristales de oxalato cálcico en una muestra de orina del individuo aquejado de dicha enfermedad, en presencia de un inhibidor de la litiasis.

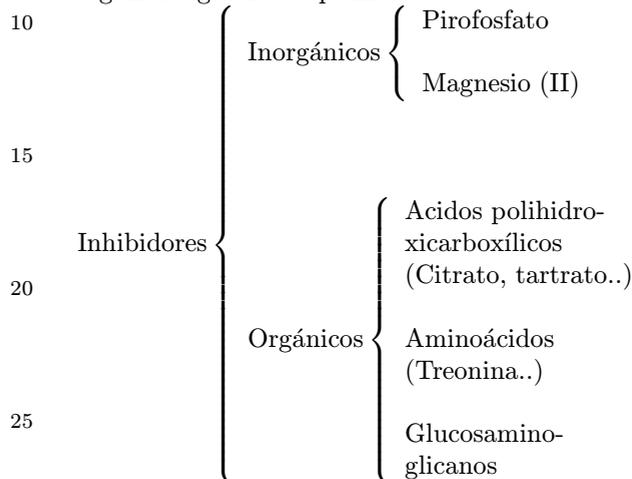
La formación de un cálculo se explica a través de la combinación de dos etapas fundamentales:

La nucleación y el crecimiento cristalino. La nucleación implica la formación de un germen cristalino mínimo, capaz de seguir creciendo y puede ser de dos tipos: homogénea y heterogénea. En la homogénea, la formación de la partícula mínima se produce por unión de las especies que van a constituir los futuros cristales. Al exigir cheques simultáneos de varias especies en el seno de la disolución es un proceso difícil y poco probable (exige elevados estados de sobresaturación). La nucleación heterogénea es mucho más sencilla puesto que exige únicamente la presencia de partículas sólidas preexistentes que sean capaces de atraer y retener en su superficie a las especies que van a constituir el futuro cristal a través de una etapa que se ha denominado crecimiento cristalino. En la formación de cálculos de oxalato cálcico, la sobresaturación ordinaria de este compuesto en la orina no permite la explicación de su formación mediante nucleación homogénea y, en consecuencia, debe admitirse la nucleación heterogénea como la más importante en la litiasis oxalocálcica. Así, el fosfato cálcico ha sido detectado frecuentemente como posible núcleo de un gran número de cálculos renales. En ocasiones también se han detectado otras sustancias que fácilmente alcanzan elevados grados de sobresaturación en orina que, por tanto nuclean homogéneamente con facilidad, tal como el ácido úrico, medicamentos ó incluso la sílice.

La etapa de crecimiento cristalino, bajo el punto de vista de su mecanismo, es mucho más fácil de que se produzca, ya que consiste en el simple depósito y agregación de nuevas especies o partículas sobre los núcleos ya formados. A pesar de ello, presenta una enorme importancia para explicar la génesis de la litiasis renal. Así, resulta interesante observar como en el caso de individuos con parámetros urinarios prácticamente idénticos, unos generan cálculos y otros no. La explicación de este fenómeno radica en admitir la presencia en la orina de sustancias que dificultan o impiden el crecimiento y agregación de determinadas sustancias sólidas en la misma. Estas sustancias son los llamados inhibidores de la litiasis renal. El mecanismo de acción de los inhibidores del crecimiento cristalino es un fenómeno bastante conocido en cristalografía. parece que el efecto inhibitorio está relacionado con la unión (el enlace) de los inhibidores a la superficie del cristal (Bliznakow, 1965). Una vez adsorbidos en la superficie, distorsionan la simetría superficial, inhibiendo el posterior crecimiento así como la inducción epitaxial del crecimiento. Cuando el crecimiento es inhibido sólo en cierta dirección, se producirá un cambio en el hábito cristalino.

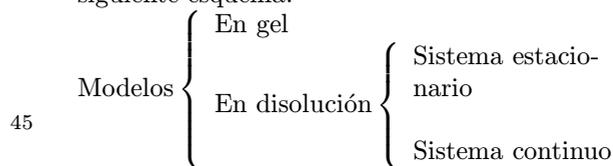
Hasta el presente se han descrito diversas sus-

tancias con pretendidas propiedades inhibitoras. Así, el pirofosfato es quizás el producto con propiedades inhibitoras más antiguamente conocido. En la actualidad los estudios de inhibición de la cristalización del oxalato cálcico por los glicosaminoglicanos están adquiriendo notable importancia. De hecho las sustancias que hasta ahora se han descrito como inhibitoras pueden clasificarse según el siguiente esquema:



A pesar de que, como puede observarse, son bastantes los productos que se dice presentan propiedades inhibitoras, en la bibliografía se pueden encontrar opiniones contradictorias acerca de dichos efectos inhibitorios. Así, para demostrar estos efectos inhibitorios se han desarrollado toda una amplia serie de modelos que permiten el estudio en el laboratorio de los diferentes efectos causados por estas sustancias.

Con el fin de poder dar una visión de estas metodologías las hemos clasificado de acuerdo con el siguiente esquema.



Los modelos denominados en gel, están basados en conseguir la difusión del calcio y del oxalato, uno hacia otro, en el seno de un gel (normalmente agar) impregnado del inhibidor estudiado. Macroscópicamente, la cantidad de cristales formados podrá relacionarse con la acción del inhibidor estudiado.

En los modelos en disolución, los estudios de cristalización se efectúan en el seno de una disolución, ya sea en un sistema en continuo, que pretende emular las condiciones del riñón, o bien en sistemas estacionarios en los que la cristalización del oxalato cálcico se consigue por incremento suficiente del ión precipitante o por siembra previa de cristales de oxalato cálcico en el medio.

Sin embargo, la potencia de un determinado inhibidor parece depender del modelo empleado para su estudio, siendo ello uno de los factores que ha generado una notable controversia acerca de la eficacia de determinados inhibidores.

Por otra parte, las determinaciones del nivel

de concentración de distintos inhibidores en orina de individuos sanos y aquejados de urolitiasis, ha contribuido a incrementar esta controversia. Así, mientras que para algunos autores los contenidos en orina de determinados inhibidores son diferentes entre individuos sanos y enfermos (estos presentan contenidos menores), otros autores no han detectado tales diferencias.

Todas estas circunstancias pueden explicarse si consideramos que la capacidad de nucleación, crecimiento y agregación de un cristal concreto depende de la composición y condiciones del medio que rodea a tal cristal. Así, estas condiciones varían de un modelo a otro y de la orina de un individuo a la orina de otro.

Como referencias bibliográficas pueden mencionarse las siguientes:

- 1.- W.G. Robertson and M. Peacock: "Pathogenesis of Urolithiasis" in "Urolithiasis: Etiology. Diagnosis". Edited by Hans-Joachim Schneider, Springer-Verlag, N.Y. 1985.
- 2.- F. Grases, C. Genestar, P. March and A. Conte: "Evaluation of the inhibitory capacity of diverse substances in calcium oxalate urolithiasis using urines from stone-former and normal people".

A la vista de la situación planteada en el apartado anterior, los solicitantes han profundizado en el desarrollo de una metodología en la que se utilicen varias condiciones diferentes, elegidas de manera que permitan cierta extrapolación del problema. Por otra parte han demostrado que los efectos inhibitorios de una determinada sustancia en la cristalización del oxalato cálcico dependen marcadamente del tipo de orina utilizado en el estudio correspondiente.

Así, una sustancia que manifieste importantes efectos inhibitorios en la orina de una persona concreta, puede manifestar efectos mucho menores en otra perteneciente a una persona distinta, o incluso presentar efectos promotores. En consecuencia, de acuerdo con nuestros resultados, el mejor inhibidor para una persona concreta debe determinarse apartir del estudio de su propia orina. Hasta la fecha, los solicitantes no han podido encontrar referencias bibliográficas previas relativas a la determinación del inhibidor adecuado (a ser usado como fármaco) para cada individuo aquejado de urolitiasis ("inhibidor a medida").

Concretamente, la presente invención se refiere a un método para detectar la formación de cristales de oxalato cálcico en una muestra de orina en presencia de un inhibidor de la litiasis renal.

Mediante el procedimiento de la presente invención, es posible conocer y determinar de entre diversas sustancias que potencialmente pueden inhibir el crecimiento cristalino de un cálculo (inhibidores de la litiasis renal), aquélla que manifieste un efecto inhibitorio adecuado en el individuo al que se le va a suministrar. El método operativo propuesto es extraordinariamente sencillo, por lo que puede desarrollarse en cualquier laboratorio que disponga de las mínimas facilidades de trabajo.

El procedimiento de la presente invención implica la determinación del poder inhibitor de los posibles fármacos a utilizar para el tratamiento de cada individuo aquejado de litiasis renal. Para ello se emplea el método que se especifica a continuación, utilizando la propia orina del enfermo, que debe corresponder a orina de dos horas (con ayuno previo) y recién recogida. De las posibles sustancias a utilizar, se administrará aquella que, de acuerdo con los resultados del procedimiento manifieste un mayor efecto inhibitorio. El seguimiento del enfermo se efectuará a través del análisis de orina y por aplicación periódica del método de la invención.

El método para detectar la formación de cristales de oxalato cálcico en una muestra de orina en presencia de un inhibidor de la litiasis renal de la presente invención, está caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- a) colocar unos 4 ml de orina fresca en un tubo de ensayo;
- b) añadir un volumen de solución de CaCl_2 9.10^{-3}M ;
- c) añadir un volumen de solución que contenga la cantidad adecuada del inhibidor de la litiasis renal el cual está seleccionado del grupo formado por pirofosfato, Mg (II), ácidos polihidroxicarboxílicos, aminoácidos y glucosaminoglicanos;
- d) añadir un volumen adecuado de agua desionizada para que el volumen final sea de unos 5 ml;
- e) homogeneizar cuidadosamente la solución y a continuación añadir un volumen de solución de oxalato sódico $7,5.10^{-3}\text{M}$;
- f) homogeneizar de nuevo el producto obtenido y evaluar la cantidad de cristales de oxalato cálcico formados mediante conteo del número de partículas formadas en una cámara de conteo de partículas de un microscopio óptico y/o mediante medida de la luminiscencia en función del tiempo con un nefelómetro.

El procedimiento antes descrito puede desglosarse, a nivel práctico en dos ensayos, tal y como se indica a continuación:

Ensayo A (Estudio con microscopio óptico)

Este ensayo comprende las siguientes etapas:

- a) Colocar 4 ml de orina fresca en un tubo de ensayo;
- b) Añadir un volumen de solución de CaCl_2 9.10^{-3}M ;
- c) Añadir un volumen que contenga una cantidad adecuada del inhibidor ensayado;
- d) Añadir un volumen adecuado de agua desionizada para que el volumen final sea de 5 ml;

- e) Homogeneizar cuidadosamente la mezcla y entonces añadir un volumen de oxalato sódico $7.5 \cdot 10^{-3} \text{M}$;
- f) Homogeneizar nuevamente el sistema y termostatarlo a 20°C durante 60 minutos.

Transcurrido el tiempo de calefacción se homogeneiza nuevamente y se coloca una gota sobre una cámara de contaje de partículas para microscopio. Se evalúa entonces el número y tipo de partículas contenidas en un volumen concreto a 400 aumentos.

Este experimento se repite para 3 ó 4 cantidades diferentes de inhibidor. Los resultados obtenidos se evalúan gráficamente, representando para cada tipo de partícula, el porcentaje obtenido en cada experiencia con relación al total obtenido (en las 3 ó 4 experiencias realizadas), frente a las concentraciones de inhibidor utilizadas.

Ensayo B (Estudio nefelométrico)

Este ensayo comprende las siguientes etapas:

- a) Colocar 4 ml de orina fresca en un tubo de ensayo;
- b) Añadir un volumen de solución de CaCl_2 $9 \cdot 10^{-3} \text{M}$
- c) Añadir un volumen que contenga una cantidad adecuada del inhibidor ensayado;
- d) Añadir un volumen adecuado de agua desionizada para que el volumen final sea de 5 ml;
- e) Homogeneizar cuidadosamente la mezcla y entonces añadir un volumen de oxalato sódico $7.5 \cdot 10^{-3} \text{M}$;
- f) Homogeneizar nuevamente el sistema inmediatamente proceder a registrar la curva luminiscencia-tiempo en un nefelómetro.

Este experimento se repite para las mismas 3 ó 4 cantidades distintas de inhibidor utilizadas en el ensayo A y los resultados obtenidos se evalúan gráficamente, representando el valor de la tangente en el origen a las curvas luminiscencia-tiempo, frente a las concentraciones de inhibidor utilizado.

Antes de proceder a la aplicación de una terapia concreta, es aconsejable repetir los ensayos A y B varias ocasiones para un mismo individuo, con el fin de evaluar inequívocamente los resultados.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo I Ensayo A

- a) Se colocan 4ml de orina fresca en un tubo de ensayo,
- b) Se añade un volumen de solución de CaCl_2 $9 \cdot 10^{-3} \text{M}$ para que la concentración final de Ca(II) añadido sea de 7,2 mg/l;

- c) Se añade un volumen que contenga una cantidad adecuada del inhibidor ensayado (cantidades crecientes de Mg(II) correspondientes a concentraciones finales de 0, 40, 60 y 100 mg/l).
- d) Se añade un volumen adecuado de agua desionizada para que el volumen final sea de 5 ml,
- e) Se homogeneiza cuidadosamente la mezcla y entonces se añade un volumen de oxalato sódico $7.5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ para que la concentración final en oxalato sea de 16,5 mg/l.
- f) El sistema se homogeneiza nuevamente y se termostatiza a 20°C durante 60 minutos.

Ensayo B

- a) Se colocan 4 ml de orina fresca en un tubo de ensayo,
- b) Se añade un volumen de solución de CaCl_2 $9 \cdot 10^{-3} \text{M}$, para que la concentración de Ca(II) añadido sea de 39 mg/l,
- c) Se añade un volumen que contenga una cantidad adecuada del inhibidor ensayado (cantidades crecientes de Mg(II) correspondiente a concentraciones finales de 0, 40, 60 y 100 mg/l),
- d) Se añade un volumen adecuado de agua desionizada para que el volumen final sea de 5 ml,
- e) La mezcla debe homogeneizarse cuidadosamente y entonces se añade un volumen de oxalato sódico $7.5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ para que la concentración final de oxalato añadido sea de 90 mg/l.
- f) El sistema se homogeneiza de nuevo e inmediatamente se procede a registrar la curva luminiscencia-tiempo en un nefelómetro.

Ejemplo II Ensayo A

- a) Se colocan 4 ml de orina fresca en un tubo de ensayo,
- b) Se añade un volumen de solución de CaCl_2 $9 \cdot 10^{-3} \text{M}$ para que la concentración final de Ca(II) añadido sea de 7,2 mg/l,
- c) Se añade un volumen que contenga una cantidad adecuada del inhibidor ensayado (cantidades crecientes de citrato correspondientes a concentraciones finales de 0, 200, 400 y 600 mg/l),
- d) Se añade un volumen adecuado de agua desionizada para que el volumen final sea de 5 ml,
- e) La mezcla debe homogeneizarse cuidadosamente y entonces se añade un volumen de oxalato sódico $7.5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ para que la concentración final de oxalato sea de 16,5 mg/l,

- f) El sistema se homogeniza nuevamente y se termostatiza a 20°C durante 60 minutos.

Ensayo B

- a) Se colocan 4 ml de orina fresca en un tubo de ensayo, 5
- b) Se añade un volumen de solución de CaCl_2 $9 \cdot 10^{-3}$ M para que la concentración de Ca(II) añadido sea de 39 mg/l, 10
- c) Se añade un volumen que contenga una cantidad adecuada del inhibidor ensayado (cantidades crecientes de citrato correspondientes a concentraciones finales de 0, 200, 400, 15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

600 mg/l),

- d) Se añade un volumen adecuado de agua desionizada para que el volumen final sea de 5 ml,
- e) La mezcla debe homogeneizarse cuidadosamente y entonces se añade un volumen de oxalato sódico $7,5 \cdot 10^{-3}$ M para que la concentración final de oxalato añadido sea de 90 mg/l,
- f) El sistema se homogeneiza de nuevo e inmediatamente se procede a registrar la curva luminiscencia-tiempo en un nefelómetro.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la formación de cristales de oxalato cálcico en una muestra de orina en presencia de un inhibidor de la litiasis renal, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) colocar unos 4 ml de orina fresca en un tubo de ensayo;
- b) añadir un volumen de solución de CaCl_2 $9 \cdot 10^{-3}$ M;
- c) añadir un volumen de solución que contenga la cantidad adecuada del inhibidor de la litiasis renal el cual está seleccionado del grupo formado por pirofosfato, Mg (II), ácidos polihidroxicarboxílicos, aminoácidos y glu-

cosaminoglicanos;

- d) añadir un volumen adecuado de agua desionizada para que el volumen final sea de unos 5 ml;
- e) homogeneizar cuidadosamente la solución y a continuación añadir un volumen de solución de oxalato sódico $7,5 \cdot 10^{-3}$ M; y
- f) homogeneizar de nuevo el producto obtenido y evaluar la cantidad de cristales de oxalato cálcico formados mediante conteo del número de partículas formadas en una cámara de conteo de partículas de un microscopio óptico y/o mediante medida de la luminiscencia en función del tiempo con un nefelómetro.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65