



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“BASE DE DATOS DE ESPECTROS DE REFERENCIA POR
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (FT-IR)
DE UROLITOS DE SILICATO Y MEZCLAS
CON OTROS MINERALES”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

PMVZ Bertha Eugenia Sarai Herrera Camacho

ASESORES:

Dr en C. Javier Del-Ángel-Caraza.
Dr en C. Israel Alejandro Quijano-Hernández.
M en C. Marco Antonio Barbosa-Mireles.

Toluca-México, Febrero de 2017



DEDICATORIA

Dedico esta tesis primeramente a Dios que ha sido parte fundamental en mi vida, mi fuente, mi sustento, el que me ha dado la capacidad, la fortaleza para cumplir este sueño, que me ha permitido estar y ejercer en esta gran profesión, que ha estado conmigo en cada momento y que todo lo que tengo es por él y para él. Te amo pa.

A mis padres José Alfredo y María Eugenia un regalo hermoso de Dios. Gracias por su apoyo incondicional, por inspirarme y ser ese ejemplo de lucha por cumplir nuestros sueños y no dejarse vencer a pesar de las adversidades y continuar por alcanzarlos. A siempre confiar en Dios. Les amo.

A mis hermanos Alfredo, Esteban y Josué por sus consejos, apoyo y motivación. Saber que puedo contar con ustedes. Son muy especiales para mí.

A mis abuelos Esteban Camacho y Bertha Vieyra gracias por el apoyo que me han dado durante mi carrera y por su motivación de cumplir nuestros sueños y hacernos saber que podemos lograrlo. Les amo

A cada uno de mis amigos y amigas porque son motivación a mi vida, por su apoyo y consejos brindados.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer sinceramente a mi asesor de tesis Dr en C. Javier Del Angel Caraza por la oportunidad de permitirme desarrollar este gran proyecto, por su esfuerzo y dedicación, por los conocimientos brindados, sus orientaciones, su persistencia, su paciencia, su pasión y su motivación que han sido fundamentales para mi desarrollo profesional.

Así mismo a la M en C. Claudia Iveth Mendoza por el tiempo dedicado, por su apoyo total y su amistad. Por su valiosa colaboración y compartir sus conocimientos y enseñarme nuevas cosas de esta gran carrera.

Al Dr. Raúl García Cuevas gracias por el apoyo brindado al inicio de este proyecto porque su apoyo fue fundamental, por la confianza, la motivación y los consejos brindados. Enseñarme con su ejemplo a amar esta carrera y perfeccionarme cada día en ella.

Al Dr. Oscar Antonio Guadarrama por su confianza, su apoyo para que pudiera realizar este proyecto y las oportunidades que me ha dado para desenvolver y desarrollarme en esta gran profesión. Gracias por su ejemplo, pasión y amor a esta carrera.

A cada uno de mis compañeros de trabajo y amigos Sandy, Marce, Pilar, Susi, Pablo por sus consejos, motivaciones y de los cuales eh ha aprendido muchísimo y que han inspirado mi vida profesional, que me han enseñado a amar más a esta profesión. Los quiero.

INDICE

| | <i>Página</i> |
|--------------------------------|---------------|
| Introducción..... | 1 |
| Revisión de la literatura..... | 3 |
| Justificación..... | 26 |
| Objetivo..... | 27 |
| Material y Métodos..... | 28 |
| Límite de espacio..... | 32 |
| Límite de tiempo..... | 33 |
| Resultados..... | 34 |
| Discusión..... | 40 |
| Conclusión..... | 42 |
| Literatura citada..... | 43 |

INTRODUCCIÓN

El término urolito proviene de la palabra griega *Uro* que significa orina y *litho* que significa piedra (Osborne *et al.*, 1999); siendo un agregado de minerales que se forman en cualquier parte del tracto urinario (Bartges, 2002). Este fenómeno es un proceso de origen multifactorial en el que pueden estar involucrados uno o varios componentes como los genéticos metabólicos, nutricionales, infecciosos, geográficos, por citar los más comunes (Guillén *et al.*, 2011).

El término “urolitiasis” en general hace referencia a las causas y efectos de la formación de piedras en cualquier parte del sistema urinario [166]; no debe considerarse como una única entidad patológica, sino como la secuela de una o más alteraciones subyacentes resultante de factores bioquímicos, fisiológicos o patológicos, congénitos o adquiridos, relacionados entre sí.

La presencia de estos urolitos dentro de la vejiga pueden lesionar el uroepitelio y ocasionar inflamación urinaria manifestándose con hematuria, polaquiuria y estranguria; y así predisponer al desarrollo de una infección bacteriana de las vías urinarias (Prado y Mendez, 2010). Si estos se alojan en los uréteres o uretra pueden obstruir las vías urinarias, generar azotemia postrenal y evolucionar a una lesión renal aguda en algunos casos (Del Ángel, 2000).

Para el diagnóstico de la urolitiasis, es indispensable evidenciar los urolitos en las vías urinarias con estudios de imagen radiográficos y/o ultrasonográficos.

El manejo médico de esta patología tiene dos metas fundamentales, la primera resolver los signos clínicos asociados a la presencia de urolitos en las vías urinarias, y la segunda evitar la reincidencia de los mismos.

Para resolver los signos clínicos se pueden retirar los urolitos por cirugía o técnicas menos invasivas como la urohidropropulsión; en algunos casos es posible la dilución por medio de dietas terapéuticas como en el caso de los urolitos de estruvita.

Una vez que los urolitos son retirados de las vías urinarias, es necesario que los urolitos sean enviados a un laboratorio de referencia para su análisis y determinación de su composición mineral y con base en este dato y los hallazgos clínicos del paciente comprender el mecanismo fisiopatológico y los factores que contribuyeron en la formación del urolito, y así poder establecer medidas terapéuticas específicas con la finalidad de evitar una nueva formación de urolitos.

Estructuralmente los urolitos pueden contener cuatro partes ó capas siendo de la más interna a la externa: núcleo, piedra, corteza y cristales de superficie y cada una de estas capas puede tener una misma o diferente composición mineral.

De acuerdo a su composición química, existen diferentes tipos de urolitos, siendo los más frecuentes los de estruvita y oxalato de calcio, seguidos de los de purinas –urato de amonio, xantina-, silicato, fosfatos y cistina. Además de que otros urolitos están formados de una mezcla de estos minerales por lo que se denominan urolitos mixtos ó compuesto.

Actualmente en los laboratorios de referencia ubicados en USA, Canadá y México, los urolitos son analizados con técnicas fisicoquímicas muy precisas como lo es la espectroscopía infrarroja que permite determinar la composición mineral de una sustancia en base a su espectro característico tanto de los minerales puros como de las mezclas de estos en diferentes proporciones.

Y con base a estos análisis conocer la composición química de los urolitos y clasificarlos según descrito por Osborne como:

- Urolitos puros: capa única o diversas capas con más del 70% de un mineral particular.
- Urolitos mixtos: capa única o diversas capas de la misma composición con menos del 70% de algun mineral particular.
- Urolitos compuestos: diferencias en la composición del núcleo, piedra, corteza y cristales de superficie.

Comercialmente existen librerías de referencia de espectroscopía infrarroja cargadas con diferentes cantidades de espectros de referencia de los minerales más frecuentes (estruvita, oxalato de calcio, fosfato), sin embargo difícilmente cumplen con todas las necesidades particulares de diagnóstico, por lo que es necesario el generar algunos espectros de referencia particulares para solventar esta problemática.

Tal es el caso de la urolitiasis de silicato que por sus particularidades geográficas es un mineral relativamente frecuente que forma urolitos puros de los que se tienen espectros de referencia comerciales, pero no de mezclas de silicato con otros minerales. Y en nuestro laboratorio es indispensable contar con un librería de espectros de referencia de mezclas de minerales que contengan diferentes proporciones de silicato, y de esta forma solventar la necesidad diagnóstica regional que se tiene en México.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Fisiopatología de la urolitiasis

La urolitiasis ocurre cuando los cristales de minerales formados en la orina no son capaces de moverse a través de las vías urinarias y salir de ellas con la misma velocidad que el flujo urinario (Del Ángel, 2000).

Una sobresaturación de la orina es la fuerza motriz de la formación de cristales en el interior de las vías urinarias (Stevenson et al., 2008).

Existen 3 teorías:

1. Teoría de la precipitación- cristalización: la sobresaturación de la orina con sales es el factor que inicia la formación del núcleo (nido) y mantiene el crecimiento del urolito. La orina canina normal esta sobresaturada con diversas sales. A mayor concentración de sales menor frecuencia de micciones (Bajo consumo de líquidos) mayor probabilidad de urolitiasis (Del Ángel, 2000).
2. Nucleación: la primera etapa del desarrollo del urolito es la formación de un nido cristalino (embrión) esta fase llamada nucleación, depende de la sobresaturación de la orina con sustancias calcúlogénicas, de modo que puede producirse precipitación de sales y cristalización (Stevenson et al., 2008).

El grado de sobresaturación de la orina puede estar influido por factores como la magnitud de la excreción renal de cristaloides, un pH urinario favorable para la cristalización, la retención urinaria y una concentración baja de inhibidores de la cristalización en la orina (Robertson *et al.*, 2002).

3. Teoría de la inhibición de la cristalización: sugiere que la causa principal de la urolitiasis es la ausencia de algún factor inhibidor decisivo para la formación de cristales. Los ejemplos de estos inhibidores son los citratos, glicosaminoglicanos y pirofosfatos. Las concentraciones reducidas de estas sustancias en la orina puede facilitar la cristalización espontánea y el crecimiento del urolito (Del Ángel, 2000).

El crecimiento del urolito depende entonces de su tiempo de permanencia en las vías urinarias y del grado y duración de la sobresaturación de la orina por iones y de las propiedades de los cristales (Stevenson et al., 2008).

Los urolitos se pueden formar en cualquier lugar de las vías urinarias, aunque en los perros, la gran mayoría se encuentran en la vejiga (Stevenson *et al.*, 2008) y solo un 5-10% se localizan en los riñones. Los urolitos pueden nombrarse dependiendo de su localización, riñón, uréteres o vejiga como nefrolitos, renolitos, ureterolitos, urocistolitos (García, 2012).

No debe considerarse como una única identidad patológica, si no como la secuela de una o más alteraciones subyacentes resultante de factores bioquímicos, fisiológicos o patológicos, congénitos o adquiridos, relacionados entre sí. El tipo de urolito formado depende de varios factores, incluyendo la excreción renal de minerales, la presencia de promotores de la cristalización, de bacterias y detritus celulares (Prado y Mendez, 2010).

Siendo los urolitos piedras multiestratificadas (diferentes capas), descriptivamente de la parte más interna a la más externa se divide en cuatro (Figura 1):

- A) Núcleo o nido: la más interna y que inicio el crecimiento.
- B) Piedra o cálculo: la que le da el cuerpo al urolito.
- C) Corteza: la última capa completa que rodea a la piedra.
- D) Cristales de superficie: los cristales que se encuentran en la parte exterior y forman una capa incompleta.

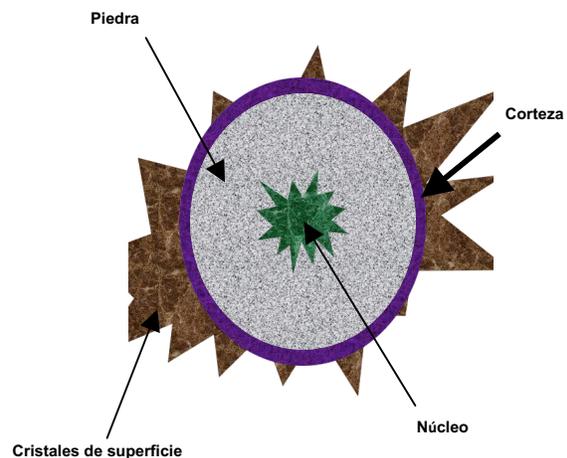


Figura 1. Estructura de un urolito. *Izq.* Microfotografía de un urolito fracturado obtenida con Microscopio Estereoscópico Zeiss Stemi DV4, Hospital Veterinario para Pequeñas Especies FMVZ-UAEMex. *Der.* Esquema de las partes de un urolito.

Su forma se puede deber por su sitio de formación por lo tanto los cálculos solitarios son usualmente redondos en su forma, mientras la presencia de varias piedras da lugar a que se desgasten y toman otra morfología (Hesse et al., 2009). Por lo que se pueden clasificar como facetados, lisos, piramidales, rugosos y asteroidales (Chumbi et al., 2009).

Los diferentes tipos de cálculos solo adquieren su coloración característica después de la inclusión de pigmentos urinarios (Urocromos) (Figura 2).



Figura 2: Imágenes por microscopía estereoscópica. Diferentes formas y coloraciones de cálculos urinarios. Microscopio Estereoscópico Zeiss Stemi DV4, Hospital Veterinario para Pequeñas Especies FMVZ-UAEMex.

Factores de riesgo

Existen diferentes factores de riesgo para la aparición de cálculos urinarios como la especie, raza, sexo, edad, alteraciones anatómicas o funcionales del tracto urinario, alteraciones metabólicas, infección del tracto urinario, dieta o pH urinario; cada uno de estos factores genera efectos diferentes en cada uno de los tipos de urolitos (Del Ángel, 2009):

- *Raza:* las razas pequeñas son generalmente más afectadas por urolitiasis y esta predisposición puede ser relacionada a un volumen inferior de orina y menor frecuencia de micciones, lo que conduce a una mayor concentración de minerales en la orina (Del Ángel et al., 2010). La predisposición racial a tipos específicos de minerales sugiere una base genética y suele estar correlacionada de forma significativa con el sexo (Chumbi et al., 2009).
- *Sexo:* las hembras son más propensas a desarrollar una infección en el tracto urinario ya que su uretra es más corta y ancha que la de los machos, por lo tanto, también es más probable que formen cálculos con mayor frecuencia, pero en

muchos casos los pueden eliminar sin presentar obstrucción uretral como en el caso de los machos (Chumbi et al., 2009).

- *Edad:* la presentación de litiasis puede aparecer en el perro a partir de los dos meses de edad, pero la mayoría de las piedras se presentan en perros de dos a diez años (Chumbi et al., 2009).
- *Alimentación:* la dieta puede influir en la composición de la orina, por lo que los factores alimentarios desempeñan un papel significativo en el aumento del riesgo de urolitiasis (Páscale et al., 2008). Ya que niveles elevados de algunos minerales en la dieta como magnesio, fósforo, calcio se han relacionado directamente con la formación de cálculos y una dieta con exceso de proteínas puede contribuir a la formación de determinados tipos de cálculos (Chumbi et al., 2009).
- *Infeción del tracto urinario:* una infección en el tracto urinario promueve la formación de cálculos urinarios de estruvita en el perro, en especial si están asociadas a la bacteria formadoras de ureasa. Como las infecciones urinarias son más frecuentes en las hembras que en los machos, esto explica por qué los urolitos de estruvita aparecen con mayor frecuencia en estas y en especial en las esterilizadas (Baciero, 2012).
- *Entorno geográfico:* el patrón general de formación de urolitos varía según el país. Los factores que predisponen al individuo a la deshidratación (p. ej., clima cálido, acceso restringido al agua) o la retención de orina en la vejiga (modo de vida de interior) puede aumentar la probabilidad de formación de urolitos.
- *Administración de medicamentos:* los medicamentos con fines diagnósticos y terapéuticos pueden favorecer la urolitiasis al alterar el pH urinario, la reabsorción o la secreción tubular y la precipitación de fármacos y de sus metabolitos. Se desconoce la prevalencia de las urolitiasis inducidas por fármacos, aunque es más probable que estos y sus metabolitos precipiten en la orina si hay urolitos presentes (Chumbi et al., 2009).
- *Causas metabólicas:* una hipercalcemia prolongada y la consiguiente calciuria pueden aumentar el riesgo de cálculos que contienen calcio. El síndrome de Cushing se ha asociado con cálculos de oxalato cálcico, ya que los glucocorticoides incrementan la movilización de calcio desde el hueso y reduce la reabsorción tubular, provocando una calciuria (Stevenson et al., 2008).
- *pH urinario:* los cálculos de estruvita tienden a formarse en una orina alcalina mientras que los urolitos de oxalato, urato y cistina tienden a formarse en una orina ácida. Por esta razón en ocasiones el pH urinario nos ayuda a predecir el tipo de cálculo y para instaurar un tratamiento dietético que disuelva o evite la recurrencia de los urolitos (Chumbi et al., 2009).

Diagnóstico

La urolitiasis puede manifestar signos clínicos de enfermedad del tracto urinario como hematuria, polaquiuria y/o estranguria (Bartges y Polzin, 2011). La vejiga urinaria puede estar inflamada y generar dolor o bien detectar los urolitos a la palpación abdominal. Es indispensable que todos los pacientes con urolitiasis sean evaluados con pruebas de laboratorio y estudios de imagen:

Análisis de la orina:

- *Urianalysis.* A menudo destacan la presencia de inflamación urinaria (Hematuria, piuria, incremento del número de células epiteliales y proteinuria). El pH de la orina varía dependiendo del tipo de cálculo, si existe infección bacteriana concurrente y la dieta del paciente. Aunque la cristaluria puede existir en ausencia de urolitos y es posible la presencia de urolitos sin cristaluria.
- *Urocultivo:* El cultivo urinario permite la confirmación de una infección urinaria y la identificación de la bacteria implicada (Couton y Nelson, 2003).

Análisis de sangre:

- *Bioquímico y hemograma.* En muchas ocasiones no existen cambios evidentes en el hemograma y perfil bioquímico. Sin embargo, puede aportar información sobre posibles alteraciones subyacentes como hipercalcemia de diferentes orígenes, alteración hepática, hiperadrenocorticismos, y a cerca de la función renal en pacientes con nefrolitiasis o con obstrucción urinaria como con presencia de azotemia, hipercalcemia, hiperfosfatemia y acidosis metabólica (Suarez y Bertolani, 2013). Algunas patologías particulares pueden predisponer al perro a la urolitiasis. Por ejemplo, la enfermedad hepática o puentes portosistémicos pueden asociarse a urolitiasis por uratos, la hipercalcemia de cualquier origen puede asociarse con la formación de urolitos de oxalato cálcico (Morales, 2011).

Estudios de imagen:

El principal objetivo de realizar estudios de imagen es evidenciar la presencia de urolitos, localización, número, tamaño, densidad y forma. Solo los urolitos de más de 2 mm se detectan mediante estudios radiográficos o ultrasonográficos de buena calidad (Bartges y Polzin, 2011) (Figura 3).

- **Radiología:** Los urolitos pueden observarse en un estudio radiográfico simple cuando son mayores a 2 mm, pero esto depende la sobreposición con estructuras anatómicas y el número de urolitos; además de que los minerales tienen diferentes radiodensidades. Los urolitos de oxalato de calcio y estruvita son generalmente radiopacos, sin embargo los de purinas, cistina y fosfato de calcio son variablemente radiopacos (Langston et al., 2008).
- **Ultrasonografía:** La interface entre la orina y el cálculo es intensamente hiperecogénica (blanco brillante) con una sombra acústica (áreas negras) debajo de los urolitos (Langston et al., 2008).

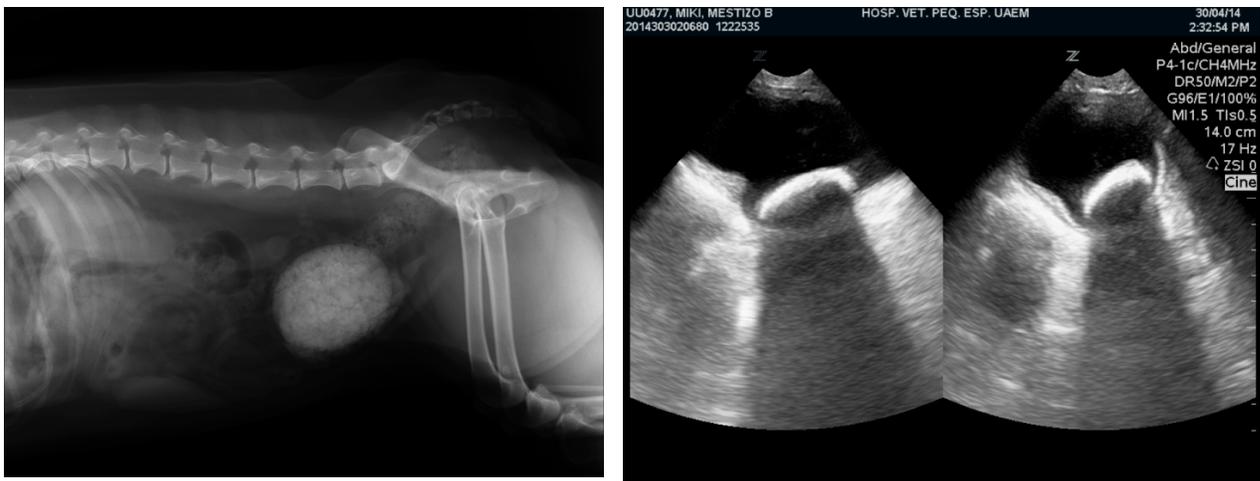


Figura 3. Estudios de imagen de casos clínicos de urolitiasis. **Izq.** Estudio radiográfico, múltiples urolitos en la vejiga urinaria; **Der.** Estudio ultrasonográfico, presencia de un urolito en la vejiga.

Manejo médico

El manejo médico de esta patología tiene dos metas fundamentales, la primera resolver los signos clínicos asociados a la presencia de urolitos en las vías urinarias, se pueden retirar los urolitos por cirugía o técnicas menos invasivas como la urohidropropulsión; en algunos casos es posible la dilución por medio de dietas terapéuticas como en el caso de los urolitos de estruvita; y la segunda evitar la reincidencia de los mismos.

Una vez que los urolitos son retirados de las vías urinarias, es necesario que los urolitos sean enviados a un laboratorio de referencia para su análisis y determinación de su composición mineral y con base en este dato y los hallazgos clínicos del paciente comprender el mecanismo fisiopatológico y los factores que contribuyeron en la formación del urolito especialmente el núcleo y la piedra, y así poder establecer medidas terapéuticas específicas o más apropiadas que eviten o retrasen formación de nuevos urolitos.

Análisis de urolitos

El análisis de los urolitos es indispensable para conocer la composición estructural y química de los cálculos urinarios ya que la forma, tamaño, número o color no es específico de una composición mineral (Figura 4).



Figura 4: Diferentes tipos de urolitos. La forma no es característica de ningún tipo de mineral. Solo con el análisis fisicoquímico se puede determinar el tipo de mineral del que están formados.

Si el urolito mide más de 5mm de diámetro, es posible hacer la disección del mismo y de esta forma tomar muestras del material de cada capa y analizarlas por separado. Si mide menos de 5 mm, se tritura completamente, se homogeniza la muestra y se analiza como si fuera solamente una parte (núcleo o piedra) (Moore 2007).

El procedimiento para el análisis y estudio del cálculo requiere una combinación apropiada de inspección como la microscopía estereoscópica y técnicas de análisis espectral tales como la espectroscopia infrarroja o difracción de Rx por mencionar algunas (Grases *et al.*, 1997; García *et al.*, 2011) (Tabla 1):

Tabla 1. Métodos para el estudio de los cálculos urinarios

Físicos

Químicos

Ópticos

- Microscopía estereoscópica.
- Microscopía electrónica de barrido.
- Kit de reactivos comerciales.

Espectrales

- Espectrometría de infrarrojo
- Difracción de rayos x
- Microscopía electrónica de barrido acoplada a EDAX

Microscopía estereoscópica:

Consiste en la observación de las características morfológicas de la superficie y sección del cálculo mediante un microscopio estereoscópico con una magnificación entre 10 y 60 aumentos, lo que permite examinar la superficie de los urolitos enteros o de los fragmentos, el color, la estructura superficial, la características de los cristales y la heterogeneidad o no de los cálculos si estos son múltiples. Al hacer una disección de urolito las diferentes capas que lo conforman (Figura 5).

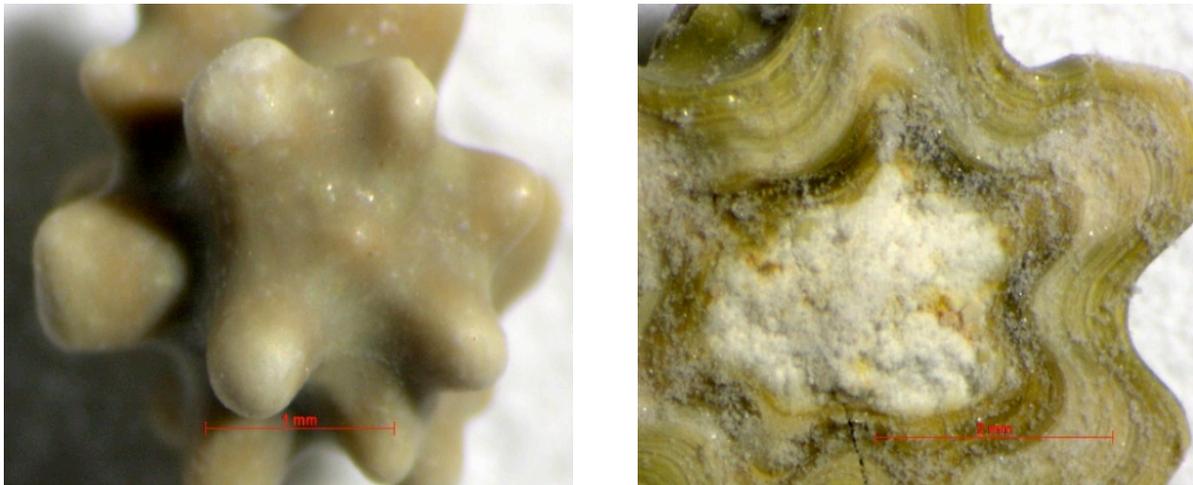


Figura 5. Imágenes de microscopía estereoscópica. **Izq.** Aspecto de la superficie externa de un urolito de silicato. **Der.** Aspecto del interior de un urolito, obsérvese las diferentes capas, delimitándose el núcleo de color blanco y aspecto rugoso al centro, rodeado de múltiples láminas de color gris verdoso que conforman la piedra. Microscopio Estereoscópico Zeiss Stemi DV4, Hospital Veterinario para Pequeñas Especies FMVZ-UAEMex.

Analisis espectrales:

Difracción de Rayos X: Es una técnica reconocida universalmente como óptima en la identificación de las sustancias cristalinas de los cálculos, sin embargo no permite la identificación de sustancias amorfas (García et al., 2011). La estructura distintiva cristalina de los cálculos urinarios produce características monocromáticas de patrones de difracción de rayos x como una función del tipo red de cristales. Los patrones de difracción son comparados con diagramas de pruebas para dar un exacto análisis cualitativo y semi-cuantitativo siendo un método muy preciso del análisis de cálculos urinarios; sin embargo, este es muy costoso y requiere medidas protocolos de instalación y manejo especiales (Hesse et al., 2009).

Espectroscopía infrarroja: Es la técnica más apropiada para el análisis de los cálculos y se está convirtiendo en la técnica de referencia para su análisis (Primiano et al., 2014). Es una técnica analítica de determinación molecular basada en la absorción de energía por parte de determinados enlaces moleculares que producen una vibración (Argüelles, 2009).

Fundamentos de espectroscopía infrarroja:

El infrarrojo, radiación de infrarrojo o luz infrarroja (IR) es la parte del espectro electromagnético con una longitud de onda más larga que la de la luz visible pero más corta que la de la radiación de microondas. La banda de infrarrojo se divide habitualmente en varias secciones: Infrarrojo cercano, infrarrojo medio o infrarrojo lejano, siendo en el IR medio ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales (Armelin et al., 2012).

Las radiaciones infrarrojas se propagan, se reflejan, interfieren y polarizan de la misma forma que la radiación visible, de las que solo difieren por los valores más elevados de sus longitudes de onda. Las radiaciones electromagnéticas son emitidas, transmitidas y absorbidas bajo la forma de corpúsculos elementales llamados fotones. La representación gráfica de la absorción de las radiaciones infrarrojas por una sustancia en función de la frecuencia, o de la longitud de onda, constituye el espectro de absorción infrarroja, también llamado espectro infrarrojo (Hidalgo et al., 1983).

La frecuencia en la cual las moléculas vibran, depende de las masas de sus átomos y de la fuerza del enlace. La posición de una banda de infrarrojo específica por su longitud de onda de luz absorbida. Sin embargo la unidad más común es el número de onda que corresponde a la cantidad de onda de radiación de infrarrojo contenida en un centímetro y se expresa en cm^{-1} (Armelin et al., 2012).

El principio de esta técnica de análisis se basa en el hecho de que todas las moléculas químicas son excitadas a un diferente grado por luz infrarroja, como una función de su estructura espacial y las relaciones de los átomos a las oscilaciones. En consecuencia, la energía de la irradiación de los infrarrojos es selectivamente absorbida. El espectro de absorción resultante es característico por cada molécula, y es también referido como la huella dactilar de una sustancia (Hesse et al., 2009). Así que la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés) permite que el análisis de una sustancia puede realizarse por medio de un pastilla de bromuro de potasio que consiste, hacer una pastilla de bromuro de potasio para como espectro de referencia, calibrando el equipo con esta; para después hacer otras pastilla de bromuro de potasio con una pequeña cantidad de el compuesto de interés a analizar en una mezcla homogénea para obtener un espectro característico al que el equipo de infrarrojo restara el espectro del bromuro de potasio, dando como resultado solo el espectro del compuesto de interés. Otra posibilidad es el uso del equipo espectroscopia infrarroja con un accesorio de ATR.

Una reflectancia total atenuada (ATR) es un accesorio que funciona midiendo los cambios que ocurren en un haz de luz infrarroja reflejada totalmente internamente cuando el haz entra en contacto con una muestra.

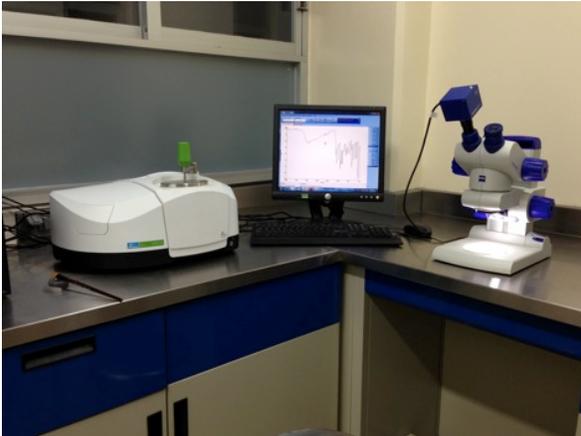
El sistema genera entonces un espectro infrarrojo. Para que la técnica tenga éxito, los dos siguientes requisitos se deben cumplir:

1. La muestra debe estar en contacto directo con el cristal de ATR, porque la onda evanescente o de burbujas solo se extiende más allá del cristal de $0,5\mu$ - 5μ .
2. El índice de refracción del cristal debe ser significativamente mayor que la de la muestra o bien reflectancia interna no se producirá. La luz se transmite en lugar de ser reflejada internamente del cristal. Normalmente, los cristales ATR tienen valores de índice de refracción entre 2,38 y 4,01 en 2000 cm^{-1} (Perkinelmer, 2005).

La técnica de espectroscopia ATR/FT-IR consiste en el paso de un haz de radiación infrarroja (IR) a través de un cristal transparente al IR y de alto índice de refracción sobre el que ésta colocada la muestra. En su paso a través del cristal, el haz IR incidente se refleja varias veces y la superficie de la muestra absorbe parte de la radiación a frecuencias características; por lo tanto, el requerimiento de vital importancia es que haya el contacto adecuado entre el cristal y la muestra (Contreras et al., 2010).

El uso de la ATR/FT-IR para el análisis de urolitos (Figura 6). Se fundamenta en la interacción de la luz infrarroja con los enlaces covalentes de los compuestos presentes en el cálculo, lo que da lugar a la aparición de unas bandas características que posibilitan su identificación. Sus principales ventajas son: que pueden aplicarse sobre muestras muy pequeñas (inferiores a 1mg) y que permite también la identificación de sustancias amorfas (proteínas, fosfatos amorfos, lípidos etc.) (García et al 2011). La interpretación de los espectros obtenidos se realiza con la comparación de los espectros de referencia patrón (Hidalgo et al. 1983) o bien con una librería electrónica de espectros de referencia para hacer el análisis cuantitativo de los compuestos minerales como la NICODOM IR Kidney stones 1668 spectra, Nikodom-República Checa.

a)



b)



c)

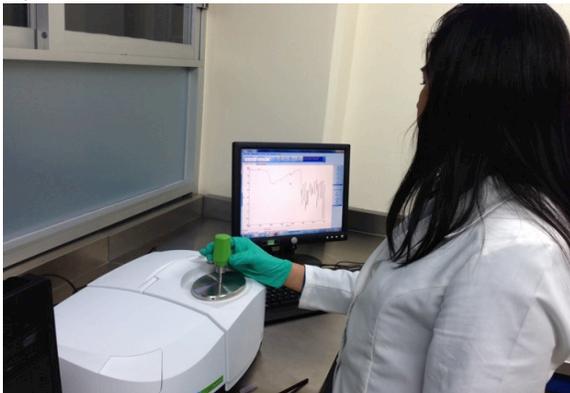


Figura 6: Laboratorio para el análisis de urolitos del Hospital Veterinario para Pequeñas Especies de la FMVZ-UAEMex. *a.* Imagen del equipamiento general; *b.* Microscopía estereoscópica (Microscopio Estereoscópico Stemi DV4, Carl-zeiss, México) *c.* Espectroscopia infrarroja (Espectroscopio Spectrum Two, Perkin Elmer, México).

Métodos químicos

Antes del uso de técnicas espectrales, los métodos de análisis de cálculos urinarios eran con el uso de kits de diferentes reactivos que requieren de la disolución polvo fino de los urolitos en diferentes reactivos químicos en un protocolo según la casa comercial. Su uso se basa en la propiedad específica que poseen algunos iones presentes en los constituyentes del cálculo de reaccionar con uno o varios reactivos químicos produciendo el desarrollo de un color o fase cristalina característica. Los métodos químicos han mostrado reiteradamente su escasa fiabilidad en numerosos programas de control de calidad, con unos porcentajes de error en la identificación de algunos componentes superiores al 90% por lo que deberían ser abandonados definitivamente (Hesse et al., 2009).

¿De que están compuestos los urolitos?

De acuerdo a su composición química, existen diferentes tipos de urolitos, siendo los más frecuentes los de estruvita y oxalato de calcio, seguidos de los de purinas –urato de amonio, xantina-, silicato, fosfatos y cistina (Tabla 2). Si bien, de forma general para que se formen urolitos de alguno de estos minerales es indispensable la sobresaturación urinaria, cada uno de estos minerales tiene un mecanismo fisiopatológico particular que lo diferencia.

Tabla 2: Clasificación química de los urolitos (Morgan, 2004)

- Fosfato amónico- magnésico (*Estruvita*).
- Oxalato de calcio
 - Monohidratado.
 - Dihidratado.
- Purinas:
 - Ácido úrico
 - Urato de amonio
 - Urato de sodio
 - Urato cálcico
 - Xantina
- Cistina
- Fosfato cálcico
 - Carbonato de calcio (apatita)
 - Fosfato de calcio (hidroxiapatita)
 - Fosfato ácido de calcio Hidratado
 - Fosfato tricálcico
- Silicato
- Tipos compuestos
- Tipos mixtos
- Matriz (proteínas, detritus celulares, sangre)

Las características de los espectros de infrarojo de los diferentes minerales en forma pura se encuentra en la tabla 3.

Tabla 3: Frecuencias típicas de las bandas de los diferentes urolitos. (Hidalgo, et al., 1983)

| <u>Mineral</u> | <u>Complejo</u> | cm^{-1} | |
|---------------------------|-----------------|---------------------------------------|--|
| | | <u>Bandas fuertes</u> | <u>Bandas debiles</u> |
| <i>Estruvita</i> | 3420 - 605 | 568, 1045,1095 | 3565 |
| <i>OxCa monihidratado</i> | 3492-3058 | 1622, 1320, 784 | 952, 886 |
| <i>OxCa dihidratado</i> | 782-522 | 1640, 3450,1327 | 1470, 917 |
| <i>Urato de Amonio</i> | 600-493 | 2910, 1701, 1650, 1598, 1392 | 1276, 1215, 1139, 1008, 742, 298 |
| <i>Xantina</i> | 1567-1335 | 3130, 1701,1660, 540 | 1258, 1120, 1033, 960 |
| <i>Cistina</i> | 1040-872 | 3025, 2915, 1622, 1586, 1488, 1411 | 2742, 2670, 2095, 1267, 1255, 1090, 328 |
| <i>Silicato</i> | 470 | 1095 | 1386, 940, 805, 560 |

Debido a que es muy difícil de que un urolito este constituido por solo un mineral, en la mayoría de las ocasiones los urolitos están formados por una mezcla de diversos minerales, se ha estandarizado su clasificación en base a los porcentajes de los minerales presentes basado en lo descrito por Osborne et al 1999:

- 1) Cuando un urolito tiene entre el 70 y 100% de un solo mineral se clasifica como un urolito puro y se denomina con el nombre del mineral. Por ejemplo:
 - 80% de Oxalato de calcio y 20% de Estruvita = Urolito es de Oxalato de calcio.
 - 75% de Oxalato de calcio, 15 % de Urato de amonio y 10 de Estruvita = Urolito de Oxalato de calcio.

- 2) Cuando un urolito tiene <70% de un solo mineral se considera un urolito mixto, lo que quiere decir que el paciente sobresatura su orina con diferentes iones que forman varios compuestos a la vez. Por ejemplo:
 - 60% de Oxalato de calcio y 40% de Estruvita = Urolito mixto (Oxalato de calcio y Estruvita).
 - 50% de Oxalato de calcio, 25% de Urato de amonio y 25% de Estruvita = Urolito Mixto (Oxalato de calcio, Urato de amonio y Estruvita).

- 3) Cuando un urolito tiene un núcleo de una composición mineral, la piedra de otra composición; y la corteza y cristales de superficie también diferente se considera que es un urolito compuesto. Por ejemplo:
 - a) Núcleo de Xantina
 - b) Piedra mixta de Xantina con Urato de amonio.
 - c) Corteza de estruvita
 - d) Cristales de superficie de estruvita

a + b + c + d = urolito compuesto (núcleo de xantina, piedra mixta xantina y urato de amonio y corteza y cristales de superficie de estruvita).

Los urolitos también pueden estar compuestos parcial o completamente por metabolitos de fármacos o bien cuerpos extraños como material de sutura, el pelo y vegetales que actúan como núcleo para la formación de urolitos (Osborne et al., 2008).

Breve descripción de los mecanismos fisiopatológicos según el tipo de mineral:

- Estruvita: También llamado de fosfato triple o fosfato- amonico-magnésico, es uno de los urolitos más frecuentes a nivel global. Estos urolitos normalmente se forman en una orina sobresaturada con fosfato y amonio y magnesio con un pH alcalino, generalmente están asociados con infecciones del tracto urinario por bacterias positivas de ureasa (*staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* O *Proteus spp.*) ya que la ureasa es una enzima que hidroliza la urea favoreciendo la sobresaturación con amonio, y provocando una orina alcalina siendo más frecuentes en las hembras (Del Ángel et al., 2010). Los urolitos de estruvita estériles son raros en el perro pero muy frecuentes en los gatos; su mecanismos fisiopatológicos abarcan factores alimentarios, metabólicos o familiares, pero no la infección bacteriana (Stevenson et al., 2008).
- Oxalato de calcio: Es otro de los urolitos más frecuentes se produce en dos formas cristalinas el oxalato cálcico monohidratado y el dihidratado (Chumbi et al., 2009), ambas identificadas en los urolitos de perros y gatos. Para su formación es indispensable una orina sobresaturada con calcio y oxalato, como resultado de la interacción de diferentes factores de riesgos ambientales y demográficos y diferentes trastornos metabólicos (Lulich et al., 2010). Las condiciones asociadas con hipercalcemia incluyen a la hipercalcemia, el consumo excesivo en la dieta de calcio, proteína, sodio, vitamina D, o vitamina C, acidificantes en la dieta, acidificantes urinarios y ciertas drogas (ej., glucocorticoides, diuréticos de asa) y enfermedades (ej., Hiperadrenocortisismo) y la idiopática (Gisselman et al., 2009), la Hiperoxaluria puede ocurrir con un aumento en el consumo de precursores de oxalato en la dieta, tal como verduras de hoja verde (ej., espinacas) o nueces (especialmente cacahuates). El calcio en la dieta se une al ácido oxálico e inhibe su absorción, por lo tanto, la restricción de calcio aumenta la hiperoxaluria. La Vitamina C (ácido ascórbico) es metabolizada a oxalato, y la Vitamina B altera el metabolismo del oxalato (Gisselman et al., 2009).
- Purinas: Las purinas son productos derivados del metabolismo de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), siendo la adenina, guanina, ácido úrico, hipoxantina, xantina. Dichos productos tienen diferentes procesos metabólicos dependiendo de la especie y se excretan del organismo particularmente en la mayoría de los mamíferos como alantoína, un compuesto muy soluble en la orina; a excepción del humano, los primates y el hombre que excretan normalmente ácido úrico. Dependiendo de la especie o bien en presencia de alteraciones patológicas estos compuestos pueden cristalizar y formar urolitos comúnmente llamados de “uratos o purinas” siendo específicamente de urato de amonio, urato de sodio y urato de calcio especialmente en algunas líneas genéticas de perros de la raza Dálmata que presenta características únicas a diferencia de las otras razas ya que tiene un transporte

ineficaz del ácido úrico desde el torrente sanguíneo hacia los hepatocitos, deficiencias de la enzima uricasa que cataliza (oxida) el ácido úrico en alantoína, un compuesto más soluble en comparación con el ácido úrico, esta conversión tiene lugar dentro de los hepatocitos (Del Ángel, 2000). Es posible que perros de algunas otras razas como el Schnauzer, Shitzu y Bulldog relacionados con enfermedad hepática o puentes portosistémicos; otros urolitos como los de xantina tienen un origen genético o secundarios al uso de fármacos como el alopurinol (Del Angel-Caraza et al., 2012).

- Cistina: La cistinuria es una patología metabólica caracterizada por una disminución de la reabsorción de aminoácidos en los túbulos renales, lo que provoca una sobresaturación urinaria con aminoácidos, siendo la cistina el que tienen mayores posibilidades para precipitar y formar urolitos (Sarno, 2010). Esta patología afecta principalmente a razas como los Terranova, Mastín y Bulldog Ingles y Dachshund relacionada a una mutación gen rBAT (Hand et al., 2010).
- Fosfato de calcio: Este mineral es comúnmente encontrado como un componente menor de urolitos de estruvita, oxalato cálcico, purinas y cistina. En pocas ocasiones pueden formar urolitos considerados puros en sus formas de hidroxiapatita y el carbonato de apatita en animales con algún tipo de hiperparatiroidismo, hipercalcemia e hiprecalciuria (Prado y Mendez, 2010; Hand et al., 2010).
- Silicato: El término silicio (Si) es derivado de la palabra latín “*silicis*” significando piedra. El silicio se combina con el oxígeno, se forma SiO_2 y es llamado sílice o dióxido de silicio, y término silicato es un sustantivo utilizado para designar una sal compuesta por sílice y otros elementos abundantes en la corteza terrestre. Debido a que los silicatos no son un producto del metabolismo del organismo animal la urolitiasis de silicato tienen su origen en el consumo de dietas con alto contenido de silicatos. Este tipo de urolito ha sido descrito en diferentes especies como el humano por un consumo crónico de medicamentos antiácidos que contienen silicato de aluminio y trisilicato de magnesio; en los rumiantes ya que el silicato es absorbido por las raíces de las plantas y depositado en las paredes celulares de tallos y hojas como silicatos solubles; y en los perros y gatos se asocia con el consumo de dietas elaboradas con arroz, cascarilla de soya y gluten de maíz (Del-Angel-Caraza, et al. 2010). Además de que es posible que la principal fuente dietética de silicato sea el agua para consumo proveniente de mantos acuíferos ubicados en áreas volcánicas (Tasaki et al., 2013; Del-Angel-Caraza, et al. 2010).

Epidemiología de la urolitiasis en México

El laboratorio para el análisis de urolitos del Hospital Veterinario para Pequeñas Especies de la FMVZ-UAEMex es un laboratorio de referencia nacional donde se concentran los urolitos de los casos clínicos perros y gatos con urolitiasis de diferentes ciudades del país.

De los últimos 747 casos de urolitiasis en perros analizados, el 57.25% de los casos fueron machos (n=425) y resto hembras. Con una proporción macho:hembra de 1.3:1. El 82.88% de los casos se encontró en animales de raza pura, siendo las razas más frecuentes el schnauzer, poodle, dálmata, labrador, cocker spaniel, pastor alemán y golden retriever. Las razas de talla pequeña fueron las más afectadas representando el 72.47%. En el 98% de los casos los urolitos fueron encontrados en la vejiga y/o uretra.

La composición mineral más frecuente de los urolitos fue la estruvita con el 45.11%, seguido del oxalato de calcio 27.71 %, silicato 9.90%, purinas 6.42%, cistina 0.80%, fosfato de calcio 0.26%, urolitos mixtos 7.76% y compuestos 2%.

En nuestro estudio nacional, como en la mayoría de los reportes publicados en otros países, la urolitiasis de estruvita y oxalato de calcio representan poco más del 75% de los casos. Sin embargo, nuestros resultados evidencian una elevada proporción de urolitos de silicato mayor al 9% en comparación con la registrada en los estudios epidemiológicos internacionales, que informan valores inferiores al 1%.

En el caso de la urolitiasis de estruvita esta se asocia especialmente a la infección del tracto urinario por bacterias ureasa positivo como *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* o *Proteus spp.* (Ling et al., 1998). Este mecanismo fisiopatológico puede explicar el hecho de que la mayoría de los casos de urolitiasis de estruvita en este estudio se produjo en las hembras, ya que este género es más susceptible a infección del tracto urinario. Sin embargo, el 45.9% de los casos se presentó en los machos que pueden presentar también una infección del tracto urinario o bien consumir una dieta con mayores cantidades de fosfato y magnesio que sobresaturan la orina (Ling et al., 1998).

La relativa alta frecuencia de urolitos de oxalato de calcio en los machos, concuerdan con estudios realizados en Irlanda (Jones et al., 2001), EE.UU. (Osborne et al., 1999) y Canadá (Houston et al., 2004). En los seres humanos los hombres tienen una mayor osmolaridad urinaria, lo que podría conducir a una mayor sobresaturación de minerales (Peruca et al., 2007). Incrementos en la proporción de los urolitos de oxalato de calcio han sido documentados en otros reportes realizados en diferentes poblaciones al comparar periodos de estudios (Ling et al., 2001; Picavet et al., 2007, Osborne et al 2009), y ha sido atribuidos a causas multifactoriales como cambios en la nutrición de los perros de dietas caseras a comerciales (Ling et al., 2001, Picavet et al., 2007, Osborne et al 2009); es muy probable que la opción de tratamiento de dietas para la disolución de los urolitos de estruvita haya influido en la disminución de la presentación de este tipo de urolitos y por lo tanto a un incremento en el envío de urolitos de oxalato de calcio para su análisis en los diferentes centros de referencia como el nuestro (Houston et al., 2004; Jones et al., 2001; Osborne et al 1999); la tendencias de los propietarios a tener perros que estén predispuestos a presentar la urolitiasis de oxalato de calcio como los Schnauzer (American Kennel Club); otra posibilidad es fenómenos similares a los encontrados en otras especies como el humano, en los que el sedentarismo, obesidad y cambios de hábitos se han relacionado con una mayor prevalencia de urolitiasis de oxalato de calcio (Sarica et al., 2008; Negri et al., 2008; Speakman et al., 2008); y finalmente es posible que al incrementarse la sobrevida de los animales se esté presentado una mayor frecuencia de patologías asociadas a condiciones de hipercalcemia que aumentan el riesgo de urolitos de oxalato de calcio, como son el hiperadrenocorticismos, los síndromes preneoplásicos y la acidosis metabólica por diferentes patologías crónica que también puede estar asociada con este tipo de urolitos (Osborne et al., 2009).

En cuanto a los urolitos de silicato estos fueron el tercer tipo de urolito más frecuente en los periodos analizados. Las proporciones son superiores a la reportado en la mayoría de los estudios epidemiológicos que informan valores entre 0,5 y 0,9% (Houston et al., 2004; Osborne et al., 1999). Se ha sugerido que los urolitos de sílice se deben al aumento de la ingesta de este mineral por dietas elaboradas con arroz, soya o gluten de maíz o bien por el consumo de agua con alto contenido de silicatos disueltos. (Lulich et al., 2000; Del-Ángel-Caraza et al., 2010; Tasaki et al., 2013). Una posible explicación para la alta proporción de urolitos de silicato en los casos estudiados en nuestro laboratorio es que el agua potable que los perros beben es obtenida de los mantos acuíferos ubicados en el área geográfica correspondiente al eje neo-volcánico transmexicano y esta pueden contener un alto contenido de silicatos (Hizar et al., 2004, Del-Ángel-Caraza et al., 2010).

Observaciones derivadas del análisis de los urolitos de perros en México

Por nuestras observaciones con el análisis de urolitos en los últimos 10 años hemos observado que existe una alta prevalencia de casos de urolitiasis de silicato en perros.

Físicamente los urolitos de silicato considerados puros tienen una forma de “matatena” (*jackstone*) con proyecciones radiales de diversas longitudes, pero pueden ser redondos u ovalados; pueden ser de color verdoso, blanco o amarillento; son muy duros para triturarlos muy similar a fragmentar cuarzo, jade u obsidiana (Figura 7).

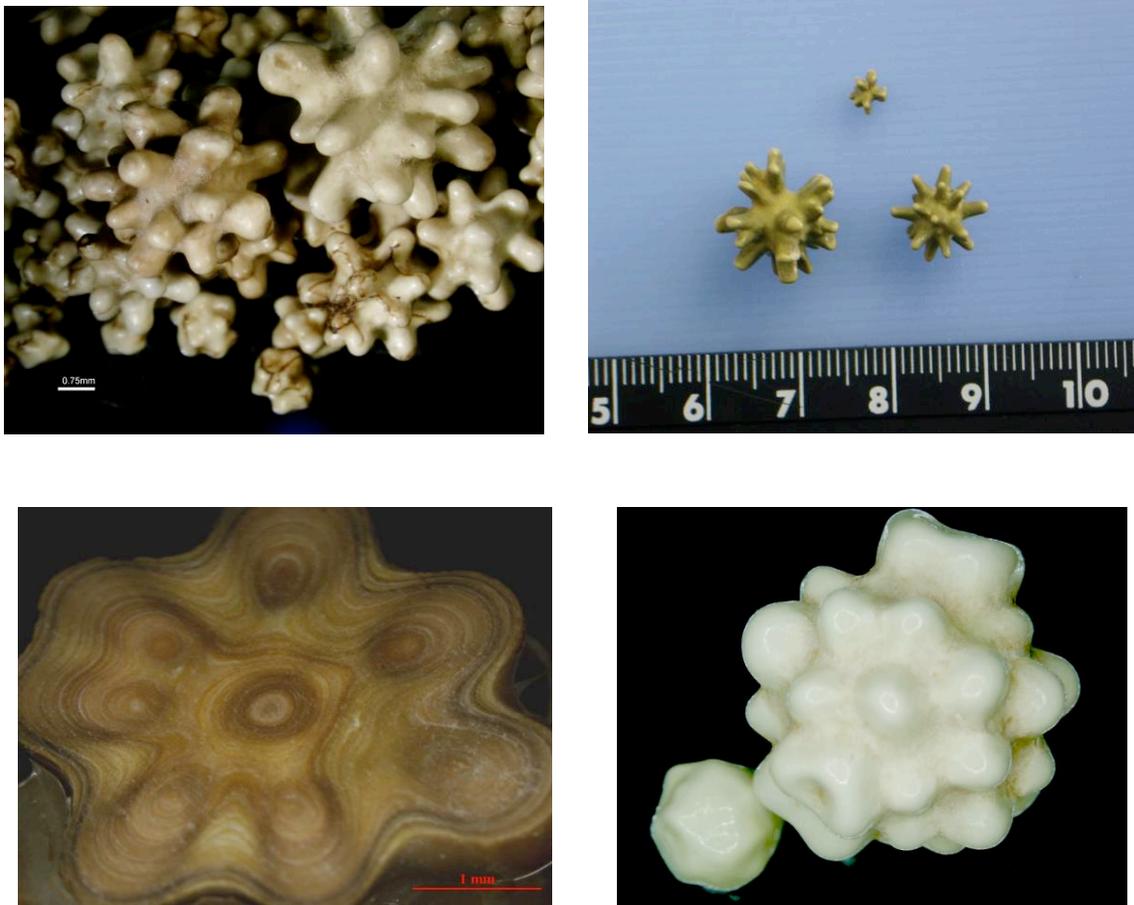


Figura 7. Urolitos de silicato puros (Del-Angel-Caraza J, HVPE-FMVZ-UAEMex).

En su análisis por espectroscopia infrarroja en un rango de 4000 a 400 cm^{-1} , los urolitos de silicato tienen un espectro característico con un banda fuerte a 1,100 (1,195-1,105), y otras menores a 1648, 798 y 470 (Figura 8), según lo descrito por Hidalgo et al, 1983.

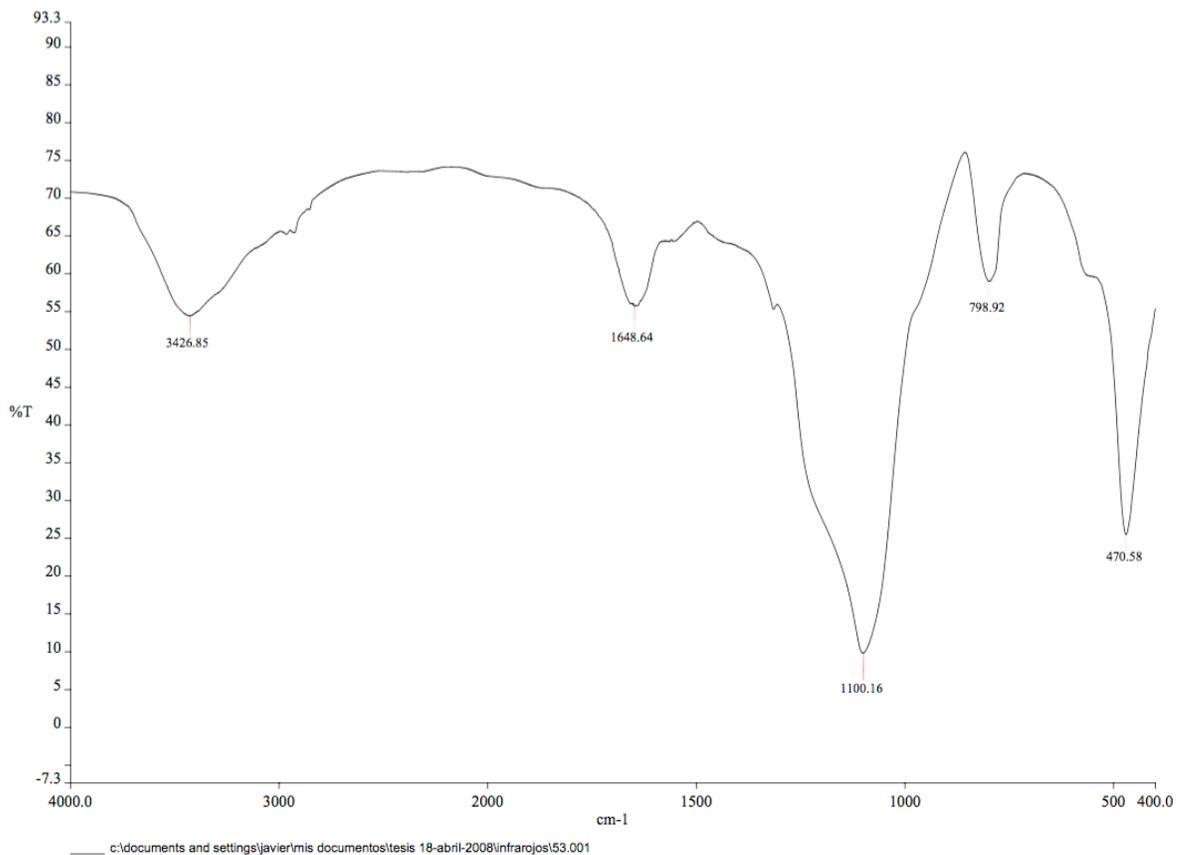


Figura 8. Espectro característico de los urolitos de silicato considerados puros.

El silicato puede estar presente en los urolitos en proporciones menores al 70% como en los urolitos mixtos entonces, las bandas menores se pueden superponer con otras bandas presentes en los espectros de otros compuestos (Figura 9).

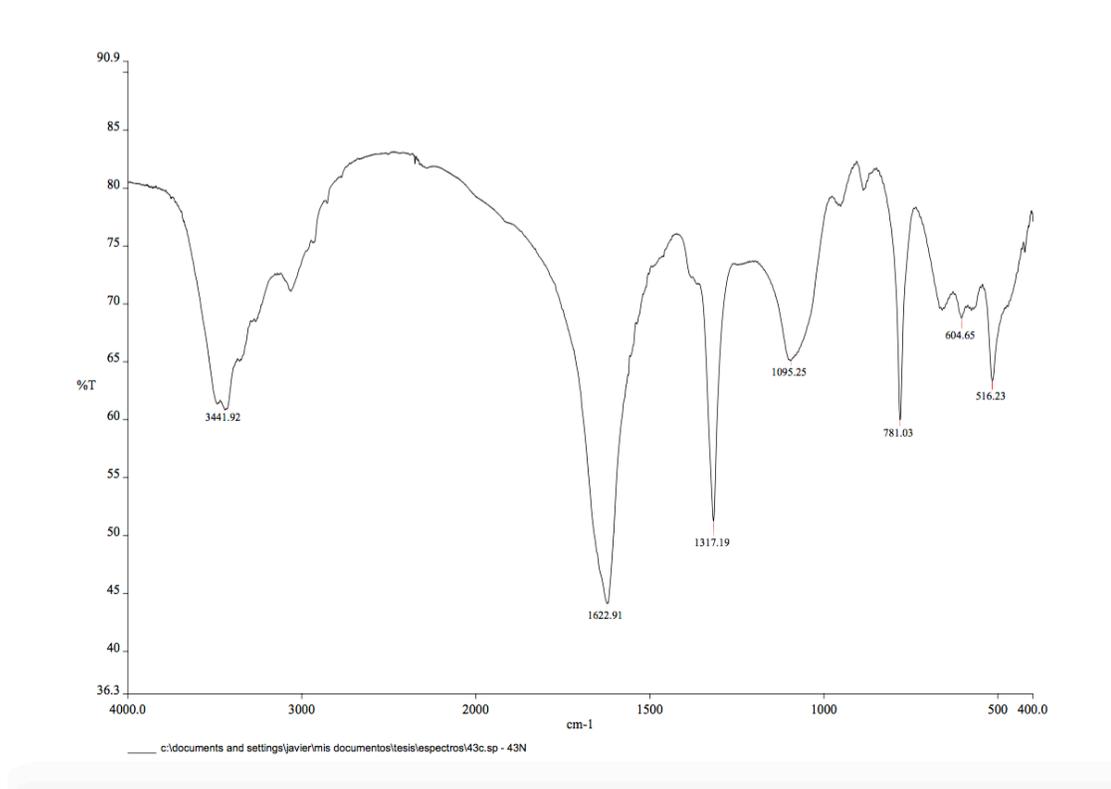


Figura 9. Espectro de un urolito mixto que contienen oxalato de calcio monohidratado y silicato. Obsérvese la banda a 1095 característica del silicato.

Algunos urolitos pueden ser compuestos, tener un núcleo de silicato u otra mineral y capas más externas como la piedra y corteza de otro mineral puro o mixto (Figura 10).

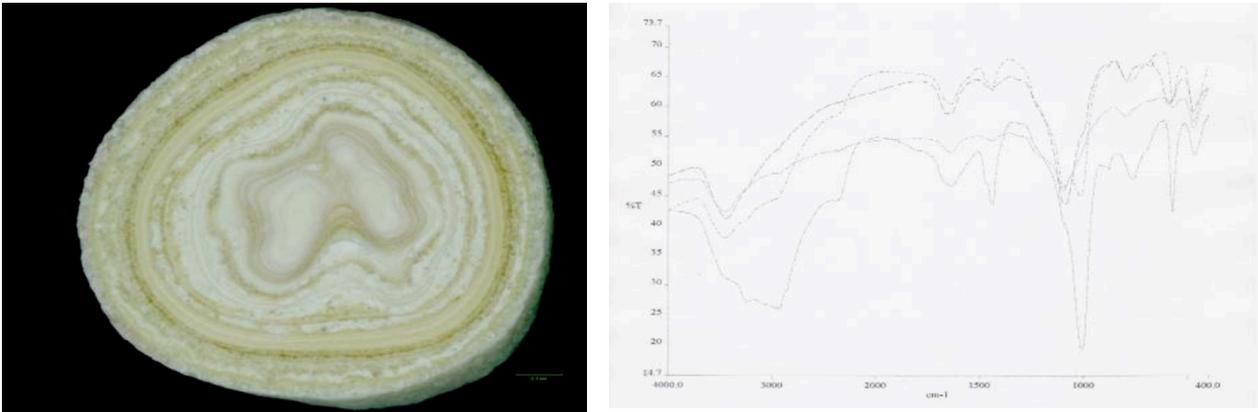


Figura 10. Urolito compuesto. Núcleo de silicato puro, piedra y corteza de un mineral mixto de silicato y estruvita.

Estos urolitos provienen de diferentes poblaciones del país que se encuentran ubicadas en el eje neo-volcánico transmexicano como la Ciudad de México y área metropolitana, Toluca, Morelia, Puebla, Veracruz, Querétaro, Guadalajara, Colima (Figura 11).



Figura 11: Ubicación geográfica del eje neo-volcánico transmexicano.

JUSTIFICACIÓN

La espectroscopia infrarroja es una técnica útil en el análisis de los minerales que componen los urolitos. En el mercado existen librerías electrónicas de espectros infrarrojo desarrolladas para el análisis de los urolitos de humano; si bien estas librerías son sumamente útiles para el análisis de urolitos de otras especies carecen de espectros de referencia de diferentes urolitos mixtos de que se llegan a encontrar en especies animales. Como es el caso de los urolitos que contienen silicato, que no es considerado de los urolitos de humano un componente por lo que las librerías comerciales no cuentan con espectros de referencia para las mezclas de este mineral con otros minerales en diferentes proporciones.

Actualmente en nuestro laboratorio de referencia nacional se trabaja con una librería electrónica de 1668 espectros infrarrojo de referencia de urolitos (NICODOM IR Kidney stones 1668 spectra, Nikodom, República Checa), pero no contamos con los espectros de referencia de las mezclas de silicatos y otros minerales en diferentes proporciones que permitan hacer un análisis mineral del urolito forma automatizada.

El desarrollar una librería electrónica de referencia con los espectros infrarrojos de cálculos urinarios que contienen silicato de gran utilidad para el análisis de urolitos que se remiten a un centro de referencia de cálculos urinarios en el país como lo es el Hospital Veterinario para Pequeñas Especies de la FMVZ-UAEMex, ya que como se ha demostrado en los estudios epidemiológicos realizados en México la urolitiasis de silicato es más frecuente que en otras poblaciones realizadas.

OBJETIVO

Generar una librería electrónica de referencia de espectros infrarrojos de urolitos que contienen silicatos mezclado con otros minerales en diferentes proporciones que permitan hacer un análisis mineral del urolito de forma automatizada, y probar su eficacia con el análisis de casos reales de urolitiasis de perros.

MATERIAL Y METODOS

Materiales

- Un espectrómetro FT-IR Spectrum two, de la marca Perkin Elmer, Inc. acoplado a un ATR de diamante.
- Software Spectrum Perkin Elmer (*.sp)
- Microscopio estereoscópico Zeiss Stemi DV4
- Báscula analítica
- Mortero de agata.
- Agitador Vortex- Genie 2.
- Tamiz de acero inoxidable con malla de 10mm y con un diámetro de 35cm.
- Cálculos urinarios considerados puros de silicato, estruvita, oxalato de calcio monohidratado, oxalato de calcio dihidratado, urato de amonio, cistina y xantina.

Método

La técnica utilizada es mediante el análisis de espectroscopia infrarroja acoplado a un ATR de diamante en base a la técnica citada por García (2011), se obtendrá el espectro infrarrojo de referencia de un urolito de silicato considerado puro en base a lo descrito por Hidalgo et al, 1983. Este espectro será identificado y etiquetado como espectro de silicato puro en el software spectrum two del equipo y puestos a disposición en la librería electrónica de referencia del mismo.

Se seleccionaron cálculos urinarios considerados puros de los minerales: estruvita, oxalato de calcio monohidratado y oxalato de calcio dihidratado, urato de amonio, cistina y xantina, en base a lo descrito por Hidalgo et al, 1983, analizando en que ninguno de los espectros tuviera alguna banda característica del silicato.

Los urolitos de las diferentes composiciones fueron pulverizados individualmente con la ayuda de un mortero de agata hasta obtener un polvo fino y tamizado con el tamiz de acero inoxidable.

Con la ayuda de la báscula analítica, se realizaron las mezclas del polvo de urolitos de silicato considerados con otros de diferente composición química. Las mezclas fueron realizadas considerando a 250 mg como el 100 % cambiando las proporciones de los diferentes minerales en cada mezcla como se muestra en las tablas de los diferentes grupos de mezclas más adelante. Cada mezcla fue analizada con el equipo de espectroscopia infrarroja y el espectro obtenido fue etiquetado como característico de dicha mezcla por medio del software Spectrum con una extensión *.sp y puestos a disposición en la base de datos electrónica .

Mezclas de silicato y otros minerales en diferentes proporciones

| Grupo 1: S/E 1 a 7. Mezcla de silicato con estruvita. | | | | | | | |
|--|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| Mezcla | Min 1 | Prop | (mg) | Min 2 | Prop | (mg) | Mezcla de urolito creada |
| S/E-1 | Silicato | 80% | 200 | Estruvita | 20% | 50 | Urolito de Silicato |
| S/E-2 | Silicato | 70% | 175 | Estruvita | 30% | 75 | Mixto (Sil 70% Estr 30%) |
| S/E-3 | Silicato | 60% | 150 | Estruvita | 40% | 100 | Mixto (Sil 60% Estr 40%) |
| S/E-4 | Silicato | 50% | 125 | Estruvita | 50% | 125 | Mixto (Sil 50% Estr 50%) |
| S/E-5 | Silicato | 40% | 100 | Estruvita | 60% | 150 | Mixto (Sil 40% Estr 60%) |
| S/E-6 | Silicato | 30% | 75 | Estruvita | 70% | 175 | Mixto (Sil 30% Estr 70%) |
| S/E-7 | Silicato | 20% | 50 | Estruvita | 80% | 200 | Urolito de Estruvita |

S/E: Mezcla de silicato y estruvita; **Min:** Mineral; **Prop:** proporciones; **Sil:** silicato, **Estr:** estruvita

| Grupo 2: S/OCM 1 a 7. Mezcla de silicato con oxalato de calcio monohidratado. | | | | | | | |
|--|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| Mezcla | Min 1 | Prop | (mg) | Min 2 | Prop | (mg) | Mezcla de urolito creada |
| S/OCM-1 | Silicato | 80% | 200 | OCM | 20% | 50 | Urolito de silicato |
| S/OCM-2 | Silicato | 70% | 175 | OCM | 30% | 75 | Mixto (Sil 70% OCM 30%) |
| S/OCM-3 | Silicato | 60% | 150 | OCM | 40% | 100 | Mixto (Sil 60% OCM 40%) |
| S/OCM-4 | Silicato | 50% | 125 | OCM | 50% | 125 | Mixto (Sil 50% OCM 50%) |
| S/OCM-5 | Silicato | 40% | 100 | OCM | 60% | 150 | Mixto (Sil 40% OCM 60%) |
| S/OCM-6 | Silicato | 30% | 75 | OCM | 70% | 175 | Mixto (Sil 30% OCM 70%) |
| S/OCM-7 | Silicato | 20% | 50 | OCM | 80% | 200 | Urolito de OCM |

S/OCM: Mezcla de silicato y oxalato de calcio monohidratado; **Min:** Mineral; **Prop:** proporciones; **Sil:** silicato.

| Grupo 3: S/OCD 1 a 7. Mezcla de silicato con oxalato de calcio dihidratado. | | | | | | | |
|--|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| Mezcla | Min 1 | Prop | (mg) | Min 2 | Prop | (mg) | Mezcla de urolito creada |
| S/OCD-1 | Silicato | 80% | 200 | OCD | 20% | 50 | Urolito de silicato |
| S/OCD-2 | Silicato | 70% | 175 | OCD | 30% | 75 | Mixto (Sil 70% OCD 30%) |
| S/OCD-3 | Silicato | 60% | 150 | OCD | 40% | 100 | Mixto (Sil 60% OCD 40%) |
| S/OCD-4 | Silicato | 50% | 125 | OCD | 50% | 125 | Mixto (Sil 50% OCD 50%) |
| S/OCD-5 | Silicato | 40% | 100 | OCD | 60% | 150 | Mixto (Sil 40% OCD 60%) |
| S/OCD-6 | Silicato | 30% | 75 | OCD | 70% | 175 | Mixto (Sil 30% OCD 70%) |
| S/OCD-7 | Silicato | 20% | 50 | OCD | 80% | 200 | Urolito de OCD |

S/OCD: Mezcla de silicato y oxalato de calcio dihidratado; **Min:** Mineral; **Prop:** proporciones; **Sil:** silicato.

| Grupo 4: S/UA 1 a 7. Mezcla de silicato con urato de amonio. | | | | | | | |
|---|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| Mezcla | Min 1 | Prop | (mg) | Min 2 | Prop | (mg) | Mezcla de urolito creada |
| S/UA-1 | Silicato | 80% | 200 | UA | 20% | 50 | Urolito de silicato |
| S/UA-2 | Silicato | 70% | 175 | UA | 30% | 75 | Mixto (Sil 70% OCD 30%) |
| S/UA-3 | Silicato | 60% | 150 | UA | 40% | 100 | Mixto (Sil 60% OCD 40%) |
| S/UA-4 | Silicato | 50% | 125 | UA | 50% | 125 | Mixto (Sil 50% OCD 50%) |
| S/UA-5 | Silicato | 40% | 100 | UA | 60% | 150 | Mixto (Sil 40% OCD 60%) |
| S/UA-6 | Silicato | 30% | 75 | UA | 70% | 175 | Mixto (Sil 30% OCD 70%) |
| S/UA-7 | Silicato | 20% | 50 | UA | 80% | 200 | Urolito de Urato de Amonio |

S/UA: Mezcla de silicato y urato de amonio; **Min:** Mineral; **Prop:** proporciones; **Sil:** silicato.

| Grupo 5: S/Cistina 1 a 7. Mezcla de silicato con cistina. | | | | | | | |
|--|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| Mezcla | Min 1 | Prop | (mg) | Min 2 | Prop | (mg) | Mezcla de urolito creada |
| S/C-1 | Silicato | 80% | 200 | C | 20% | 50 | Urolito de silicato |
| S/C-2 | Silicato | 70% | 175 | C | 30% | 75 | Mixto (Sil 70% C 30%) |
| S/C-3 | Silicato | 60% | 150 | C | 40% | 100 | Mixto (Sil 60% C 40%) |
| S/C-4 | Silicato | 50% | 125 | C | 50% | 125 | Mixto (Sil 50% C 50%) |
| S/C-5 | Silicato | 40% | 100 | C | 60% | 150 | Mixto (Sil 40% C 60%) |
| S/C-6 | Silicato | 30% | 75 | C | 70% | 175 | Mixto (Sil 30% C 70%) |
| S/C-7 | Silicato | 20% | 50 | C | 80% | 200 | Urolito de cistina |

S/C: Mezcla de silicato y cistina; **Min:** Mineral; **Prop:** proporciones; **Sil:** silicato.

| Grupo 6: S/X 1 a 7. Mezcla de silicato con xantina | | | | | | | |
|---|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| Mezcla | Min 1 | Prop | (mg) | Min 2 | Prop | (mg) | Mezcla de urolito creada |
| S/X-1 | Silicato | 80% | 200 | UA | 20% | 50 | Urolito de silicato |
| S/X-2 | Silicato | 70% | 175 | UA | 30% | 75 | Mixto (Sil 70% OCD 30%) |
| S/X-3 | Silicato | 60% | 150 | UA | 40% | 100 | Mixto (Sil 60% OCD 40%) |
| S/X-4 | Silicato | 50% | 125 | UA | 50% | 125 | Mixto (Sil 50% OCD 50%) |
| S/X-5 | Silicato | 40% | 100 | UA | 60% | 150 | Mixto (Sil 40% OCD 60%) |
| S/X-6 | Silicato | 30% | 75 | UA | 70% | 175 | Mixto (Sil 30% OCD 70%) |
| S/X-7 | Silicato | 20% | 50 | UA | 80% | 200 | Urolito de Xantina |

S/X: Mezcla de silicato y xantina; **Min:** Mineral; **Prop:** proporciones; **Sil:** silicato.

Para probar la eficiencia de la librería de electrónica desarrollada se realizó el análisis de urolitos recibidos en el laboratorio del Hospital Veterinario para Pequeñas Especies de la FMVZ-UAEMex.

LÍMITE DE ESPACIO

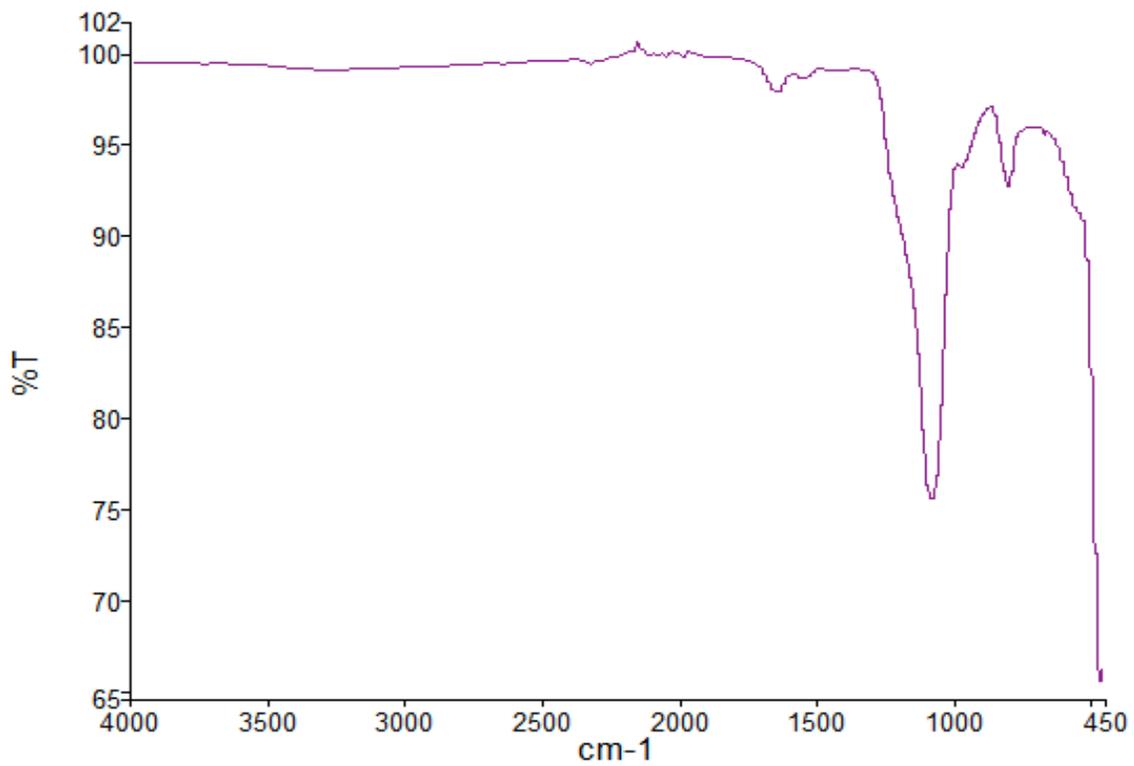
El presente estudio se realizó en el laboratorio del Hospital Veterinario para Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

LÍMITE DE TIEMPO

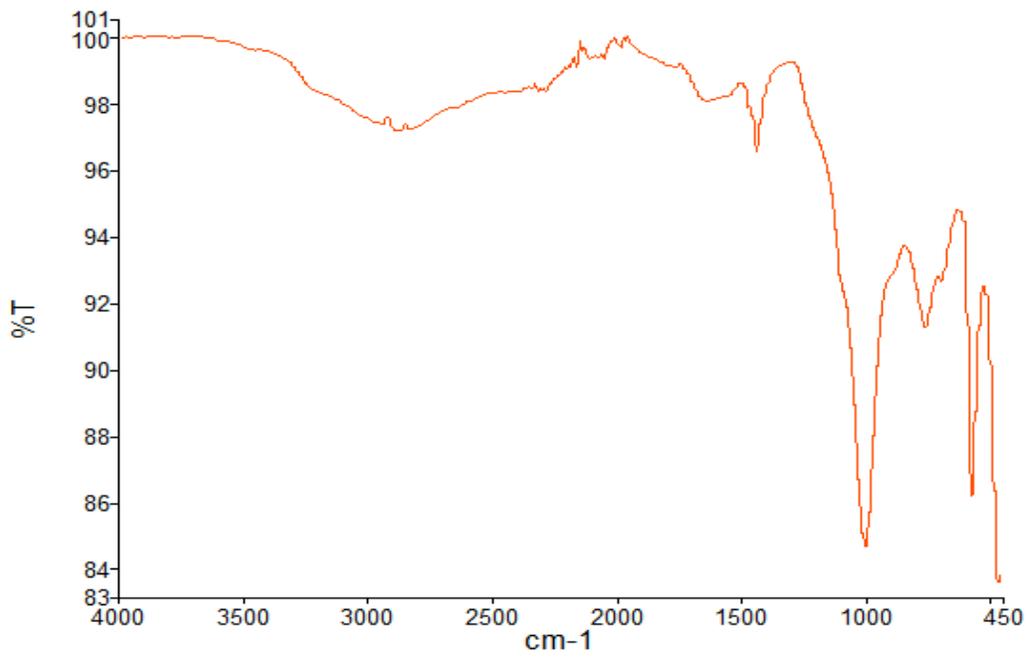
El presente estudio se realizó en el periodo de Febrero de 2015 a Julio de 2016.

RESULTADOS

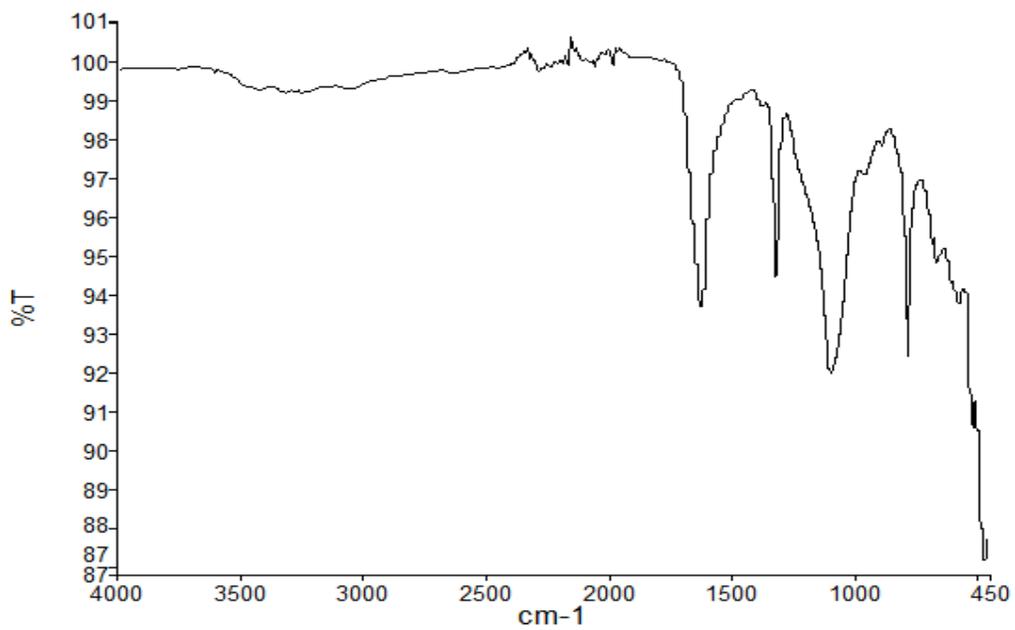
Se realizaron un total de 62 espectros infrarrojo con mezclas de silicato y otros minerales en diferentes proporciones, a continuación se muestran algunos ejemplos:



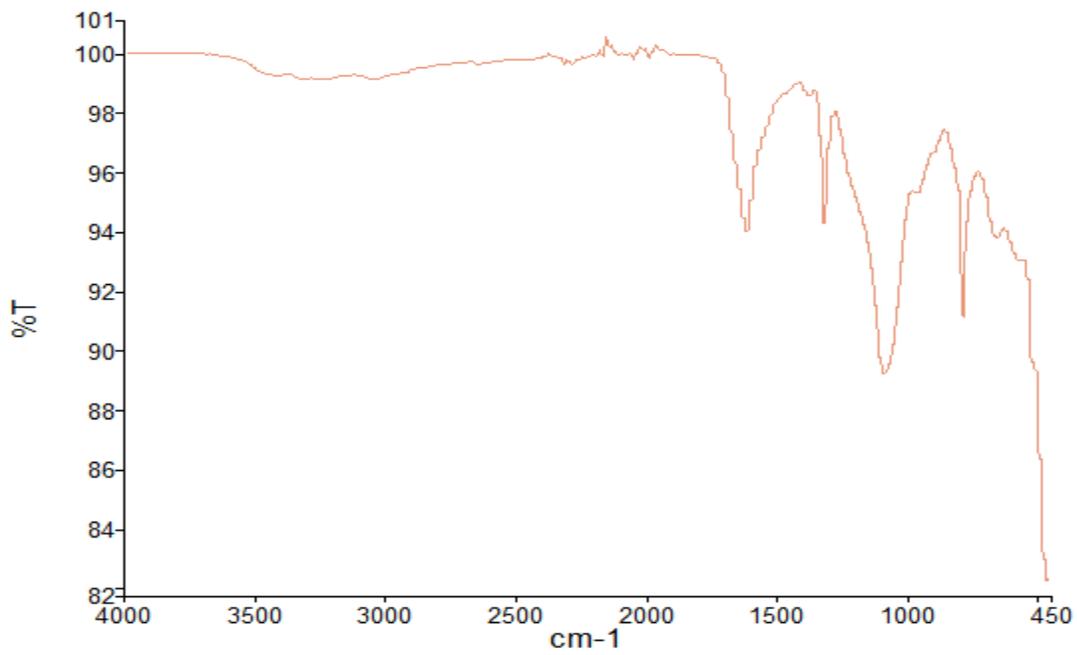
Espectro de Silicato 100%



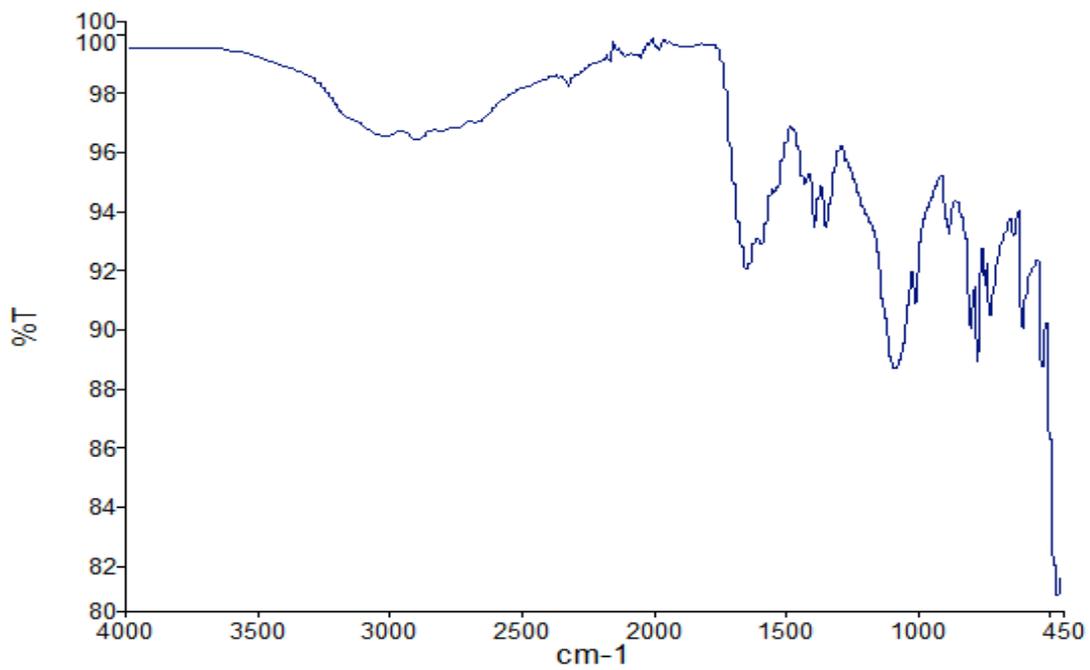
Espectro de Silicato 40%-Estruvita 60%.



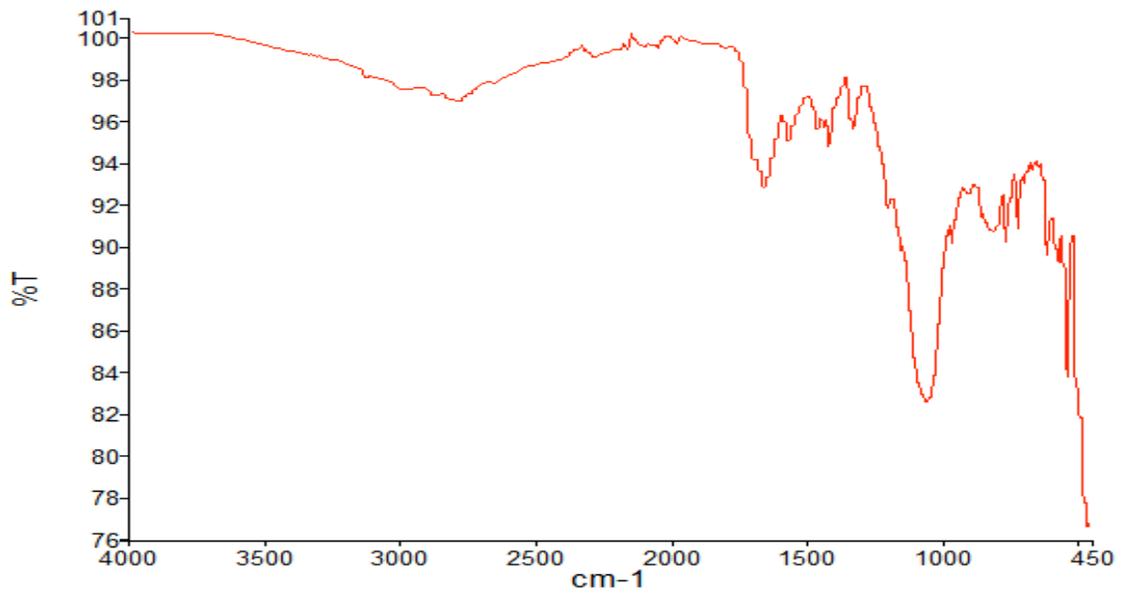
Espectro de Silicato 40 %-OxCa M 60%.



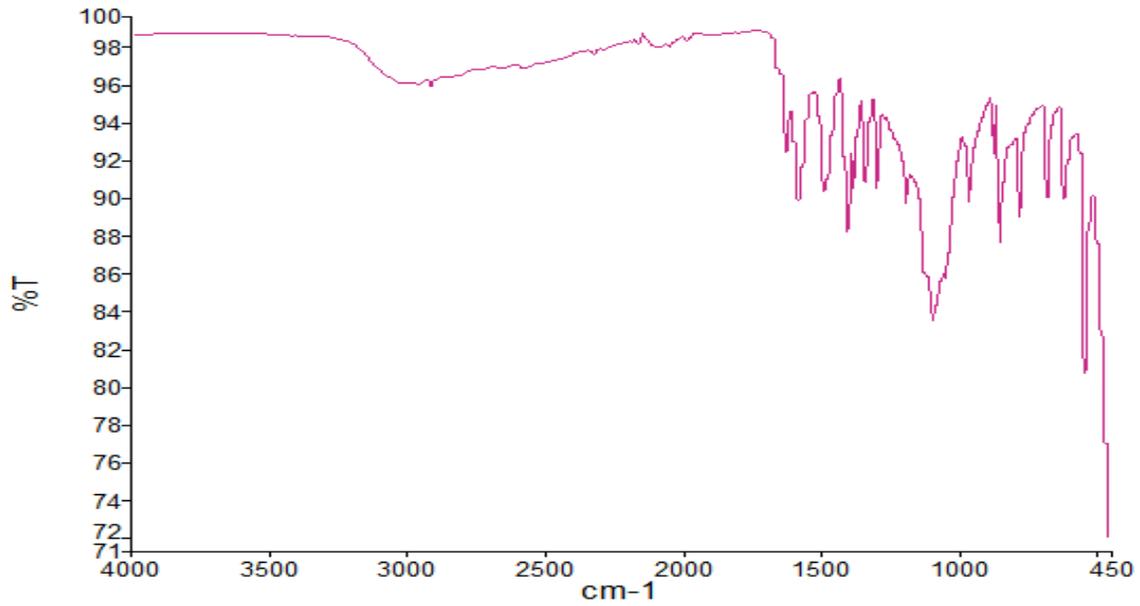
Espectro de Silicato 40%-OxCa D 60%.



Espectro de Silicato 50%-Urato de amonio 50%.



Espectro de Silicato 50%-Xantina 50%.



Espectro de Silicato 40%-Cistina 60%.

La librería de referencia fue creada y los espectros de referencia fueron puestos en la biblioteca de referencia del software Spectrum two del equipo Perkin elmer, y esta base de dato fue probada con el análisis de urolitos de 20 casos recibidos poblaciones ubicadas dentro del eje neovolcánico transmexicano y 20 de poblaciones fuera de este.

Uso de la librería en el análisis de casos clínicos de urolitiasis de perros

La librería fue probada con el análisis una serie de 480 casos de urolitos de perros remitidos al Hospital Veterinario para Pequeñas Especies de la FMVZ-UAEMex, encontrando 191 casos de Estruvita, 142 de Oxalato de calcio, 87 de Silicato, Purinas 13, Cistina 7, Fosfato de calcio 3, Mixtos 29 y Compuestos 8 (Figura 12).

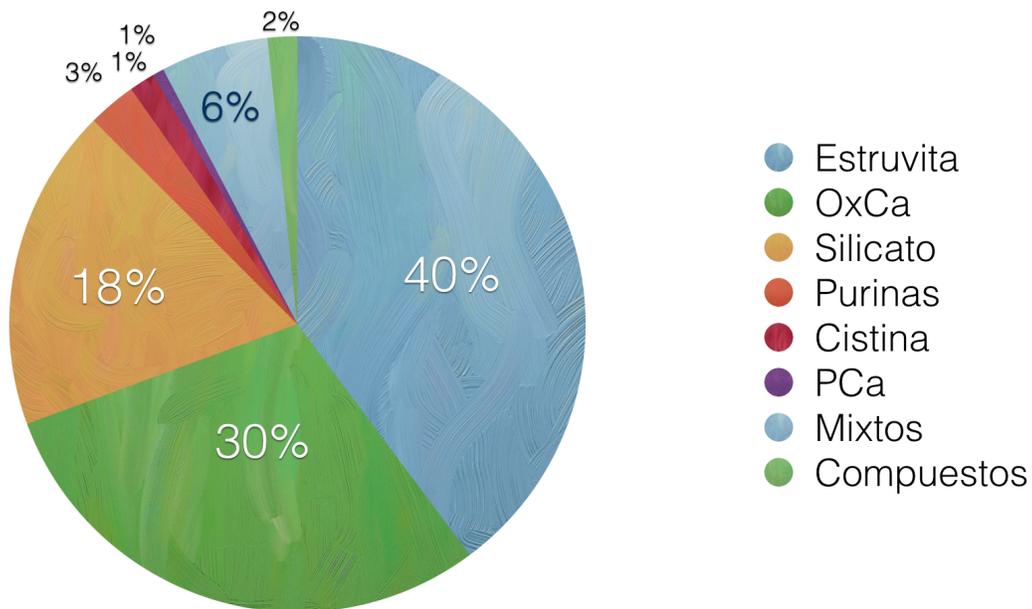


Figura 12. Frecuencia de distribución de los diferentes tipos de urolitos en base al mineral en 480 casos analizados

Del total de casos analizados, el 21.04% (n=101) contenían silicato en diferentes proporciones en su estructura química, de estos 87 (86.13%) casos fueron considerados urolitos de silicato puros por contener >70% de silicato; 13 (12.87%) casos de urolitos mixtos por contener < 60 % de silicato en mezclas con oxalato de calcio ó estruvita y solo un caso de urolitos compuestos que contenían un núcleo de silicato puro y una piedra de mineral mixto de silicato y estruvita.

Con lo anterior fue posible demostrar la utilidad de la librería electrónica en el análisis de la estructura química de los urolitos de perros y gatos.

DISCUSIÓN

El término urolitiasis hace referencia a las causas y efectos de la formación de piedras en cualquier parte del sistema urinario. Es una patología multifactorial en la que pueden estar involucrados uno o varios componentes como los genéticos metabólicos, nutricionales, infecciosos, geográficos, etc. (Guillén *et al.*, 2011).

Para el diagnóstico de la urolitiasis, es indispensable evidenciar los urolitos en las vías urinarias con estudios de imagen radiográficos y/o ultrasonográficos.

El manejo médico de esta patología tiene dos metas fundamentales, la primera resolver los signos clínicos asociados a la presencia de urolitos en las vías urinarias, y la segunda evitar la reincidencia de los mismos. Para resolver los signos clínicos se pueden retirar los urolitos por cirugía o técnicas menos invasivas como la urohidropropulsión; en algunos casos es posible la dilución por medio de dietas terapéuticas como en el caso de los urolitos de estruvita.

Una vez que los urolitos son retirados de las vías urinarias, es necesario que los urolitos sean enviados a un laboratorio de referencia para su análisis y determinación de su composición mineral y con base en este dato y los hallazgos clínicos del paciente comprender el mecanismo fisiopatológico y los factores que contribuyeron en la formación del urolito, y así poder establecer medidas terapéuticas específicas con la finalidad de evitar una nueva formación de urolitos.

En México la composición mineral más frecuente de los urolitos fue la estruvita con el 45.11%, seguido del oxalato de calcio 27.71 %, silicato 9.90%, purinas 6.42%, cistina 0.80%, fosfato de calcio 0.26%, urolitos mixtos 7.76% y compuestos 2% (Del Angel-Caraza *et al.*, 2010). Siendo los urolitos de silicato el tercer tipo de urolito más frecuente. Las proporciones son superiores a la reportado en la mayoría de los estudios epidemiológicos que informan valores entre 0,5 y 0,9% (Houston *et al.*, 2004; Osborne *et al.*, 1999). Se ha sugerido que los urolitos de sílice se deben al aumento de la ingesta de este mineral por dietas elaboradas con arroz, soya o gluten de maíz o bien por el consumo de agua con un alto contenido de silicatos disueltos. (Lulich *et al.*, 2000; Del-Angel-Caraza *et al.*, 2010; Tasaki *et al.*, 2013;). Una posible explicación para la alta proporción de urolitos de silicato en los casos estudiados en nuestro laboratorio es que el agua potable que los perros beben es obtenida de los mantos acuíferos ubicados en el área geográfica correspondiente al eje neo-volcánico transmexicano y esta pueden contener un alto contenido de silicatos (Hizar *et al.*, 2004, Del-Angel-Caraza *et al.*, 2010).

De las técnicas espectrales la espectroscopia infrarroja es una técnica precisa y fácil de realizar para el análisis de los urolitos. Sus principales ventajas son: que pueden aplicarse sobre muestras muy pequeñas (inferiores a 1mg) y que permite también la identificación de sustancias amorfas (proteínas, fosfatos amorfos, lípidos etc.) (García et al 2011). La interpretación de los espectros obtenidos se realiza en base a los espectros de referencia patrón (Hidalgo et al. 1983) o bien con una librería electrónica de espectros de referencia para hacer el análisis cuantitativo de los compuestos minerales como la NICODOM IR Kidney stones 1668 spectra, Nikodom-República Checa. Si bien estas librerías son sumamente útiles para el análisis de urolitos de diferentes especies carecen de espectros de referencia de diferentes urolitos mixtos de que se llegan a encontrar en especies animales. Como es el caso de los urolitos que contienen silicato, que no es considerado de los urolitos de humano un componente por lo que las librerías comerciales no cuentan con espectros de referencia para las mezclas de este mineral con otras minerales en diferentes proporciones.

El desarrollo de la librería electrónica de referencia con los espectros infrarrojos de cálculos urinarios que contienen silicato es de utilidad para el análisis de urolitos que se remiten al Hospital Veterinario para Pequeñas Especies de la FMVZ-UAEMex, ya que como se ha demostrado en los estudios epidemiológicos realizados en México la urolitiasis de silicato es más frecuente que en otras poblaciones realizadas.

CONCLUSION

Fue posible crear una librería electrónica de referencia de espectros infrarrojos de urolitos que contienen silicato mezclado con otros minerales en diferentes proporciones, que permite hacer una determinación de la composición mineral del urolito de forma automatizada; y probar su utilidad con el análisis de 480 casos clínicos de urolitiasis en perros encontrando 101 urolitos que contenían silicato en su estructura química de los cuales 87 (86.13%) fueron puros, 13 (12.87%) mixtos y solo uno considerado compuesto.

Literatura citada

- Argüelles M.P. (2009): XVII Jornada de Formación Interhospitalaria del Laboratorio Clínico. Métodos de identificación de los cálculos. <<http://www.aebm.org/jornadas/.../identificacion%20%calculos.pdf>> (21 Abril 2014).
- Armelin E.(2012): Espectroscopia de infrarrojo. <[http://www.eq.upc.edu./estudios/material-docente/recursos/espectroscopia de infrarrojo](http://www.eq.upc.edu./estudios/material-docente/recursos/espectroscopia%20de%20infrarrojo)>. (22 Abril 2014).
- Baciero G. (2012): Urolitiasis y su Manejo Nutricional en el perro. Revista Asist. En el Centro Vet. (37):20-26.
- Bartges J.W. (eds) (2002a): Enfermedades de la vejiga urinaria en Birchard y sherding (eds) Manual Clínico de Procedimientos en Pequeñas Especies. 2^{da} ed., McGraw-Hill interamericana, Aravaca Madrid. 1101-1110
- Bartges J, Polzin D. (2011b) Nephrology and Urology of Small Animals. 1^{ra} ed., Wiley- Blackwell
- Chumbi J.J.M. (2009) Prevalencia e identificación Microscópica de urolitos en caninos en el área Urbana de la Ciudad de Cuenca, Tesis de Licenciatura, fac. de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.
- Contreras Q. Héctor J., Trujillo P., Hugo A.; Arias O., Pérez C., Delgado F. (2010): Espectroscopia ATR-FTIR de celulosa: Aspecto Instrumental y Tratamiento matemático de espectros. *Redalyc*. Vol. 8 (9): 1 a 14
- Couton G., Nelson R.W. (2003) Medicina Interna de Animales Pequeños. 3^{ra} ed., Inter-médica Buenos Aires, República Argentina.
- Del Ángel-Caraza .J. (2000): Nefrología y Urología en Perros y Gatos. Cuernavaca, Morelos.
- Del Ángel-Caraza J., Diez P., Perez C.C., García M.B (2010): Composition of lower urinary tract stones in canines in Mexico City. *Urol. Res.*, 38: 201-204.
- García G.S., Millan F., Rousaud F., Montañes R., Angerri O., Sanchez F., Villavicencio H., Oliver A. (2011): Por qué y cómo hemos de analizar los Cálculos Urinarios. *Acta. Uros. Esp.*, 35:354-362.

- García M.Y. (2012), Caracterización de urolitiasis en Clínicas Veterinarias de la Ciudad de Morelia, en el periodo de Septiembre 2008 – Junio 2010, Tesis de Licenciatura, FMVZ, Universidad Michoacana De San Nicolás de Hidalgo.
- Gisselman K. Langston C.E., Douglas P. (2009): Calcium Oxalate Urolithiasis. *Compend Contin Educ Vet.* 31: 496-502
- Grases F.F., Conte A Costa B.A. (1997): Análisis y estudio de los cálculos renales. *Urol. Integr. Invest.*, 2:477-487.
- Guillen R., Ruiz I., Vera P., Ozuna R. (2011): Litiasis recidivante en cachorro Schnauzer miniatura. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 7:49-53
- Hand M. S., Thatcher C.D., Remillard R.L. (2010): Small Animal Clinical Nutrition. 5^{ta} ed., Mark Morris.
- Hidalgo A. Carmona P., Bellanato J., Santos M. Ramos J.V.(1983): Análisis de cálculos urinarios por espectroscopia infrarroja y ramman. Danza de Valdes. Madrid.
- Houston D.M., Moore A., Favrin M., Hoff B. (2004): Canine urolithiasis: a look at over 16,000 urolith submissions to the Canadian veterinary urolith centre from February 1998 to April 2003. *Can Vet J*, 45:225–30.
- Huizar A.J., Carrillo J.J., Serrano A. (2004): Chemical response to groundwater extraction southeast of Mexico City. *Hydrogeol*, 12:436–50.
- Jones B.R (2001): Canine uroliths: analysis of uroliths from dogs in Ireland. *Irish Vet J*,54:629–32.
- Langston C., Gisselman K., Palma D., McCue J. (2008): Diagnosis of Urolithiasis. *Compend. Contin. Educ. Vet.*, 30:447- 455.
- Ling G.V., Franti C.E., Johnson D.L., Ruby A.L. (1998a) Urolithiasis in dogs. III: prevalence of urinary tract infection and interrelations of infection, age, sex, and mineral composition. *Am J Vet Res*, 59:643–49.
- Ling G.V., Mark C., Young K., Franti E., Ruby L., Johnson D.L. (2003b): Changes in proportion of canine urinary calculi composed of calcium oxalate or struvite in specimens analyzed from 1981 through 2001. *J Vet Intern Med*, 17:817–23.
- López-Villa., Mendoza C., Del Angel C.J., Quijano H.I., Barbosa M.A. (2014): Patologías que afectan al tracto urinario caudal de los perros y gatos. Memorias del Seminario de Residentes de la Especialidad en Medicina y Cirugía en Perros y Gatos-Generación 2012- 2014. *Mem. Hosp. Veteri. Peq.Esp. FMVZ-UAEMex.* Toluca, México, (Electrónico).

- Lulich J.P., Osborner C.A., Albasan H., Koehler A., Ulrich M. (2000a) Canine lower urinary tract disorders. In: Ettinger SJ, Feldman EC (eds) Textbook of veterinary internal medicine-diseases of dog and cat, 5th Ed. Saunders, Philadelphia.
- Lulich J.P., Osborner C.A., Albasan H., Koehler A., Ulrich M. (2010b): "Small Animal Clinical Nutrition" Canine Calcium Oxalate Urolithiasis: Changing paradigms in detection management and prevention. 5^{ta} ed., Topeka
- Lulich J.P., Osborner C.A., Albasan H., Koehler A., Ulrich M. (2013c) Recent shifts in the global proportions of canine uroliths. *Vet. Rec.* 172 (14):363.
- Moore A. (2007): Quantitative Analysis of Urinary Calculi in Dogs and Cats. *Vet. Foc.* Vol 17(1): 22-27.
- Morales A.M. (2011): "Urolitiasis canina". <[http://www. Albeitar.com/content.php? section=9&element= 108](http://www.Albeitar.com/content.php?section=9&element=108) (12 Marzo 2014).
- Negri A.L., Spivacow F.R., Del Valle E.E., Forrester M., Rosende G., Pinduli I. (2008): Role of overweight and obesity on the urinary excretion of promoters and inhibitors of stone formation in stone formers. *Urol Res* 36:303–7.
- Osborne C.A., Lulich J.P., Polzin D.J., Sanderson S.L., Koehler L.A., Ulrich L.K., Bird K.A., Swanson L.L., Pederson L.A., Sudo S.Z. (1999a): Analysis of 77,000 canine uroliths. Perspectives from the Minnesota Urolith Center. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 29:17-38
- Osborner C.A (2004b): Improving management of urolithiasis: canine struvite uroliths
- Osborne C.A., Lulich J.P., Wilson J.F., Weiss C.H. (2008c): Changing Paradigms in Ethical Issues and Urolithiasis, *Vet. Clin. Small Anim* 39: 93-109.
- Osborne C., Jody P., Lulich., John M., Ulrich L., Koehler L.A (2009d) Analysis of 451,891 canine uroliths, feline uroliths, and urethral plugs from 1981 to 2007: Perspective from the Minnesota Urolith Center. *Vet Clin Small Anim* 39:183-97.
- Osborner C.A., Sanderson S., Lulich P., Bartges J.W., Ulrich L.K., Koehler L.A., Bird K., Swanson L.L. (2010) "Small Animal Clinical Nutrition" Canine Purine Urolithiasis: Causes, Detection, Management and Prevention. <[https://s3.amazonaws.com/mmi-sacn5/Chapter%2039%20-%20Canine%20 Purine %20 Urolithiasis. Pdf](https://s3.amazonaws.com/mmi-sacn5/Chapter%2039%20-%20Canine%20Purine%20Urolithiasis.Pdf)> (27 Marzo 2014).
- PerkinElmer (2005) FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR). www.utsc.utoronto.ca/traceslab/ATR_FTIR.pdf. (22 Abril 2014)

- Prado A.J., Méndez C.D. (2010): Identificación de Urolitiasis y Cristaluria en Perros Muestreados del Centro de Control Canino de Morelia Michoacán, Tesis de Licenciatura, Fac. de Med. Vet. y Zoot. de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
- Perkinelmer (2005): FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR). www.utsc.utoronto.ca/traceslab/ATR_FTIR.pdf. (22 Abril 2014).
- Perucca J., Bouby N., Valeix P., Bankir L. (2007): Sex difference in urine concentration across differing ages, sodium intake, and level of kidney disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292:R700–5.
- Picavet P., Detilleux J., Verschuren S., Sparkes A., Lulich J., Osborner C. (2007): Analysis of 4495 canine and feline uroliths in the Benelux. A retrospective study: 1994- 2004. *J Anim Physiology Anim Nut (Berl)* 91:247-51.
- Primiano A., Persichilli S., Gambaro G., Ferraro P., Cocci A., Zuppi C., Gervasoni J. (2014) FT-IR Analysis of urinary stones: a helpful tool for clinician comparison with the chemical spot test. *Hin. Publis. Corp.*, Volume 2014, Article ID 176165, 5 paginas.
- Robertson W.G., Jones J.S., Heaton M.A., Stevenson A.E., Markwell P.J. (2002): Predicting the crystallisation potential of urine from cats and dogs with respect to calcium oxalate and magnesium ammonium phosphate (struvite) *J. Nutr*, (132) 1637S-1641S.
- Sarica K.(2008) Effect of being overweight on stone-forming risk factors. *Urology* 71:771–75.
- Sarno G. (2010): Nutritional management of struvite urolithiasis in dogs, *Farm. Vet, Rese.* , (3): 2-14.
- Schamble M. (2016): Urinary Tract Infections (UTI) in Dogs. <http://www.akc.org/content/health/articles/urinary-tract-infections-uti-in-dogs/> (22 de Agosto del 2013).
- Speakman J., Hambly C., Mitchell S., Krol E. (2008): The contribution of animal models to the study of obesity. *Lab Anim* 42:413–32.
- Stevenson A., (2008): Manejo nutricional de la urolitiasis canina en Pascale, Biourge y Elliott (eds) Enciclopedia de la nutrición canina. Royal canin, Paris. 301-333
- Suarez., Bertolani C. (2013): “Las Vías Urinarias”. Tan sencillas como complejas. avepa.org/pdf/proceedings/URINARIO_PROCEEDING2013.pdf (10 mar. 2014)

- Tasaki Y., Ito G., Momoi Y. (2013): “Silica urolithiasis in dogs” <http://hdl.handle.net/10232/16977>> (5 feb. 2015).
- Ulrich L.K., Osborner C., Cokley A., Lulich J. (2008): Changing Paradigms in the Frequency and Management of canine compound Uroliths. *Vet Clin Small Anim.* (39) 41-53.<http://hdl.handle.net/10232/16977>
- Wallerstrom B.I., Wagberg T.I. (1992): Canine urolithiasis in Sweden and Norway: retrospective survey of prevalence and epidemiology. *J Small Anim Pract* 33:534–9.