

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Disciplina: SEMINÁRIOS APLICADOS

TÉCNICAS DE ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE URÓLITOS

Paula Costa Ariza
Orientadora: Maria Clorinda Soares Fioravanti

GOIÂNIA
2012

PAULA COSTA ARIZA

TÉCNICAS DE ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE URÓLITOS

Seminário apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Nível: Mestrado

Área de concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Linha de Pesquisa:

Alterações clínicas, metabólicas e toxêmicas dos animais e meios auxiliares de diagnóstico

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Clorinda Soares Fioravanti

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva

Prof^a. Dr^a. Naida Cristina Borges

GOIÂNIA

2012

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Classificação química dos urólitos	2
2.2 Importância da análise da composição dos urólitos	2
2.3 Técnicas de análise da composição dos urólitos	4
2.3.1 Métodos empíricos	5
A) Urinálise	5
B) Avaliação das características morfológicas dos urólitos	9
C) Estimativa por probabilidade	11
2.3.2 Métodos por imagem	13
A) Ultrassonografia	13
B) Avaliação radiográfica	13
C) Tomografia computadorizada	16
2.3.3 Análises qualitativas químicas	19
2.3.4 Análises quantitativas físicas	20
A) Microscopia de luz polarizada	20
B) Espectroscopia infravermelha	21
C) Difração de raios-X	24
D) Termoanálises	27
E) Espectroscopia de energia dispersiva	29
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
REFERÊNCIAS	33

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Formas características de vários urólitos de cães e gatos.....	11
FIGURA 2	Espectro de absorvância de amostras puras de ácido úrico (inferior) e oxalato de cálcio (centro) e cálculo urinário composto por ácido úrico e oxalato de cálcio (superior).....	22
FIGURA 3	Padrões de difração de raios-X de cálculos de hidroxiapatita (1) oxalato de cálcio monohidratado (2) e ácido úrico (3).....	25
FIGURA 4	Curvas térmicas de urólitos padronizados de oxalato de cálcio monohidratado e dihidratado.....	28
FIGURA 5	Espectroscopia de energia dispersiva em urólito composto de ácido úrico.....	30

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Alterações de constituição urinária e sua relação com tipo de urólito.....	9
QUADRO 2	Características morfológicas típicas de urólitos de cães e gatos de acordo com a sua composição.....	10
QUADRO 3	Fatores que sugerem a provável composição mineral de urólitos caninos.....	12
QUADRO 4	Características radiográficas de urólitos caninos de acordo com a sua composição.....	14

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Probabilidade de ocorrência de erro de avaliação da composição dos diferentes tipos de cálculos pelo uso da tomografia computadorizada.....	10
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ATR	Reflexão total atenuada
CaOx	Oxalato de cálcio
DTA	Termoanálise diferencial
EI	Espectroscopia infravermelha
FT-IR	Espectroscopia infravermelha transformada de Fourier
MLP	Microscopia de luz polarizada
TC	Tomografia computadorizada
TG	Termogravimetria

1 INTRODUÇÃO

A urolitíase é uma enfermidade frequente nos animais domésticos e seres humanos. Os urólitos são agregados de substâncias minerais ou não minerais, que se formam no trato urinário e que podem ser constituídos de diversas substâncias. Seu tamanho e número são muito variáveis, bem como sua localização no trato urinário (ULRICH ET al., 2008). Existem diversas substâncias que podem estar presentes na constituição dessas concreções, de maneira associada ou não. A avaliação ou a estimação da composição dos cálculos urinários pode ser procedidas por diferentes métodos que são classificados em empíricos, de imagem, qualitativos e quantitativos, sendo que apenas nos dois últimos são realizadas análises diretas da composição química.

A análise da composição dos urólitos é importante para o conhecimento da causa-base da enfermidade e para o estabelecimento do protocolo de tratamento, já que a capacidade ou não de dissolução e a resistência a tratamentos por ondas de choque dependem das substâncias formadoras (LEE et al., 2012). É de grande significância a análise completa de todos cálculos presentes, de modo a evitar erros no diagnóstico (KALINSKI et al., 2012).

A escolha e conhecimento do método de análise a ser usado na identificação das substâncias presentes nos urólitos é importante (SCHUBERT, 2006) e não deve ser levado em consideração apenas a facilidade de realização de determinada metodologia mas também sua acurácia, o método de preparo da amostra, tempo para emissão do resultado e capacidade de identificar corretamente todos os compostos presentes (MATERAZZI et al., 1995).

O presente seminário tem como objetivo a apresentação das principais técnicas analíticas da composição de urólitos, suas características, vantagens, desvantagens e aplicabilidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação química dos urólitos

Os urólitos podem ser classificados quanto à sua composição química em simples, com mais de 70% de sua estrutura composta de apenas um tipo de mineral; compostos, quando há a presença de camadas justapostas de composições diferentes e mistos, quando há apenas uma camada identificável, com mais de um componente, sendo que nenhum ultrapassa 70% da constituição do urólito (ULRICH et al., 2008).

Os minerais mais encontrados nos urólitos de animais e seres humanos são: fosfato amoníaco magnésiano hexahidratado, ou estruvita; oxalato de cálcio (CaOx) monohidratado ou dihidratado; fosfato de cálcio, nas formas de hidroxiapatita, carbonato apatita e brushita; uratos, que incluem, urato ácido de amônio, urato ácido de sódio e ácido úrico; cistina: sílica e carbonato de cálcio (OSBORNE et al., 1995; KALOUSTIAN et al., 2003). Entretanto, existem cálculos com outras composições menos frequentes como, por exemplo, de metabólitos de medicamentos ou purinas (OSBORNE et al., 2008).

2.2 Importância da análise da composição dos urólitos

A formação de urólitos é afetada por fatores sistêmicos que influenciam na composição química e propriedades físicas da urina e por fatores individuais do trato urinário, infecções urinárias e fatores ambientais (OCHMANSKI et al., 1999).

A realização da análise de todos cálculos removidos é muito importante (ULRICH et al., 2008). A identificação da composição química e estrutural dos cálculos urinários é de extrema utilidade para a o conhecimento das causas que levaram à deposição urinária de materiais litogênicos e também permite a escolha de um protocolo para o manejo correto do paciente e para evitar as recidivas em animais (DIAZ-ESPIÑERA et al., 1997; KOEHLER et al., 2008;) e seres humanos

(MATERAZZI et al., 1995; MOSTAFAVI et al., 1998; GRASES et al., 2002; SCHUBERT et al., 2006; MOROZ et al., 2009; KRAMBECK, et al., 2010; SEKKOUM et al., 2011; SELVARAJU et al., 2012). As propriedades mecânicas desses materiais, como o valor de dureza dependem da sua composição (LEE et al., 2012). A dificuldade no tratamento da urolitíase muitas vezes resulta da não determinação da composição dos cálculos removidos (KALINSKI et al., 2012). Infelizmente muitos urologistas optam por não fazer a análise da composição dos urólitos devido ao custo, falta de conhecimento ou conveniência (SCHUBERT, 2006).

São estabelecidos protocolos médicos e nutricionais para a dissolução de urólitos de estruvita, urato de amônio e cistina, assim como para a minimização da chance de recorrência de urolitíase. No entanto, para tratamento de cálculos ativos de oxalato de cálcio, fosfato de cálcio e sílica ou aqueles que obstruem o fluxo urinário, o tratamento médico não é suficiente (OSBORNE et al., 1995).

Cálculos de diferentes composições reagem ao tratamento por ondas de choque de maneira diferente. A litotripsia, que se baseia nessas ondas para fragmentação das concreções, é uma forma de tratamento muito utilizada em pacientes humanos (ANCHAROV et al., 2007). A diferenciação dos subtipos de urólitos é necessária, pois pode haver reação diferenciada a essa forma de tratamento. A distinção dos urólitos de oxalato de cálcio monohidratado daqueles de oxalato de cálcio dihidratado, por exemplo, tem grande importância nos pacientes humanos por esse motivo, pois há uma diferença de densidade que afeta diretamente resposta à fragmentação. É comum que as duas formas de oxalato de cálcio (monohidratado e dihidratado) estejam presentes na mesma amostra e a diferenciação se torna difícil se ambas as formas encontram-se presentes em grandes quantidades (KALOUSTIAN et al., 2002). Cálculos compostos por oxalato de cálcio monohidratado têm densidade maior e fragmentação mais difícil à litotripsia (DRETLEER & POLYKOFF, 1996; BELIN et al., 2004), assim como aqueles compostos por cistina (KIM et al., 2004) e brushita; enquanto que concreções de estruvita, outras formas de fosfato e o oxalato de cálcio dihidratado se fragmentam facilmente por essa técnica (BELIN et al., 2004).

A composição do núcleo pode diferir da composição do restante do cálculo e é muito importante que se determine corretamente a composição nuclear, pois é a partir dessa composição que se pode determinar a causa que levou ao desenvolvimento da urolitíase (OSBORNE et al., 1995).

Variações na composição entre os diferentes cálculos de um mesmo paciente também podem estar presentes, portanto, apenas a análise de todos os cálculos traz informações completas a respeito dos processos de formação e desenvolvimento da urolitíase (OSBORNE et al., 1995; KRAMBECK, et al., 2010). Pelo menos uma análise de composição deve ser realizada para cada cálculo por episódio por paciente para realização de terapia adequada (SCHUBERT, 2006).

2.3 Técnicas de análise da composição dos urólitos

Diversas técnicas analíticas podem ser utilizadas para a identificação da composição de cálculos urinários (MATERAZZI et al., 1995) e não há um padrão analítico aceito para esse tipo de análise (KRAMBECK et al., 2010). As técnicas mais usadas geralmente são classificadas em qualitativas, nas quais é apenas detectada a presença dos minerais, ou quantitativas, nas quais os componentes são quantificados (KOEHLER et al., 2008). Também há técnicas de avaliação empírica e técnicas auxiliares de imagem que podem ser empregadas na estimativa aproximada da composição. As avaliações quantitativa e qualitativa dos cálculos removidos tem maior valor que avaliações de estimativa (KALINSKI et al., 2012; PUCETAITE et al., 2012). Cálculos urinários possuem, muitas vezes, composição complexa e com presença de diferentes tipos minerais, portanto, o uso associado de mais de uma técnica é útil para a correta investigação da composição química desses materiais (LEE et al., 2012).

Os laboratórios comerciais muitas vezes não especificam metodologia de análise utilizada e geram resultados que diferem da real composição demonstrada pelas amostras, especialmente nos casos de urólitos compostos ou mistos, que eles tendem a caracterizar como puros. Para os cálculos realmente puros, os laboratórios apresentam menor ocorrência de erros (KRAMBECK et al., 2010).

A análise quantitativa ou qualitativa dos cálculos urinários é um desafio devido ao tamanho diminuto e a fragilidade de muitas amostras. (ANDERSON et al., 2007; PUCETAITE et al., 2012). Vários métodos analíticos destroem o urólito na fase de preparo da amostra, o que é um fator negativo, já que a manutenção da integridade estrutural é útil para a elucidação da etiologia da urolitíase (ANDERSON et al., 2007). Na escolha do método mais adequado de análise dos cálculos, também devem ser levadas em consideração, a possibilidade de ocorrência de heterogenicidade das amostras e o custo-benefício do método (SCHUBERT, 2006). Nenhuma das técnicas é perfeita e todas estão sujeitas a erros e o ideal é que sejam utilizadas associações de técnicas (MATERAZZI et al., 1995; KALINKS et al., 2012), o que muitas vezes é impossível na rotina clínica (KALINSKI et al., 2012).

As análises que podem ser utilizadas para identificação da composição dos cálculos urinários incluem a urinálise, avaliação morfológica dos cálculos, estimativa por probabilidade, avaliação por técnicas de imagem (radiografias e tomografia computadorizada), análises quantitativas químicas, microscopia de luz polarizada, termoanálises, espectroscopia infravermelha, espectroscopia de energia dispersiva e difração de raios-X (KOEHLER et al., 2008).

2.3.1 Métodos empíricos de análise dos urólitos

A) Urinálise

A formação das concreções urinárias pode levar de meses a vários anos e o processo de desenvolvimento dos cálculos pode mudar, em maior ou menor grau, a composição da urina (LAUBE et al., 2003). O desenvolvimento de protocolos para a dissolução e prevenção de urólitos resultou em interesse na detecção e correta interpretação da cristalúria, já que a identificação de cristais formados *in vivo* pode auxiliar na detecção das alterações que predispõem os animais à urolitíase; na estimativa da composição mineral dos urólitos, quando os mesmos não estão disponíveis e na avaliação da efetividade dos protocolos de dissolução ou prevenção prescritos (LULICH & OSBORNE, 2008).

A urinálise é uma importante ferramenta auxiliar no diagnóstico de urolitíase, porém pode ser mal interpretada (OSBORNE et al., 1995; GARCIA-

NAVARRO, 2005). Embora a presença de cristais em urina saturada seja um fator de risco para a formação de urólitos, possibilitando a formação e crescimento de cálculos do mesmo tipo mineral (LULICH & OSBORNE, 2008), sua ocorrência isolada não significa que os cálculos já estejam formados, ou mesmo, que se formarão (GRASES et al., 2002; ADAMS & SYME, 2005; GARCIA-NAVARRO, 2005; LULICH & OSBORNE, 2008) e, esse achado pode ser inespecífico e isoladamente não possui valor diagnóstico (LULICH, et al., 2004). Por vezes há a supersaturação sem a formação de cálculos, ou mesmo a presença de cálculos, com ausência de supersaturação (LINGEMAN et al., 1999; LAUBE et al., 2003). Pacientes com urolitíase recorrente costumam excretar quantidades aumentadas de substâncias litogênicas, no entanto; em certas ocasiões os valores de excreção desses compostos não são tão elevados como seria esperado (LAUBE et al., 2003).

No caso de cálculos de oxalato de cálcio, LAUBE et al. (2003) demonstraram que, quanto mais rápida a taxa de crescimento dos urólitos em pacientes humanos, maior a chance de subestimação da concentração de cálcio na urina. Os autores sugerem que a avaliação da situação metabólica urinária dos pacientes deve ser realizada após a remoção total dos cálculos, para verificar a presença das substâncias litogênicas na urina.

Cristais na urina podem possuir composição similar à dos urólitos, porém a identificação dessas substâncias não é um substituto à análise mineral específica (LULICH & OSBORNE, 2008). Deve haver cuidado na avaliação da presença de cristalúria e a composição dos urólitos de um paciente nunca deve ser determinada de maneira definitiva por meio da identificação dos cristais urinários (HERRMANN & SCHILLE, 1992; OSBORNE et al., 1995). Por vezes, a presença do sedimento urinário pode corresponder apenas à camada mais externa do cálculo e não refletir a composição do cálculo como um todo (HERMANN & SCHWILLE, 1992). A ausência de cristalúria em pacientes com urolitíase confirmada pode representar um fator positivo, que demonstra um ambiente não propenso ao crescimento do urólito; porém só é avaliada a urina no momento da colheita, e a ausência de supersaturação pode ser apenas transitória (KOEHLER et al., 2008). A análise periódica da urina é importante na avaliação de pacientes com urolitíase recorrente e durante tratamento nutricional para

dissolução de cálculos para analisar se está ocorrendo ou não produção de urina supersaturada e propensa ao crescimento de urólitos (KOEHLER et al., 2008).

O exame não evidencia a composição urinária anterior à avaliação e, portanto, é inadequada para a determinação da estrutura química dos urólitos presentes. Seria necessária avaliação de urinálise em períodos muito longos (meses a anos) para que seu uso fosse adequado a esse tipo de diagnóstico e, sendo assim, mesmo a avaliação da urina de 24 horas é inadequada (ANDERSON et al., 2007).

Alterações *in vitro* podem levar à formação do mesmo tipo de cristais que ocorrem *in vivo* e por esse motivo, a interpretação da cristalúria deve ser ainda mais cuidadosa. Os fatores que podem influenciar a formação *in vitro* de cristais na amostra coletada incluem temperatura, tempo, evaporação, pH urinário e crescimento de bactérias contaminantes (ALBASAN et al., 2003; LULICH & OSBORNE, 2008). A refrigeração da urina é um importante método de preservação da amostra; entretanto para avaliação de cristalúria deve ser evitada, pois facilita a cristalização *in vitro* por provocar atração eletrostática dependente de temperatura entre moléculas de água e íons calcilogênicos. A análise deve, portanto, ser realizada o mais rápido possível e em amostra não resfriada. O objetivo é realizar análise de uma urina com características semelhantes às apresentadas *in vivo* (KOEHLER et al., 2008; LULICH & OSBORNE, 2008).

A presença de certos tipos de cristais na urina pode indicar a presença de determinadas enfermidades primárias, por ser consequência de processos patológicos que alteram a composição urinária, como por exemplo, a xantínúria hereditária, que leva ao acúmulo de cristais de xantina na urina, ou redução de atividade hepática, que pode cursar com cristalúria por urato (LULICH & OSBORNE, 2008). A análise do pH urinário também é importante, pois certos tipos de cálculos urinários se desenvolvem em pH específicos. Essa medida deve, então, ser realizada para monitoração de pacientes com urolitíase confirmada (KOEHLER et al., 2008).

Estudo de HERRMANN & SCHWILLE (1992) visou estabelecer se há relação entre a composição de cálculos e a cristalúria, em casos de urolitíase recorrente idiopática em seres humanos. O estudo retrospectivo foi feito com resultados de 116 urinálises de pacientes humanos do sexo masculino que

apresentaram nefrolitíase por oxalato de cálcio. Nas urinálises realizadas após período de jejum de duas horas e após período pós-prandial de três horas, não houve presença de cristalúria de oxalato de cálcio. Foi concluído, então, que provavelmente a patogenia da enfermidade no trato urinário superior não depende da cristalúria pré-existente.

OCHMANSKI et al. (1999) realizaram estudo, no qual foram comparadas análises da composição mineral de urólitos e de cristais presentes na urina de 386 pacientes humanos com urolitíase. Houve coincidência entre as análises minerais dos dois parâmetros em 78% dos casos de urolitíase por oxalato de cálcio, em 72% daqueles por fosfato de cálcio e em 64% dos casos de urolitíase por ácido úrico e uratos. Nesse estudo, observou-se alto nível de concordância entre a composição do sedimento urinário e dos cálculos removidos, porém comprovou-se que existe a possibilidade de ocorrência de urolitíase sem a presença dos cristais correspondentes na análise do sedimento urinário.

Em trabalho realizado por LINGEMAN et al. (1999), investigou-se a ocorrência de divergência entre a ocorrência de supersaturação da urina com a formação de cálculos urinários. Foram analisadas 538 urinálises de pacientes humanos formadores de cálculos urinários. Em 19,15% dos casos, houve a presença de supersaturação urinária por substâncias calculogênicas diferentes do cálculo formado e em 31,60% dos casos houve a formação de cálculo sólido sem a presença da supersaturação. No total, em 50,75% dos casos analisados, não ocorreu relação entre o tipo de supersaturação e o tipo de cálculos presentes.

GRASES et al. (2002) realizaram estudo, no qual foram comparadas amostras de urina de 24 horas coletadas de 1.799 pacientes humanos formadores de cálculos de diversas constituições com amostras de pacientes saudáveis utilizados como grupo controle. Alterações na constituição das urinas desses grupos podem ser observadas no Quadro 1.

No mesmo estudo, para os pacientes que desenvolveram urólitos de estruvita, a principal alteração urinária observada foi presença de infecção urinária em todos os casos (GRASES et al., 2002).

QUADRO 1 – Alterações de constituição urinária e sua relação com tipo de urólito

Tipo de urólito	Alterações de constituição urinária
Oxalato de cálcio monohidratado papilar	Hipocitratúria (citrato é inibidor de cristalização) em 36% dos pacientes
Oxalato de cálcio monohidratado não aderido	Hipocitratúria em 47% dos pacientes
Oxalato de cálcio dihidratado	Hiper calciúria em 60% dos pacientes Hipocitratúria em 50% dos pacientes
Cálculo misto de oxalato de cálcio dihidratado e hidroxapatita	Hiper calciúria em 69% dos pacientes Hipocitratúria em 54% dos pacientes
Hidroxapatita	Hipocitratúria em 70% dos pacientes
Ácido úrico	Hiperuricosúria em 41% dos pacientes
Cálculo misto de ácido úrico e oxalato de cálcio	Hiperuricosúria em 54% dos pacientes
Cistina	Hiper cistinúria (grupo não atingiu número suficiente para análises estatísticas)
Grupo controle	Hipocitratúria em 21% dos pacientes Hiperuricosúria em 16% dos pacientes Hiper calciúria em 19% dos pacientes

Fonte: Adaptado de GRASES et al. (2002).

B) Avaliação das características morfológicas dos urólitos

A forma, o tamanho e a textura de superfície de um cálculo urinário dependem, em certo grau, de sua composição química (OCHMANSKI et al., 1999). No entanto, isso nem sempre ocorre (PUCETAITE et al., 2012). A composição interna não pode ser prevista apenas pelas características visuais externas; então a composição do núcleo não é considerada, assim como a possível presença de cristais de superfície microscópicos (KOEHLER et al., 2008). Diversas condições em associação a particularidades de formação, crescimento e dissolução podem alterar a aparência morfológica, que não pode ser utilizada para a identificação definitiva da composição dos urólitos, mesmo

que sua morfologia seja muito característica (OSBORNE et al., 1995).

As características morfológicas típicas dos principais tipos de urólitos de cães e gatos podem ser visualizadas no Quadro 2.

QUADRO 2 – Características morfológicas típicas de urólitos de cães e gatos de acordo com sua composição

Composição	Forma
Cistina	Superfície lisa, pequeno, oval a redondo
Oxalato de cálcio monohidratado	Superfície rugosa, redondo a oval, e ocasionalmente com prolongamentos
Oxalato de cálcio dihidratado	Superfície lisa, redondo, ocasionalmente formato com prolongamentos
Estruvita	Superfície lisa, redondo ou facetado, às vezes laminado
Fosfato de cálcio	Superfície lisa, redondo ou facetado
Urato de amônio	Superfície lisa ou irregular, redondo
Ácido úrico	Superfície lisa ou irregular, redondo
Sílica	Tipicamente com prolongamentos
Mistos e compostos	Variam conforme a composição. Podem ter núcleo e parede identificáveis

Fonte: Adaptado de OSBORNE et al., 1995

Na Figura 1, podem ser observadas as características físicas de alguns tipos de urólitos de cães e gatos. Os urólitos de humanos, em sua maioria são formados no rim. Por esse motivo, muitas vezes apresentam a forma de “coral”, pois se formam e crescem na pelve renal (PUCETAITE et al., 2012).

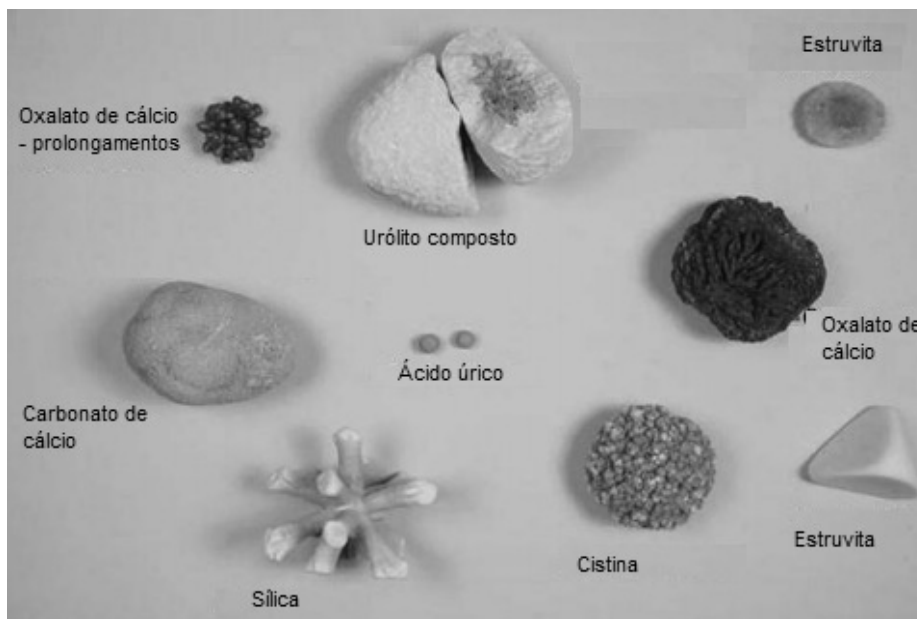


FIGURA 1 – Formas características de vários urólitos de cães e gatos.

Fonte: KOEHLER et al. (2008).

C) Estimativa por probabilidade

A composição dos urólitos de cães e gatos pode ser estimada por meio de probabilidade. São levados em consideração diversos fatores, como achados clínicos, radiografia, urinálise, cultura de urina e fatores individuais. O Quadro 3 mostra alguns fatores considerados, que sugerem determinado tipo mineral de urólito (KOEHLER et al., 2008).

A estimativa da composição dos urólitos de cães e gatos, baseada em probabilidade, foi estabelecida por OSBORNE et al. (1995) para que fossem instaurados protocolos de dissolução de urólitos pelos clínicos veterinários, em casos em que houvesse grandes chances de que os cálculos presentes fossem passíveis dessa forma de tratamento, evitando o tratamento cirúrgico desnecessário. Segundo os autores, a formulação de terapia médica, seguida a esse tipo de determinação, está associada a um alto índice de sucesso. No entanto, em casos de urólitos com composição heterogênea, a previsão é muito prejudicada.

Os fatores considerados para a estimativa da composição dos cálculos urinários de cães e gatos, por meio de probabilidade são: pH urinário; identificação de cristais em sedimento de urina não contaminada, fresca e não

refrigerada; tipo de bactéria isolada, se for o caso, sendo que bactérias urease-produtoras estão frequentemente associadas a cálculos de estruvita; radiopacidade; avaliação química sérica; avaliação química da urina; raça do felino ou canino; histórico familiar e análise quantitativa de urólitos que porventura tenham sido expelidos (OSBORNE et al., 1995).

QUADRO 3 - Fatores que sugerem a provável composição mineral de urólitos caninos.

Tipo mineral	pH urinário	radiodensidade	Predisposição sexual	Idade mais comum (anos)
Estruvita	Neutro a alcalino	+ a ++++	Fêmeas (>85%)	2-9
Oxalato de cálcio	Ácido a neutro	++ a ++++	Machos (>70%)	5-11
Purinas e urato	Ácido a neutro	0 a ++	Machos (>85%)	1-4
Fosfato de cálcio	Alcalino a neutro (brushita se forma em urina ácida)	++ a ++++	Machos (>53%)	<1; 6-10
Cistina	Ácido a neutro	+ a ++	Machos (>94%)	1-7
Sílica	Ácido a neutro	++ a +++	Machos (>92%)	3-10

Fonte: Adaptado de KOEHLER et al. (2008).

2.3.2 Métodos por imagem para análise de composição dos urólitos

A) Ultrassonografia

A ultrassonografia, geralmente é utilizada apenas como ferramenta diagnóstica da presença e localização dos urólitos no trato urinário. Contudo, o uso dessa técnica, para determinação da composição de cálculos vesicais caninos, foi estudado por WEICHSELBAUM et al. (1999) pela análise da sombra acústica. Não foi encontrada relação entre esse artefato e a composição de urocistólitos em nenhuma das frequências analisadas, de 3,5MHz, 5,0MHz e 7,5MHz. Os autores concluíram que é improvável que seja possível a caracterização de composição de urólitos com o uso de técnicas ultrassonográficas, embora a ultrassonografia seja útil à detecção dos mesmos.

B) Avaliação radiográfica

A avaliação com uso de radiografias, nos casos de urolitíase, tem como objetivo principal a identificação da presença, localização e número de urólitos, além da determinação de sua forma e densidade. Também é útil para a identificação de fatores morfológicos predisponentes às urolitíases. As características radiográficas dos urólitos são influenciadas por seu tamanho, número, localização e composição. A identificação da composição por essa técnica *in vivo* seria de grande valia para o tratamento clínico (OSBORNE et al., 1995).

Existem diversas características dos cálculos reconhecíveis à radiografia, passíveis de serem observadas em urólitos com tamanhos a partir de 1 cm e que podem auxiliar na diferenciação da composição dos cálculos urinários (DRETTLER & POLYKOFF, 1996). A análise da composição química de cálculos por esse método dá-se apenas por meio de avaliações indiretas, portanto avaliações radiológicas não possuem uma eficácia muito elevada na identificação da composição dos urólitos (KALINSKI et al., 2012). Os urólitos menores que 3 mm de diâmetro ou com radiopacidade similar aos tecidos adjacentes, como os compostos de urato de amônia, cistina e xantina, raramente são vistos por meio de radiografias simples (LULICH & OSBORNE, 2008).

No Quadro 4, podemos observar as características radiológicas

normalmente observadas, associadas a composição de urólitos em cães.

QUADRO 4 – Características radiográficas de urólitos caninos de acordo com sua composição

Mineral	Radiopacidade comparada a tecido mole	Contorno de superfície	Forma	Tamanho
CaOx monohidratado	+++ a ++++	Lisa	Geralmente redonda	2mm-7mm
CaOx dihidratado	+++ a ++++	Rugosa	Roseta	1mm-15mm
Estruvita estéril	++ a +++	Irregular, poucas são lisas	Redonda a ovoide	5mm-15mm
Estruvita com infecção	+ a +++	Lisa a levemente rugosa	Redonda a facetada ou piramidal	4mm->20mm
Urato	- a ++	Lisa	Redonda a oval	1mm-15mm
Fosfato de cálcio	+++ a ++++	Lisa	Redonda a cuboide	2mm-6mm
Cistina	- a +++	Lisa a bosselada (presença de saliências)	Redonda	2mm-10mm
Sílica	++ a ++++	lisa	Irradiação de prolongamentos	2mm-10mm
Xantina	- a +	lisa	Redonda a ovóide	1mm-4mm

Fonte: Adaptado de LULICH & OSBORNE, 2008.

DRETLEER & POLYKOFF (1996) realizaram estudo comparativo entre radiografias de urólitos de pacientes humanos formados por oxalato de cálcio monohidratado e polihidratado e concluíram que embora hajam certos padrões

radiográficos reconhecíveis, a correlação desses padrões com a composição desses dois tipos de cálculo não é precisa. Há problemas especialmente, quando o urólito analisado possui ambos os tipos de oxalato de cálcio.

WEICHSELBAUM et al. (2000) avaliaram a possibilidade do uso de radiografias de alta intensidade para a identificação da composição de urólitos, levando em consideração a forma, a superfície e a arquitetura interna (radiopacidade e uniformidade). Foram realizadas radiografias simples e cistografia de contraste duplo, na qual são injetados contraste positivo e negativo, em cálculos removidos de pacientes caninos. As amostras foram posicionadas no interior de luva de látex suspensa em um tanque de vidro com volume de 37,85L totalmente preenchido. Avaliaram-se radiograficamente 2.041 amostras, que tiveram sua composição previamente determinada por meio de espectroscopia infravermelha ou difração de raios-X. A cistografia de contraste duplo caracterizou de maneira mais eficiente a forma e as radiografias simples, a arquitetura interna das amostras. Observou-se, no entanto, que a avaliação da forma dos urólitos por meio de radiografias, ainda assim, é muito inexata e se mostrou de pouca utilidade para a predição da composição de cálculos urinários. O mesmo ocorreu com a avaliação da arquitetura interna dos urólitos.

WEICHSELBAUM et al. (2001) desenvolveram um algoritmo que integrou o uso de características individuais (sexo, idade, raça ou padrão racial) e características radiográficas na predição da composição dos urocistólitos caninos, para facilitar o diagnóstico conclusivo sem que haja cirurgia. A acurácia do algoritmo criado encontra-se na Tabela 1. Os autores notaram que a combinação de características individuais, com o padrão radiográfico dos cálculos, não aumentou a acurácia da predição em relação ao uso de apenas as características individuais. Os autores concluíram que o algoritmo não se mostrou eficiente, mas o uso dessa associação foi melhor do que a identificação apenas por padrão radiográfico.

C) Tomografia computadorizada

A atual rotina clínica de tomografia computadorizada (TC) para urolitíase não se baseia na diferenciação entre os tipos de cálculos (PRIMAK et al., 2007). Essa técnica é muito eficiente para avaliação de pacientes com suspeita de urolitíase e chega a ter de 96% a 100% de sensibilidade e 100% de especificidade para a análise da presença de cálculo e para a determinação da localização do mesmo (BELIN et al., 2004; KIM, et al., 2007).

O exame de TC pode adicionar informações valiosas à caracterização dos urólitos (ELIAHOU, 2010). A análise dos urólitos quanto a sua densidade à tomografia computadorizada pode ajudar na predição de sua composição (BELIN et al., 2004). A habilidade de prever a composição do cálculo ainda *in vivo* permitiria ao urologista utilizar o tratamento mais adequado, de acordo com o grau de dureza e capacidade de o cálculo ser ou não dissolvido (NAKADA et al., 2000; BELIN et al., 2004; PIMAK et al., 2007; ELIAHOU et al., 2010). A análise dos urólitos quanto à sua densidade à tomografia computadorizada pode ajudar na predição de sua composição (BELIN et al., 2004).

Análises como difração de raios-X, espectroscopia de energia dispersiva, espectroscopia infravermelha e microscopia de luz polarizada possuem o inconveniente de serem realizadas apenas após a extração dos cálculos. Sendo assim, não há benefícios ao tratamento pré-operatório (ELIAHOU et al., 2010). O tratamento médico para as urolitíases é preferível, quando for possível, e por essa razão, os pacientes que não requerem tratamento imediato, podem ser beneficiados pela determinação mineral por tomografia computadorizada (PRESSLER et al., 2004). Em relação aos métodos analíticos mais utilizados, a TC tem como vantagens a rápida velocidade de realização e a análise não invasiva; além da possível influência que o resultado terá no protocolo de tratamento a ser instituído (NAKADA et al., 2000; PRESSLER et al., 2004).

Resultados contraditórios quanto à eficácia do uso da tomografia computadorizada na análise da composição química dos urólitos tem sido encontrados. A análise visual da densidade é subjetiva e pode haver variabilidade entre diferentes analistas, bem como entre diferentes tomógrafos (BELIN et al., 2004). Erros também podem ocorrer devido a diferenças de tamanhos de pacientes, o que influencia a sobreposição de diferentes composições no cálculo

(ELIAHOU et al., 2010). O uso de tomografia computadorizada para a previsão da composição de cálculos ainda não é suficientemente confiável para ser utilizado na rotina clínica (PRIMAK et al., 2007) e a caracterização de cálculos por meio de tomografia necessita de otimização, para que o número de grupos de cálculos passíveis de ser identificados por esse método seja aumentado (ELIAHOU et al., 2010).

Os urólitos, do menos denso ao mais denso à análise tomográfica são: ácido úrico, estruvita, cistina, oxalato de cálcio dihidratado, oxalato de cálcio monohidratado e brushita (MOSTAFAVI et al., 1998). É importante salientar que urólitos de ácido úrico podem ser diferenciados daqueles de composição diferente por meio da TC (MOSTAFAVI et al., 1998; NAKADA et al., 2000).

PRESSLER et al. (2004) realizaram estudo no qual foi feita análise *in vitro* por TC de urólitos caninos por dois radiologistas diferentes e chegou-se a acurácia na avaliação da composição de amostras puras, de 75% a 88%. No entanto, para os urólitos compostos ou mistos, a acurácia não foi determinada. As amostras haviam sido previamente analisadas por métodos quantitativos.

Estudo *in vitro* realizado por DEVECI et al. (2004) com cálculos humanos, concluiu que o método simples de TC a 120 kV provou ser capaz de diferenciar cálculos dos seguintes tipos minerais: ácido úrico, estruvita, cistina, fosfato de cálcio e oxalato de cálcio monohidratado. Também foi capaz de diferenciar diferentes composições em uma mesma amostra. No entanto, o uso da TC de dupla energia a 80 kV e 120 kV não foi confiável para a análise da composição de urólitos humanos quando o método de TC simples falhou. O uso da técnica de dupla energia também tem o inconveniente de submeter o paciente a alto nível de radiação ionizante.

Estudo realizado por BELIN et al. (2004), visou a análise do uso de TC para identificar a composição de urólitos humanos previamente identificados por meio de técnica de difração de raios-X, para a comparação de resultados. As amostras foram posicionadas no interior de rins suínos para que a análise se aproximasse de situação clínica real. As tomografias foram analisadas por dois radiologistas que não sabiam a composição das amostras. Foi escolhida uma região de interesse, de acordo com o diâmetro da amostra, e essa região foi analisada. A probabilidade de erro no uso de técnica de tomografia

computadorizada para análise de composição de cálculos urinários pode ser vista na Tabela 2.

A composição dos urólitos teve acurácia entre 64% a 81% por esse método de análise (BELIN et al., 2004). Ácido úrico, cistina, oxalato de cálcio monohidratado e brushita podem ser identificados com probabilidade de acerto acima de 85%, o que é positivo, já que esses cálculos muitas vezes são refratários a tratamentos extracorpóreos e a brushita e a cistina podem ser tratados clinicamente. Sendo assim, os autores acreditam que a aplicação desse método em pacientes é promissora e a tomografia pode ser usada para prever a composição de urólitos.

Tabela 2 - Probabilidade de ocorrência de erro de avaliação da composição dos diferentes tipos de cálculos pelo uso da tomografia computadorizada

Composição mineral	Todos cálculos	Cálculos puros	Cálculos mistos
Ácido Úrico	15%	0%	40%
Cistina	11%	11%	-
Estruvita	93%	86%	100%
Oxalato de cálcio dihidratado	89%	100%	75%
Hidroxiapatita	90%	33%	100%
Oxalato de cálcio monohidratado e Brushita	9%	12%	6%
Total	36%	31%	46%

Fonte: BELIN et al. (2004).

KIM et al. (2007) correlacionaram a fragilidade e dureza dos cálculos de cistina à litotripsia por ondas de choque e as estruturas visíveis à tomografia (KIM, et al., 2007). Os resultados sugerem que os cálculos frágeis de cistina possuem características identificáveis à tomografia, como a presença de espaços vazios. Os cálculos de cistina com constituição homogênea eram mais resistentes à litotripsia. (KIM, et al., 2007).

Segundo MOSTAFAVI et al. (1998), o uso de tomografia para análises de composição de urólitos pode ser positivo. No entanto, segundo KALINSKI et al. (2012), a tomografia computadorizada não permite, de maneira muito eficiente, a identificação da composição de concreções urinárias.

2.3.3 Análises qualitativas químicas

As análises qualitativas se baseiam em testes químicos projetados para identificar radicais e íons de uma substância ou mistura. Nesses testes, o urólito é pulverizado, uma alíquota é separada e são adicionados reagentes a essa alíquota. O surgimento de cores diferentes indica a presença de determinados ânions ou cátions. É impossível a identificação de camadas de constituições distintas, diferentemente de várias análises quantitativas. As análises da composição de urólitos por meios químicos foram consideradas inadequadas, porque a estrutura interna das amostras, tão importante para a determinação dos mecanismos que levaram à formação do cálculo, não é eficientemente detectada pelo uso desses métodos, e análises físicas são necessárias a essa identificação (GRASES et al., 2002). As análises quantitativas químicas são insensíveis e pouco específicas (OSBORNE, 1995) e também possuem os inconvenientes de não determinar as porcentagens dos minerais presentes e de serem incapazes de detectar a presença de alguns componentes, como xantina, sílica, drogas e seus metabólitos. São portanto, métodos pouco confiáveis (KOEHLER et al., 2008).

2.3.4 Análises quantitativas físicas

OSBORNE et al. (1995) não recomendam que sejam feitas apenas análises químicas quantitativas, pois esses métodos detectam apenas alguns radicais e não quantificam os componentes. Diferentemente dos métodos químicos, os físicos são mais eficientes na determinação de substâncias cristalinas e permitem a subdivisão de determinados tipos minerais, como o oxalato de cálcio monohidratado e oxalato de cálcio dihidratado, ou ácido úrico, urato de amônio e xantina. Esses métodos, além de analisar quantitativamente, também permitem análises semiquantitativas e qualitativas de diversos constituintes.

A) Microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada (MLP) é uma técnica baseada na interação de luz polarizada com os componentes presentes no cálculo e os parâmetros utilizados para identificação dos tipos minerais são a cor e a refração da luz (SCHUBERT, 2006). Essa técnica, também chamada de cristalografia óptica, consiste no uso de um microscópio de polarização para a identificação de componentes cristalinos dos urólitos. Áreas representativas dos cálculos são identificadas com auxílio de microscópio de dissecação, seguida da emissão de luz polarizada e as propriedades ópticas, como índice de refração são medidas (BHATT & PAUL, 2008). A comparação dos valores de refração obtidos com índices de refração padronizados é utilizada para a identificação das substâncias presentes (KOEHLER et al., 2008).

A MLP tem como vantagens seu custo benefício favorável, rápida velocidade de análise, possibilidade de análise de amostras pequenas e de detecção de componentes presentes em pequenas quantidades na amostra. Esse é o método de escolha na análise para urólitos simples, como aqueles de oxalato de cálcio monohidratado ou dihidratado (SCHUBERT, 2006).

Suas principais desvantagens incluem a dificuldade de diferenciação dos grupos de ácido úrico, derivados de purinas e fosfatos de cálcio e problemas em realizar análises quantitativas em casos de urólitos mistos (SCHUBERT, 2006).

B) Espectroscopia infravermelha

A técnica de espectroscopia infravermelha (EI) se baseia em padrões de onda gerados quando as ondas de luz infravermelha entram em contato com a amostra. A luz infravermelha simula vibrações atômicas que, conseqüentemente, ocasionam absorção de energia. Algumas ondas são absorvidas (absorbância) e algumas ondas passam através da amostra (transmitância). É produzido, então, um espectro de radiação infravermelha (Figura 2) com faixas de absorção, que é comparado com espectros padrões. A partir disso se pode identificar a composição da amostra, já que não há duas estruturas moleculares com espectro infravermelho semelhante (SCHUBERT, 2006; BHATT & PAUL, 2008; KOEHLER

et al., 2008; SELVARAJU et al., 2012).

A EI é uma poderosa ferramenta analítica, que pode ser usada para análise da presença e quantificação dos componentes cristalinos ou não cristalinos dos cálculos urinários. Esse método analítico, que detecta inclusive compostos orgânicos, se utiliza da interação entre a amostra e as ondas infravermelhas emitidas pelo aparelho (BHAT & PAUL, 2008). A EI pode identificar a presença de componentes não identificados pela microscopia de luz polarizada (KOEHLER et al., 2008). Dentre as técnicas físicas de análise esse é o método mais utilizado. O volume amostral necessário para as análises é reduzido e os resultados produzidos possuem grande reprodutibilidade (SELVARAJU et al., 2012). É uma técnica especialmente útil na identificação de substâncias desconhecidas, determinação da consistência da amostra e quantificação das diferentes substâncias calculogênicas.

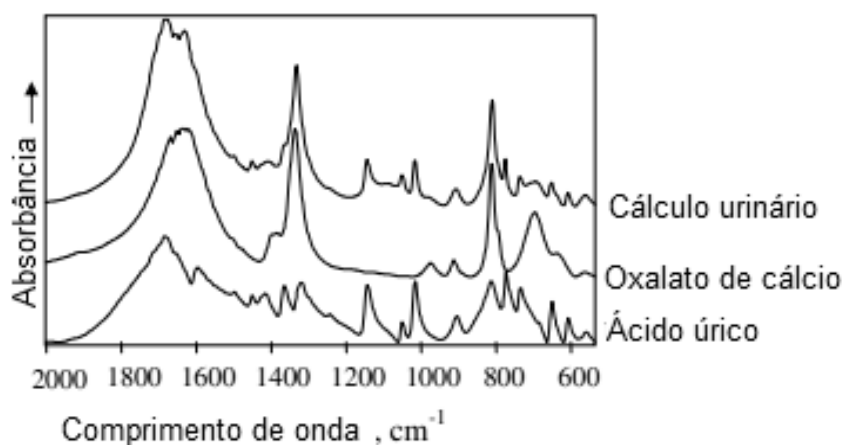


FIGURA 2 – Espectro de absorvância de amostras puras de ácido úrico (inferior) e oxalato de cálcio (centro) e cálculo urinário composto por ácido úrico e oxalato de cálcio (superior)

Fonte: PUCETAITE et al. (2012).

A espectroscopia infravermelha transformada de Fourier (FT-IR) é um método muito utilizado para a detecção de compostos orgânicos e inorgânicos (SELVARAJU et al., 2012) e é, para a análise de urólitos, a técnica de espectroscopia infravermelha mais utilizada. A FT-IR é um método confiável e

sensível para obtenção qualitativa e quantitativa da composição dos cálculos urinários (PUCETAITE et al., 2012). Geralmente, para essa técnica, é realizada a pulverização do urólito a ser analisado até formar um pó muito fino que será peletizado em pastilhas para ser analisados. Esse preparo das amostras leva tempo e é difícil; porém, pelo fato da absorvência de radiação infravermelha estar relacionada às ligações químicas presentes no composto, não são necessários níveis elevados de substâncias cristalinas para que a análise seja eficiente, como no caso da análise por difração de raios-X (SELVARAJU et al., 2012).

A análise quantitativa por esse método é realizada pelo cálculo de absorvência de todas as faixas de espectro presentes. A absorvência é obtida com a medida do percentual dos valores de transmitância, e o percentual de cada componente é calculado ao se dividir a soma dos valores de absorvência correspondente a cada constituinte pela absorvência total (PUCETAITE et al., 2012; SELVARAJU et al., 2012).

As vantagens desse método de análise são: custos moderados, exames realizados rapidamente, possibilidade de análise de amostras pequenas, análises semiautomáticas possíveis, se usados programas específicos, e possibilidade de detecção de substâncias não cristalinas (SCHUBERT, 2006).

Suas desvantagens englobam: preparo demorado das amostras pelo método tradicional de peletização; destruição do cálculo e em alguns casos a diferenciação e análise qualitativa de subgrupos são dificultadas, como por exemplo, para ácido úrico, purinas e fosfatos de cálcio (SCHUBERT, 2006; PUCETAITE et al., 2012). Para a análise de um cálculo urinário, cada camada deve ser individualmente separada e amostras de cada uma, produzidas, o que pode introduzir erros na análise (ANDERSON et al., 2007; PUCETAITE et al., 2012). Os fosfatos, sulfatos e a sílica possuem dificuldade de detecção pela EI, se houver presença de carbonato de cálcio. Esse fenômeno decorre da grande absorção das ondas infravermelhas pelo carbonato que pode se sobrepor e impedir a análise dos constituintes menores. Para análise eficiente de cálculos com essas composições pode ser usada a associação de espectroscopia infravermelha com espectroscopia de energia dispersiva (DIAZ-ESPIÑERA et al., 1997).

Uma modificação da técnica FT-IR é o método de reflexão total

atenuada (ATR), que permite um preparo mais simplificado da amostra e a avaliação de amostras moles (SCHUBERT, 2006).

ANDERSON et al. (2007), para evitar problemas decorrentes do complexo preparo tradicional das amostras, testaram o método de ATR, que analisa o urólito seccionado ao meio e não exige a peletização. Foram analisados por essa técnica urólitos humanos e, ao final, os resultados foram comparados aos obtidos pela técnica tradicional de FT-IR. Primeiramente as camadas de deposição de cristais foram observadas microscopicamente, o que possibilitou a obtenção de informações precisas de posição de diferentes camadas; a amostra foi então analisada por microscópio de espectroscopia de infravermelho, gerando um espectro qualitativamente preciso e semelhante ao espectro de uma análise FT-IR. O resultado qualitativo dessa nova técnica de espectroscopia também foi similar à análise por FT-IR. A técnica de ATR é menos susceptível a erros que os métodos já utilizados para avaliação da composição de urólitos. No entanto, é uma técnica que não permite a avaliação quantitativa das amostras (ANDERSON et al., 2007).

BENRAMDANE et al. (2008) também compararam o método tradicional de FT-IR por peletização e a ATR, que não necessita de tratamento complexo da amostra. A técnica por peletização foi mais apropriada para determinar a composição amostral, no entanto, demandou mais tempo para a identificação de todas as substâncias presentes. O método por ATR permite a rápida identificação de componentes. No entanto, a quantificação apenas é possível no método tradicional.

SEKKOUM et al. (2011), realizaram estudo utilizando 62 urólitos humanos. A composição desses cálculos foi analisada pela utilização de FT-IR. Regiões do cálculo como núcleo, camada externa e parede interna foram pulverizadas individualmente e pastilhas foram produzidas a partir do pó resultante. Os autores foram capazes de identificar a composição de todas essas regiões dos urólitos. As substâncias mais encontradas foram as duas formas de oxalato de cálcio, atingindo frequência de 58%. Também foram identificados em frequência relativamente alta, fosfato de cálcio e purinas.

C) Difração de raios-X

Essa técnica, como o nome indica, se baseia na difração de raios-X nos cristais da amostra, o que possibilita a classificação dos diferentes tipos de compostos pela medição do grau da difração. É utilizado um emissor e um detector do raios-X. Programas específicos permitem a análise quantitativa exata dos cristais presentes (SCHUBERT, 2006).

A Figura 3 tem representados padrões de raios-X de diferentes urólitos.

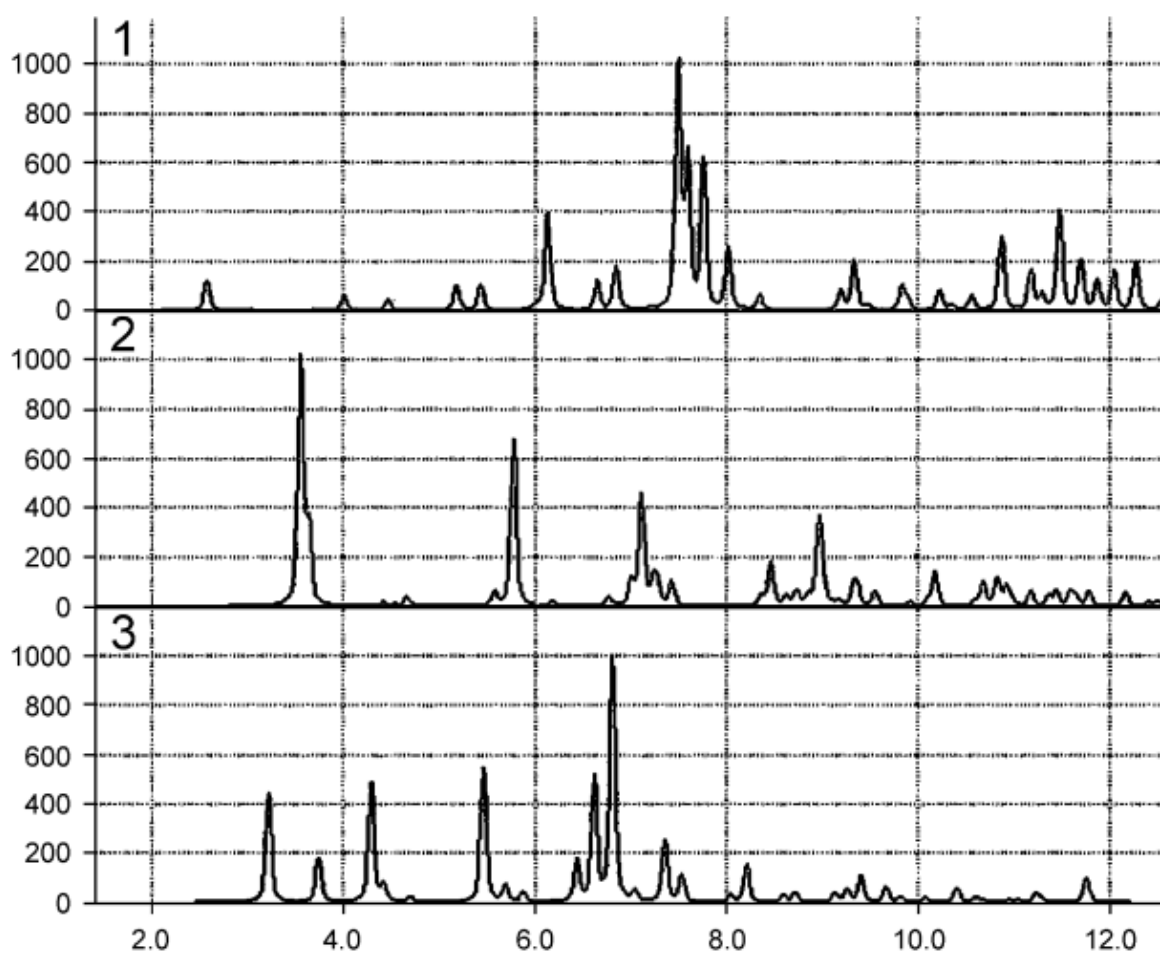


FIGURA 3 - Padrões de difração de raios-X de cálculos de hidroxiapatita (1), oxalato de cálcio monohidratado (2) e ácido úrico (3)

Fonte: ANCHAROV et al. (2007).

A difração de raios-X é considerada por alguns autores a técnica padrão-ouro na análise de cálculos urinários (DAVIDSON et al., 2005; SCHUBERT, 2006).

Embora a difração de raios-X permita a caracterização de materiais cristalinos, a obtenção da correta composição depende da escolha dos métodos

de preparação da amostra (DAVIDSON et al., 2005). A técnica, quando utilizada em conjunto com outros métodos analíticos, como a espectroscopia infravermelha, leva a resultados altamente precisos da composição do analito (WANDT & RODGERS, 1988).

As vantagens dessa metodologia incluem a avaliação semiautomática do difratograma de raios-X, desde que instalado programa adequado; análise quantitativa e diferenciação exata de todos os componentes cristalinos (SCHUBERT, 2006).

Custo elevado, impossibilidade de detecção de substâncias não-cristalinas (WANDT & RODGERS, 1988; SCHUBERT, 2006) e tempo de medição de até 30 minutos (SCHUBERT, 2006) estão entre as principais desvantagens. A técnica não é útil na avaliação de amostras intactas, pois a baixa emissão de raios-X (8 keV) utilizada leva à penetração insuficiente e há, portanto, a necessidade de pulverização da amostra, sendo que a perda das características estruturais originais do cálculo limita o acesso a informações a respeito da litogênese, tratamento e acompanhamento (DAVIDSON et al., 2005). No entanto, maior emissão de radiação pode ser usada para avaliação *in vitro* de modo a evitar a necessidade de preparo complexo da amostra (ANCHAROV et al., 2007). A detecção de apatita em baixas quantidades também é dificultada nesse método e o uso de outra técnica é necessária para a correta avaliação desse mineral. A presença de três ou mais componentes no cálculo também reduzem a eficácia do método (WANDT & RODGERS, 1988).

ANCHAROV et al. (2007), desenvolveram um modelo experimental para avaliação do uso *in vivo* da difração de raio-X, para que a determinação do tipo de tratamento pudesse ser tomada com base em informações de composição. Devido ao pequeno número dos tipos mais frequentes de urólitos, à grande diferença de padrões de difração dos raios-X entre os tipos de urólitos e à relativa baixa dose de radiação necessária ao exame, os autores sugeriram que seria possível a avaliação *in vivo* dessa técnica que já é amplamente utilizada *in vitro*. Es autores criaram um modelo de simulação do teste *in vivo* utilizando imersão dos urólitos humanos em gordura suína. Foram simulados movimentos respiratórios, e os movimentos não interferiram na qualidade da análise que se mostrou eficiente.

SCHUBERT (2006) realizou estudo comparativo das seguintes técnicas de detecção da composição de cálculos: análises químicas, espectroscopia infravermelha e difração de raios-X. Amostras constituídas de 60% de brushita e 40% de apatita foram analisadas qualitativamente pelos três métodos e apenas a difração de raios-X foi capaz de identificar os dois compostos em 100% dos casos. O método por análises químicas detectou corretamente brushita em apenas 20% dos casos e apatita em 30% e o método de espectroscopia infravermelha detectou corretamente brushita em 93% dos casos e apatita em 60%. O método por análises químicas ainda identificou erroneamente a presença de componentes como estruvita e oxalato de cálcio.

D) Termoanálises

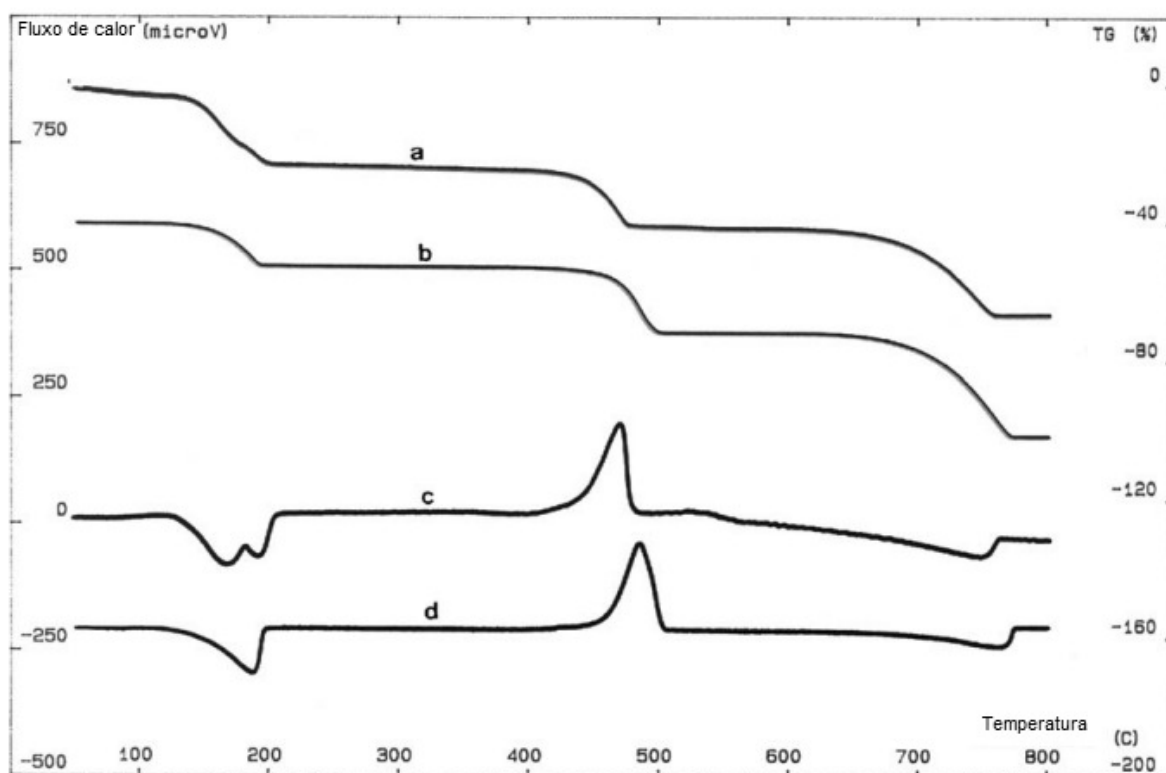
Nas termoanálises, as amostras são aquecidas por fluxo de ar quente, argônio ou nitrogênio, a uma taxa constante, até temperaturas tão altas quanto 850°C, 900°C ou 1000°C e, seu comportamento é analisado, sendo possível identificar quais os compostos químicos presentes. São geradas as curvas de Termogravimetria (TG) e Termoanálise Diferencial (DTA) (MATERAZZI et al., 1995; KALOUSTIAN et al., 2003; LEE et al., 2012).

As termoanálises podem ser usadas como técnicas qualitativas ou quantitativas de análise da composição das concreções urinárias e podem ser inclusive utilizadas para realizar análise quantitativa de urólitos compostos ou mistos (KALOUSTIAN et al., 2003). Técnicas de termoanálise são uma ferramenta de alto potencial para identificação da composição de urólitos e, diferentemente de outros métodos, como a espectroscopia, não sofrem interferência tão grande nos resultados quando a amostra é composta de uma mistura complexa de diversas substâncias (MATERAZZI et al., 1995).

A curva de TG demonstra as alterações de massa de acordo com o aumento da temperatura. Cada redução da massa corresponde a uma reação de decomposição. Com o conhecimento da curva de TG das substâncias puras, pode-se fazer o cálculo quantitativo de cada substância na amostra (MATERAZZI et al., 1995; LEE et al., 2012). A DTA, que demonstra as alterações endotérmica (pico negativo) e exotérmica (pico positivo) que ocorrem na amostra com o aquecimento, permite análise qualitativa com grande acurácia devido às curvas

térmicas características de cada componente que são produzidas durante a análise (LEE et al., 2012). Cada componente possui suas curvas-padrão. As curvas obtidas na análise são comparadas com os padrões estabelecidos, tornando possível a identificação dos compostos presentes nos cálculos. Existem programas que fazem esse cálculo de maneira automática (LEE et al., 2012).

Na Figura 4, estão as curvas de TG e DTA dos urólitos de oxalato de cálcio monohidratado e dihidratado.



a = TG de oxalato de cálcio dihidratado
 b = TG de oxalato de cálcio monohidratado
 c = DTA de oxalato de cálcio dihidratado
 d = DTA de oxalato de cálcio monohidratado

FIGURA 4 - Curvas térmicas de urólitos padronizados de oxalato de cálcio monohidratado e dihidratado.

Fonte: KALOUSTIAN et al. (2003)

São vantagens dessa técnica analítica, a ausência de necessidade de pré-tratamento da amostra e a realização da análise dos cálculos de maneira rápida e geralmente precisa (MATERAZZI et al., 1995). O uso de técnicas de termoanálise possibilita a análise qualitativa e quantitativa dos principais

componentes dos cálculos urinários, como oxalato de cálcio monohidratado ou dihidratado, estruvita e ácido úrico, em composição pura ou mista. (KALOUSTIAN et al., 2003).

Para realização de termoanálises, no entanto, são necessários pelo menos de 5 a 15 mg por amostra (KALOUSTIAN et al., 2002). Em certos casos, há a produção de resultados duvidosos, sobretudo quando há composições muito complexas, nas quais os processos de decomposição térmicos se sobreponham ou quando os cálculos analisados possuem substâncias orgânicas, especialmente sangue e proteínas, e fosfatos ou hidroxapatita, já que, nesse caso, os sinais termogravimétricos dessas substâncias são muito fracos (MATERAZZI et al., 1995; LEE et al., 2012). O fosfato de cálcio não demonstra qualquer pico endotérmico ou exotérmico na curva de DTA e não perde massa à TG e devido a sua grande estabilidade térmica, portanto sua presença não é caracterizada por essas curvas (KALOUSTIAN et al., 2002).

A combinação do uso de termoanálises ao método de espectroscopia de energia dispersiva é benéfica em casos em que há a necessidade de detecção diferenciada qualitativa, quando existe variação espacial da composição química do urólito. Combinando essas duas técnicas o diagnóstico é estabelecido corretamente, o que permite a instauração de tratamento clínico (LEE et al., 2012).

MATERAZZI et al. (1995) utilizaram a técnica de termoanálises em associação a FT-IR, para contornar possíveis contratempos, como a presença de substâncias orgânicas e compostos resistentes a variações térmicas, como os fosfatos ou as apatitas. Os cálculos humanos foram submetidos a análise térmica a até 1000°C e os resíduos, livres de substâncias orgânicas, foram analisados por FT-IR. A associação de ambas as técnicas permite a identificação e quantificação de todos os diferentes tipos minerais que podem fazer parte da composição de um urólito, possuindo grande sensibilidade, reprodutibilidade e acurácia. Alguns laboratórios utilizam esse método na rotina da avaliação da composição de urólitos (LEE et al., 2012).

E) Espectroscopia de energia dispersiva

O uso da espectroscopia de energia dispersiva permite a análise da microestrutura do cálculo, bem como de sua composição química. A técnica detecta a composição elemental de matéria orgânica e inorgânica da amostra (DIAZ-ESPIÑERA et al., 1997; KALINSKI et al., 2012; LEE et al., 2012). Permite inclusive, a quantificação em porcentagem de quanto cada elemento identificado representa na massa da amostra (DIAZ-ESPIÑERA et al., 1997). Os átomos da superfície da amostra interagem com a luz infravermelha e os elétrons da amostra, quando expostos a essa luz, absorvem energia, o que provoca transições de camada eletrônica, emitindo então radiação que é captada por detectores. A radiação emitida é característica dos elementos da amostra. A técnica oferece resultados de forma rápida e simples, entretanto é incapaz de detectar elementos com número atômico menor que 12 (KALINSKI et al., 2012; LEE et al., 2012).

O uso da espectroscopia de energia dispersiva é indicado em casos em que há necessidade de detecção diferenciada em cálculos com variação espacial de composição (LEE et al., 2012). Essa técnica permite o estabelecimento dos elementos na área examinada com base na presença ou ausência de seus picos característicos no gráfico espectral (Figura 5). A comparação da intensidade dos picos permite que seja realizada a análise quantitativa, baseada no nível de presença do elemento, em comparação com padrões já estabelecidos (KALINSKI et al., 2012).

A espectroscopia de energia dispersiva possibilita a avaliação do processo de litogênese por caracterizar bem cada camada do urólito. A repetibilidade da análise não é prejudicada, pois a amostra não é destruída. É apenas seccionada ao meio para que seja realizada a análise nas camadas concêntricas presentes no urólito e revestido por um elemento de alta refração, como por exemplo, o ouro. O equipamento que realiza essa análise é acoplado a um microscópio de varredura, o que torna possível a avaliação microscópica das camadas concêntricas de deposição de substâncias litogênicas do urólito. Também são visualizadas falhas e fissuras na estrutura. À análise propriamente dita, elementos como cálcio, magnésio, fósforo, enxofre, nitrogênio, carbono,

entre outros, são reconhecidos e o material orgânico é identificado pela presença de elementos de carbono e nitrogênio (KALINSKI et al., 2012).

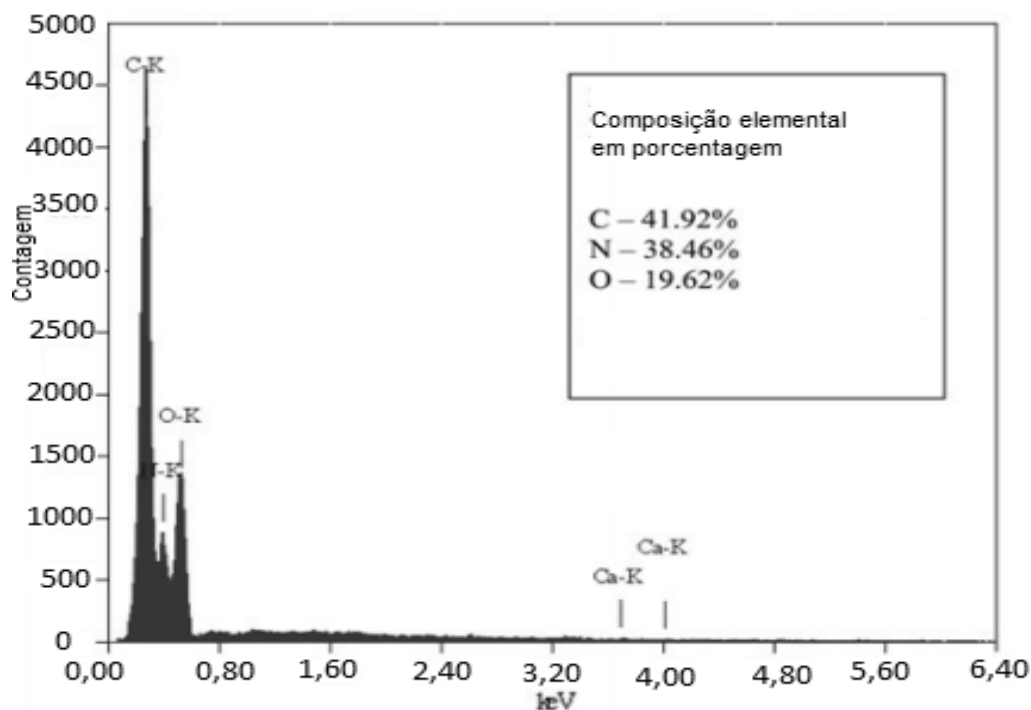


FIGURA 5. Espectroscopia de energia dispersiva em urólito composto de ácido úrico

Fonte: LEE et al. (2012)

LEE et al. (2012) analisaram por meio de espectroscopia de energia dispersiva, cálculos renais provenientes de pacientes humanos formados de ácido úrico, oxalato de cálcio e estruvita. Urólitos constituídos por ácido úrico, à análise de espectroscopia de energia dispersiva, possuem apenas picos que caracterizam carbono, nitrogênio e oxigênio. Os urólitos de estruvita possuem picos de fósforo, cálcio, magnésio e oxigênio. Cálculos de oxalato de cálcio, à espectroscopia, possuem picos de cálcio, carbono e oxigênio. O grau de hidratação do oxalato de cálcio pode ser calculado ao se comparar a intensidade dos picos de oxigênio (LEE et al., 2012).

O uso de termogravimetria associada à espectroscopia de energia dispersiva provou ser uma abordagem alternativa para laboratórios que possuam os equipamentos necessários (LEE et al., 2012).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para o estabelecimento de terapia adequada para os pacientes que desenvolverem urolitíase é necessário que se tenha conhecimento da composição de todos urólitos desenvolvidos. Portanto, não é aconselhável que o profissional médico ou veterinário deixe de realizar análises nos urólitos. A escolha de uma técnica de análise composicional que forneça resultados precisos é extremamente desejável e diversos fatores devem ser analisados ao momento da escolha dessa técnica. Também é importante que o profissional conheça as diversas técnicas, para fazer uma melhor escolha, quando for possível.

Metodologias empíricas não devem ser utilizadas devido aos altos índices de erros. Dentre os métodos de imagem, a tomografia computadorizada ainda está em estudos e, apesar da obtenção de alguns bons resultados, deve ser considerada apenas uma técnica auxiliar. As técnicas de análise qualitativa, embora ainda muito usadas na rotina, são ineficientes e devem ser evitadas. É desejável o uso de técnicas quantitativas que são os métodos analíticos que apresentam resultados mais fidedignos, embora tenham o inconveniente de ser realizadas apenas após a remoção dos urólitos. No entanto, é importante frisar que, se apenas está disponível ao clínico uma metodologia pouco eficiente, como análises químicas, ainda sim é desejável que seja realizada a análise.

Como cada método quantitativo de análise possui características específicas, vantagens e desvantagens, é ideal que se associe pelo menos duas desses procedimentos para a realização de exames mais exatos.

Infelizmente as técnicas físicas necessitam de equipamentos altamente especializados e de alto valor e, por esse motivo, geralmente não estão disponíveis, especialmente aos veterinários, que acabam por utilizar métodos químicos para análise da composição dos cálculos urinários de seus pacientes, chegando a resultados pouco exatos.

REFERÊNCIAS

1. ADAMS, L. G.; SYME, H. M. Canine lower urinary tract diseases. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C **Textbook of veterinary internal medicine**. St. Louis: Elsevier, 2005. v. 2. P. 1850-1874.
2. ALBASAN, H.; LULICH, J. P.; OSBORNE, C. A.; LEKCHAROENSK, C.; ULRICH, L. K.; KARPENTER, K. Effects of storage time and temperature on pH, specific gravity, and crystal formation in urine samples from dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 222, n. 2, p. 176-179, 2003.
3. ANCHAROV, A. I.; POTAPOV, S. S.; MOISEENKO, T. N.; FEOFILOV, I. V.; NIZOVSKII, A. I. Model experiment of *in vivo* synchrotron X-ray diffraction of human kidney stones. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A**, Hamburg. v. 575, p. 221-224, 2007.
4. ANDERSON, J. C.; WILLIAMS Jr, J. C.; EVAN, A. P.; CONDON, K. W.; SOMMER, A. J. Analysis of urinary calculi using an infrared microspectroscopic surface reflectance imaging technique. **Urological Research**, Berlin, v. 35, p. 41-48, 2007.
5. BELLIN, M.; RENARD-PENNA, R.; COURT, P.; BISSERY, A.; MERIC, J.; DAUDON, M.; MALLET, A.; RICHARD, F.; GRENIER, P. Helical CT evaluation of the chemical composition of urinary tract calculi with discriminant analysis of CT-attenuation values and density. **European Radiology**, Berlin, v. 14, p. 2134-2140, 2004.
6. BENRAMDANE, L.; BOUATIA, M.; IDRISSE, M. O. B.; DRAOUI, M. Infrared analysis of urinary Stones, using a single reflection accessory and a KBr pellet transmission. **Spectroscopy Letters**, Dublin, v. 41, p. 72-80, 2008.
7. BHATT, P. A.; PAUL, P. Analysis of urinary stone constituents using powder X-

ray diffraction and FT-IR. **Journal of Chemical Science**, Bangalore, v. 120, p. 267-273, 2008.

8. DAVIDSON, M. T. M.; BATCHELAR, D. L.; VELUPILLAI, S.; DENSTEDT, J. D.; CUNNINGHAM, I. A. Analysis of urinary stone components by X-ray coherent scatter: characterizing composition beyond laboratory X-ray diffractometry. **Physics in Medicine and Biology**, London, v. 50, p. 3773-3786, 2005.

9. DEVECI, S.; COSKUN, M.; TEKIN, M. I.; PESKIRCIOGLU, L.; TARHAN, N. Ç.; OZKARDES, H. Spiral computed tomography: role in determination of chemical compositions of pure and mixed urinary stones – an *in vitro* study. **Journal of Urology**, Baltimore, v. 64, p. 237-240, 2004.

10. DIAZ-ESPIÑERA, M.; ESCOLAR, E; BELLANATO, J.; DE LA FUENTE, M. A. Infrared and atomic spectrometry analysis of the mineral composition of a series of equine sabulous material samples and urinary calculi. **Research in Veterinary Science**, St. Paul. v. 47, p. 211-217, 1997.

11. DRETHER, S. P.; POLYKOFF, G. Calcium oxalate stone morphology: fine tuning our therapeutic distinctions. **The Journal of Urology**, Baltimore. v. 155, p. 828-833, 1996.

12. ELIAHOU, R.; HIDAS, G.; DUVDEVANI, M.; SOSNA, J. Determination of renal Stone composition with computed tomography: na emerging application. **Seminars in Ultrasounds, CT and MRI**, Philadelphia, v. 31, p. 315-320, 2010.

13. GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de urinálise veterinária**. São Paulo: Varela, 2005, 131p.

14. GRASES, F.; COSTA-BAÚZA, A.; RAMIS, M.; MONTESINOS, V; CONTE, A. Simple classification of renal calculi closely related to their micromorphology and etiology. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam. v. 322, p. 29-36, 2002.

15. HERRMANN, U.; SCHWILLE, P. O. Crystalluria in idiopathic recurrent calcium urolithiasis – dependence on stone composition. **Urological Research**, Berlin. v. 20, p. 157-164, 1992.
16. KALINSKI, K.; MARYCZ, K.; CZOGALA, J; SERWA, E.; JANEKZEK, W. An application of scanning electron microscopy combined with roentgen microanalysis (SEM-EDS) in canine urolithiasis. **Journal of Electron Microscopy**, Tokyo, v. 61, p.47-55, 2012.
17. KALOUSTIAN, J.; EL-MOSELHY, T. F.; PORTUGAL, H. Determination of calcium oxalate (mono- and dihydrate) in mixtures with magnesium ammonium phosphate or uric acid: the use of simultaneous thermal analysis in urinary calculi. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam. v. 334, p. 117-129, 2003.
18. KALOUSTIAN, J.; PAULI, A. M.; PIERONI, G.; PORTUGAL, H. The use of thermal analysis in determination of some urinary calculi of calcium oxalate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Budapeste. v. 70, p. 959-973, 2002.
19. KIM, S. C.; BURNS, E. K.; LINGEMAN, J. E.; PETERSON, R. F.; McATEER, J. A.; WILLIAMS Jr., J. C. Cystine calculi: correlation of CT-visible structure, CT number , and stone morphology with fragmentation by shock wave lithotripsy. **Urological Research**, Berlin, v. 35, p. 319-324, 2007.
20. KOEHLER, L. A.; OSBORNE, C. A.; BUETTNER, M. T.; LULICH, J. P.; BEHNKE, R. Canine urolithiasis: frequently asked questions and their answers. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia. v. 39, p. 161-181, 2008.
21. KRAMBECK, A. E.; KHAN, N. F.; JACKSON, M. E.; LINGEMAN, J. E.; MCATTEER, J. A.; WILLIAMS, J. C. Inaccurate reporting of mineral composition by commercial stone analysis laboratories: implications for infection and metabolic stones. **Journal of Urology**, Baltimore. v. 184, p. 1543-1549, 2010.

22. LAUBE, N.; PULLMANN, M.; HERGATEN, S.; HESSE, A. Influence of urinary stones on the composition of a 24-hour urine sample. **Clinical Chemistry**. New York. v. 49, p. 281-285, 2003.
23. LEE, H. P.; LEONG, D.; HENG, C. T. Characterization of kidney stones using the thermogravimetric analysis with electron dispersive spectroscopy. **Urological Research**, Berlim. v. 40, p. 197-204, 2012.
24. LINGEMAN, J.; KAHNOSKI, R.; MARDIS, H.; GOLDFARB, D. S.; GRASSO, M.; LACY, S.; SCHEINMAN, S. J.; ASPLIN, J. R.; PARKS, J. H.; COE, F. L. Divergence between stone composition and urine supersaturation: clinical and laboratory implications. **Journal of Urology**, Baltimore. v. 161, p. 1077-1081. 1999
25. LULICH, J. P.; OSBORNE, C.A.; BARTGES, J. W.; LEKCHAROENSUK. C. Distúrbios do trato urinário inferior dos caninos. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 2, p. 1841-1877.
26. LULICH, J. P.; OSBORNE, C. A. Changing paradigms in the diagnosis of urolithiasis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 39 p.79-91, 2008.
27. MATERAZZI, S.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; MAGRI, A. D. TG-FTIR coupled analysis applied to the studies in urolithiasis: characterization of human renal calculi. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 264, p. 75-93, 1995.
28. MOROZ, T. N.; PALCHIK, N. A.; DAR'IN, A. V. Microelemental and mineral compositions of pathogenic biomineral concrements: SRXFA, R-ray powder diffraction and vibrational spectroscopy data. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A**, Hamburg, v. 603, p. 141-143, 2009.

29. MOSTAFAVI, M. R.; ERNST, R. D.; SALTZMAN, B. Accurate determination of chemical composition of urinary calculi by spiral computerized tomography. **Journal of Urology**, Baltimore, v. 159, p. 673-675, 1998.
30. NAKADA, S. Y.; HOFF, D. G.; ATTAI, S.; HEISEY, D.; BLANKENBAKER, D.; POZNIAK, M.F. Determination of stone composition by noncontrast spiral computed tomography in the clinical setting. **Urology**, Ridgewood, v.55, p. 816-819, 2000.
31. OCHMANSKI, W.; KMIEK, J.; SULOWICZ, W. Analysis of chemical composition of urinary stones. **International Urology and Nephrology**, Budapest. v. 31, p. 743-750, 1999.
32. OSBORNE, C. A.; LULICH, J. P.; BARTGES, J. W.; UNGER, L. K.; THUMCHAI, R.; KOEHLER, L. A.; BIRD, K. A.; FELICE, L. J. Canine and feline urolithiasis: relationship of etiopathogenesis to treatment and prevention. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**, Media: Williams & Wilkins, 1995. p. 798-888.
33. OSBORNE, C. A.; LULICH, J. P.; SWANSON, C. V. T.; ALBASAN, H. Drug-induced urolithiasis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, St. Paul, v. 39 p.183-197, 2008.
34. PRESSLER, B. M.; MOHAMMADIAN, L. A.; LI, E.; VADEN, S. L.; LEVINE, J., F.; MATHEWS, K. G.; ROBERTSON, I. D. *In vitro* prediction of canine urolith mineral composition using computed tomographic beam attenuation measurements. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, Raleigh, v. 45, p. 189-197, 2004.
35. PRIMAK, A. N.; FLETCHER, J. G.; VRTISKA, T. J.; DZYUBAK, O. P.; LIESKE, J. C.; JACKSON, M. E.; WILLIAMS, J. C.; McOLLOUGH. Noninvasive differentiation of uric acid versus non-uric acid kidney stones using dual-energy CT. **Academic Radiology**, Reston, v. 14, p. 1441-1447, 2007.

36. PUCETAITE, M.; HENDRIXSON, V.; ZELVYS, A.; JANKEVIVIUS, F.; TYLA, R.; CEPONKUS, J.; SABLINSKAS, V. Application of infrared spectroscopic imaging in specular reflection mode for determination of distribution of chemical components in urinary stones. **Journal of molecular structure**, Amsterdam, v, 1031, p. 38-42, 2012.
37. SCHUBERT, G. Stone analysis. **Urological Research**, Berlim, v. 34, p. 146-150, 2006.
38. SEKKOUM, K.; CHERITI, A.; TALEB, S.; BELBOUKHARI, N. FTIR spectroscopic study of human urinary stones from El Bayadh district (Algeria). **Arabian Journal of Chemistry**, Riyadh, v. 4, p. 27-37, 2011.
39. SELVARAJU, R.; THIRUPPATHI, G.; RAJA, A. FT-IR spectral studies on certain human urinary stones in the patients of rural area. **Spectrochimica Acta**, Kidlington, v. 93, p. 260-265, 2012.
40. SUN, W.; ZHANG, K.; WANG, J.; WANG, X,. The chemical composition and ultrastructure of uroliths in Boer goats. **The Veterinary Journal**, London, v. 186, p. 70-75, 2010.
41. ULRICH, L. K.; OSBORNE, C. A.;COKLEY, A.; LULICH, J. P. Changing paradigms in the frequency and management of canine compound uroliths. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 39, p. 41-53, 2008.
42. WANDT, M. A. E.; RODGERS, A. L. Quantitative X-ray diffraction analysis of urinary calculi by use of the internal-standard method and reference intensity ratios. **Clinical Chemistry**, Nova York. v. 34, p. 289-294, 1988.
43. WEICHSELBAUM, R. C.; FEENEY, D. A.; JESSEN, C. R.; OSBORNE, C. A.; DREYTSER, V.; HOLTE, J. Loss of urocystolith architectural cavity during *in vivo*

radiographic simulation versus *in vitro* visualization. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, Raleigh. v. 41, p. 241-246, 2000.

44. WEICHSELBAUM, R. C.; FEENEY, D. A.; JESSEN, C. R.; OSBORNE, C. A.; DREYTSER, V.; HOLTE, J. An integrated epidemiologic and radiographic algorithm for canine urocystolith mineral type prediction. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, Raleigh. v. 42, p. 311-319, 2001.