

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA APLICADA AL ANÁLISIS DE UROLITOS DE PERROS Y GATOS EN PARAGUAY

INFRARED SPECTROSCOPY APPLIED TO THE ANALYSIS OF UROLITHS OF DOGS AND CATS IN PARAGUAY

Guillén, R M ^{1 2}

¹ Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción - San Lorenzo - Paraguay

² Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Asunción - San Lorenzo - Paraguay

RESUMEN. La urolitiasis es una patología recurrente originada como consecuencia de múltiples causas. La identificación precisa de la composición química de los urolitos es esencial para controlar los factores que contribuyen a la formación de la piedra, facilitando la elección de medidas terapéuticas a largo plazo. Recientemente se inició el uso a nivel nacional del análisis de los cálculos urinarios por espectroscopía infrarroja, pero estaba limitado a muestras de humanos. El presente trabajo tiene como objetivo presentar los primeros resultados de la implementación en Paraguay del uso combinado de epimicroscopía y espectroscopía para el análisis de urolitos de pequeños animales que incluyeron 16 perros y 5 gatos. Se observó una mayor frecuencia de urolitos en hembras de ambas especies, perros de la raza Schnauzer miniatura y en gatos mestizos. El 76% de los urolitos estuvo formado por un solo componente, siendo la estruvita el constituyente mayoritario presente en el 81% y 80% de muestras de perros y gatos, respectivamente. Otros compuestos como el oxalato de calcio monohidratado y diversos fosfatos incluyendo: brushita, carbapatita y fosfato amorfo carbonatado se encontraron en frecuencias que variaron entre el 6 al 20% en ambas especies. Los datos permiten mostrar la capacidad nacional de implementar técnicas analíticas validadas a nivel internacional y ofrecerlas como herramienta que orientará la conducta terapéutica más específica, a fin de disminuir el riesgo de recidivas.

Palabras clave: urolitiasis, urolito, perros, gatos, espectroscopía infrarroja.

ABSTRACT. Urolithiasis is a recurrent pathology that results from multiple causes. Precise identification of the chemical composition is essential to manipulate the factors that contribute to the stone formation, making easier the choice for long term therapeutic measures. Recently the use of infrared espectroscopy has begun for the analysis of urinary calculi at national level, but till now it was limited to human samples. The current study aimed to present the first results of the implementation in Paraguay of the combined use of epimicroscopy and infrared espectroscopy for the analysis of uroliths from small animals, including 16 dogs and 5 cats. It was observed a higher frequency of urolith in females of both species, Schnauzer miniature dogs and mixed breed cats. 76% of the samples were formed by only one component. Struvite was the most frequent component and it was present in 81% and 80% of samples from dogs and cats respectively. Other components such as calcium oxalate and different phosphates such as: brushite, carbapatite, and amorphous phosphate were found in samples in variable frequencies that ranged between 6% to 20% in both species. Our data allow to show national capacity to implement internationally validated analytical technique and offer them as a tool to guide therapeutic choices of veterinaries to decrease recurrence risks.

Keywords: urolithiasis, urolith, dogs, cats, infrared spectroscopy.

Dirección para correspondencia: Dra. Rosa María Guillén Fretes - Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud - Universidad Nacional de Asunción - San Lorenzo - Paraguay.

E-Mail: rmgullenf@gmail.com

Recibido: 15 de octubre de 2014 / **Aceptado:** 10 de diciembre de 2014

INTRODUCCIÓN

La urolitiasis es un problema clínico importante en pequeños animales, incluyendo perros y gatos, en todo el mundo. Esta patología se caracteriza por la formación y agregación de cristales de diversa composición a nivel de las vías urinarias. Es una patología frecuente y recurrente (1). En Suecia y Noruega se reporta una prevalencia de 0,25 al 0,5% de urolitiasis en perros (2). Mientras que Alban y colaboradores, estudiando datos de 4.435 gatos litiasicos en un periodo de 5 años, observaron que la recurrencia de urolitos variaba entre el 3 al 13% en un lapso de 20 meses, dependiendo de la composición de los mismos (3).

Se reconocen como factores de riesgo para la urolitiasis la raza, el género, la edad, los hábitos alimenticios, las infecciones urinarias e incluso existen algunas causas de origen genético y medicamentoso. Así por ejemplo, los perros de la raza Schnauzer miniatura son propensos a sufrir con más frecuencia que otras razas, litiasis por oxalato de calcio, mientras que los de raza Dálmata se ven más afectados por las litiasis úricas, debido a una causa genética que origina un metabolismo alterado de purinas (4,5). Por otro lado las litiasis infecciosas, compuestas por fosfato amónico magnésico y otros fosfatos, son más frecuentes en hembras que en machos, así como en animales jóvenes, mientras que las litiasis oxalocálcicas aumentan su frecuencia de aparición con la edad del animal (6). Medicamentos diversos como los antibióticos pueden cristalizar y formar un núcleo que predispone a la formación de cristales de otros compuestos presentes en la orina o bien pueden inducir la acumulación de compuestos poco solubles en la orina como es el caso del allopurinol, inhibidor de la xantina oxidasa, que favorece la formación de urolitos de xantina (7).

En el caso de los gatos, se señala que tanto los animales de razas de pelo corto, como las de pelo largo, entre los cuales se cita por ejemplo a los Himalayas, Persas y Siameses, pueden estar predispuestos a sufrir urolitiasis. Los gatos de raza pura tienen más riesgo de formar cálculos que los mestizos, en tanto que los gatos esterilizados presentan 12 veces mayor riesgo de padecer urolitiasis que los enteros (8).

El manejo efectivo a largo plazo depende de la identificación y el control del mecanismo

fisiopatológico implicados en la formación del urolito, que a su vez se relaciona con la composición del mismo, por tanto la identificación precisa de la composición mineral del urolito es necesaria para el tratamiento efectivo y la prevención de la recurrencia.

Grandes centros de investigación como el Urolith Center de Minesotta, Estados Unidos o el Canadian Veterinary Urolith Centre de Ontario, Canadá, han publicado extensos y variados estudios epidemiológicos en los que se describe la composición de los urolitos en perros, gatos y otras especies, además de factores de riesgo asociados a los diversos tipos de urolitos. Estos centros emplean como método cuantitativo de análisis de los urolitos una combinación de al menos dos métodos físicos que incluyen microscopía ya sea estereoscópica, de polarización o electrónica de barrido y métodos espectroscópicos como difracción de rayos X y espectroscopía infrarroja (9,10,11).

La morfología de los urolitos es dependiente de la fase cristalina de los compuestos y de la localización en el tracto urinario, combinada con la espectroscopía infrarroja que genera un espectro propio de cada compuesto, considerado como huella dactilar, la cual provee información útil sobre las causas y condiciones en las que se formó el urolito (12).

En Paraguay el empleo del estudio de la morfología de urolitos de animales, se dio por primera vez en el año 2011, en el que se reportó un caso clínico de litiasis recidivante en un animal de la especie canina, de raza Schnauzer miniatura, macho de 2 de años de edad (13).

En el presente artículo se presentan por primera vez en el país, datos obtenidos mediante el análisis de urolitos en perros y gatos, empleando la combinación de dos métodos físicos: la epimicroscopía y la espectrofotometría infrarroja, con procedimientos que son comparables a los llevados a cabo en los más importantes centros de investigación de urolitos del extranjero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los urolitos estudiados en este trabajo provinieron de 21 pequeños animales (16 perros y 5 gatos), siendo los mismos analizados en una primera

etapa mediante esteromicroscopía, empleando un epimicroscopio modelo Btb3a (Boeco, Alemania) para el estudio de la morfología de los mismos, siguiendo los criterios descritos por Daudon y colaboradores para identificar características estructurales específicas (14). La segunda fase del estudio consistió en la toma de muestras representativas de cada uno de los estratos presentes en el urolito, incluyendo núcleo, sección y superficie, y la preparación de las mismas mediante la técnica de la pastilla traslúcida de bromuro de potasio. Para la obtención de la pastilla se empleó bromuro de potasio grado infrarrojo (Merck, Estados Unidos) y una prensa hidráulica modelo S72-120Jn (Shimatzu, Japón), acoplada a una bomba de vacío modelo SA18 (Shimatzu, Japón); y para la obtención del espectro infrarrojo se empleó el espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier IRPrestige 21 FTIR 8400S (Shimatzu, Japón), con rango de 4000 a 400 cm^{-1} y una resolución espectral de 4 cm^{-1} . La interpretación de los espectros obtenidos se hizo por comparación con una biblioteca de espectros de compuestos presentes en cálculos urinarios publicado por Quy Dao y Daudon (12).

Los urolitos fueron considerados como simples o puros cuando contenían 70% o más de un mismo componente en todos los estratos; mixtos cuando contenían menos del 70% de un componente en todos los estratos, y compuestos cuando presentaban un núcleo y varias capas de composición variada (15).

Los resultados obtenidos fueron remitidos al veterinario responsable para orientar el tratamiento de los pacientes. Los datos han sido manejados bajo códigos, manteniéndose la confidencialidad de los animales, propietarios y profesionales veterinarios tratantes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los urolitos analizados en el caso de los perros provinieron de 7 machos (43,7%) y 9 hembras (56,3%) pertenecientes a las siguientes razas: Schnauzer miniatura (n=4; 25%), Yorkshire (n=4; 25%), Shitzu (n=2; 12,5%), Mestizos (n=2; 12,5%), Basset Hound (n=1; 6,25%), Pastor Alemán (n=1; 6,25%), Caniche (n=1; 6,25%) y Cocker (n=1; 6,25%). El número de urolitos presentes varió de 1 a 29 por cada animal, con

dimensiones: largo, ancho y espesor mínimos y máximos de 3 x 3 x 3 mm y 28 x 22 x 18 mm, respectivamente. La ubicación anatómica principal fue la vejiga en el 56,2% (n=9) de las muestras, en tan solo 1 caso se refirió la ubicación a nivel renal, mientras que en el remanente de casos no se identificó la misma. El método de eliminación más frecuente fue mediante procedimientos quirúrgicos, en 9 casos (56,2%), seguida de la eliminación espontánea en 5 casos (31,2%). Es interesante señalar que en su gran mayoría las muestras de perros correspondieron a razas pequeñas, dentro de las cuales los Schnauzer miniatura y los Yorkshire aportaron el 50% del total de muestras provenientes de perros, coincidentemente con lo reportado por varios autores (2,15,16). En el caso específico de los Schnauzer miniatura, existen indicios experimentales que muestran una mayor susceptibilidad a la cristalización de sales como el oxalato de calcio en comparación con otras razas debido a la producción de una glicoproteína urinaria, la nefrocalcina, con poder de inhibición de cristalización reducido (4).

El análisis morfológico e infrarrojo de los urolitos de los perros mostró que 11 estuvieron conformados por un solo componente en todos los estratos, por lo que fueron clasificados como puros y 5 presentaron dos componentes clasificándose como mixtos. Tanto en el caso de los urolitos puros como en los mixtos el compuesto más frecuente encontrado fue la estruvita (fosfato amónico magnésico hexahidratado) correspondiendo al 81% de las muestras de esta especie, seguido en una frecuencia mucho menor por compuestos como whewhellita (oxalato de calcio monohidratado), carbapatita (fosfato de calcio carbonatado cristalizado) y fosfato amorfo carbonatado cristalizado (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de urolitos provenientes de perros

Tipo	Componente ^a	Total (n=16)	Hembras (n=9)	Machos (n=7)
Puros (n=11)	Estruvita	10	5	5
	Brushita	1	0	1
Mixtos (n=5)	Estruvita+Carbapatita	10	5	5
	Estruvita+Fosfato amorfo	1	0	1
	Whewhellita+Carbapatita	1	0	1

^a Estruvita: Fosfato amónico magnésico hexahidratado

La predominancia de la estruvita en los urolitos de perros ha sido señalada por distintos trabajos realizados por centros internacionales especializados en litiasis renal en animales. Así un

estudio realizado en 77.191 muestras provenientes de perros y publicado por Osborne y colaboradores en Estados Unidos mostró una frecuencia global de 49,6% de urolitos de estruvita (15), mientras que en Houston, Canadá, analizando 16.000 muestras de la misma especie, obtuvieron resultados muy similares con el 43,8% correspondiente a cálculos formados por estruvita (9). En Méjico, Del Angel Caraza mostró un 40% de estruvita en los cálculos provenientes de 105 perros litíasicos (17). El riesgo de presentar litiasis por estruvita es mayor en hembras que en machos (18), a diferencia de lo que se encontró en este trabajo con un número similar de animales afectados de ambos sexos, sin embargo es importante continuar el análisis de un número mayor de muestras para poder obtener un panorama más completo de las causas de la patología litíásica de animales en el país.

La formación de los cristales de estruvita está relacionada a condiciones en las cuales aumentan las concentraciones de los iones que la componen: amonio, magnesio y fosfato, siendo un factor fundamental el pH urinario muy alcalino (superior a 7) que facilita la precipitación de estos cristales (19).

En pequeños animales se ha observado la formación de urolitos por este compuesto asociado tanto a orinas alcalinas estériles, así como a orinas alcalinas generadas como consecuencia de infecciones urinarias por bacterias productoras de ureasa como por ejemplo *Proteus mirabilis* y otros (1). En uno de los urolitos proveniente de un canino, macho, de la raza Yorkshire, con antecedentes de episodios anteriores de litiasis renal y procedimientos quirúrgicos previos por este motivo, se pudo observar en el análisis morfológico la presencia de un cuerpo extraño, consistente en un segmento de hilo de pescar de color verde, ubicado a nivel del núcleo del urolito compuesto por estruvita (Figura 1).



Figura 1. Urolito de 28 x 18 x 10 mm, obtenido de un canino de raza Schnauzer miniatura, macho, compuesto por estruvita en el que se observa la presencia de un cuerpo extraño de color verde como parte del núcleo de cálculo (nucleación heterogénea).

En este fenómeno conocido como nucleación heterogénea, un cuerpo extraño al cuerpo sirve como iniciador o “semilla” para la formación y agregación de cristales a su alrededor (19). En humanos se han descrito varios casos en los que catéteres y/o hilos de sutura han sido el punto de inicio de formación de cálculos, mientras que en animales se tiene registrado incluso, de la formación de urolitos alrededor de semillas de un vegetal, el *Hordeum murinum*, que migraron dentro del aparato urinario de dos caninos de raza Pastor Alemán, machos siendo el núcleo de dichos cálculos (20). Este tipo de fenómeno pone de manifiesto que si bien las medidas de desobstrucción de las vías urinarias son la prioridad en el accionar del profesional veterinario, por sí solas no son suficientes para controlar la patología y que si no se identifican las causas que originaron el cálculo y se inician las medidas orientadas para controlarlas, la recidiva es muy probable, por tanto la identificación precisa de la composición del urolito, siempre que éste sea accesible, debe realizarse con métodos sensibles y fiables como la combinación de la epimicroscopía y la espectroscopía infrarroja.

Los casos de urolitiasis en gatos se dieron en 4 hembras (80%) y 1 macho (20%), de los cuales uno era de la raza Siamés y los demás de raza Mestiza. El número de urolitos presente varió de 1 a 50 por cada animal, con dimensiones: largo, ancho y espesor de los urolitos, mínimos de 1 x 1 x 1 mm y máximos 18 x 13 x 13 mm respectivamente. Se pudo obtener datos respecto a la ubicación de los urolitos sólo en 3 de los gatos, siendo en todos ellos a nivel vesical (60%). Los urolitos fueron extraídos del aparato urinario mediante intervención quirúrgica en 3 gatos, mientras que en un caso se remitieron microurolitos (50 elementos, con dimensiones de 1 x 1 x 1 mm correspondientes al largo, ancho y espesor), obtenidos de una muestra de orina extraída con sonda (Figura 2); en tanto que en el gato restante no se contó con información referente a este punto.



Figura 2. Múltiples microurolitos de tamaño aproximado a 1 x 1 x 1 mm, obtenido de un gato Siamés, macho por extracción de orina con sonda.

La composición de los urolitos extraídos de los gatos mostró que la totalidad de los mismos estaban compuestos por un solo componente, por tanto el 100% de las muestras analizadas correspondieron a cálculos puros. El 80% (n=4) estuvo formado por estruvita y en la muestra restante se encontró fosfato amorfo carbonatado cristalizado (Tabla 2). Estos resultados coinciden con los de un estudio realizado por Osborne y colaboradores en los que se analizaron 6.704 cálculos ureterales de gatos colectados en 10 años, encontrando que el 84% de los mismos estuvo formado por estruvita (11).

Tabla 2. Composición de urolitos provenientes de gatos

Tipo	Componente ^a	Total (n=5)	Hembras (n=4)	Machos (n=1)
Puros (n=5)	Estruvita	4	3	1
	Fosfato amorfo carbonatado	1	1	0

^aEstruvita: Fosfato amónico magnésico hexahidratado.

En este trabajo tanto en perros como en gatos se observó un predominio de litiasis en hembras (9/16 en perros y 4/5 en gatos), si bien no se ha tenido acceso a datos de urocultivo de los animales participantes en el estudio, se cree que el efecto del factor infeccioso podría explicar en muchos casos el hecho de que la litiasis de estruvita sea más frecuente en hembras, debido a que muestran una mayor susceptibilidad de sufrir litiasis debido a infecciones urinarias (21). Un inconveniente encontrado fue la falta de información acerca de si los animales estudiados eran enteros o esterilizados y que puede asociarse también a un riesgo de litiasis renal.

La presencia de oxalato de calcio monohidratado en los urolitos analizados fue muy inferior (6,25%) a la reportada en Inglaterra, en la

que se habla de alrededor del 19% de urolitos de este compuesto en perros en un total de 6.519 muestras analizadas. Sin embargo, la baja frecuencia de aparición de la carbapatita (fosfato de calcio carbonatado cristalizado) y la brushita (fosfato de ácido de calcio dihidratado) coincide con el citado estudio en el que se reportan frecuencias de estos compuestos en perros de 0,4% y 1,5%, respectivamente (6). Una ventaja al poder identificar que el compuesto responsable de la litiasis es la estruvita, es que se cuentan con métodos de control basados en la administración de alimentos especiales que buscan acidificar la orina, logrando la disolución de los cristales de estruvita. Así, diversos autores señalan que para evitar la recurrencia de urolitos de estruvita que puedan causar obstrucciones urinarias, deben controlarse las infecciones urinarias empleando antibióticos específicos en cada caso, además se recomienda el uso de balanceados especiales que acidifican la orina y por tanto favorecen la disolución de los cristales de estruvita. Esta alimentación en algunos casos debe extenderse por varios años. Así estudios realizados en gatos evaluando dos balanceados especiales que buscan la disolución de estruvita, mostraron la desaparición radiográfica de los urolitos de estruvita estériles lograda en una media de entre 30 a 33 días, en ambos casos la hematuria visible así como la disuria desaparecieron antes de la disolución completa (18,19,22,23).

La aplicación de la espectroscopía infrarroja ha permitido obtener espectros específicos para cada compuesto presente en los urolitos de pequeños animales, tanto en aquellos puros como en los mixtos (Figura 3), así como el hecho de precisar una cantidad mínima de muestras haciendo posible el análisis con resultados óptimos incluso con

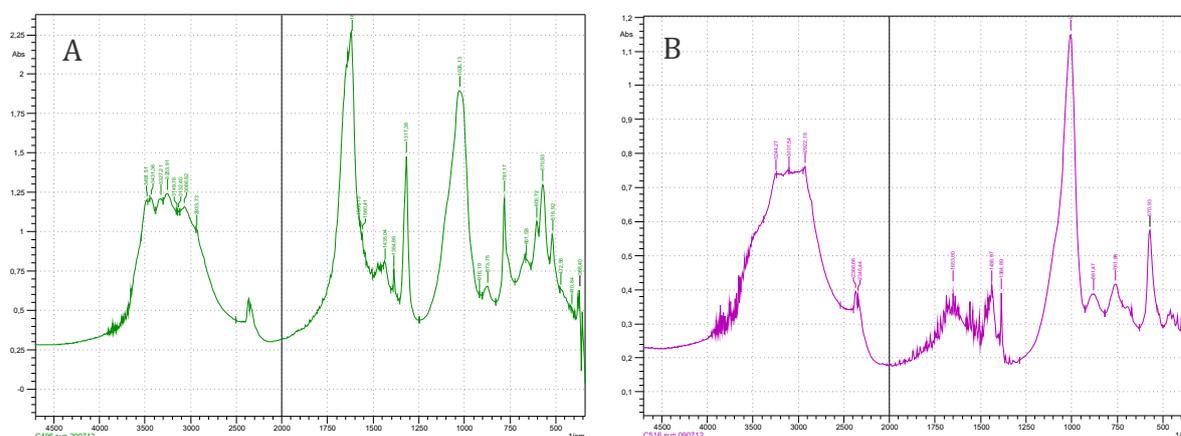


Figura 3. Análisis infrarrojo de urolitos provenientes de perros y gatos. A) Espectro FTIR de urolitos mixtos formado por Oxalato de calcio monohidratado y Fosfato de calcio carbonatado cristalizado, obtenidos por eliminación espontánea en una hembra de Schnauzer miniatura. B) Espectro FTIR de un urolito puro, de 19 x 18 x 14mm, formado por fosfato amónico magnésico hexahidratado, proveniente de la vejiga de una hembra Schnauzer miniatura, obtenido por cirugía.

microcristales recuperados a partir de muestras de orina.

CONCLUSIÓN

La implementación del uso combinado de la epimicroscopía y la espectroscopía infrarroja pone al alcance de todos los veterinarios del Paraguay una herramienta potente, sensible y fiable para la identificación de la composición de los urolitos obtenidos en animales. Los resultados de este tipo de análisis brindan información fundamental para la elección de medidas precisas y específicas, orientadas a controlar las causas de la patología litiásica con el objetivo final de disminuir el riesgo de recidiva y brindar una mejor calidad de vida para el paciente. Este trabajo es el primero en su clase en el país y se espera que el conocimiento de la capacidad desarrollada permita el alcance de esta herramienta de diagnóstico a más profesionales con prácticas veterinarias y redunde en beneficio de los animales aquejados por esta patología.

AGRADECIMIENTOS

A los profesionales veterinarios, la Dra. Paola Vera Vigo, miembros del laboratorio "Diagnovet", propietarios de perros y gatos, así como a todas las personas que han brindado un constante apoyo en la difusión de este proyecto, así como su colaboración en la remisión de muestras.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bartges JW, Osborne CA, Lulich JP, Kirk C, Allen TA, Brown C. Methods for evaluating treatment of uroliths. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* enero de 1999; 29(1): 45-57, x.
2. Houston DM, Moore AEP. Canine and feline urolithiasis: examination of over 50,000 urolith submissions to the Canadian veterinary urolith centre from 1998 to 2008. *Can Vet J Rev Vét Can (CA).* 2009; 50(12): 1263-8.
3. Albasan H, Osborne CA, Lulich JP, Lekcharoensuk C, Koehler LA, Ulrich LK, et al. Rate and frequency of recurrence of uroliths after an initial ammonium urate, calcium oxalate, or struvite urolith in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2009; 235(12): 1450-5.
4. Carvalho M, Lulich JP, Osborne CA, Nakagawa Y. Defective urinary crystallization inhibition and urinary stone formation. *Int Braz J Urol Off J Braz Soc Urol.* 2006; 32(3): 342-8.
5. Bannasch D, Henthorn PS. Changing paradigms in diagnosis of inherited defects associated with urolithiasis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2009; 39(1): 111-25.
6. Rogers KD, Jones B, Roberts L, Rich M, Montalto N, Beckett S. Composition of uroliths in small domestic animals in the United Kingdom. *Vet J Lond Engl* 1997. mayo de 2011; 188(2): 228-30.
7. Osborne CA, Lulich JP, Swanson LL, Albasan H. Drug-induced urolithiasis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2009; 39(1): 55-63.
8. Albasan H, Osborne CA, Lulich JP, Lekcharoensuk C. Risk factors for urate uroliths in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2012; 240(7): 842-7.
9. Houston DM, Moore AEP, Favrin MG, Hoff B. 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 Rev Vét Can.* 2004; 45(3): 225-30.
10. Houston DM, Moore AEP, Favrin MG, Hoff B. Feline urethral plugs and bladder uroliths: a review of 5484 submissions 1998-2003. *Can Vet J Rev Vét Can.* 2003; 44(12): 974-7.
11. Osborne CA, Lulich JP, Kruger JM, Ulrich LK, Koehler LA. Analysis of 451,891 canine uroliths, feline uroliths, and feline urethral plugs from 1981 to 2007: perspectives from the Minnesota Urolith Center. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2009; 39(1): 183-97.
12. Quy Dao, Nguyen, Daudon, Michel. *Infrared and Raman Spectra of Calculi.* Paris: Elsevier; 1997.
13. Guillén R, Ruíz I, Vera Vigo P, Ozuna R. Litiasis recidivante en cachorro de Schnauzer miniatura. Reporte de caso. *Mem Inst Investig Cienc Salud.* 2011; 9(1): 49-53.
14. Daudon M, Bader CA, Jungers P. Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology. *Scanning Microsc.* septiembre de 1993; 7(3): 1081-104; discussion 1104-6.
15. Osborne CA, Lulich JP, Polzin DJ, Sanderson SL, Koehler LA, Ulrich LK, et al. Analysis of 77,000 canine uroliths. Perspectives from the Minnesota Urolith Center. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1999; 29(1): 17-38, ix - x.

16. Picavet P, Detilleux J, Verschuren S, Sparkes A, Lulich J, Osborne C, et al. Analysis of 4495 canine and feline uroliths in the Benelux. A retrospective study: 1994-2004. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2007; 91(5-6): 247-51.

17. Del Angel-Caraza J, Diez-Prieto I, Pérez-García CC, García-Rodríguez MB. Composition of lower urinary tract stones in canines in Mexico City. *Urol Res.* 2010; 38(3): 201-4.

18. Okafor CC, Pearl DL, Lefebvre SL, Wang M, Yang M, Blois SL, et al. Risk factors associated with struvite urolithiasis in dogs evaluated at general care veterinary hospitals in the United States. *J Am Vet Med Assoc.* 2013; 243(12): 1737-45.

19. Jungers P, Daudon M, Cohort P. Lithiase rénale, Diagnostic et traitement. Paris: Flammarion; 1999. 226 p.

20. Del Angel-Caraza J, Pérez-García CC, Bende B, Diez-Prieto I, García-Rodríguez B. Mouse barley awn (*Hordeum murinum*) migration induced cystolithiasis in 2 male dogs. *Can Vet J Rev Vét Can.* enero de 2011; 52(1): 67-9.

21. Lekcharoensuk C, Lulich JP, Osborne CA, Koehler LA, Urlich LK, Carpenter KA, et al. Association between patient-related factors and risk of calcium oxalate and magnesium ammonium phosphate urolithiasis in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2000; 217(4): 520-5.

22. Osborne CA, Lulich JP, Polzin DJ, Allen TA, Kruger JM, Bartges JW, et al. Medical dissolution and prevention of canine struvite urolithiasis. Twenty years of experience. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1999; 29(1): 73-111, xi.

23. Osborne C, Lulich JP. Medical dissolution of feline struvite urocystoliths: prospective clinical study of 30 cases. *J Am Vet Med Assoc.* 1990; 196: 1053-63