

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE CÁLCULOS URINARIOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA (FTIR): ESTUDIO RETROSPECTIVO DE 144 PACIENTES PARAGUAYOS¹

ANALYSIS OF URINARY CALCULI COMPOSITION BY INFRARED SPECTROSCOPY (FTIR): A RETROSPECTIVE STUDY OF 144 PARAGUAYAN PATIENTS¹

Rosa María Guillén²

Patricia Funes³

Irene Ruiz³

Gloria Echague⁴

Esteban Ferro⁵

1 Trabajo presentado por la Facultad de Ciencias Médicas y financiado con rubros del Rectorado de la Universidad Nacional de Asunción, durante el año 2013.

2 Autor correspondiente. Auxiliar de Docencia Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Médicas (FCM), Docente Investigador, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), Email: rmg Guillen@gmail.com

3 Coinvestigadora. Departamento de Análisis Clínicos, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS)

4 Jefa del Dpto. de Análisis Clínicos y Microbiología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS)

5 Encargado de Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Médicas (FCM)

RESUMEN

Los cálculos urinarios son el resultado de la cristalización, agregación y retención de diversos compuestos en la vías urinarias. La composición de los cálculos es el fiel reflejo de las condiciones o causas que originaron la patología y por tanto es información importante para la selección de las medidas terapéuticas orientadas a evitar recidivas. El presente trabajo descriptivo retrospectivo tuvo como objetivo determinar la composición de cálculos urinarios de 144 pacientes paraguayos empleando la combinación de análisis morfológico por epimicroscopía y análisis constitucional por espectrofotometría infrarroja. Los cálculos analizados provinieron de 66 mujeres y 78 varones con media de edad de 33 ± 18 y 32 ± 22 años respectivamente. El modo de eliminación más frecuente fue la cirugía abierta en el 32,6% de los pacientes. El análisis por FTIR mostró que el 35,4% de los cálculos eran puros, mientras que en el 64,6% restante se encontraron mezclas de 2 a 4 componentes. Tanto en los cálculos puros como en los mixtos los componentes más frecuentes fueron respectivamente: el oxalato de calcio (52,8% y 72%), la carbapatita (13,7% y 10,8%) y el ácido úrico (11,7% y 8,7%). Se detectaron por primera vez en Paraguay compuestos poco frecuentes como Cistina, Xantina y Sílice opalina asociados a procesos patológicos específicos.

Palabras clave:

Urolitiasis, Composición de cálculos urinarios, FTIR

ABSTRACT

Urinary calculi are the result of diverse compounds crystallization, adherence and retention in the urinary system. Calculi composition is the faithful reflection of the pathology

causes therefore this information is important for the proper selection of therapeutic measures implemented to avoid recurrence. This descriptive and retrospective study was made to determine composition of urinary calculi of 144 paraguayen patients by epimicroscopy and infrared spectroscopy. The samples analyzed came from 66 women and 78 men with mean age of 33 ± 18 and 32 ± 22 years respectively. The most frequent way of calculi elimination was open surgery in 32,6% of the patients. FTIR showed that 35,4% of the samples were pure, meanwhile the remaining 64,6% were a mixture of 2 to 4 compounds. The most frequent components in pure and mixed calculi were respectively: calcium oxalate (52,8% and 72%), carbapatite (13,7% and 10,8%) and uric acid (11,7% and 8,7%). Rare compounds such as cystine, xanthine and opaline silica were detected for the first time in Paraguay, all this are associated with specific pathological process.

Key words: Urolithiasis, Urinary calculi composition, FTIR.

INTRODUCCIÓN

La formación de cálculos en las vías urinarias es un problema de salud pública al que deben enfrentarse de forma regular tanto urólogos como nefrólogos. En países occidentales la frecuencia de la litiasis urinaria se ha triplicado en los últimos 50 años. Varios autores señalan una incidencia de entre el 5 al 15% en países industrializados (CHOU *et al.*, 2007; DAUDON, 2005; JUNGERS, *et al.*, 1999)

El diagnóstico de esta patología se basa en datos clínicos, análisis laboratoriales y técnicas de imagen. Si bien los síntomas son en general muy similares, las causas que originan la patología varían incluyendo factores intrínsecos, ambientales y metabólicos. La recurrencia en general supera el 50%

en un periodo de seguimiento de entre 5 a 7 años, conllevando graves riesgos para la función renal. La identificación correcta de la etiología es esencial para instaurar medidas terapéuticas orientadas a disminuir las recidivas (BANDI *et al.*, 2008; EVAN, 2010)

Los cálculos pueden estar compuestos de oxalato cálcico, fosfato cálcico, estruvita, ácido úrico, cistina y medicamentos en el menor número de los casos. La litiasis por oxalato de calcio es la más frecuente y representa el 70% de los casos, asociado a hiper calciuria y/o hiper oxaluria. Tanto la litiasis por fosfato de calcio como la de estruvita tienen en común la alcalinización urinaria persistente. Los cálculos de ácido úrico se forman preferentemente en varones con pH urinario menor a 5 acompañado o no de hiperuricosuria. Enfermedades genéticas asociadas a un aumento en la excreción de cistina están asociadas a cuadros litiásicos agresivos y recidivantes. Medicamentos como el triamtereno, las sulfamidas y otros pueden promover la formación de cálculos en las vías urinarias. En las sociedades occidentales el 70-80% de las litiasis están compuestas de oxalato y/o fosfato de calcio, asociados a hábitos alimentarios en los que resaltan el consumo elevado de sal, de proteínas de origen animal, materia grasa y azúcares refinados. En nuestro país, tanto los hábitos alimenticios como las condiciones climáticas favorecen la formación de cálculos en las vías urinarias. Trabajos nacionales señalan que la litiasis no sólo afecta a población adulta sino también a niños y que son frecuentes los antecedentes familiares y la presencia de desequilibrios metabólicos como la hipocitraturia y la hiper calciuria, sumado al hecho de que el tipo mayoritario de cálculos urinarios corresponde a los formados por oxalato de calcio (GUILLÉN, *et al.*, 2010, 2011; JUNGERS, *et al.*, 1999; LÓPEZ AND HOPPE, 2010)

El análisis de la composición de los cálculos es importante para determinar la posible etiología de la formación del cálculo y su patofisiología. Varios métodos son empleados para este efecto incluyendo métodos químicos y métodos físicos combinados en pares como: la difracción de rayos X, la espectrofotometría infrarroja, microscopía de luz polarizada y microscopía electrónica de barrido (Bassiri *et al.*, 2012). La espectrofotometría infrarroja es considerada a nivel mundial como el método estándar para el análisis de la composición de los cálculos urinarios debido a que es muy sensible, selectiva para todos los componentes del cálculo y requiere de mínima cantidad de muestra para el análisis (SINGH, 2008).

Daudon y colaboradores propusieron un protocolo de análisis de cálculos combinando dos técnicas físicas, la epimicroscopía para el análisis morfológico de los cálculos complementada por la espectroscopía infrarroja para el análisis constitucional. El análisis morfológico de los cálculos urinarios se basa en la estructura cristalina que es el reflejo de la composición de los mismos. La combinación de ambas técnicas en un número grande de cálculos permitió establecer una relación entre composición y causas de formación de cálculos (DAUDON *et al.*, 1993).

A nivel nacional, en el año 2006 se inició la implementación del análisis morfológico de los cálculos aplicando los criterios descritos por Daudon y colaboradores (DAUDON *et al.*, 1993; GUILLÉN, R *et al.*, 2008).

Si bien este hecho constituyó un adelanto desde el punto de vista analítico como aporte del laboratorio al diagnóstico de litiasis urinaria, incluía limitaciones propias de la técnica como ser la incapacidad para estimar cantidad, detectar o identificar compuestos minoritarios, así como compuestos

poco frecuentes como medicamentos, etc. En este contexto, gracias a la colaboración entre dos instituciones de la Universidad Nacional de Asunción como son el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), que cuenta con un banco de cálculos urinarios colectados desde el año 2006 y la Facultad de Ciencias Médicas, constituida en la entidad pionera en la aplicación de la espectroscopía infrarroja al análisis de cálculos urinarios, se realizó este estudio con la finalidad de determinar la composición química de cálculos urinarios de pacientes paraguayos empleando por primera vez en el país la espectroscopía infrarroja.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y población en estudio:

Estudio descriptivo retrospectivo con muestreo consecutivo en el que se analizaron cálculos urinarios provenientes de 144 pacientes con diagnóstico de litiasis que concurren al IICS a partir del año 2006 con pedido médico de análisis morfológico de cálculos urinarios. Los datos personales como edad y sexo del paciente, así como ubicación y modo de eliminación de los cálculos fueron registrados en una ficha de rutina del laboratorio de análisis clínicos del IICS y sometidos a codificación.

Asuntos éticos:

El protocolo de estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas y los Comités Científico y Ético del IICS. Los datos de los pacientes se mantuvieron en estricta confidencialidad y fueron manejados de forma exclusiva por los investigadores bajo códigos de proyecto.

Análisis de los cálculos urinarios:

El análisis morfológico se realizó en el IICS siguiendo el protocolo y los

criterios de la clasificación publicada por Daudon y colaboradores en 1993. Para identificar las características estructurales de los cálculos se empleó un microscopio estereoscópico (Motic SMZ 140, China), observando la superficie, para luego realizar un corte en la zona media del cálculo y estudiar tanto la sección como el núcleo. Se tomaron muestras de todos los estratos para el análisis constitucional empleando espectrofotometría infrarroja. Se realizaron soluciones del polvo de la muestra con bromuro de potasio grado infrarrojo (Merck, Estados Unidos) en una concentración aproximada del 1% que fue homogenizada en un mortero de ágata y sometida a presión en una prensa hidráulica (Shimatzu, Japón) hasta conseguir una pastilla de 13 mm de diámetro y un espesor aproximado de 1mm, apropiada para la lectura del espectro infrarrojo. El barrido espectral se llevó a cabo en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} y 60 scans para la adquisición de los datos de FTIR empleando el espectrofotómetro infrarrojo PRESTIGE 21 (Shimatzu, Japón).

Análisis estadístico:

El cálculo del tamaño mínimo de la muestra necesaria para este protocolo fue de 139 pacientes. Los datos fueron introducidos y almacenados en una base de datos, utilizando una planilla electrónica (Microsoft Excel). El análisis estadístico se realizó empleando los softwares Epi Info 3.5.2 y SPSS 11.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de pacientes, 66 (45,8%) fueron del sexo femenino y 78 (54,2%) del sexo masculino con media de edad para cada grupo de 33 ± 18 años y 32 ± 22 años respectivamente. La ubicación de los cálculos fue predominantemente en vías urinarias altas que incluyeron 43,1% en riñón y 6,9% en uréteres, por otra parte en

vías urinarias bajas, vejiga y uretra de forma conjunta, correspondían al 15,3%, mientras que en el 34,7% de los pacientes no se contaba con el dato de la ubicación exacta del cálculo. Estos datos coinciden con publicaciones de países occidentales (CHOU *et al.*, 2007; DAUDON, 2005)

La expulsión espontánea de los cálculos se registró en 29 pacientes (20,1%), 75 pacientes (52%) requirieron algún tipo de intervención urológica para la remoción de los cálculos. En el caso de las intervenciones urológicas la más frecuente fue la cirugía abierta en 47 pacientes (32,6%), litotricia extracorpórea (n=13, 9%), nefrolitotomía percutánea (n=10, 6,9%) y endoscopia (n=5, 3,5%). En 40 pacientes (27,9%) no se obtuvo datos sobre la forma de eliminación del cálculo. Es importante resaltar el elevado porcentaje de pacientes que requiere intervenciones urológicas para la eliminación de los cálculos con las complicaciones que éstas conllevan. El porcentaje de pacientes sometidos a procedimientos mínimamente invasivos es muy inferior a la reportada en países europeos, sin embargo son similares a datos de trabajos de investigación realizados en Brasil y Algeria (DAUDON, 2005; DJELLOUL *et al.*, 2006; JUNGERS, PAUL *et al.*, 1999; DA SILVA *et al.*, 2009)

La evaluación de la espectrofotometría infrarroja realizada al analizar los componentes de todos los estratos de los cálculos: núcleo, sección y superficie, mostró que los cálculos provenientes de 51 (35,4%) pacientes estaban formados por un solo componente, y fueron considerados como cálculos puros, mientras que los restantes 93 pacientes (64,6%) presentaron cálculos mixtos en los que se encontraron combinaciones de dos hasta 4 compuestos diferentes. En el caso de los cálculos puros el componente más frecuente fue el oxalato de calcio monohidratado (COM) en 27 pacientes (52,8%), se-

guido del fosfato de calcio carbonatado o carbapatita (CAP) en 7 pacientes (13,7%), otros compuestos responsables de la formación de cálculos puros se muestran en la tabla 1.

En el caso de los cálculos formados por COM, varios autores han señalado que este tipo de cristal se ve favorecido en condiciones de hiperoxaluria, pudiendo ser esta condición intermitente, o bien cuando hay un déficit de inhibidores urinarios de cristalización del oxalato de calcio como lo son el citrato y el magnesio (COE *et al.*, 2011). Mientras que la cristalización de la carbapatita (CAP) se da en condiciones en que la orina presenta pH alcalino como puede darse en algunas infecciones urinarias, o bien en presencia de hiper-calciuria o hiperfosfaturia (CARPENTIER *et al.*, 2009).

Si bien fueron poco frecuentes los cálculos formados por Cistina, Estruvita (PAM), Silice opalina y Xantina, todos estos compuestos evidencian procesos fisiopatológicos muy específicos y por tanto su identificación es fundamental para la orientación del tratamiento del cálculo. Además de que este trabajo constituye el primer reporte a nivel nacional de la presencia de cistina (Figura 1), sílice opalina y xantina en cálculos de pacientes paraguayos.

La presencia de cistina en un cálculo es diagnóstica de una patología genética, la cistinuria, en la que existe un defecto en el transportador renal de aminoácidos básicos y que produce niveles elevados de cistina en orina, la cual cristaliza formando cálculos muy recidivantes (EGGERMANN *et al.*, 2012). La estruvita (PAM) se forma sólo en orinas con pH extremadamente alcalino y exceso de concentración de amonio, estas condiciones se observan en infecciones urinarias generadas por gérmenes productores de ureasa como aquellos del género *Proteus*, *Ureaplasma* y otros (Coe *et al.*, 2010).

Los cálculos compuestos de Xantina se han asociado a enfermedades genéticas como la Xantinuria o bien pueden darse en el curso de enfermedades mieloproliferativas en las cuales hay un metabolismo exacerbado de purinas. A nivel mundial los pocos casos reportados de cálculos de síli-

ce opalina han sido relacionados en adultos con el consumo de trisilicato de aluminio como agente terapéutico de gastritis, mientras que en niños se asoció al uso del trisilicato de aluminio como espesante de leche usado en niños con problemas de reflujo gástrico.

Tabla 1. Media de valores de analitos séricos basales antes de inicio del tratamiento^a

	Total	Mujeres	Varones	p ^b
	(n=36)	(n=23)	(n=13)	
Calcio (mg/dL)	9,8 ± 1,1	9,9 ± 1,4	9,6 ± 0,4	0,390
Magnesio (mg/dL)	1,9 ± 0,5	2,0 ± 0,6	1,8 ± 0,3	0,253
Fósforo (mg/dL)	2,9 ± 0,6	2,8 ± 0,6	3,2 ± 0,5	0,043
Ácido úrico (mg/dL)	5,1 ± 2,2	4,2 ± 1,8	6,7 ± 1,7	0,0001
Urea (mg/dL)	37 ± 19	33 ± 12	44 ± 26	0,099
Creatinina (mg/dL)	1,1 ± 0,7	0,8 ± 0,2	1,5 ± 1,1	0,004

^a Media ± Desvío estándar, ^b prueba t para muestras independiente, nivel de significancia p<0,05



Figura 1. Análisis morfológico de cálculos urinarios: A) Cálculo vesical de 45x28x18 mm, extraído por cirugía de un paciente masculino de 71 años, composición Ácido úrico B) Cálculo renal de 5x3x3 mm, eliminado de forma espontánea por una paciente de sexo femenino de 32 años de edad. Composición: Weddellita (oxalato de calcio dihidratado) + whewhellita (Oxalato de calcio monohidratado)

La mayor proporción de cálculos mixtos observados en este trabajo muestra de forma coincidente con lo señalado por muchos autores que la urolitiasis es el resultado de la interacción de varios factores en simultáneo. En estos cálculos se pone en evidencia la predominancia del oxalato de calcio, ya sea en su forma monohidratada (COM) o dihidratada (COD), combinados con diversos compuestos minoritarios que corresponde al 72% del total de cálculos mixtos, seguidos de los cálculos de carbapátita (14%) y ácido úrico (8,6%). Estos resultados coinciden con lo publicado en la literatura por países occidentales en la que se señalan al oxalato de calcio entre el 75% y 90% como componente mayoritario de los cálculos urinarios, seguido del fosfato de calcio y del ácido úrico (DAUDON *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2009). La patogénesis de los cálculos de oxalato de calcio es actualmente asociada a factores metabólicos o genéticos, dentro de los cuales se señala la presencia de la Placa de Randall, consistente en la formación de cristales en la papila renal que sirven como núcleo para la cristalización del oxalato de calcio, o bien condiciones de exceso de la concentración urinaria de promotores de cristalización como el oxalato o

el calcio o el déficit de inhibidores urinarios de cristalización como el citrato y el magnesio, siendo en muchos casos asociados a la obesidad y otras patologías como la diabetes (BOUCHIRÉB *et al.*, 2012; COE *et al.*, 2011).

La espectrofotometría infrarroja es una de las técnicas más frecuentemente empleadas a nivel internacional debido a que permite el análisis preciso, eficiente, cuantitativo y estrato independiente de componentes de cálculos urinarios (BASIRI *et al.*, 2012; SINGH, 2008). Su aplicación en Paraguay ha permitido detectar, identificar y discernir los componentes de los cálculos urinarios siendo éstos mayoritarios, minoritarios, presentes en forma pura o como mezclas, e incluso compuestos raros reportados por primera vez como la cistina, xantina, sílice opalina y otros. El empleo de este tipo de análisis en un mayor número de muestras no sólo brindará datos epidemiológicos valiosos para el país, sino también un beneficio directo para el paciente litiasico, ya que los resultados de la composición de sus cálculos permitirá que el médico tratante pueda identificar los factores de riesgo litogénicos propios de cada paciente y recomiende medidas terapéuticas per-

Tabla 2. Media de valores de analitos urinarios basales antes del inicio del tratamiento^a

	Total	Mujeres	Varones	P ^b
	(n=36)	(n=23)	(n=13)	
Calcio (mg/24Hs)	186±97	181±91	181±111	0,835
Magnesio (mg/24Hs)	111±63	103±54	125±76	0,323
Sodio (mEq/24Hs)	162±77	136±47	207±97	0,005
Amonio (mM)	20±12	20±12	20±13	0,975
Fósforo (mg/24Hs)	651±246	550±154	831±281	0,004
Sulfato (mM)	22±11	23±11	22±10	0,693
Citrato (mg/24Hs)	381±227	404±262	340±147	0,426
Oxalato (mg/24Hs)	28±12	24±7	35±15	0,004
Ácido úrico (mg/24Hs)	435±168	417±148	467±200	0,400

^a Media ± Desvío estándar, ^b prueba t para muestras independiente, nivel de significancia p<0,05

sonalizadas que disminuyan el riesgo de recidivas y por tanto repercutan en la mejor calidad de vida del paciente.

CONCLUSIONES

La realización de este estudio ha permitido implementar por primera vez en el país la aplicación de la espectrofotometría infrarroja en el análisis de cálculos urinarios. La composición predominante de los cálculos urinarios de pacientes incluidos en este trabajo es de oxalato de calcio, seguido de cálculos de fosfato de calcio y ácido úrico, por tanto asociado a factores de riesgo similares a los descritos en países occidentales. Así mismo se han identificado compuestos asociados a litiasis genéticas o medicamentosas como cistina, xantina y sílice opalina.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ARIKYANTS, N.; SARKISSIAN, A.; HESSE, A.; EGGERMANN, T.; LEUMANN, E.; AND STEINMANN, B. (2007). Xanthinuria type I: a rare cause of urolithiasis. *Pediatr. Nephrol.* 22, 310–314.

AUGUSTI, M.; MIKAELIAN, J.C.; MONSAINT, H.; BRIN, D.; AND DAUDON, M. (1993). [A silica urinary calculus secondary to the absorption of gellopectose in a child]. *Prog. Urol.* 3, 812–815.

BANDI, G.; NAKADA, S.Y.; AND PENNISTON, K.L. (2008). Practical approach to metabolic evaluation and treatment of the recurrent stone patient. *WMJ* 107, 91–100.

BASIRI, A.; TAHERI, M.; AND TAHERI, F. (2012). What is the state of the stone analysis techniques in urolithiasis? *Urol J* 9, 445–454.

BOUCHIREB, K.; BOYER, O.; PIETREMENT, C.; NIVET, H.; MARTELLI, H.; DUNAND, O.; NOBILI, F.; SYLVIE, G.L.; NIAUDET, P.; SALOMON, R. *et al.* (2012). Papillary stones with Randall's plaques in children: clinicobiological features and outcome. *Nephrol. Dial. Transplant.* 27, 1529–1534.

CARPENTIER, X.; DAUDON, M.; TRAXER, O.; JUNGERS, P.; MAZOUYES, A.; MATZEN, G.; VÉRON, E.; AND BAZIN, D. (2009). Relationships between carbonation rate of carbapatite and morphologic characteristics of calcium phosphate stones and etiology. *Urology* 73, 968–975.

CHOU, Y.-H.; LI, C.-C.; WU, W.-J.; JUAN, Y.-S., HUANG, S.-P., LEE, Y.-C., LIU, C.-C., LI, W.-M., HUANG, C.-H., AND CHANG, A.-W. (2007). Urinary stone analysis of 1,000 patients in southern Taiwan. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 23, 63–66.

COCHAT, P.; PICHAULT, V.; BACCHETTA, J.; DUBOURG, L.; SABOT, J.-F.; SABAN, C.; DAUDON, M. AND LIUTKUS, A. (2010). Nephrolithiasis related to inborn metabolic diseases. *Pediatr. Nephrol.* 25, 415–424.

COE, F.L.; EVAN, A.P.; WORCESTER, E.M.; AND LINGEMAN, I.E. (2010). Three pathways for human kidney stone formation. *Urol. Res.* 38, 147–160.

COE, F.L.; EVAN, A.; AND WORCESTER, E. (2011). Pathophysiology-Based Treatment of Idiopathic Calcium Kidney Stones. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 6, 2083–2092.

DAUDON, M. (2005). [Epidemiology of nephrolithiasis in France]. *Ann Urol (Paris)* 39, 209–231.

- DAUDON, M.; BADER, C.A.; AND JUNGERS, P. (1993). Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology. *Scanning Microsc.* 7, 1081–1104; discussion 1104–1106.
- DAUDON, M.; BOUNXOUEI, B.; SANTA CRUZ, F.; LEITE DA SILVA, S.; DIOUF, B., ANGWAFOO, F.F.; 3RD, TALATI, J.; AND DESREZ, G. (2004). [Composition of renal stones currently observed in non-industrialized countries]. *Prog. Urol.* 14, 1151–1161.
- DJELLOUL, Z.; DJELLOUL, A.; BEDJAOU, A.; KAID-OMAR, Z.; ATTAR, A.; DAUDON, M.; AND ADDOU, A. (2006). [Urinary stones in Western Algeria: study of the composition of 1,354 urinary stones in relation to their anatomical site and the age and gender of the patients]. *Prog. Urol.* 16, 328–335.
- EGGERMANN, T., VENGHAUS, A.; AND ZERRES, K. (2012). Cystinuria: an inborn cause of urolithiasis. *Orphanet J Rare Dis* 7, 19.
- EVAN, A.P. (2010). Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. *Pediatr. Nephrol.* 25, 831–841.
- GUILLÉN, R.; PISTILLI, N.; RAMÍREZ, A.; AND ECHAGUE, G (2008). Estudio morfológico de cálculos urinarios de pacientes que concurren al IICS en el 2007. *Mem Inst Investig Cienc Salud* 4, 11–17.
- GUILLÉN, R.; RUÍZ, I.; STANLEY, J.; RAMÍREZ, A.; AND PISTILLI, N. (2010). Evaluación de parámetros litogénicos con urolitiasis que concurren al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud en el año 2009. *Mem Inst Investig Cienc Salud* 8, 14–21.
- GUILLÉN, R.; RUÍZ, I.; STANLEY, J.; RAMÍREZ, A.; PISTILLI, N.; VALIENTE, N.; AND LUCCINI, N (2011). Evaluación metabólica de pacientes pediátricos con urolitiasis. *Pediatr (Asunción)* 38, 87–92.
- JUNGERS, PAUL, DAUDON, MICHEL, AND COHORT, PIERRE (1999). *Lithiase rénale, Diagnostic et traitement* (Paris: Flammarion).
- LÓPEZ, M.; AND HOPPE, B. (2010). History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis. *Pediatr. Nephrol.* 25, 49–59.
- DA SILVA, S.F.R.; SILVA, S.L.; DAHER, E.F.; SILVA JUNIOR, G.B.; MOTA, R.M.S.; AND BRUNO DA SILVA, C.A. (2009). Determination of urinary stone composition based on stone morphology: a prospective study of 325 consecutive patients in an emerging country. *Clin. Chem. Lab. Med.* 47, 561–564.
- SINGH, I. (2008). Renal geology (quantitative renal stone analysis) by “Fourier transform infrared spectroscopy.” *Int Urol Nephrol* 40, 595–602.