

## **Cálculos Urinarios: Importancia de los métodos de identificación química en la litogénesis, constitución y clasificación**

V. Brito<sup>a\*</sup>, B. Rojas de Gascue<sup>b\*</sup>, J. M. Mago<sup>c</sup>, W. Velásquez<sup>c,d</sup>, J. Lezama<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Venezuela.

<sup>b</sup>Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

<sup>c</sup>Laboratorio de Servolab Overseas Inc. Puerto Ordaz, Venezuela.

<sup>d</sup>Laboratorio de Fisiología, Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Venezuela.

<sup>e</sup>Laboratorio de Físicoquímica Orgánica y Química Computacional, Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Venezuela.

\*Autor de Correspondencia, E-mail: vnbrito2@gmail.com y blanca.gascue@gmail.com, Teléf.: +58 426 19946444

Recibido: 31-01-2022 Aceptado: 17-02-2022

Publicado: 31-03-2022

### **RESUMEN**

El objetivo de este estudio fue ofrecer información sobre algunos métodos de identificación de los cristales que conforman las concreciones renales en el proceso de litogénesis, la constitución y la clasificación de los cálculos urinarios. La identificación está basada en la técnica de microscopía óptica, la cual facilita la observación de la superficie de los cálculos favoreciendo, de esta forma, la identificación de formas cristalinas; corroborándose, mediante espectroscopia infrarroja, con la identificación de las especies químicas litogénicas a partir de los grupos funcionales presentes en la matriz de las concreciones. Lo antes expuesto le otorga importancia significativa a los diferentes métodos de identificación que permiten dilucidar el origen, la constitución y la clasificación de los cálculos urinarios. Es por ello que en el presente trabajo se determinó la constitución de tres (3) cálculos urinarios (A, B y C) provenientes de pacientes urolitiásicos de la consulta urológica y la unidad de diálisis del Hospital Universitario Antonio Patricio de Alcalá (Cumaná, Estado Sucre, Venezuela), para ello se utilizó microscopía óptica (MO) y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Entre los resultados obtenidos se encontró que los cálculos estudiados estaban constituidos de oxalato de calcio, fosfatos cálcicos (apatíticos y estruvíticos) y sales derivadas del ácido úrico. Estos resultados son de gran importancia, ya que el conocimiento de la composición de los cálculos urinarios permite corregir el manejo terapéutico de este problema de salud pública. Además, la combinación de las técnicas reportadas permite determinar los componentes mayoritarios en cada caso.

**Palabras clave:** Cálculos urinarios, litiasis, litogénesis, composición química, FTIR, MO.

### **Urinary Calculi: Importance of chemical identification methods in lithogenesis, constitution and classification**

### **ABSTRACT**

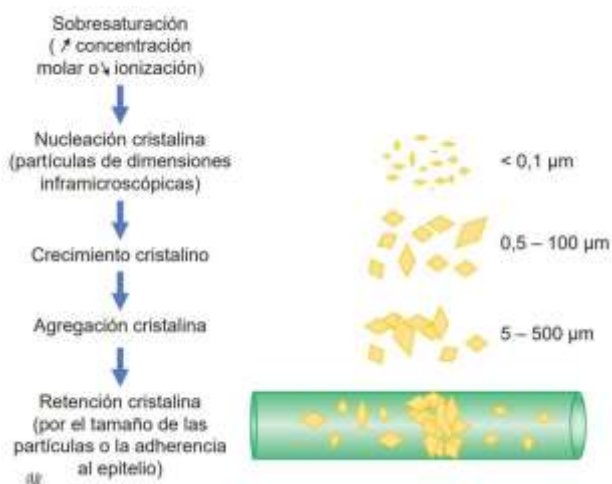
The objective of this study was to offer information on some identification methods of the crystals that form the renal concretions, in the lithogenesis process, the constitution and the classification of urinary stones. The identification is based on optical microscopy technique which facilitates the observation of the surface of the stones, thus favoring the identification of crystalline structures, corroborating by infrared spectroscopy, the identification of lithogenic chemical species from functional groups contained in the matrix of concretions. The foregoing gives significant importance to the different identification methods that make it possible to elucidate the origin, constitution and classification of urinary stones. For this reason, in the present work the constitution of three (3) urinary stones (A, B y C), from urolithiasis patients of the urological consultation and dialysis unit of the University Hospital Antonio Patricio de Alcalá (Cumaná, Estado Sucre, Venezuela), was determined using optical microscopy (OM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Among the results obtained, it was found that the stones studied were made up of calcium oxalate, calcium phosphates (apatitic and struvitic) and salts derived from uric acid. These results are of great importance since knowledge of the composition of urinary stones allows correcting the therapeutic management of this public health problem. In addition, the combination of the reported techniques makes it possible to determine the majority components in each case.

**Keywords:** Urinary stones; lithiasis; lithogenesis; chemical composition; FTIR; OM.

**INTRODUCCIÓN**

La urolitiasis constituye una de las afecciones más comunes en la sociedad moderna, es una patología de gran incidencia. Se calcula que entre 1-14% de la población la padece con una mayor tasa de incidencia en individuos entre 30-50 años y es mucho más común en hombres. Además, tiene una alta tasa de recurrencia, se estima que tras el primer episodio entre 30-50% reincide en los próximos 5 a 10 años [1].

La litiasis urinaria es una patología en la que se manifiestan, en el aparato urinario, concreciones sólidas de cristales inorgánicos y/o de matrices orgánicas formadas por los componentes de la orina en su fase sólida, a las cuales se les denomina cálculos. El término nefrolitiasis hace referencia a la presencia de cálculos en el riñón, mientras que el de urolitiasis alude a la posible ubicación de cálculos en cualquier parte del aparato urinario. Por otra parte, tal como se ilustra en la figura 1, la litogénesis es el término con el cual se designa al conjunto de los procesos fisicoquímicos y biológicos conocidos que producen desde la saturación de la orina hasta la formación de un cálculo.



**Fig. 1.** Etapas principales de la litogénesis [2].

Seguendo la figura 1, la primera etapa en este mecanismo de formación, es la sobresaturación urinaria, donde la orina por múltiples factores se encuentra con

concentraciones muy elevadas de sustancias cristalizables. El segundo paso es la nucleación, donde a partir de moléculas disueltas no disociadas, se forman partículas cristalinas de tamaño menor a  $0,1 \mu\text{m}$ . La nucleación puede ser homogénea o heterogénea, pero esta última es mucho más común debido a que requiere de niveles de sobresaturación más bajos donde los cristales se forman sobre partículas ya presentes en la orina.

La siguiente etapa consiste en el crecimiento de cristales ya formados, con la consecuencia de un aumento en su tamaño por la agregación de nuevas moléculas. En este punto los cristales resultan ya visibles en microscopía óptica.

La cuarta etapa es la aglomeración de cristales donde participan fuerzas de atracción electrostática entre cristales, así como interacciones entre cristales y macromoléculas presentes. Esta etapa deriva en partículas voluminosas que pueden llegar a superar los  $200 \mu\text{m}$ . A partir de este punto por su tamaño o por adhesión, los cristales aglomerados son retenidos y finalmente después de esta etapa, la unión de nuevas moléculas o cristales a este aglomerado favorece el crecimiento y formación de lo que se conoce como un cálculo [2].

Cabe destacar, que las clasificaciones urolitiásicas se basan tanto en su composición química, características ópticas o cristalográficas, morfología y mecanismo de formación, así como las condiciones clínicas. La clasificación de Daudon publicada en 1993 [3], es una de las más útiles por su sistematización y correspondencia clínica. Toma muy en cuenta la morfología, así como las características ya mencionadas, completando su estudio con una obligada tipificación química mediante espectroscopía infrarroja.

Establece seis tipos (ver figura 2 y tabla 1) con distintos subgrupos por familias de cálculos, los dos primeros de oxalato de calcio de distinta hidratación, la tercera con las litiasis derivadas del ácido úrico, la cuarta, con las variadas composiciones en las que está presente el fosfato

y las últimas dos menos comunes de cistina y proteínas.

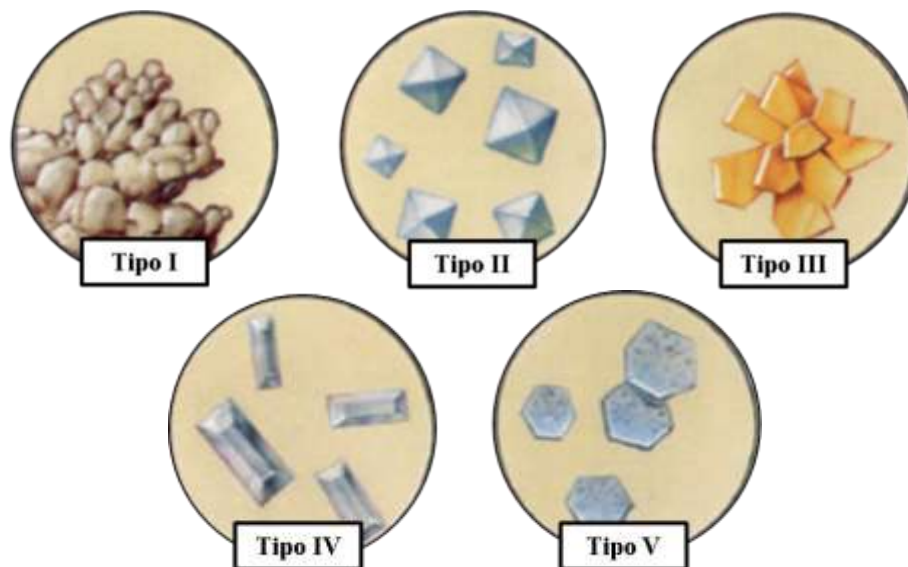


Fig. 2. Representación gráfica que ilustra la morfología de diferentes tipos de litiasis [4].

Tabla 1. Clasificación de Daudon (1993).

<b>Tipo I: Oxalatos monohidratos</b>	5 subvariedades
<b>Tipo II: Oxalatos dihidratos</b>	3 subvariedades
<b>Tipo III: Ácido Úrico y Uratos</b>	4 subvariedades
<b>Tipo IV: Fosfatos</b>	5 subvariedades
<b>Tipo V: Cistina</b>	2 subvariedades
<b>Tipo VI: Proteínas</b>	1 variedad

En cuanto a frecuencia de los componentes anteriormente mencionados, en la figura 3 se muestran los resultados de diferentes estudios que reportan la frecuencia de distintas especies químicas en cálculos urinarios, simplificados y que los divide en cinco grupos comparativos. Se puede observar, que a pesar de los distintos tamaños muestrales, el oxalato de calcio es el componente más común, seguido por fosfatos cálcicos apatíticos.

También que las litiasis úricas son más comunes, en la mayoría de los casos, que las de fosfatos estruvíticos, mientras que las de cistina son las menos comunes [5-9].

Para la identificación de estas concreciones existe un gran número de técnicas de análisis, como la microscopía óptica, la espectroscopía infrarroja y métodos químicos

tradicionales. Sin embargo, su capacidad de detectar todas sus características, es decir, composición química, especies cristalinas o morfología, no es equivalente.

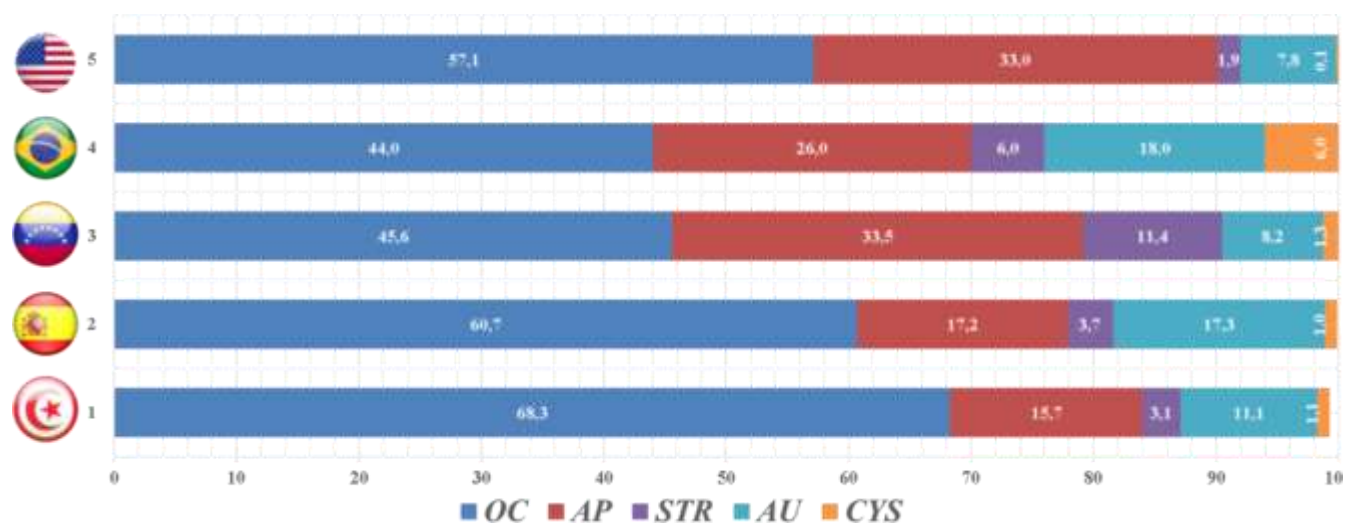
El análisis por microscopía óptica (MO) mediante la observación de la superficie y secciones del cálculo facilita la identificación de formas cristalinas y morfológicas con un bajo costo. Y suelen complementarse con los métodos químicos que se basan en la propiedad, más o menos específica, que poseen algunos iones presentes en los constituyentes de un cálculo pulverizado de reaccionar con uno o varios reactivos produciendo el desarrollo de un color o precipitado característico. Habitualmente, se presenta en un estuche comercial listo para usar, pero son escasamente fiables, con porcentajes de error en la identificación de algunos componentes superiores al 90%.

Una de las técnicas más confiables es la espectroscopía infrarroja (IR), fundamentada en la interacción de la radiación infrarroja con los enlaces de los compuestos presentes en el cálculo, lo que da lugar a la aparición de espectros con bandas características que posibilitan su

identificación. Tiene una elevada calidad analítica y permite detectar tanto sustancias cristalinas como amorfas. Finalmente, cabe mencionar a la técnica reconocida universalmente para la identificación de sustancias cristalinas, como es la difracción de rayos X. Sin embargo, a nivel clínico tiene un coste elevado, por lo que se aplica principalmente en laboratorios de investigación.

Debido a que ninguna técnica por si sola es capaz de

reconocer todas las características de un cálculo y, teniendo en cuenta la mejor relación costo-efectividad, típicamente se realiza una combinación de dos técnicas, que se conoce como análisis morfo-constitucional, mediante MO, se definen los aspectos morfológicos y la secuencia de precipitación de los componentes en el cálculo, y la espectroscopia IR, para la detección y cuantificación de los mismos [10].



**Fig. 3.** Frecuencia (%) del componente litíásico. 1: Túnez. 2: España. 3: Venezuela. 4: Brasil. 5: Estados Unidos.

OC: Oxalato de calcio. AP: Apatita. STR: Estruvita. AU: Ácido úrico. CYS: Cistina [5-9].

Lo antes expuesto le otorga importancia significativa a los diferentes métodos de identificación que permiten dilucidar el origen, la constitución y la clasificación de los cálculos urinarios. Es por ello que en el presente trabajo se determinó la composición química de diferentes muestras de cálculos urinarios utilizando microscopia óptica (MO) y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) para así determinar posteriormente un posible proceso litogénico.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron evaluados tres cálculos urinarios (Cálculos A, B y C) de pacientes urolitiásicos provenientes de la consulta urológica y la unidad de diálisis del Hospital Universitario Antonio Patricio de Alcalá (Cumaná, Estado Sucre,

Venezuela), que fueron suministrados por los pacientes a la empresa Servolab Overseas Inc. Para ello se empleó un microscopio óptico digital Aigo EV5610 utilizando un objetivo de 4X, con el que se obtuvieron las micrografías de las superficies de las concreciones urinarias.

Los espectros infrarrojos de cada cálculo se obtuvieron utilizando un espectrómetro FTIR Bruker Alpha II en un rango desde 4000 a 700cm<sup>-1</sup> con una resolución de 2 cm<sup>-1</sup> luego de 32 barridos recolectados. Los cálculos se analizaron en el módulo de reflexión total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés) sin ningún tratamiento previo. Los espectros FTIR obtenidos se evaluaron con el software *Alpha Kidney Stone Analyzer* que contiene una librería con más de 5000 espectros de muestras auténticas de cálculos renales que fue creada y validada por el Prof.

Michel Daudon, para identificar los componentes químicos de cada muestra [11-13].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

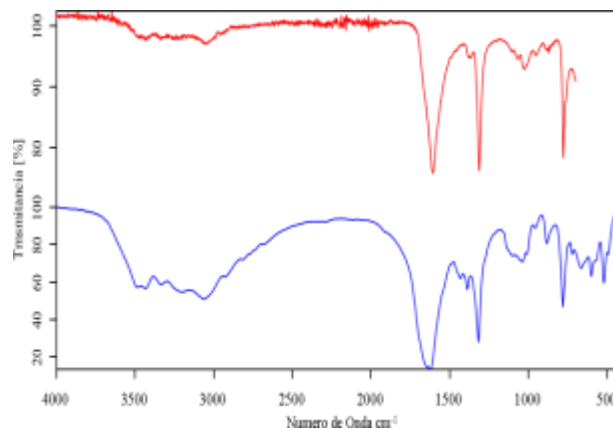
Para analizar las micrografías obtenidas, se siguió el método de análisis morfo-constitucional de los cálculos reportado por Daudon *et al.* [2, 3, 11, 14]. Los puntos principales que fueron analizados en cada cálculo son tamaño, forma, color, aspecto (liso, rugoso o afilado) de la superficie, y apariencia de la misma (organizada y homogénea, o desorganizada y heterogénea).

La figura 4 muestra la micrografía obtenida del Cálculo A, en la que se puede observar que no se evidencia una morfología cristalina definida, sino más bien una superficie suave con diferentes matices de color marrón. Lo cual coincide con la descripción de cálculos de diferentes tipos. La mayoría de los cálculos que son de color marrón se debe a que su crecimiento es intermitente permitiendo que los pigmentos urinarios, conocidos como urocromos, se fijen en los cristales, usualmente de oxalato de calcio [11].



**Fig. 4.** Micrografía del Cálculo A.

En el espectro infrarrojo del Cálculo A (figura 5, línea en rojo), se observan dos bandas características a 1608 y a 1313  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico, respectivamente, de los grupos carboxilato del oxalato.



**Fig. 5.** Espectro IR del Cálculo A (Línea roja) y espectro IR referencial de un cálculo mayoritariamente constituido por whewellita (70%) (Línea azul).

A través del software de identificación de cálculos urinarios se obtuvo un contenido de 70% de whewellita (línea en azul), el cual corresponde al nombre mineral del oxalato de calcio monohidratado.

El oxalato de calcio es uno de los componentes más comunes de los cálculos urinarios, debido a que la concentración de sus iones se encuentra próxima a su límite de sobresaturación. Como muchas de otras urolitiasis, su formación ocurre producto de un desequilibrio soluto-solvente que provoca la sobresaturación urinaria. Cuando la concentración de iones oxalato es elevada, superior a 0,3 mmol/L, lo que se conoce como hiperoxaluria, esto deriva en formación de urolitiasis de oxalato de calcio monohidratado. Esto es provocado por un alto consumo de alimentos ricos en oxalato como chocolate negro o legumbres como remolacha, espinaca, entre otras; un alto consumo de alimentos ricos en hidroxiprolina, que inducen una síntesis metabólica de oxalato en el hígado; o una baja ingesta de calcio, lo que resulta en una mayor absorción de iones oxalato por el intestino [11].

Por otra parte, si la concentración elevada es de los iones de calcio, mayor de 3,8 mmol/L, denominada hipercalcemia, se originan cálculos de oxalato de calcio dihidratado, whewellita. Ambos tipos de cálculos no son dependientes del pH, sin embargo, se encuentran dentro

de un rango de 5,2 a 7,8 [15-16].

La figura 6 muestra la micrografía del Cálculo B, en la que se observa una superficie heterogénea en relieve con depósitos superficiales amorfos de color blanquecino a beige, lo que coincide con la descripción reportada sobre los cálculos de fosfato, especialmente los de carboapatita (fosfato cálcico carbonatado), debido a que los otros tipos de fosfatos, como la estruvita (fosfato de amonio y magnesio hexahidratado) aunque también exhiban una superficie blanquecina y muestren una cristalización difusa, como la del Cálculo B. Estos se caracterizan por formar agregados de grandes cristales con ángulos y aristas definidos, que no se observan en la figura 6 [11].

Los cálculos de fosfato constituyen un grupo de urolitiasis heterogéneo y muy amplio, con composiciones y mecanismos de formación mucho más complejos que otros.



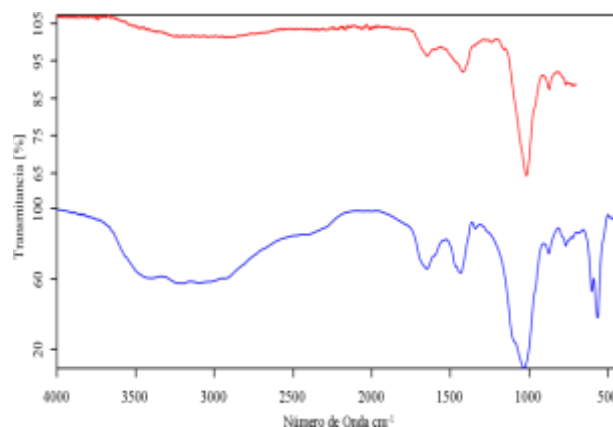
**Fig. 6.** Micrografía del Cálculo B.

En el espectro IR del Cálculo B (figura 7, línea roja) se aprecia una banda intensa cercana a los  $1017\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los grupos fosfatos, por el estiramiento en los enlaces P-O.

También se observan bandas menos intensas a  $1418\text{ cm}^{-1}$  que corresponden al ion carbonato y a  $1646\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al ion amonio. Según el software de identificación esta muestra está constituida por 60% de carboapatita (fosfato cálcico carbonatado) y 30% de

estruvita (fosfato de amonio y magnesio hexahidratado) (línea azul). Este tipo de cálculos suelen aparecer en orinas alcalinas y se catalogan como infecciosos. Las infecciones urinarias por ciertas bacterias generan un aumento en la ureasa, esta es la enzima que cataliza la conversión de urea en amoniaco y dióxido de carbono.

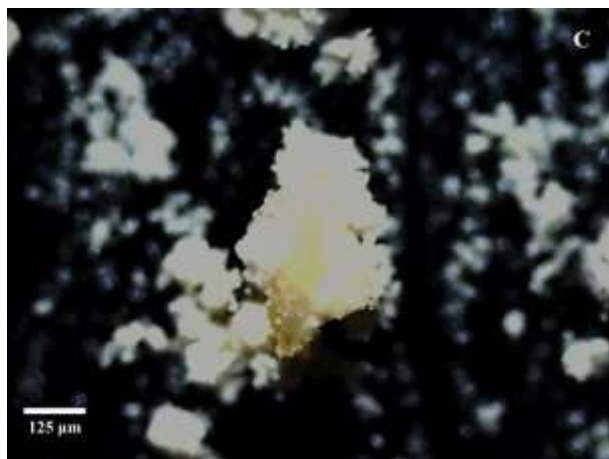
El amoniaco pasa a amonio alcalinizando la orina y, según la abundancia de cationes e iones fosfato, precipita como fosfato amónico magnésico hexahidratado (estruvita). Mientras que, el dióxido de carbono finaliza como carbonato en concreciones formadas por fosfatos apatíticos, como el fosfato cálcico carbonatado (carboapatita) [17-18].



**Fig. 7.** Espectro IR del Cálculo B (Línea roja) y espectro IR referencia de un cálculo mayoritariamente constituido de una mezcla de fosfatos: carboapatita/estruvita (60/30%) (Línea azul).

La figura 8 muestra la micrografía del Cálculo C, en la que se observa una partícula de características cristalinicas de un color marrón amarillento, rodeado por partículas blanquecinas.

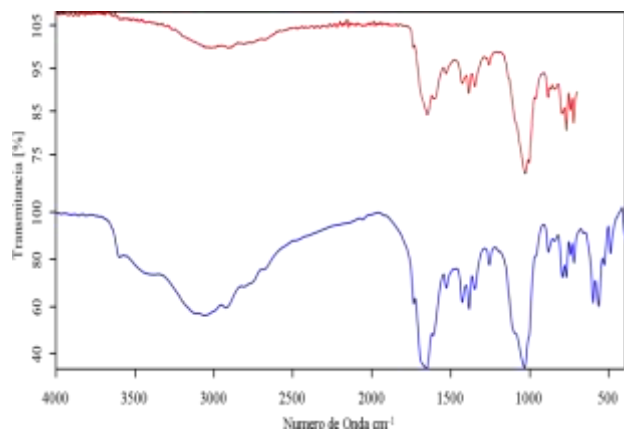
Las concreciones de este color más amarillo o naranja son usualmente atribuidas a cálculos de ácido úrico [19]. El color anaranjado típico de los cálculos de ácido úrico resulta de una afinidad particular entre los cristales de ácido úrico y un pigmento rojo naturalmente presente en la orina llamado uricina [11].



**Fig. 8.** Micrografía del Cálculo C.

Otra de las características que se reporta de las concreciones de ácido úrico, que no se observaron en la micrografía del Cálculo C, son una superficie lisa y homogénea en el caso del ácido úrico anhidro, o una superficie rugosa, heterogénea y de estructura porosa en el caso del ácido úrico dihidratado.

Sin embargo, los resultados por espectroscopia infrarroja (figura 9, línea roja) indican que se trata de una mezcla de uratos y carboapatita. En este caso se evidencia nuevamente la banda correspondiente al fosfato a  $1030\text{ cm}^{-1}$ , y en el rango de  $1500\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$  se observaron tres bandas características de los uratos:  $1427$ ,  $1385$  y  $1346\text{ cm}^{-1}$  [20].



**Fig 9.** Espectro IR del Cálculo C (Línea roja) y espectro IR referencial de un cálculo constituido de una mezcla de urato de sodio/carboapatita/urato de amonio (50/40/10%) (Línea azul).

El ácido úrico es el resultado del metabolismo de las proteínas ingeridas en la dieta, y es uno de los componentes principales de la orina como producto final de desecho [11].

Al igual que las litiasis oxálicas, las úricas se producen por sobresaturación de la orina. En el caso del ácido úrico, tiene la diferencia de ser muy dependientes del pH. El ácido úrico a pH bajo se mantiene no disociado disminuyendo su solubilidad y precipitando, lo que origina la litiasis de ácido úrico. A medida que el pH aumenta por distintos factores como una concentración elevada de amonio o pérdidas digestivas de bases, alcaliniza la orina provocando la desprotonación del ácido úrico convirtiéndolo en urato. En los uratos se incorporan cationes dependiendo de su abundancia, usualmente son amonio, sodio o potasio formándose así cálculos de uratos, como el del cálculo C [21].

## CONCLUSIONES

El análisis morfológico mediante microscopia óptica junto al análisis por espectroscopia FTIR permitió identificar la composición química de los cálculos urinarios evaluados. La espectroscopia infrarroja aportó mayor información sobre la composición química de los cálculos, debido a que las descripciones resultantes del análisis morfológico coincidían con más de un tipo, por lo que la información suministrada por esta técnica era limitada. La aplicación del software *Alpha Kidney Stone Analyzer* facilitó la identificación de los componentes químicos, así como su cuantificación. La importancia en la determinación analítica de los constituyentes químicos de los cálculos urinarios radica en su directa correlación clínica para su tratamiento y prevención.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte de un Proyecto de Investigación del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente (IIBCA-UDO) y del Departamento de Bioanálisis de la UDO en conjunto

con la empresa privada SERVOLAB, especialistas en servicios y suministros de análisis instrumental, a la cual se le agradece la pasantía de investigación del Tesista Valentín Brito en sus laboratorios. También se agradece a la FUNDACIÓN POLAR, por la donación y el mantenimiento del Espectrómetro FTIR del IIBCAUDO.

## REFERENCIAS

- [1] Sola I., Martínez-Ballesteros C., Vázquez D., Carballido J. (2011) “Litiasis urinaria” *Medicine* 10(83):5601-5611.
- [2] Daudon M. (2014) “Litogénesis” *EMC Urología* 46(1):1-14.
- [3] Daudon M., Bader C.A., Jungers P. (1993) “Urinary calculi: Review of classification methods and correlations with etiology” *Scanning Microscopy* 7(3):1081-1106.
- [4] Gómez P., Guzón O., Navarro B., Panadero F. (2010) “Litiasis Urinaria” *Panorama actual del medicamento* 34(338):835-840.
- [5] Alayaa A., Nouri A., Belgithb M., Saadc H., Hell I., Hellarac W. Jouini R., Najjar M.F. (2012) “Cambios en el tipo de cálculos renales según sexo y edad en pacientes tunecinos” *Actas Urológicas Españolas* 36(2):171-177.
- [6] Costa-Bauzá A., Ramis M., Montesinos V., Conte A., Pizá P., Pieras E., Grases F. (2007) “Type of renal calculi: variation with age and sex” *World J Urol* 25(4):415-421.
- [7] Henríquez C., Herrera J. (1995) “Aspectos clínicos de 116 pacientes formadores de cálculos renales” *Investigación Clínica* 26(2):103-115.
- [8] Silva S.F.R., Matos D.C., Silva S.L., Daher E.F., Campos H.H., Silva C.A.B. (2010) “Chemical and morphological analysis of kidney stones. A double-blind comparative study” *Acta Cirúrgica Brasileira* 25(5):444-448.
- [9] Grant C., Guzman G., Parke R., Amdur R.L., Mufarrij P. (2018) “Variation in Kidney Stone Composition within the United States” *Journal Endourology* 32(10):973-977.
- [10] Gracia-García S. Millán-Rodríguez F., RousaudBarón F., Montañés-Bermúdez R., Angerri Feu O., Sánchez-Martín F., Villavicencio-Mavrich H., Oliver-Samper A. (2011) “Por qué y cómo hemos de analizar los cálculos urinarios” *Actas Urol Esp* 35(6):354-362.
- [11] Daudon M., Dessombz A., Frochot V., Letavernier E., Haymann J.P., Jungers P., Bazin D. (2016) “Comprehensive morpho-constitutional analysis of urinary stones improves etiological diagnosis and therapeutic strategy of nephrolithiasis” *Comptes Rendus Chimie* 19(11-12):1470-1491.
- [12] Carmona P., Bellanato J., Escolar E. (1997) “Infrared and Raman Spectroscopy of Urinary Calculi: A Review” *Biospectroscopy* 3(5):331-346.
- [13] Bruker Optics. (2013) “Application Note” *ANM131*.
- [14] Daudon M., Frochot, V. (2015) “Crystalluria” *Clin Chem Lab Med* 53(Suppl 2):S1479–S1487.
- [15] Bazin D., Leroy C., Tielens F., Bonhomme C., Bonhomme-Coury L., Damay F., Le Denmat D., Sadoine J., Rode J., Frochot V., Letavernier E., Haymann J.P., Daudon M. (2016) “Hyperoxaluria is related to whewellite and hypercalciuria to weddellite: What happens when crystalline conversion occurs?” *Comptes Rendus Chimie* 19(11-12):1492-1503.
- [16] Petit I., Belletti G.D., Debroise T., Llansola-Portoles, M.J., Lucas I.T., Leroy C., Bonhomme C., Bonhomme-Coury L., Bazin D., Daudon M., et al. (2018) “Vibrational Signatures of Calcium Oxalate Polyhydrates” *ChemistrySelect* 3(31):8801-8812.
- [17] Gracia-García S., Montañés-Bermúdez R. (2018) “Estudio bioquímico del paciente litiásico. El estudio de la cristaluria” *Ed Cont Lab Clín* 33:53-63.
- [18] Tansel B., Lunn G., Monje O. (2018) “Struvite formation and decomposition characteristics for ammonia and phosphorus recovery: A review of magnesium-ammonia-phosphate interactions”



*Chemosphere* 914:504-514.

- [19] Daudon M., Letavernier E., Weil R., Veron E., Matzen G., André G., Bazin D. (2015) "Type 2 diabetes and uric acid stones: A powder neutron diffraction investigation" *Comptes Rendus Chimie* 19(11-12):1527-1534.
- [20] Izatulina A.R., Gurzhiy V.V., Krzhizhanovskaya M.G., Chukanov N.V., Panikorovskii T.L. (2019) "Thermal Behavior and Phase Transition of Uric Acid and Its Dihydrate Form, the Common Biominerals Uricite and Tinnunculite" *Minerals* 9(6):373.
- [21] Serrano S., Martínez V. (2011) "*Litiasis Renal: Estudio Metabólico. Técnicas de Análisis de Cálculos Urinarios. En El Laboratorio Clínico III: Análisis de las Muestras de Orina*" Toledo, LABCAM. ISBN: 978-84-615-5915-2 pp. 129-158.