

26424
C-46204

SÔNIA LEITE DA SILVA

"ESTUDO EXPERIMENTAL DE FATORES NUTRICIONAIS NA FORMAÇÃO DE CRISTAIS NA URINA. AVALIAÇÃO DO PAPEL DA CRISTALÚRIA NA PRÁTICA CLÍNICA"

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Ceará para a obtenção do Título de Mestre em Medicina - Área de Clínica Médica

616.628
55232
1996

Orientador : Prof. Henry de Holanda Campos

FC-00006110-2

R. 54 30 64/96
07.01.98

Fortaleza - 1996

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

UFC	BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
Nº. R 870064	
02 109 198	

Silva, Sônia Leite da

“Estudo experimental de fatores nutricionais na formação de cristais na urina. Avaliação do papel da cristalúria na prática clínica” / Sônia Leite da Silva. - Fortaleza, 1996.

166p.: il.

Orientador: Prof. Henry de Holanda Campos
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Departamento de Clínica Médica.

1. Cristalúria. 2. Litíase. 3. Fatores nutricionais. I. Título.

CDD610

S586e 1996

"... o mestre que caminha à sombra do templo, rodeado de discípulos, não dá de sua sabedoria, mas sim de sua fé e de sua ternura. Se ele for verdadeiramente sábio, não vos convidará a entrar na mansão de seu saber, mas antes vos conduzirá ao limiar de vossa própria mente."

Orientador: Prof. Dr. Henry de Holanda Campos

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, do Departamento de Clínica Médica, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Clínica Médica.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Henry/de Holanda Campos
Universidade Federal do Ceará
Orientador

Dra. Ana Maria Misael da Silva
Universidade Estadual de São Paulo

Prof. Dra. Sandra T. S. Neiva Coelho
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles
Universidade Federal do Ceará

Os trabalhos apresentados nesta dissertação foram realizados no Hôpital NECKER - Paris, na Unidade de Pesquisa INSERM U 90 dirigida pelo Prof. Tilman Drüeke e no Centro de Pesquisas em Doenças Hepato-Renais, Universidade Federal do Ceará, dirigido pelo Prof. Roberto Barreto Marques.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos:

- Ao meu orientador Prof. Dr. Henry de Holanda Campos pelo brilhantismo com que me guiou no processo de elaboração desta dissertação, bem como pelo apoio, interesse, amizade e confiança que tem demonstrado a minha pessoa. É uma grande honra trabalhar sob sua direção.

- A minha amiga Wanda Maria Azeredo Demoraes Campos pela imensa capacidade, espírito crítico e paciência com que me auxiliou na elaboração desta dissertação, assim como pelo calor humano, amizade e confiança demonstrados a minha pessoa. É um grande privilégio trabalhar em sua companhia.

- Aos Professores Dr. Jean Pierre Grünfeld, Dr. Tilman Drüeke, Dr. Bernard Lacour e Dr. Michel Daudon pelos valiosos ensinamentos, pela gentileza e paciência com que me receberam na Unidade INSERM U90, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, França. A bagagem científica acumulada no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1992 constitui-se em um tesouro valioso que poucos no Brasil têm a oportunidade de experimentar.

- A minha grande amiga Silvia Fernandes Ribeiro da Silva pela sua inteligência, espírito crítico e inestimáveis sugestões na elaboração deste trabalho e pelo carinho, apoio, paciência e amizade que vem demonstrando ao longo dos anos.
- A minha amiga Prof. Dra. Vanda Jorgetti pela colaboração, apoio e incentivo, amizade, carinho ao longo do processo de elaboração deste trabalho.
- A Prof. Dra. Maria Pitombeira da Silva pela determinação, dinamismo e coragem demonstrados na criação do Mestrado de Clínica Médica, bem como pelo apoio e incentivo dado a primeira turma deste curso.
- Aos meus professores do Curso de Mestrado em Clínica Médica pelos valiosos ensinamentos recebidos nestes dois anos.
- A Dra Zilmar Fontenele e Silva e Dr. Fernando Antônio Frota Bezerra pela preciosa colaboração e apoio na implantação do Laboratório de Cristalúria do Centro de Pesquisas em Doenças Hepato-Renais da Universidade Federal do Ceará.
- A Prof. Rosa Maria Salani Mota pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

- Ao Governo Francês pelo apoio oferecido através da liberação da bolsa de estudos "Post Vert", que me possibilitou realizar parte desta pesquisa na unidade do Prof. Dr. Tilman Drüeke, ampliando os meus conhecimentos pessoal-profissional. Este apoio se manteve durante três anos, tendo sido recusado pelos Órgãos Governamentais responsáveis pelo desenvolvimento da pesquisa no Brasil.
- Aos pacientes que participaram deste estudo, tornando possível o desenvolvimento do conhecimento na área de litíase renal.
- Aos animais que são submetidos ao sacrifício em prol do avanço do conhecimento científico para que os seres humanos sejam beneficiados.
- A Daisy Maria Meireles Arruda, Christiane Costa, Ronaldo Soares de Farias, Antonia Oscarina, Paula de Lima Sousa, Maria Ana Paes Conde, Sonia Maria Carlos de Abreu, José Wilson Pascoal de Oliveira, Jaqueline Maria de Amorim Fernandes, Carmosa Barão dos Santos e aos funcionários do SAME pela colaboração ao longo deste processo de estudo.

RESUMO

A litíase urinária determina uma morbidade significativa e estudos epidemiológicos mostram um aumento de sua prevalência em países industrializados. Mudanças nos hábitos alimentares têm contribuído para a evolução desta patologia. Este trabalho compreende três etapas, e tem por objetivo avaliar alguns aspectos dos fatores nutricionais na cristalúria oxalo-cálcica e determinar o papel da cristalúria na prática clínica.

Primeira etapa. Foi realizado um estudo experimental piloto, com o objetivo de validar um modelo de indução de hiperoxalúria em animais, que fosse estável, reprodutível e que não acarretasse insuficiência renal. Doze ratos Wistar AF, machos, foram submetidos a dieta moderadamente deficiente em Cálcio (Ca) (0,1%) e água mineral contendo 78 mg/l de Ca (Evian ®) *ad libitum*, durante 21 dias. Após uma semana de adaptação à gaiola metabólica, os animais foram divididos em 6 grupos de 2 animais, que receberam etileno glicol (EG) adicionado à água ou oxalato de sódio (OxNa) misturado ao regime alimentar, durante um período de 15 dias: grupo I, EG 2,0%; grupo II, EG 1,0%; grupo III, EG 0,5%; grupo IV, OxNa 80 mg/100g; grupo V, OxNa 40 mg/100g; grupo VI, OxNa 20 mg/100g. No 7º e 21º dias foram realizadas análise de cristalúria, dosagens de Ca e de oxalato na urina de 24 horas, e de creatinina no plasma. No final do estudo os animais foram sacrificados, tendo o trato urinário sido cuidadosamente dissecado para pesquisa de cálculos e os rins retirados para análise radiológica e histológica. Os resultados mostram que o EG foi tóxico nas concentrações de 2,0% e 1,0%, e nefrotóxico na concentração de 0,5%. A sobrecarga em OxNa acarretou aumento na oxalúria e induziu a formação de cristais de oxalato de cálcio (OxCa). O modelo utilizando este agente indutor na concentração de 20 mg% mostrou ser mais estável.

Segunda etapa. Nesta etapa avaliamos o efeito de diferentes concentrações de Ca da água na formação de cristais de OxCa, em animais submetidos a dieta deficiente (0,1%) ou a dieta normal em Ca (1,0%). Quarenta ratos adultos, machos, Wistar foram submetidos a dieta deficiente em Ca (0,1%) e água mineral *ad libitum*, durante 21 dias. Após uma semana de adaptação à gaiola metabólica, os animais foram divididos em 3 grupos, que receberam aporte de água com diferentes teores de Ca: grupo I (n=13), Ca=222 mg/l, Badoit ®; grupo II (n=14), Ca=467 mg/l, Contrexéville ®; e, grupo III (n=13), Ca=78 mg/l, Evian ®. Simultaneamente, OxNa a 20 mg/100 g foi adicionado à dieta. Outra série

de 25 ratos (grupo I, n=9; grupo II, n=8; grupo III, n=8), foi submetida ao mesmo protocolo, sendo que o conteúdo de Ca da dieta era normal-alta (1%). No 7º e 21º dias do protocolo experimental foram realizadas análises bioquímicas e de cristalúria. No final do estudo os animais foram sacrificados, seguindo o mesmo protocolo descrito na primeira etapa. Nos animais submetidos a dieta pobre em Ca (0,1%), cristais urinários de OxCa monohidratado (COM) foram observados somente após a adição de OxNa à dieta, com um número médio significativamente maior no grupo III ($16,7 \pm 4,5$ cristais/mm³) do que nos grupos I e II ($2,5 \pm 1,5$ e $4,1 \pm 1,5$ cristais/mm³, respectivamente). Cristais de COD foram vistos apenas no final do estudo e não houve diferença entre os grupos. O produto oxalo-cálcico (pCaOx) reduziu-se ($p < 0,005$) de modo semelhante nos três grupos no final do experimento. A adição de OxCa também acarretou diminuição da razão molar oxalo-cálcica (Ca/Ox) ($p < 0,001$), porém com valores significativamente maiores no grupo II ($3,1 \pm 0,6$ mmol²) do que nos grupos I ($1,1 \pm 0,2$ mmol²) e III ($0,6 \pm 0,06$ mmol²). As concentrações de Ca e magnésio (Mg) urinário diminuíram em todos os grupos ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) após a adição de OxNa à dieta, enquanto que a concentração de oxalato urinário aumentou em todos os grupos ($p < 0,001$). A alanina aminopeptidase urinária aumentou ($p < 0,001$) de modo semelhante nos animais dos três grupos, após sobrecarga em oxalato, enquanto que a gama-glutamiltanspeptidase não se modificou. Nos animais submetidos a dieta normal em Ca (1,0%), cristais de COM foram observados somente após a adição de dieta enriquecida com OxNa, mas, neste caso, a adição de OxNa à dieta não modificou a excreção urinária de oxalato, o pCaOx e a Ca/Ox. As concentrações urinárias de Ca e Mg diminuíram no final do estudo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente), enquanto que a excreção destes íons não se modificou. Nos dois protocolos experimentais (dieta 0,1% e 1,0%), a função renal permaneceu estável em todos os animais, e a análise radiológica e histológica não revelou alterações em qualquer dos animais estudados. Concluímos que o grau de dureza da água pode influenciar a formação de cristais de OxCa, quando a ingesta alimentar em Ca é pobre. Portanto, podemos inferir que a prescrição de dieta pobre em Ca nos indivíduos portadores de litíase oxalo-cálcica tende a aumentar a excreção de oxalato urinário, acentuando o risco litogênico.

Terceira etapa. No período de setembro de 1993 a setembro de 1996, avaliamos 755 cristalúrias provenientes de 464 pacientes ($32,1 \pm 0,74$ anos), e o estudo morfológico de 310 cálculos urinários oriundos de 145 pacientes

(34,9 ± 1,2 anos). Em 86 casos, a análise morfológica do cálculo foi comparada com aquela da cristalúria. Várias causas motivaram a solicitação do exame de cristalúria: litíase renal = 423, dor lombar = 52, transplante renal = 68, candidatos a doação em transplante renal = 48, investigação familiar de litíase = 75. A chance de encontrar cristalúria positiva nas amostras dessa população global variou de 34,6% a 41,6%. Nos pacientes litíasicos, este exame mostrou uma sensibilidade de 40,7% e especificidade de 63,9%. Os cristais mais freqüentes, em ordem decrescente, foram os de COD, COM, ácido úrico dihidratado, fosfato de cálcio amorfo carbonatado complexo, bruxita, cistina e estruvita. Associações de espécies cristalinas ocorreram em 31% das amostras positivas. Os cristais de OxCa foram mais freqüentes no sexo masculino. Dos 145 pacientes analisados, 60% eliminaram múltiplos cálculos. Nestes pacientes, foram consideradas apenas os cálculos com tipagem morfológica diferente. Desta forma, os resultados foram baseados na análise de 156 cálculos. Oxalato de cálcio monohidratado foi o constituinte majoritário mais freqüente, enquanto que o fosfato foi o minoritário. O segundo constituinte mais freqüente, tanto majoritário quanto minoritário, foi o COD. Os cálculos puros foram observados em 72 amostras: tipo I = 36,1%, tipo II = 20,8%, tipo IV = 20,8%, tipo III = 19,5%, tipo V = 2,8%. Houve predomínio do sexo feminino nos cálculos do tipo II e IV, e do sexo masculino nos tipos III e V. A cristalúria foi positiva em 48 de 86 pacientes que eliminaram cálculos (chance entre 45,4% a 66,2%). Os cristais foram concordantes com a tipagem morfológica em 83-100% dos cálculos puros, exceto os de fosfatos, onde esta taxa foi de 50%. Sendo o primeiro estudo associando informação sobre prevalência de cristalúria e análise de cálculo realizado na região Nordeste, podemos sugerir que oxalato e ácido úrico têm um importante papel na fisiopatogenia da litíase urinária na Região, provavelmente devido a fatores locais ambientais e culturais. Sugerimos que estes métodos sejam utilizados na prática clínica, especialmente na avaliação e seguimento de pacientes litíasicos, bem como na investigação familiar de litíase.

ABSTRACT

As nephrolithiasis results in significant morbidity it has been the subject of epidemiological studies which have shown its increasing prevalence in industrialized countries. Changes in alimentary patterns have contributed to the evolution of this disease. This study comprises three steps and aims to evaluate some nutritional aspects in calcium-oxalate (CaOx) crystalluria and to assess the role of crystalluria in the clinical practice.

Step 1. An experimental pilot study was undertaken in order to validate a model for the induction of hyperoxaluria in animals. In such model, hyperoxaluria should be kept stable and should be reproducible, and not lead to renal failure. Twelve adult male Wistar AF rats were placed on a Ca-deficient diet (0,1%), receiving a mineral water containing 78 mg/l of Ca (Evian®), *ad libitum*, for 21 days. After a seven-day period of adaptation to the metabolic cage, animals were separated into 6 groups receiving either ethylene-glycol (EG) or sodium oxalate (NaOx) in addition to their diet, for a 15-day period: group I - EG 2.0% (n=2), group II - EG 1.0% (n=2), group III - EG 0.5% (n=2), group IV - Na-Ox 80 mg/100 mg (n=2), group V - NaOx 40 mg/100 mg (n=2), group VI - Na-Ox 20 mg/100 mg (n=2). Determination of crystalluria, measurements of urinary calcium and oxalate, and plasma creatinine were performed on days 7 and 21. Animals were sacrificed at the end of the study period; the urinary tract was cautiously dissected in order to detect stone formation, and the kidneys were then harvested for radiologic and histological analysis. A wide toxicity of EG was seen at 2.0% and 1.0% concentrations, nephrotoxicity being observed at 0.5% concentration. Na-Ox-rich diet induced an increase in oxaluria and the formation of CaOx crystals. Results were more stable when NaOx 20 mg/100 mg was employed.

Step 2. Forty adult male Wistar rats were placed in metabolic cages on a Ca-deficient diet (0.1%) for 7 days and then on a Ca-deficient, Na-oxalate (NaOx) enriched diet (20 mg/100 g) for another 14 days. The animals were subdivided into three groups receiving three different types of mineral water: group I (n=13), Badoit®, (Ca 222 mg/l); group II (n=14), Contrexéville® (Ca 467 mg/l); and group III (n=13), Evian® (Ca 78 mg/l). Another series of 25 rats (group I, n=9; group II, n=8; group III, n=8) underwent the same study protocol, except that they received a normal Ca diet (1%). On the low-Ca diet, urinary CaOx monohydrate (COM) crystals were observed only under the NaOx diet, with a mean crystal

number significantly greater in group III (16.7 ± 4.5 crystals/mm³) than in group I or II rats (2.5 ± 1.5 or 4.1 ± 1.5 crystals/mm³, respectively). Urinary Ca concentrations decreased in all groups ($p < 0.001$) under the NaOx diet, while urinary oxalate concentrations increased in all groups ($p < 0.001$). On the normal Ca diet, COM crystal excretion was observed only with the NaOx-enriched diet, but in this case feeding the NaOx diet did not modify urinary oxalate excretion. Ca/Ox ratio was significantly lower under 0.1% Ca diet than under normal Ca diet, related with the type and the number of crystals observed, demonstrating that assessment of crystalluria can provide an index of disease severity. Moreover, the hardness of the drinking water influences urinary COM crystal excretion only under a low-Ca, oxalate-rich diet, suggesting that the total calcium intake rather than the water calcium content is an important factor in the occurrence of CaOx nephrolithiasis.

Step 3. Between september 1993 and september 1996, 755 determinations of crystalluria were performed in urinary morning samples of 464 patients (32.1 ± 0.74 y), and 310 urinary stones from 145 patients (34.9 ± 1.2 y) were analysed. Reasons given to justify the request for the determination of crystalluria were as follows: nephrolithiasis - 423, lumbar pain - 52, renal transplant recipients - 68, candidates for kidney donation - 48, family investigation for lithiasis - 75. The chance of finding a positive crystalluria in this population varied from 34.6% to 41.6%. In patients with nephrolithiasis, determination of crystalluria showed a sensibility of 40.7% and a specificity of 63.9%. Crystals more often observed were, in a decreasing order: COD, COM, dihydrate uric acid, PACC, brushite, cystine, struvite. Association between crystal species occurred in 31% of the positive samples. CaOx crystals were more frequent in male patients. CaOx monohydrate was most often the major component, whilst phosphate was the minor component. COD was the second most often seen, either as major or minor component. 72 of the stones were pure: type I = 36.1%, type II = 20.8%, type IV = 20.8%, type III = 19.5%, type V = 2.81%. Type II and IV stones were more frequent in female patients and types III and V in males. Crystalluria was positive in 48 of 86 patients whom eliminated stones (chance between 45.4% and 66.2%). Crystalluria findings were concordant with morphological analysis in 83-100% of the pure stones. In the type IV stones this occurred only in 50% of them. This is the first study associating informations obtained from determination of crystalluria and morphological analysis of stones in the northeastern region of Brazil, and our findings suggest that oxalate and uric acid play an important role in the pathogenesis

of urinary lithiasis in this Region. We suggest that these methods should be considered in clinical practice, specially in the evaluation and follow-up of patients with nephrolithiasis, and in the familial screening for urinary lithiasis.

PUBLICAÇÕES

Leite-Silva S, Jaudon MC, Le Möel G, Bourely B, Paris M, Don Simoni R, Troupel S, Lacour B, Drüeke T, Daudon M.

"Contribution des apports nutritionnels à la genèse de la lithiase oxalocalcique".

Act. Pharm. Biol. Clin. (1992): 322-327.

S L da Silva, C Hennequin, D Droz, C Bader, M Daudon, T Drüeke and B Lacour.

"Influence of various calcium intakes on calcium-oxalate crystalluria in rats on sodium-oxalate diet"

Nephrol. Dial. Transplant. (1994) 9: 1090-1096.

ABREVIATURAS

AAP	Alanina aminopeptidase
ADN	Ácido desoxirribonucléico
AGT	Alanina:glioxilato aminotransferase
ARN	Ácido ribonucléico
AUA	Acido úrico anidro
AUD	Acido úrico dihidratado
Assoc.	Associações
Bru	Bruxita
CA	Carbapatita
Ca	Cálcio
COD	Oxalato de cálcio dihidratado
COM	Oxalato de cálcio monohidratado
Ca/Ox	Razão oxalo-cálcica
Cis	Cistina
Cr	Creatinina
DHL	Dehidrogenase láctica
EG	Etileno glicol
Estru	Estruvita
EUA	Estados Unidos da América
GGT	Gama-glutamyltranspeptidase
G.L.	Grau de liberdade
Ksp	Produto de solubilidade
kV	Kilovolts
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
Mg	Magnésio

MgO	Oxido de magnésio
mAS	Miliampere segundo
NI	Não identificado
OxNa	Oxalato de sódio
OxCa	Oxalato de cálcio
pCaOx	Produto oxalo-cálcico
PF	Produto de formação
PACC	Fosfato de cálcio amorfo carbonatado complexo
PRP	Fosfato de piridoxal
SEM	Erro médio padrão
TPP	Pirofosfato de tiamina
UAA	Urato ácido de amônio
UAC	Urato amorfo complexo
Vasc.	Vascular

INDICE

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	xvi
PUBLICAÇÕES	xiv
ABREVIATURAS	xv
I. INTRODUÇÃO GERAL	
1. Apresentação	2
2. Histórico	4
3. O papel da dieta na litíase urinária	9
II. OBJETIVOS GERAIS	12
III. Parte 1: ESTUDO PILOTO - VALIDAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE CRISTALÚRIA OXALO-CÁLCICA	
1. Introdução	14
2. Objetivo	22
3. Materiais e Métodos	23
3. 1. Animais e dieta	23
3. 2. Procedimento experimental	26
4. Resultados	28
4. 1. Água com adição de etileno glicol a 2,0%, 1,0% e 0,5%	28
4. 2. Ração com adição de oxalato de sódio a 80 mg%, 40 mg% e 20 mg%	31
5. Discussão	35
6. Conclusões	39
7. Resumo	40
IV. Parte 2: INFLUÊNCIA DO TEOR DE CÁLCIO DA ÁGUA SOBRE A FORMAÇÃO DE CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO, EM ANIMAIS SUBMETIDOS A SOBRECARGA ORAL EM OXALATO	
1. Introdução	42
2. Objetivo	44
3. Materiais e Métodos	45
3. 1. Animais e dieta	45
3. 2. Procedimento experimental	47

4. Resultados	50
4. 1. Dieta deficiente em Ca (0,1%)	50
4. 1. Dieta normal em Ca (1,0%)	62
5. Discussão	70
6. Conclusões	81
7. Resumo	83
V. PARTE 3: AVALIAÇÃO DO PAPEL DA CRISTALÚRIA NA PRÁTICA CLÍNICA	
1. Introdução	86
2. 1. Cristalúria	87
2. 2. Análise do cálculo	103
2. Objetivos	112
3. Casuística e Métodos	113
4. Resultados	116
4. 1. Cristalúria	116
4. 2. Análise morfológica dos cálculos urinários	126
5. Discussão	137
6. Conclusões	144
7. Resumo	146
VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS	148
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151

"... cada homem não é apenas ele mesmo; é também um ponto único, singularíssimo, sempre importante e peculiar, no qual os fenômenos do mundo se cruzam daquela forma uma vez só e nunca mais. Assim, a história de cada homem é essencial, eterna e divina, e cada homem, ao viver em alguma parte e cumprir os ditames da natureza, é algo maravilhoso e digno de toda a atenção. Em cada um dos seres humanos o espírito adquiriu forma, em cada um deles a criatura padece, em cada qual é crucificado um redentor. " Pena que poucas pessoas se dão conta disto !

Hermann Hesse

1877-1962

escritor alemão naturalizado suíço

Prêmio Nobel em 1946



INTRODUÇÃO



1. APRESENTAÇÃO

A litíase urinária determina uma morbidade significativa e estudos epidemiológicos vêm demonstrando um aumento de sua prevalência nos Estados Unidos da América (EUA) e em vários países da Europa. No Brasil, e mais especificamente no estado do Ceará, não tem sido desenvolvido estudos para análise epidemiológica ou para caracterização da litíase renal. Numa etapa inicial faz-se necessário tornar mais eficiente os processos de diagnóstico e de tratamento de pacientes litiásicos em nosso meio, através de estudos que contribuam para definir o perfil de alterações metabólicas presentes em nossa população e para aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos litogênicos.

No presente trabalho nos propusemos a avaliar o efeito de diferentes concentrações de cálcio da água na formação de cristais de oxalato de cálcio, e a estabelecer a prevalência dos diferentes tipos de cristais urinários na região de Fortaleza, comparando-os com os tipos morfológicos de cálculos observados. Para atingir os objetivos acima mencionados, este estudo foi desenvolvido em três etapas. Inicialmente, apresentamos uma revisão histórica da litíase urinária e abordamos o papel da dieta na sua formação. Devido à escassa literatura disponível em nosso meio sobre a história da litíase urinária, consideramos importante fazer uma revisão mais aprofundada do assunto, e, para isto, utilizamos a brilhante revisão de Goldman e cols. (1990) e aquela publicada por Richet (1995).

Na primeira etapa deste trabalho, desenvolvemos um estudo piloto para validação de um modelo experimental de indução de hiperoxalúria que fosse estável, reprodutível e que não acarretasse o desenvolvimento de insuficiência renal.

Na segunda etapa, realizamos um novo estudo experimental, em que avaliamos o efeito de diferentes concentrações de cálcio da água na cristalúria oxalo-cálcica, utilizando o modelo escolhido na primeira fase.

A terceira etapa deste trabalho foi dedicada à avaliação das espécies de cristais urinários observados em habitantes da região de Fortaleza, numa tentativa de associá-los aos tipos morfológicos de cálculos encontrados nessa população. Apresentamos igualmente uma revisão sobre os cristais e cálculos mais freqüentes, suas características morfológicas e as principais implicações clínicas decorrentes de sua identificação. Na interpretação dos resultados de cristalúria e da tipagem morfológica dos cálculos urinários utilizamos os critérios estabelecidos por Daudon e cols. Este capítulo conta com ilustrações fotográficas de cristais e de alguns tipos de cálculos, obtidas a partir de nossa própria casuística ou gentilmente fornecidas por Daudon e cols.

2. HISTÓRICO

A litíase urinária é provavelmente tão antiga quanto a humanidade. Em 1901, Sir Grafton Elliot Smith descobriu um cálculo urinário misto de ácido úrico, oxalato de cálcio e fosfato amoníaco magnésiano entre os ossos pélvicos de um homem jovem na tumba pré-dinástica de El Amrah (7000-3100 a.C.), no Egito. Mukherjee e cols. analisando 1 500 esqueletos escavados na região de Jebel Moya, no Sudão, encontraram 32 (2,1%) cálculos urinários, sugerindo uma endemicidade nesta população. Desde então, inúmeros cálculos têm sido encontrados nas escavações arqueológicas [1].

Na bacia entre os rios Eufrates e Tigre, onde viveram os Mesopotâmios no 3º milênio a.C., a litíase urinária foi frequentemente mencionada nas tábuas cuneiformes. Acredita-se que os conhecimentos médicos dos antigos hindus tenham sido transmitidos por Buda e incorporados ao livro sagrado "Ayurveda". Estes conhecimentos foram posteriormente revelados à humanidade através do tratado "Susruta Samhita" (5º século a.C.). Susruta descreveu quatro tipos de cálculos causados por flegma, bile, ar e sêmem: *"Quando o ar e flegma se encontram, um pequeno cálculo é formado, cresce em direção à saída da bexiga e impede o fluxo de saída da urina. O paciente torturado range os dentes, pressiona o seu abdome e fricciona o seu pênis. Urina, flatus e fezes são eliminados durante as dores severas. Em tais casos, o cálculo é escuro, rugoso, irregular e coberto de espículas"* [1].

Embora Ammonius de Alexandria, apelidado de Lithotomus, tenha praticado litotomia perineal cerca de 200 a.C., a primeira descrição detalhada desta operação foi feita pelo romano Celsus no século I d.C. [1].

A relação entre infecção urinária e cálculo voluminoso e ramificado é

conhecida desde a observação feita por Hipócrates (século V a.C.), de que abscesso pútrido da região lombar era frequentemente associado a cálculo renal [2,3].

No período medieval, a litotomia era o único tratamento efetivo para a litíase e os sofrendores se submetiam a esta cirurgia, apesar dos conhecimentos de anestesia se limitarem ao álcool e à mandrágora [1].

A litíase urinária tem causado grande sofrimento a proeminentes figuras da história. No século XVIII, Dionis durante um curso de cirurgia, descrevia os cálculos coraliformes encontrados na autópsia do Papa Inocêncio XI [4]. O humanista Erasmus, o religioso reformador John Calvin, o cientista Benjamin Franklin e o médico Thomas Sydenham foram acometidos de gota e litíase de ácido úrico [5].

Jean-Baptiste van Helmont (1579-1644) foi o primeiro a sugerir que a formação de cálculo resultava da excreção de material anormal na urina. Helmont propôs que a formação de um núcleo e o progressivo crescimento do cálculo eram dependentes da presença de um *fermento*, que causava decomposição da urina [1].

Lorenz Bellini (1643-1704) estudou o papel da água na formação dos cálculos. Ele observou que resíduos urinários obtidos a partir da evaporação seriam redissolvidos em água, sugerindo que os cálculos poderiam ser dispersos através do aumento do fluxo urinário.

Karl Wilhelm Scheele (1742-1786), em 1776, foi o primeiro a isolar o ácido úrico de um cálculo e a estabelecer que aquele era um constituinte normal da urina humana [6].

Felix Vicq D'Azyr (1748-1794) levantou a possibilidade de que os

cálculos de ácido úrico eram devidos à hiperconcentração urinária, já que a urina do homem sempre continha ácido úrico, independente da presença de cálculo [6].

George Pearson (1751-1828), em 1795, apresentou um trabalho na *Royal Society*, em Londres, onde analisou 300 cálculos urinários. Pearson mostrou que quase todos os cálculos (194 de 200) continham ácido úrico em proporções variadas. Os outros constituintes eram sais de cálcio ou amônio, particularmente fosfatos, *além de existir alguma matéria animal* [6].

Fourcroy foi provavelmente o primeiro a realizar uma investigação médica multicêntrica eficiente. Este cientista solicitou a seus colegas que enviassem cálculos urinários, juntamente com informações relacionadas à configuração geológica da região e pH urinário. Em 1802, publicou os resultados obtidos da análise de mais de 700 cálculos, sendo 600 de origem vesical. Os sete constituintes encontrados nos cálculos urinários humanos foram separados em três grupos: (i) ácido úrico e seus sais de sódio e amônio; (ii) três sais minerais: fosfato de cálcio, fosfato amoníaco magnésiano e oxalato de cálcio; (iii) matéria animal referida como gelatina, a qual poderia agir como núcleo ou cimento. Pearson e Fourcroy assinalaram que a aparência externa do cálculo e sua superfície de corte eram relacionadas à sua composição química e que esta poderia freqüentemente ser identificada a olho nu. O núcleo central de um cálculo poderia conter matéria orgânica, cristal de ácido úrico ou de ácido oxálico, ou um corpo estranho. Os únicos cálculos que poderiam ser dissolvidos terapêuticamente eram aqueles feitos inteiramente de ácido úrico. Analisando cálculos encontrados em animais, Fourcroy mostrou que fatores exógenos, usualmente a dieta, poderiam ter influenciado a sua composição química [1,6].

Wollaston (1766-1826) muito contribuiu para a classificação dos cálculos urinários, através da identificação dos cristais de fosfato amoníaco magnésiano e de cistina. A partir de experimentos, este cientista levantou a hipótese de que o ácido oxálico poderia ser proveniente de vegetais contidos na dieta [6].

Em 1817, Alexander Marcet (1770-1822) publicou "*An Essay on the Chemical History and Medical Management of Calculus Disorders*", no qual enfatiza a importância da análise química e o valor de seccionar um cálculo para estudar a sua estrutura interna. Utilizando estes métodos, Marcet concluiu que os cálculos eram formados nos rins e migravam pelos ureteres. Através da determinação da concentração de íons hidrogênio dentro do cálculo, classificou-os de acordo com o estado ácido-básico. Desta forma, propôs tratar cálculos de cistina, ácido úrico e xantina com alcalinização da urina e dissolver cálculos de fosfato de cálcio e fosfato amoníaco magnésiano com ácido muriático ou sulfúrico. Marcet foi o primeiro investigador moderno a discutir a relação entre dieta e doença calculosa [1,6].

Em 1821, W. Prout (1795-1850) publicou "*An Enquiry into the Nature and Treatment of Gravel, Calculus and Other Diseases Connected with a Deranged Operation of the Urinary Organs*", onde concentrou sua atenção no sedimento urinário e propôs que a presença de areia, cascalho e cálculo eram variações da mesma doença. Este pesquisador documentou o efeito da variação do pH na coloração do sedimento urinário [6].

Em 1923, Keyser relatou os resultados de estudos experimentais sobre o efeito da administração de dieta contendo alto teor em oxalato e cálcio, na formação de cristalúria e cálculo [1,6].

Na década de noventa, novas descobertas permitiram um avanço

importante na compreensão e tratamento da doença calculosa.

Nos últimos trinta anos, inúmeras equipes de pesquisadores têm estudado o papel dos inibidores urinários na litogênese: inibidores da germinação, do crescimento cristalino, inibidores e estabilizadores da fase cristalina e inibidores da agregação [7].

Hiperoxalúria primária é uma doença hereditária autossômica recessiva, que se caracteriza pela produção excessiva de oxalato e glicolato. O aumento na síntese e excreção destes compostos leva à formação de litíase renal e nefrocalcinose, com conseqüente insuficiência renal. Uma vez que a função renal declina, pode ocorrer precipitação de oxalato de cálcio nos tecidos moles, com posterior disfunção dos órgãos afetados. A recidiva da doença no transplante renal é freqüente nas formas piridoxina-resistentes. Danpure e Jennings (1986) demonstraram que a enzima alanina:glioxilato aminotransferase (AGT) estava ausente em muitos pacientes com hiperoxalúria primária do tipo I. Pesquisas posteriores demonstraram que, nos indivíduos normais, esta enzima está localizada na fração peroxissomal das células hepáticas. Entretanto, alguns pacientes portadores de hiperoxalúria primária apresentavam um defeito na localização da enzima AGT, sendo detectada na fração mitocondrial, onde ela é inativa. A partir destes achados, transplante hepato-renal tem sido proposto para tratar os pacientes com formas graves de hiperoxalúria primária piridoxina-resistentes [8-10].

Desde 1960 físicos alemães pesquisavam a utilização dos princípios das ondas de choque na fragmentação de cálculos urinários. Em 1980 foi realizado em Munique o primeiro procedimento de litotripsia extracorpórea. Até maio de 1982, mais de 200 pacientes já haviam sido tratados por esta técnica [11].

2. O PAPEL DA DIETA NA LITÍASE URINÁRIA

Os conhecimentos sobre a localização dos cálculos no trato urinário, a sua natureza química, a idade de aparecimento da litíase e sua frequência evoluíram consideravelmente nos países industrializados a partir do século XX. Estudos epidemiológicos têm mostrado que 2 milhões de pessoas na França e mais de 25 milhões de pessoas na Europa são acometidas de litíase urinária. Com base em dados estatísticos, é previsto que aproximadamente 12% das pessoas formarão um cálculo ao longo de sua existência [12,13]. Esta progressão está provavelmente ligada a mudanças nos hábitos alimentares, caracterizadas por um aumento na ingestão de proteínas de origem animal, de purinas, alimentos ricos em oxalato, açúcar refinado, gordura, e sal, e na diminuição do consumo de fibras. Estas modificações nos hábitos alimentares, bem como a melhoria do nível sócio-econômico da sociedade em geral, poderiam explicar as alterações observadas no comportamento da litíase urinária nos países industrializados: (i) redução do número de crianças acometidas; (ii) o quase desaparecimento da litíase vesical endêmica; (iii) redução da prevalência de cálculos de ácido úrico e de fosfato; (iv) aumento da prevalência de litíase oxalo-cálcica em adultos e crianças; e, (v) aumento da prevalência de litíase urinária na mulher [14,15].

O oxalato de cálcio é o constituinte mais comum dos cálculos urinários, especialmente na litíase idiopática. A mais recente classificação proposta para estes pacientes introduziu mudanças no tratamento dietético da litíase cálcica.

Em 1953, Albright utilizou pela primeira vez o termo hipercalcúria idiopática, para designar os pacientes portadores de hipercalcúria normocalcêmica, associada à formação de cálculos de cálcio sem uma causa

conhecida.

Em 1974, Pak e sua equipe propuseram uma classificação fisiopatológica da litíase oxalo-cálcica idiopática baseada no teste de sobrecarga oral em cálcio: (i) hipercalciúria absorptiva de tipos I, II e III; (ii) hipercalciúria renal; (iii) hipercalciúria reabsortiva [16]. Desde então, pacientes classificados como tendo hipercalciúria absorptiva do tipo II foram orientados a adotar uma dieta alimentar reduzida em cálcio (400 mg/dia). Entretanto, inúmeros autores, incluindo o próprio Pak, têm encontrado dificuldades em diferenciar a hipercalciúria absorptiva da hipercalciúria renal em alguns pacientes, pois os valores do teste podem ser superponíveis. Além disso, Coe e cols. demonstraram que os indivíduos litiásicos portadores de hipercalciúria absorptiva podem apresentar um balanço de cálcio negativo [17].

Durante mais de 40 anos, a hipercalciúria tem sido a anormalidade metabólica mais freqüentemente encontrada nestes pacientes. Entretanto, alguns pacientes portadores de litíase oxalo-cálcica não apresentavam hipercalciúria ou mantinham a doença ativa, apesar da normalização na excreção do cálcio urinário. Mais recentemente, com o desenvolvimento das técnicas de dosagem do oxalato, a importância da hiperossalúria na patogenia da litíase oxalo-cálcica tem crescido e aberto novos campos de pesquisas [18-20].



OBJETIVOS



1. DEFINIÇÃO

Considerando o elevado custo da litíase urinária para a sociedade e a morbidade que ela acarreta, todos os esforços empregados nas pesquisas clínicas e experimentais ainda são limitados. Em decorrência disto, este trabalho se propõe a estudar alguns aspectos fisiopatogênicos da litíase urinária, tendo por objetivos:

1. Validar um modelo experimental de cristalúria oxalo-cálcica que seja estável, reprodutível e comparável àquela encontrada na hiperoxalúria moderada no homem;
2. Estudar a influência de diferentes teores em cálcio presentes na composição de três marcas comerciais de água, na formação da cristalúria oxalo-cálcica, em ratos alimentados com uma dieta moderadamente deficiente em cálcio (0,1%) ou com teor normal-alto (1,0%), antes e após sobrecarga em oxalato;
3. Avaliar o papel da cristalúria na prática clínica, através da análise dos tipos de cristais mais freqüentes na população da região de Fortaleza, atendidos no Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará, e correlacioná-las com os tipos morfológicos de cálculos urinários encontrados nesta população.

III. PARTE 1

Estudo Piloto

**VALIDAÇÃO DE MODELOS EXPERIMENTAIS
DE CRISTALÚRIA OXALO-CÁLCICA**

1. INTRODUÇÃO

A litogênese é um processo complexo que envolve uma alteração no equilíbrio entre os fatores promotores e os fatores inibidores da cristalização e do crescimento do cálculo. Dois principais aspectos da cristalização são reconhecidos: a termodinâmica e a cinética. A primeira analisa a supersaturação, que pode resultar na nucleação, e a segunda estuda a taxa de nucleação, de crescimento e de aglomeração de cristais [21].

Tendo-se em vista que a litíase oxalo-cálcica representa a maior causa de litíase urinária nos países industrializados, vários modelos animais têm sido utilizados para induzir a supersaturação em oxalato e/ou cálcio, e estudar fatores que possam inibir ou acentuar os mecanismos litogênicos.

A figura 1 mostra os mecanismos fisiopatológicos que podem acarretar aumento da excreção urinária de oxalato. Com base nestes mecanismos, têm sido desenvolvidos modelos experimentais, em animais, de indução de hiperoxalúria, sendo os mais estudados os modelos de: (i) administração de precursores de oxalato, tais como etileno glicol e ácido glioxílico; (ii) administração de ácido oxálico; (iii) dieta deficiente em piridoxina (vitamina B₆) [22-27].

A. Etileno glicol [$\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2\text{OH}$, PM 62 daltons] é um produto químico incolor, inodoro, solúvel em água, que tem inúmeras aplicações industriais. Tem sido empregado como anti-congelante de motor de carros, solvente de plásticos e de tintas, e na síntese de uma série de produtos químicos e farmacêuticos [28,29]. Desde a primeira descrição de intoxicação nos EUA, em 1930, inúmeros casos de ingestão acidental ou intencional têm sido descritos. O etileno glicol (EG) por si só tem baixa toxicidade. Entretanto, apesar de ser eliminado pela urina na forma inalterada, uma grande parcela deste álcool é submetida à metabolização hepática e renal, dando origem a CO_2 e a compostos altamente tóxicos, que têm sido responsabilizados pelo quadro clínico da intoxicação. Como mostra a figura 2, várias etapas podem ser distinguidas no metabolismo do EG [29].

a. **Produção de aldeído:** Glicolaldeído, glicolato e glioxilato são implicados na inibição de uma série de funções: fosforilação oxidativa, metabolismo da glicose, respiração, síntese protéica, replicação de ácido desoxirribonucléico (ADN), síntese de ácido ribonucléico (ARN) ribossomal, metabolismo da serotonina no sistema nervoso central [29].

b. **Produção de oxalato:** A produção de ácido oxálico é dose-dependente e tem sua importância relacionada à destruição tecidual acarretada pela deposição de cristais de oxalato de cálcio. Insuficiência renal aguda, devida à precipitação intrarenal de cristais, é freqüente. Cristais de oxalato de cálcio na forma octaédrica e cristais de oxalato de cálcio monohidratado (COM), particularmente na forma hexagonal simétrica, são os mais freqüentemente encontrados no sedimento urinário, sendo a hexagonal simétrica considerada como a forma mais típica da intoxicação pelo EG. Esses

cristais podem ser vistos na figura 3 [30-32].

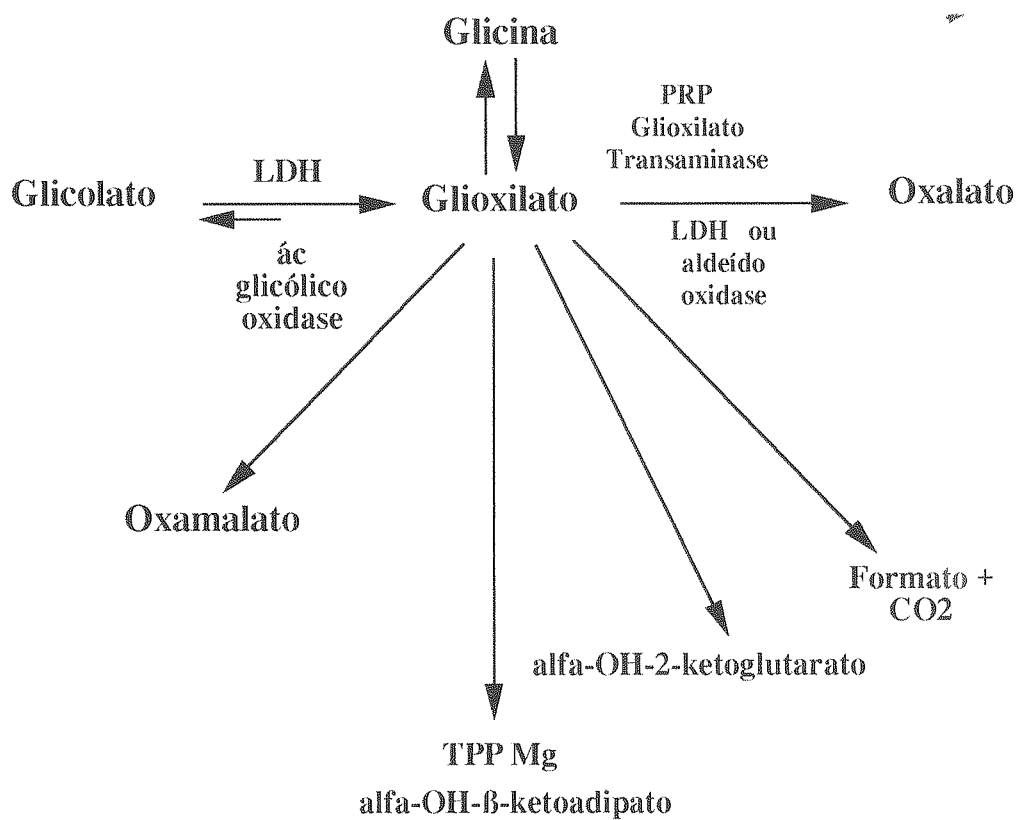
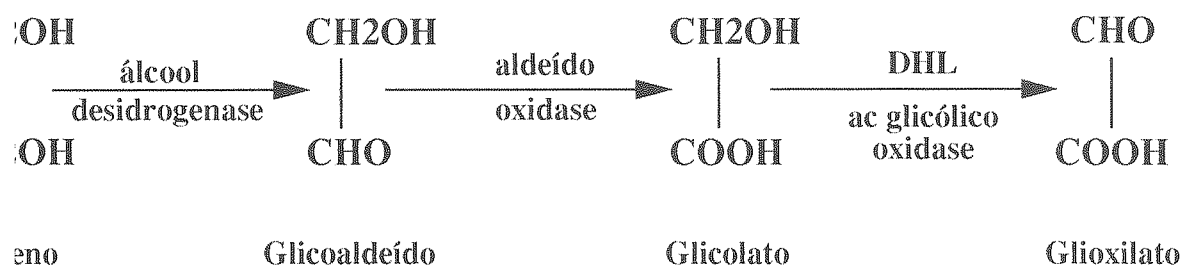


Figura 2. Metabolismo do etileno glicol



Figura 3. cristais de oxalato de cálcio monohidratado na forma hexagonal, simétrica e alongada, observados na intoxicação pelo etileno glicol.

c. **Utilização de co-fator:** O metabolismo do EG leva à formação de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), alterando a relação NADH: NAD e produzindo acidose láctica. Além disso, o glioxilato inibe o ciclo de ácido cítrico, aumentando a produção de lactato e piruvato, e diminuindo o consumo de O_2 e a produção de ATP (trifosfato adenosina). O fosfato de piridoxal (PRP) é um co-fator essencial na transaminação do glioxilato para glicina. Na intoxicação pelo EG, a concentração acentuada do glioxilato pode acarretar a deficiência relativa desta enzima, o que aumentaria ainda mais a produção de oxalato. O mesmo pode ocorrer com a pirofosfato de tiamina (TPP) na formação de 2-hidroxi- β -cetoacilato [29,33].

B. Oxalato de sódio. O ácido oxálico ($HOOC \cdot COOH$) é um ácido dicarboxílico com pK_{a1} de 1,23 e pK_{a2} de 4,19. Na sua forma livre, apresenta uma solubilidade de 8,7g/100g H_2O a $20^\circ C$. Esta solubilidade se mantém quando forma sais com o sódio e o potássio. Entretanto, os sais de oxalato de cálcio são quase insolúveis na variação fisiológica de pH urinário (0,67mg/100g H_2O a pH 7,0 e a $13^\circ C$) [33,34]. O óxido de magnésio apresenta uma solubilidade intermediária.

A produção endógena é responsável por 85% do oxalato excretado na urina, sendo 35% derivado do metabolismo oxidativo do ácido ascórbico e 40%, do metabolismo da glicina. Hidroxiprolina, serina, triptofano e aminoácidos aromáticos apresentam uma contribuição menor. Somente uma pequena parcela do oxalato eliminado na urina é proveniente da dieta. Estudos têm demonstrado que a absorção do oxalato no trato gastrointestinal ocorre através de um processo de difusão passiva, não saturável, sendo o principal sítio localizado no intestino grosso e, em menor escala, no intestino delgado

[35,36]. Entretanto, Freel, Hatch e cols., usando técnicas de segmento isolado de cólon de rato e de coelho, relataram a presença de transporte de oxalato e de cloro que foi bloqueado por um inibidor do transporte aniônico. Os autores sugeriram que o transporte de oxalato ocorria por um mecanismo dependente de energia e que o oxalato e o cloro apresentavam um sistema transportador comum [37].

O oxalato é eliminado quase que exclusivamente pela urina: é livremente filtrado pelo glomérulo e parece existir secreção ativa a nível de túbulo proximal, através de transporte mediado por carreador de alta e baixa afinidade. Não existe evidência de que o oxalato seja metabolizado nos mamíferos. É possível que uma pequena parcela do oxalato endógeno seja secretado na bile e se submeta a degradação bacteriana no trato gastrintestinal [34,38,39]. O sal de oxalato de cálcio se precipita na urina formando três tipos de cristais: oxalato de cálcio monohidratado, dihidratado, que podem ser vistos nas figuras 4a e 4b, e trihidratado. Esta última forma é vista somente em modelos experimentais ou na intoxicação pelo piridoxilato [40,41].

O modelo experimental de injeção intraperitoneal de oxalato de sódio tem sido utilizado por diversos autores para estudar as alterações renais decorrentes da sobrecarga em oxalato [42-44]. Khan e cols. sugerem que a cristalização se inicia no lúmen do túbulo proximal. A presença de cristais no interstício ocorre ocasionalmente após uma carga prolongada e poderia representar uma evolução da posição intraluminal para a intersticial [43].

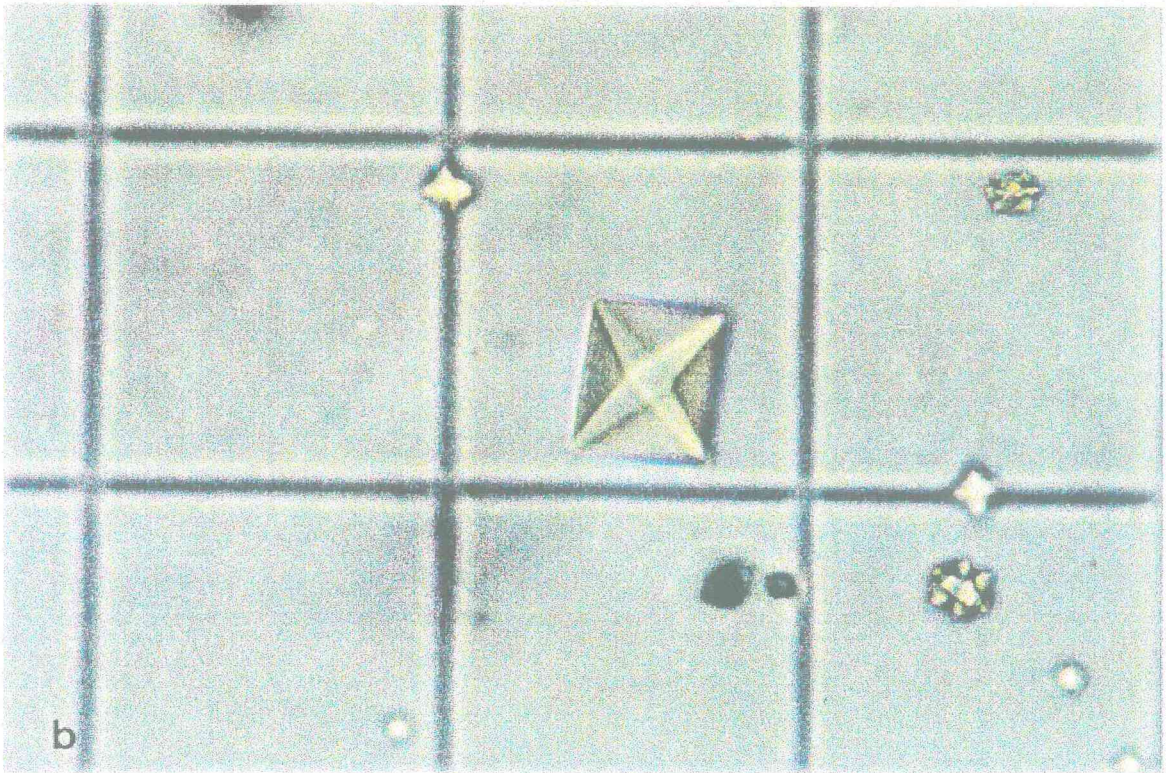


Figura 4. (a) cristais de oxalato de cálcio monohidratado; (b) cristais de oxalato de cálcio dihidratado na forma bipiramidal.

2. OBJETIVO

Reproduzir o modelo de hiperoxalúria moderada vista em humanos, utilizando um protocolo experimental, randomizado, aberto, controlado, de indução de cristalúria oxalo-cálcica que seja estável, reprodutível e não acarrete insuficiência renal ou nefrocalcinose. Para alcançar estes objetivos, utilizamos etileno glicol adicionado à água (0,5%, 1,0% e 2,0%) e oxalato de sódio adicionado à dieta (20 mg%, 40 mg% e 80 mg%), sendo os animais submetidos a uma dieta moderadamente pobre em cálcio (0,1%).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Selecionamos como agentes indutores de cristalúria o etileno glicol nas concentrações de 2,0%, 1,0% e 0,5%, e o oxalato de sódio nas concentrações de 80 mg%, 40 mg% e 20 mg%.

3. 1. Animais e dieta

Doze ratos Wistar AF, machos, pesando entre 380 a 400 g foram obtidos de IFFA CREDO, L'Arbresle, França. Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas e receberam um regime alimentar sintético moderadamente deficiente em Ca (0,1%) e água mineral contendo 78 mg/l de Ca (Evian®) *ad libitum*, durante 21 dias. A dieta continha 0,45% de sódio, 0,8% de fósforo e 2200 UI/kg de vitamina D₃. Os demais componentes são mostrados nas tabelas 1 e 2. A composição da água mineral Evian® é descrita na tabela 3. Após uma semana de adaptação à gaiola metabólica, os animais foram divididos em 6 grupos de 2 animais, que receberam etileno glicol (EG) adicionado à água ou oxalato de sódio (OxNa) misturado ao regime alimentar, durante um período de 15 dias: grupo I, EG 2,0%; grupo II, EG 1,0%; grupo III, EG 0,5%; grupo IV, OxNa 80 mg/100g; grupo V, OxNa 40 mg/100g; grupo VI, OxNa 20 mg/100g. Etileno glicol, lote n° E-9129, e oxalato de sódio (oxalic acid disodium salt), lote n° 58F0334, foram obtidos de SIGMA Chemical Company.

Tabela 1. Composição do regime alimentar sintético deficiente em Ca (0,1%)

COMPONENTES	g/kg
caseína, alto teor de proteína	300
sucrose	425,1016
farelo de milho	150
óleo de milho	60
vitaminas	10
sais minerais	13,369
fosfato de potássio monobásico	8,0844
carbonato de cálcio	2,485
cloreto de sódio	8,595

Tabela 2. Composição mineral do regime alimentar dos animais com dieta deficiente (0,1%) e normal em Ca (1,0%)

COMPONENTES	g/kg
cloreto de sódio	193,7325
citrato de potássio monohidratado	575,9615
sulfato de potássio	136,1363
óxido de magnésio	62,8322
carbonato manganoso	9,163
citrato férrico	15,708
carbonato de zinco	4,1888
carbonato cúprico	0,7854
iodeto de potássio	0,0262
selenito de sódio	0,0262
sulfato potássio crômio	1,4399

Tabela 3. Composição da água oferecida aos animais *

Composição	Evian®
pH	7,2
Sódio	5
Potássio	1
Cálcio	78
Magnésio	24
Bicarbonato	357
Cloro	4,5
Sulfato	10
Nitrato	3,8
Sílica	13,5
TOTAL	309

* A composição das águas minerais foi fornecida por Evian S.A.

* Valores expressos em mg/l

3. 2. Procedimento experimental

A quantidade de ração consumida, o volume de água ingerida e o volume urinário foram registrados diariamente. O ganho de peso corporal foi avaliado a cada 2 dias.

Análises bioquímicas séricas e urinárias, e cristalúria foram realizadas no início (dia 7) e no final (dia 21) do período experimental.

Cristalúria. Urina de 12 horas foi recolhida em recipientes contendo azida sódica (NaN_3 300 mg) para evitar proliferação bacteriana. Análise quantitativa e qualitativa dos cristais urinários foi realizada sob a Câmara de Malassez, com o auxílio de microscopia óptica com luz polarizada.

Bioquímica urinária. Urina de 24 horas foi coletada em recipiente contendo ácido clorídrico (HCl), centrifugada a 4 500 rpm durante 10 minutos, diluída em água bidestilada 1:5 e conservada a -50°C até o momento da análise. Dosagens de cálcio e oxalato foram realizadas no início e no final do experimento. O cálcio foi dosado pelo método de ortocresolftaleína, utilizando Hitachi 717 Autoanalyser (Boehringer Mannheim França); a oxalúria foi determinada pelo método enzimático de oxalato oxidase (Biorea Laboratory).

Bioquímica sangüínea. Os animais foram anestesiados com éter, e a veia subclávia foi puncionada para coleta de 500 μl de sangue. O sangue, coletado em tubos heparinizados, foi centrifugado a 4 500 rpm durante 10 minutos, o plasma separado e estocado a -50°C até o momento da análise. Dosagens de creatinina foram posteriormente realizadas, utilizando o método de Jaffé.

Análise radiológica. A pesquisa de calcificações em projeção do trato urinário foi feita no final do estudo, através de radiografia do animal sob anestesia com pentobarbital sódico, utilizando o método padrão (27 kV, 80 mAS). Devido à dificuldade em identificar concreções cálcicas no trajeto do trato urinário, pela presença das alças intestinais, optou-se por radiografar o rim após dissecação e análise cuidadosa do trato urinário para pesquisa de cálculos (23 kV, 16 mAS).

Análise histológica. No 15º dia do experimento, os animais foram anestesiados com éter e sacrificados por exsanguinação. Após a nefrectomia, um dos rins foi enviado para análise radiológica e o outro, seccionado em duas partes, para análise histológica. A primeira metade foi fixada em solução de Inboseq Brasil (Bouin alcoólico), embebida em mistura de parafina e paraplasto, e em seguida, corada com Tricromo de Masson e PAS. A outra metade foi pré-congelada em nitrogênio líquido e posteriormente congelada em isopentano. Secções de 3 μ , obtidas utilizando criostato, foram coradas com Von Kossa, para pesquisar a presença de depósitos de cálcio no tecido renal. Cada secção foi também examinada pela microscopia com luz polarizada.

Análise estatística. A análise dos dados é apresentada de modo descritivo, já que o pequeno número de amostras não permitiu realizar análise estatística. Quando necessário, os resultados foram expressos sob forma de média \pm erro médio padrão (SEM).

4. RESULTADOS

4. 1. Etileno glicol

Como mostrado na tabela 4, somente os animais que receberam etileno glicol na concentração de 0,5% completaram o estudo (ratos 5 e 6).

A dose diária de etileno glicol ingerida por estes dois animais não foi semelhante, sendo 43% mais elevada no rato 6 do que no rato 5 ($0,43 \pm 0,02$ vs $0,3 \pm 0,01$, respectivamente). A excreção de oxalato urinário aumentou após a adição de etileno glicol à água, e este aumento foi mais acentuado no rato que recebeu a maior carga deste álcool (Δ oxalúria de $+108,4 \mu\text{mol/d}$ no rato 6 e $\Delta +17,1 \mu\text{mol/d}$ no rato 5). Contrariamente, a sobrecarga em etileno glicol reduziu a excreção de cálcio urinário em ambos os animais (Δ calciúria de $-0,096 \text{ mmol/d}$ no rato 6 e $\Delta -0,064 \text{ mmol/d}$ no rato 5). A dosagem de creatinina sérica foi mais elevada no rato 6 do que no rato 5 (63 e $47 \mu\text{mol/l}$, respectivamente).

A análise cristalográfica da urina realizada antes da adição de etileno glicol à água revelou apenas raros microcristais polarizantes, em forma de grão, de $1-2 \mu$. Após a sobrecarga, cristais de oxalato de cálcio monohidratado (COM) de forma oval, cristais de COM de forma hexagonal, típica de intoxicação pelo etileno glicol, e cristais de oxalato de cálcio dihidratado (COD), foram observados. O rato n° 5 apresentou cristalúria maciça. A avaliação da cristalúria do rato 6 mostrou $194 \text{ cristais/mm}^3$ de COM de $8-24 \mu$, 2 cristais/mm^3 de forma hexagonal de 10μ , 6 cristais/mm^3 de COD de $5-8 \mu$, $129 \text{ cristais/mm}^3$ em forma de grão, e 8 agregados/mm^3 de $36-48 \mu$.

Não foi detectada nefrocalcinose nestes animais; porém, a análise histológica revelou a presença de discreta quantidade de cristais de oxalato de cálcio nos túbulos renais.

Os animais que receberam etileno glicol nas concentrações de 1% e 2% morreram antes de completar o estudo. Nefrocalcinose foi observada em todos eles e a análise histológica dos rins identificou grande quantidade de cristais de oxalato de cálcio nos túbulos, com necrose das células tubulares.

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos e alterações morfológicas renais nos animais que receberam etileno glicol (EG)

PARAMETROS		EG 2,0%		EG 1,0%		EG 0,5%	
		Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6
Dose diária EG *	<i>g/kg/d</i>	1,97 ± 0,29	2,13 ± 0,07	1,7 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,01	0,43 ± 0,02
Dose cumulativa EG	<i>g/kg</i>	3,9	4,3	6,9	6,7	4,7	6,5
Δ Oxalúria	<i>μmol/d</i>	†	†	†	4,7	17,1	108,4
Δ Calciúria	<i>mmol/d</i>	†	†	†	-0,026	-0,096	-0,064
Cr sérica pós-carga °	<i>μmol/l</i>	†	†	†	920	47	63
Nefrocalcinose		Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Histologia							
presença de cristais		+++	+++	+++	++++	+	+
necrose tubular		++	+++	++	++/+++	0	0
congestão vasc peritubular		++	++	++	++	+	+
fibrose intersticial		0	0	0	0	0	0
Dia do óbito		2	2	4	13 †	15	15

* Valores são expressos como média ± erro médio padrão

† = animais que morreram antes do completar o estudo; ° Cr = creatinina sérica após adição de etileno glicol

Δ = diferença entre o valor pós e pré-carga em oxalato de sódio

4. 2. Oxalato de sódio

Todos os animais que receberam dieta com adição de OxNa estavam vivos ao final do estudo. Conforme mostrado na tabela 5, a ingestão de água e o volume urinário aumentaram no 21º dia, sendo este aumento aparentemente maior nos animais do grupo OxNa 80 mg% e OxNa 40 mg% do que naqueles do grupo OxNa 20 mg%. O ganho de peso corporal foi menor nos ratos do grupo OxNa 80 mg%.

A dose cumulativa de OxNa foi proporcional à concentração do sal administrado na dieta (tabela 6). Após sobrecarga em oxalato, a excreção de oxalato na urina aumentou, e a de cálcio diminuiu. A magnitude destas alterações foi semelhante entre os animais do grupo OxNa 40 mg%, bem como entre aqueles do grupo OxNa 20 mg%. Entretanto, houve grande disparidade entre os animais do grupo OxNa 80 mg% (Δ oxalúria de 14,6 e 164 $\mu\text{mol/d}$; Δ calciúria de -0,072 e -0,117 mmol/d , nos ratos 7 e 8 respectivamente).

A análise inicial da cristalúria revelou apenas raros microcristais polarizantes em forma de grão, de 1-2 μ . Após a sobrecarga, cristais de COM na forma oval, cristais de COD, e microcristais polarizantes na forma de grão foram observados nos três grupos. Na urina dos animais do grupo OxNa 80 mg% foram encontrados 16 cristais/ mm^3 de COM de 8-16 μ , 10 cristais/ mm^3 de COD de 10-16 μ , 374 cristais/ mm^3 em forma de grão, 6 agregados/ mm^3 de 20-24 μ (Rato 7) e 16 cristais/ mm^3 de COM de 8-24 μ , 6 cristais/ mm^3 de COD de 10 μ , 160 cristais/ mm^3 em forma de grão e 4 agregados/ mm^3 de 34-40 μ (Rato 8). Na urina daqueles animais com sobrecarga de OxNa 40 mg% foram observados 4 cristais/ mm^3 de COM de

4-10 μ , 10 cristais/ mm^3 de COD de 10 μ , 28 cristais/ mm^3 em forma de grão (Rato 9) e 8 cristais/ mm^3 de COM de 7-8 μ , 4 cristais/ mm^3 de COD de 8-10 μ , 16 cristais/ mm^3 em forma de grão (Rato 10). A análise da urina dos animais do grupo OxNa 20 mg% mostrou 2 cristais/ mm^3 de COM de 4-8 μ , 46 cristais/ mm^3 em forma de grão, 2 agregados/ mm^3 de 16 μ (Rato 11) e 2 cristais/ mm^3 de COM de 4-8 μ , 2 cristais/ mm^3 de COD de 4 μ , 78 cristais/ mm^3 em forma de grão (Rato 12).

Embora não se tenha observado insuficiência renal, nefrocalcinose ou precipitação de cristais intra-tubulares em qualquer animal dos três grupos, o Rato 7, que recebeu OxNa na concentração de 80 mg%, apresentou hematúria macroscópica no 13º dia. Na dissecação do trato urinário não foi constatada presença de cálculo.

Tabela 5. Parâmetros biológicos dos animais segundo os teores em oxalato de sódio da dieta

Parâmetros	ANTES DA CARGA (dia 7)			CARGA EM OxNa (dia 21)		
	80 mg % (n=2)	40 mg % (n=2)	20 mg % (n=2)	80 mg % (n=2)	40 mg % (n=2)	20 mg % (n=2)
ração ingerida (g)	21,5 ± 1,0	27,5 ± 8,0	26 ± 1	23,8 ± 1,6	20,9 ± 3,0	25,7 ± 1,7
peso corporal (g)	454 ± 9	436 ± 11	429 ± 6	463 ± 17	474 ± 12	477 ± 11
ingesta de água (ml)	32,2 ± 0,9	47,9 ± 20	32 ± 2	59,8 ± 1,7	82,3 ± 14,5	47,2 ± 4,9
volume urinário (ml)	21,5 ± 0,2	42,7 ± 18,5	24,7 ± 1,6	51,0 ± 2,8	66,1 ± 2,8	34,3 ± 3,8

Valores são expressos como média ± erro médio padrão

Tabela 6. Evolução da oxalúria, calciúria e função renal dos animais que receberam sobrecarga de oxalato de sódio na dieta

PARAMETROS		OxNa 80 mg %		OxNa 40 mg %		OxNa 20 mg %	
		Rato 7	Rato 8	Rato 9	Rato 10	Rato 11	Rato 12
Dose diária Ox *	<i>g/kg/d</i>	35 ± 1	30 ± 1,3	19 ± 0,6	18 ± 1	10 ± 0,2	11 ± 0,3
Dose cumulativa Ox	<i>g/kg</i>	524	449	280	272	150	162
Δ Oxalúria	<i>μmol/d</i>	14,6	164	37,9	34	17,4	19,7
Δ Calciúria	<i>mmol/d</i>	-0,072	-0,117	-0,052	-0,031	-0,037	-0,042
Cr sérica pós-carga °	<i>μmol/l</i>	53	51	37	45	43	38
Nefrocalcinose		Não	Não	Não	Não	Não	Não
Cristais túbulos renais		Não	Não	Não	Não	Não	Não
Dia do óbito		15	15	15	15	15	15

* Valores são expressos como média ± erro médio padrão; ° Cr = creatinina sérica após sobrecarga em oxalato de sódio

OxNa = oxalato de sódio; Ox = oxalato; Δ = diferença entre o valor pós e pré-carga em OxNa

5. DISCUSSÃO

Entre os diversos modelos experimentais de nefrolitíase oxalo-cálcica, escolhemos o etileno glicol e o oxalato de sódio para induzir hiperoxalúria e estudar a eliminação de cristais de oxalato de cálcio na urina.

O etileno glicol foi utilizado por ser uma droga de fácil administração, graças ao seu gosto suave e a sua solubilidade em água. Diversos estudos mostraram que a toxicidade deste álcool é dependente da espécie e do sexo do animal, sendo os machos mais suscetíveis do que as fêmeas. Esta suscetibilidade aumentada é, provavelmente, devida à maior eficiência que os machos apresentam em converter o etileno glicol em metabólitos tóxicos, associada a uma incidência mais elevada de nefropatia espontânea [45]. A dose oral letal mínima do etileno glicol para os ratos varia de 5,5 a 7,7 g/kg [46,47]. Em nosso estudo, os animais que receberam etileno glicol a 2,0% morreram nas primeiras 48 horas. Este resultado é surpreendente, considerando que a dose acumulada recebida pelos animais (3,9 e 4,3 g/kg) foi inferior à dose letal descrita na literatura. É possível que uma carga inicial maior pudesse explicar esta toxicidade ($1,97 \pm 0,29$ e $2,13 \pm 0,07$ g/kg/d), porém outros autores utilizaram o etileno glicol nas concentrações de 2,0% e 2,5%, por tempo mais prolongado, sem observar este nível de toxicidade [45,48]. Da mesma forma, os animais do nosso estudo que receberam etileno glicol a 1,0% morreram antes do término do experimento (4º e 13º dia, respectivamente). Resultados discrepantes são relatados na literatura com o uso de etileno glicol a 1,0%. Rushton e cols. não observaram precipitação de cristais intratubulares após 11 dias de etileno glicol a 1,0%; precipitação de cristais de oxalato de cálcio apareceram, em pequena quantidade, após duas

semanas de estudo e somente se tornou extensa após 4 a 5 semanas, com formação de cálculos fixados à papila [49,50]. Lyon e cols. mostraram que dos 18 ratos Sprague Dawley machos, que receberam etileno glicol a 1,0%, durante 4 semanas, somente 1 morreu antes de terminar o estudo. Entretanto, quando a urina era acidificada com cloreto de amônio, esta mortalidade aumentava para 11, sem que o autor pudesse explicar o efeito da acidificação sobre a toxicidade do etileno glicol [51]. Cifuentes e cols. utilizaram 60 ratos Wistar machos, que receberam etileno glicol a 1,0% durante 6 semanas, para estudar o efeito do magnésio administrado na forma de sal acidificante ($MgCl_2$ 2,0%) ou sal alcalinizante (MgO 2,0% e MgO 3,0%). Os resultados mostram que 8 dos 20 ratos que receberam $MgCl_2$ a 2,0% adicionado à dieta morreram, sendo 6 (30%) na primeira semana de estudo. Nefrocalcinose foi detectada em 100% dos animais. Nenhum rato que ingeriu dieta enriquecida com óxido de magnésio morreu e apenas os animais que receberam dieta com menor teor deste sal apresentaram nefrocalcinose (65%) [52].

Nós não temos uma explicação para a gravidade da toxicidade do etileno glicol, nas concentrações de 1,0% e 2,0%, encontrada em nosso estudo, quando comparamos com a literatura. Porém, é possível que, assim como existe diferença na metabolização do etileno glicol entre as espécies de animais e entre os sexos, o mesmo fenômeno possa ser observado entre os animais de uma mesma espécie. Além disso, como foi demonstrado, variações na composição da dieta e no grau de acidez urinária podem interferir na resposta dos animais a uma mesma carga de etileno glicol.

Os dois animais que ingeriram etileno glicol a 0,5% estavam vivos ao final do estudo. Não obstante, não consideramos que este modelo de hiperoxalúria preencha nossos requisitos pelos seguintes motivos: (i) a carga

de etileno glicol ingerida foi 43% mais elevada em um dos animais. Esta diferença se deve a um maior consumo de água observado ao final do estudo, fato também observado com o volume urinário. Como a capacidade de concentração urinária não foi avaliada, não podemos afirmar se esta diferença se deve à presença de lesão tubular, com conseqüente poliúria, ou a diferenças na aceitação de água pelo animal. Este mesmo fenômeno foi relatado por outros autores [53]; (ii) a presença de nefrotoxicidade em um dos animais, como evidenciada pela elevação da creatinina sérica; e, (iii) diferenças na quantidade de cristais eliminados na urina sugerem a falta de reprodutibilidade do modelo.

O segundo modelo de hiperoxalúria que utilizamos foi o de sobrecarga oral de oxalato de sódio no rato. Estudos experimentais mostram que o metabolismo do oxalato neste animal é semelhante ao do homem, com 15% do oxalato da dieta sendo absorvido pelo intestino, através de um processo de simples difusão passiva. O cólon parece ser o maior sítio de absorção intestinal [35,54]. Além disso, a urolitíase espontânea é um fenômeno raro no rato, especialmente aquela causada por oxalato de cálcio [55]. Escolhemos a via de administração oral, ao invés da intraperitoneal, porque esta via leva em consideração a interação do oxalato com outros fatores da dieta, presentes na luz intestinal. Além disso, o oxalato de sódio administrado por via intraperitoneal é rapidamente absorvido, resultando em maior saturação urinária e formação de cristais de oxalato de cálcio tão precoce quanto 15 minutos [56,57].

A sobrecarga em oxalato de sódio aumentou a excreção urinária de oxalato e induziu a formação de cristais de oxalato de cálcio mono e dihidratado em todos os animais, sendo esta elevação proporcional à dose

administrada. Entretanto, houve disparidade na oxalúria de 24 horas dos animais do grupo recebendo OxNa 80 mg%, com um rato apresentando uma excreção onze vezes mais elevada do que o outro. Embora não se tenha observado nefrocalcinose ou precipitação de cristais de oxalato de cálcio intratubular em nenhum animal dos três grupos, aqueles que receberam 80 mg% de oxalato de sódio na dieta, apresentaram uma creatinina sérica mais elevada que os demais, e um deles apresentou hematúria macroscópica. Todos os animais apresentaram um aumento na ingesta de água e no volume urinário no final do estudo, sendo este aumento mais acentuado nos ratos do grupo OxNa 40 mg%. Este fenômeno não pode ser explicado, uma vez que não avaliamos a capacidade de concentração urinária. Entretanto, provavelmente não houve lesão renal importante nos animais dos grupos OxNa 40 mg% e OxNa 20 mg%, uma vez que não foram observadas precipitação de cristais intratubulares, eliminação maciça de cristais ou elevação da creatinina plasmática.

A sobrecarga em oxalato de sódio na dieta parece modificar a excreção de cálcio urinário, sendo observada uma redução da calciúria em todos os animais. Esta interação do oxalato com o cálcio da dieta já foi relatada por outros autores e tem aumentado a discussão em torno do papel da dieta na litíase oxalo-cálcica [58].

Este modelo animal de indução de hiperoxalúria, através da administração de baixas doses de OxNa na dieta, reproduz a hiperoxalúria moderada observada no homem e fornece um modelo adequado para estudar as interações dos diversos componentes da dieta na litíase oxalo-cálcica.

6. CONCLUSÕES

(1) O etileno glicol é um agente indutor de cristalúria oxalo-cálcica, porém apresenta toxicidade importante nas concentrações de 2,0% e 1,0%, e nefrotoxicidade mesmo na concentração de 0,5%, o que constitui fator limitante para sua utilização em modelos experimentais. É possível que essa toxicidade seja variável em função das diferentes cepas de animais;

(2) O modelo experimental de indução de hiperoxalúria utilizando sobrecarga em oxalato de sódio na dieta, nas concentrações de 40 mg% e 20 mg%, induz a formação de cristais de oxalato de cálcio na urina, sem acarretar nefrocalcinose ou insuficiência renal. Este modelo reproduz a hiperoxalúria moderada observada no homem e permite estudar a interação dos fatores dietéticos na litíase oxalo-cálcica. Hematúria macroscópica e discreta elevação da creatinina plasmática foram observados nos animais que receberam oxalato de sódio na concentração de 80 mg%;

(3) Com base nos dados obtidos neste experimento, concluímos que o modelo de sobrecarga oral em oxalato de sódio, na concentração de 20 mg%, mostrou-se mais adequado para estudar o efeito do teor em cálcio da água sobre a formação de cristais de oxalato de cálcio.

7. RESUMO

Este estudo experimental teve por objetivo validar um modelo de indução experimental de hiperoxalúria em animais, buscando-se um modelo de cristalúria oxalo-cálcica estável, reproduzível e que não acarretasse insuficiência renal. Doze ratos Wistar AF, adultos, machos foram submetidos a dieta deficiente em Ca (0,1%) e água mineral contendo 78 mg/l de cálcio (Evian®) *ad libitum*, durante 21 dias. Após uma semana de adaptação à gaiola metabólica, os animais foram divididos em 6 grupos de 2 animais, os quais receberam etileno glicol (EG) adicionado à água ou oxalato de sódio (OxNa) misturado ao regime alimentar, durante um período de 15 dias: grupo I, EG 2,0%; grupo II, EG 1,0%; grupo III, EG 0,5%; grupo IV, OxNa 80 mg/100g; grupo V, OxNa 40 mg/100g; grupo VI, OxNa 20 mg/100g. No 7º e 21º dias foram realizadas análises da cristalúria, dosagens de cálcio e de oxalato na urina de 24 horas, e de creatinina no plasma. No final do estudo os animais foram sacrificados, tendo o trato urinário sido cuidadosamente dissecado para pesquisa de cálculos, e os rins retirados para análise radiológica e histológica. Os animais que receberam EG nas concentrações de 2,0% e 1,0% morreram antes de completar o estudo. Naqueles que receberam EG 0,5%, foi observado um aumento na oxalúria e uma redução na calciúria, além de um discreto aumento na creatinina plasmática. A cristalúria destes animais revelou cristais de COM e COD, havendo porém grande diferença no número de cristais eliminados pelos animais. O exame histológico mostrou discreta quantidade de cristais no parênquima renal. Nos animais que receberam OxNa na dieta, esta sobrecarga acarretou aumento na oxalúria e redução na calciúria, bem como formação de cristais de COM e COD em todos os grupos. Contudo, a magnitude destas alterações foi mais estável nos animais que receberam OxNa a 20 mg%. Nos ratos que receberam sobrecarga de oxalato na dieta, nenhum caso de insuficiência renal, nefrocalcinose ou precipitação de cristais no parênquima renal foi observado. Com base nos dados obtidos neste experimento, concluímos que o modelo de sobrecarga oral em OxNa, na concentração de 20 mg%, mostrou-se mais adequado para estudar o efeito do teor de cálcio da água na formação de cristais de oxalato de cálcio.

IV. PARTE 2

INFLUÊNCIA DO TEOR DE CÁLCIO DA ÁGUA
SOBRE A FORMAÇÃO DE CRISTAIS DE
OXALATO DE CÁLCIO, EM ANIMAIS
SUBMETIDOS A SOBRECARGA ORAL DE
OXALATO.

1. INTRODUÇÃO

A ingesta de fluido tem um papel importante na formação e prevenção de litíase renal, através da diluição urinária e conseqüente redução na saturação dos sais presentes na urina [59]. Porém, não somente a quantidade de líquidos ingeridos, mas também a sua natureza pode interferir nos mecanismos litogênicos. A dureza da água, expressa em dH^o, é determinada pela concentração de cálcio e magnésio que esta contém (1 dH^o equivale a 7,1 mg/l de cálcio e 4,3 mg/l de magnésio) [60]. A influência da dureza da água na formação de cálculos urinários no homem é um assunto controverso. Enquanto correlações negativas têm sido demonstradas nos EUA [61,62], em algumas regiões da Grã Bretanha [63], Tchecoslováquia [64], Finlândia [60], e da Tunísia [65], outros estudos não encontraram nenhuma correlação significativa [66-69]. Nos estudos mostrando correlação negativa, a incidência de litíase renal, avaliada pela taxa de admissões hospitalares, foi maior nas regiões de água branda do que naquelas de água dura. Dauncey e cols. analisaram amostras de urina de 157 homens que habitavam em Londres, região abastecida com água dura, e 196 homens de algumas regiões inglesas, cuja água apresentava baixo teor em cálcio e magnésio. Estes autores não encontraram diferença significativa na excreção urinária de cálcio, magnésio e de creatinina entre os habitantes destas duas regiões [70]. Esta discrepância nos resultados pode ter sido gerada por erros inerentes aos métodos epidemiológicos utilizados: (i) a taxa de admissões hospitalares pode ter sido um pobre indicador da verdadeira incidência de cálculos urinários, pois não considera os pacientes portadores de litíase renal que não requerem hospitalização; (ii) a recusa de muitos hospitais e pacientes em participar do

estudo e as possíveis diferenças locais de indicação de hospitalização, podem ter introduzido um vício de seleção; (iii) além da ingestão de água, outros líquidos tais como refrigerantes e bebidas alcoólicas podem ter sido consumidos em quantidades suficientes para influenciar a formação de cálculos. [Shuster e cols. demonstraram que a ingestão de cerveja e café parece estar associada negativamente com a prevalência de litíase nas Regiões Rochosas dos EUA, enquanto que associação positiva foi encontrada com a ingestão de soda nas Carolinas do Norte e do Sul e nas Regiões Rochosas [71,72]]; (iv) em regiões recebendo água dura, filtros empregados no tratamento da água podem modificar o conteúdo mineral desta água consumida; (v) a análise da qualidade da água não obedeceu a um padrão uniforme; e, (vi) finalmente, diferenças nos hábitos alimentares de cada região podem influenciar os resultados obtidos [61].

Tendo em vista estas dificuldades, decidimos analisar com maior detalhe a relação entre a dureza da água e a eliminação de cristais de oxalato de cálcio, usando o modelo animal de indução de hiperoxalúria. Estudamos a influência de três marcas comerciais de água, contendo diferentes teores em Ca, na formação de cristais de oxalato de cálcio, em ratos alimentados com uma dieta moderadamente deficiente em Ca (0,1%) ou com teor normal-alto em Ca (1,0%), antes e após a adição de oxalato de sódio à dieta.

2. OBJETIVO

Estudar a influência da composição de três tipos de água, contendo diferentes teores em cálcio, na formação da cristalúria oxalo-cálcica, em ratos alimentados com uma dieta deficiente em Ca (0,1%) ou com teor normal-alto (1,0%), antes e após sobrecarga em oxalato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1. Animais e dieta

Dieta pobre em Ca (0,1%). Quarenta ratos Wistar AF, machos, pesando 300-360 g obtidos de IFFA CREDO, L'Arbresle, França, foram utilizados no experimento. Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas e receberam um regime alimentar sintético deficiente em Ca (0,1%) e água mineral *ad libitum*, durante 21 dias. A dieta continha 0,45% de sódio, 0,8% de fósforo e 2200 UI/kg de vitamina D₃. Os demais componentes são mostrados nas tabelas 1 e 2 (Parte 1).

Após uma semana de adaptação à gaiola metabólica, os animais foram divididos de modo randomizado em 3 grupos, que receberam uma das três seguintes marcas de água mineral: grupo I (n=13), Ca=222 mg/l, (Badoit ®); grupo II (n=14), Ca=467 mg/l, Contrexéville ®; e, grupo III (n=13), Ca=78 mg/l, Evian ®. A composição destas águas minerais é mostrada na tabela 7. Após 1 semana de adaptação, a dieta foi enriquecida com 20 mg/100 g de oxalato de sódio (OxNa).

Dieta normal em Ca (1,0%). Outra série de 25 ratos Wistar AF, machos, pesando 300 g (grupo I, n=9; grupo II, n=8; grupo III, n=8), foi submetida ao mesmo protocolo, sendo que o conteúdo de Ca da dieta era normal-alta (1%).

Table 7. Composição das diferentes marcas comerciais de água utilizadas no estudo *

Composição	Badoit®	Contrexéville®	Evian®
pH	6,1	7,1	7,2
Sódio	171	7	5
Potássio	11,6	3	1
Cálcio	222	467	78
Magnésio	92	84	24
Bicarbonato	1420	377	357
Cloro	59,5	7	4,5
Sulfato	50,5	1192	10
Nitrato	8,2	3,2	3,8
Sílica	37,5	8	13,5
TOTAL	1400	1850	309

Valores expressos em mg/l

* A composição das águas foi fornecida por Evian S. A. .

3. 2. Procedimento experimental

A quantidade de ração consumida, o volume de água ingerida e o volume urinário foram registrados diariamente, enquanto que o peso corporal foi avaliado a cada 2 dias. Análises bioquímicas plasmáticas e urinárias, e cristalúria foram realizadas no início (dia 7) e no final (dia 21) do período experimental. Os animais foram anestesiados com éter e a veia subclávia foi puncionada para coleta de 500 µl de sangue, para dosagem de creatinina, cálcio, fósforo, uréia e proteínas. O sangue, coletado em tubos heparinizados, foi centrifugado a 4 500 rpm durante 10 minutos e o plasma estocado a -50 °C até o momento da análise. As amostras de urina de 24 horas foram acidificadas com HCl, centrifugadas a 4 500 rpm durante 10 minutos, diluídas em água bidestilada 1:5 e estocadas a -50°C até o momento da análise.

Bioquímica plasmática e urinária. Creatinina, uréia, cálcio, fósforo e sódio urinários foram dosados pela metodologia do Hitachi 717 Autoanalyser. Creatinina, uréia, cálcio, fósforo e proteínas plasmáticos foram dosados utilizando a mesma técnica. Oxalato urinário foi determinado pelo método enzimático usando oxalato oxidase (Biorea Laboratory). A concentração de magnésio foi determinada através de espectrofotometria de absorção atômica (Philips, PU 900) e a de sulfato urinário pela técnica turbidimétrica utilizando RA 1000. A atividade das enzimas urinárias gama-glutamiltanspeptidase (GGT) [EC 2.3.2.2], e alanina aminopeptidase (AAP) [EC 3.4.11.2] foi determinada e o resultado expresso em UI/mmol de creatinina. Com a finalidade de evitar perda da atividade destas enzimas com a congelação, a atividade da GGT e da AAP foi determinada no mesmo dia da coleta das amostras.

Determinação da cristalúria. A urina de 12 horas foi recolhida em recipientes contendo azida sódica (NaN_3 , 300 mg) para evitar a proliferação bacteriana. A análise quantitativa e qualitativa dos cristais urinários foi realizada sob a Câmara de Malassez, com o auxílio de microscopia óptica com luz polarizada. As amostras de urina contendo cristais de difícil identificação pela microscopia com luz polarizada foram filtradas em filtro Millipore de $0,22 \mu$. Os cristais filtrados foram secados à temperatura ambiente e posteriormente analisados pela espectrofotometria infra-vermelha (Espectrofotômetro PERKIN-ELMER modelo 683, com comprimento de ondas variando de 2,5 à 50 microns, ou seja, 4000 à 200 cm^{-1}).

Dosagens de oxalato e de cálcio foram realizadas nestas amostras urinárias para determinação do produto molar oxalo-cálcico (pCaOx) e da razão molar oxalo-cálcica (Ca/Ox).

Análise radiológica e histológica. No 15º dia do experimento, os animais foram anestesiados com éter e sacrificados por exsanguinação. Um rim foi retirado para análise histológica e outro para análise radiológica. Na análise radiográfica dos rins foi utilizado o mesmo procedimento padronizado em nosso estudo piloto (23 kV, 16 mAS). O outro rim foi dividido em duas metades. A primeira metade foi fixada usando a solução de Dubosq Brasil (Bouin alcoólico), embebida em mistura de parafina e paraplasto e, em seguida, corada com Tricromo de Masson e PAS. A outra metade foi pré-congelada em nitrogênio líquido e posteriormente congelada em isopentano. Secções de 3μ foram obtidas utilizando criostato e coradas com Von Kossa, para pesquisar a presença de depósitos de Ca no tecido renal. Cada secção foi também examinada pela microscopia com luz polarizada.

Análise estatística. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando a análise de variância simples e repetida (ANOVA) e os resultados expressos sob a forma de média \pm erro médio padrão (SEM).

4. RESULTADOS

4. 1. Dieta deficiente em Ca (0,1%)

Parâmetros biológicos. Como mostrado na tabela 8, o ganho de peso, a ingesta alimentar e o volume urinário foram semelhantes nos três grupos. Entretanto, o consumo de água foi maior no grupo I ($p < 0,001$) do que nos demais. Da mesma forma que a ingesta alimentar, a sobrecarga em OxNa também foi semelhante: grupo I - $5,43 \pm 0,06$; grupo II - $5,40 \pm 0,06$; grupo III - $5,67 \pm 0,05$ mg/d. Estes parâmetros foram comparáveis durante todo o período do experimento, por esta razão mostramos apenas os resultados obtidos no 7° e 21° dias.

Cristalúria. O pH urinário aumentou no final do estudo nos três grupos (de $6,2 \pm 0,09$ para $6,4 \pm 0,05$ no grupo I, de $6,2 \pm 0,06$ para $6,3 \pm 0,05$ no grupo II, e de $6,1 \pm 0,05$ para $6,3 \pm 0,06$ no grupo III) ($p < 0,01$), porém não houve diferença entre os grupos. Durante o período de adaptação à gaiola metabólica, a análise da urina revelou a presença de cristais em forma de grão, de 1-2 μ , polarizantes, em quantidade insignificante. Entretanto, após a adição de OxNa à dieta, foram identificados 3 tipos de cristais. Estes foram classificados como cristais de oxalato de cálcio monohidratado (COM) de forma oval, cristais de oxalato de cálcio dihidratado (COD) e cristais em forma de grão de 1-2 μ , cuja identificação exata pela microscopia com luz polarizada não foi possível, devido ao seu pequeno tamanho. A análise destes cristais pela espectrofotometria infravermelha mostrou tratar-se de cristais de COM, COD ou carbapatita.

Cristais de COM, de forma oval, foram encontrados somente após

introdução de OxNa na dieta, com um número médio significativamente maior ($p < 0,01$) no grupo III ($16,7 \pm 4,5$ cristais/ mm^3) do que nos grupos I e II ($2,5 \pm 1,5$ e $4,1 \pm 1,5$ cristais/ mm^3 , respectivamente) (figura 5). Cristais COD não foram visualizados no início do experimento. Entretanto, cristais de COD de forma bipiramidal (octaedro) apareceram em quantidades semelhantes nos três grupos no final do estudo (grupo I - $1,47 \pm 0,65$; grupo II - $9,32 \pm 7,33$; e, grupo III - $4,93 \pm 1,47$ cristais/ mm^3) (figura 6). Agregados de cristais foram observados no final do estudo em alguns animais: grupo I - $2,3 \pm 3,3$; grupo II - $5,2 \pm 8,2$; e, grupo III - 10 ± 9 agregados/ mm^3 , sendo significativa a diferença entre os grupo I e III ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos quanto ao tamanho médio e máximo dos cristais, com cristais de COM de 8-10 μ , ocasionalmente atingindo 32 μ e cristais de COD de 5 a 10 μ .

Tabela 8. Parâmetros biológicos dos diferentes grupos de animais que receberam dieta deficiente em Ca (0,1%), antes e após sobrecarga em oxalato de sódio

Parâmetros	ANTES DA CARGA (dia 7)			CARGA EM OxNa (dia 21)		
	Grupo I Badoit (n=13)	Grupo II Contrexéville (n=14)	Grupo III Evian (n=13)	Grupo I Badoit (n=13)	Grupo II Contrexéville (n=14)	Grupo III Evian (n=13)
ração ingerida (g)	27,2 ± 1,1	24,9 ± 0,8	28,0 ± 0,9	27,0 ± 1,1	28,1 ± 0,6	28,6 ± 0,9
peso corporal (g)	366 ± 7	362 ± 8	370 ± 5	444 ± 8	435 ± 5	450 ± 7
ingesta de água (ml)	51,8 ± 4,2 *	32,2 ± 2,9	32,1 ± 1,8	57,3 ± 5,0 *	35,8 ± 3,0	29,5 ± 2,2
volume urinário (ml)	28,1 ± 3,4	22,5 ± 2,3	23,6 ± 1,7	30,2 ± 3,8	27,2 ± 2,6	22,1 ± 1,9

Valores expressos como média ± erro médio padrão

*p<0,001 entre o grupo indicado e os dois outros grupos

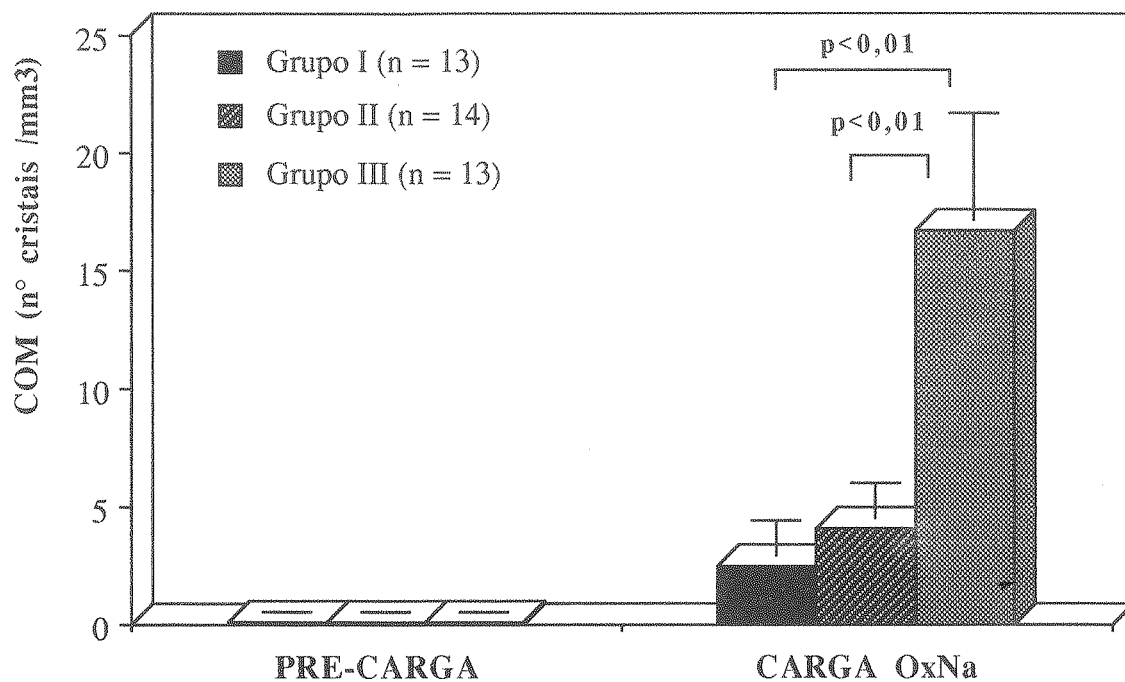


Figura 5. Eliminação de cristais de oxalato de cálcio monohidratado após sobrecarga em oxalato de sódio, nos animais que receberam dieta deficiente em Ca (0,1%).

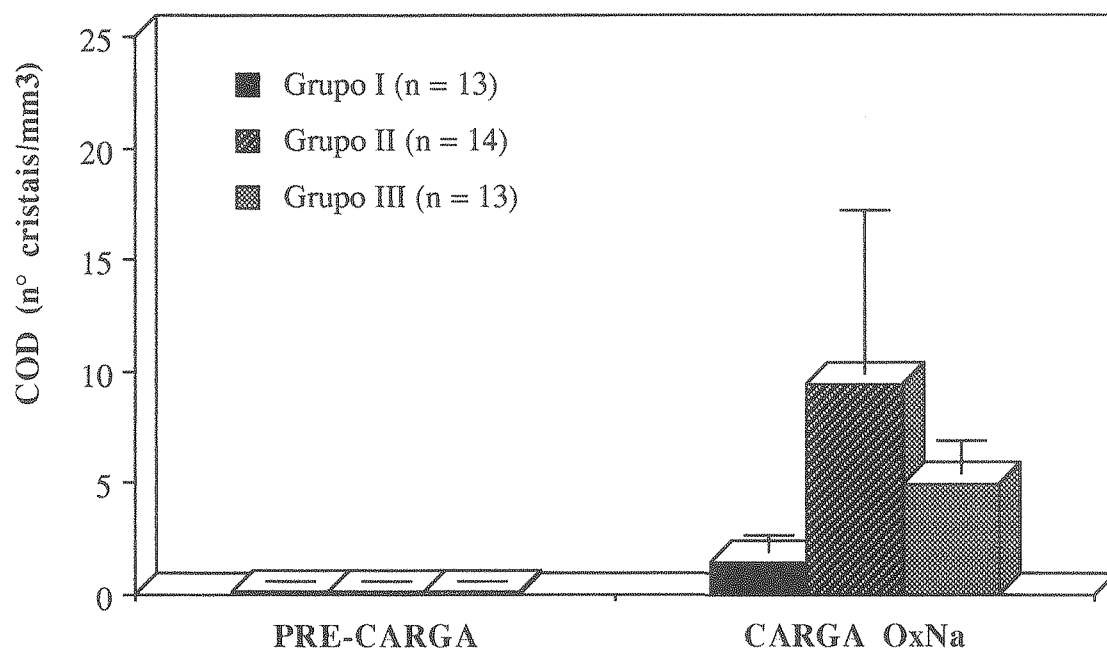


Figura 6. Eliminação de cristais de oxalato de cálcio dihidratado após sobrecarga em oxalato de sódio, nos animais que receberam dieta deficiente em Ca (0,1%).

Bioquímica urinária. Como mostrado na tabela 9, a concentração urinária de cálcio, oxalato, magnésio, fósforo, sódio, uréia e creatinina foi semelhante nos três grupos no início do experimento. A adição de OxNa à dieta alterou alguns destes parâmetros urinários. Foi observada diminuição na concentração de cálcio nos três grupos ($p < 0,001$), com o grupo II mostrando valor significativamente mais elevado ($p < 0,001$) que os demais: grupo I - $1,1 \pm 0,1$ mmol/l; grupo II - $2,3 \pm 0,3$ mmol/l; e, grupo III - $1,0 \pm 0,1$ mmol/l. A concentração de oxalato urinário aumentou nos três grupos ($p < 0,001$), com elevação mais acentuada no grupo III ($1,82 \pm 0,20$ mmol/l) do que no grupo I ($1,03 \pm 0,07$ mmol/l) ou no grupo II ($1,00 \pm 0,17$ mmol/l) ($p < 0,001$). As concentrações de magnésio e de fósforo diminuíram em todos os grupos ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente), embora tenham se mantido comparáveis entre eles. Nenhuma diferença foi observada em relação às concentrações de sódio, uréia e creatinina.

A tabela 10 mostra que o produto molar oxalo-cálcico ($pCaOx$) foi semelhante nos três grupos no início do estudo. A sobrecarga oral em OxNa acarretou diminuição destes valores ($p < 0,05$) de modo comparável entre eles. Do mesmo modo, a razão molar oxalo-cálcica (Ox/Ca) foi similar nos três grupos no início do experimento. Após introdução de OxNa na dieta, Ca/Ox diminuiu nos três grupos ($p < 0,001$), com valores significativamente mais altos no grupo II ($3,1 \pm 0,6$ mmol²) do que nos grupos I ($1,1 \pm 0,2$) e III ($0,6 \pm 0,06$ mmol²) ($p < 0,001$). A atividade das enzimas urinárias gama-glutamiltranspeptidase (GGT) e alanina aminopeptidase (AAP) era semelhante nos três grupos no início do experimento e a adição de OxNa na dieta acarretou aumento comparável da excreção da AAP entre eles: de $6,3 \pm 0,7$ para $9,6 \pm 1,3$ UI/creatinina no grupo I; de $5,4 \pm 0,5$ para $9,8 \pm 1,3$

UI/creatinina no grupo II; e, de $6,1 \pm 0,2$ para $10,8 \pm 1,4$ UI/creatinina no grupo III ($p < 0,001$). A excreção de GGT não se alterou com a sobrecarga em oxalato.

A tabela 11 mostra que a excreção urinária de cálcio, oxalato e magnésio foi semelhante nos três grupos no início do experimento e que estes valores foram modificados com a introdução de OxNa na dieta. A excreção urinária de oxalato aumentou em todos os grupos ($p < 0,01$), com valores mais altos no grupo III ($p < 0,01$) do que no grupo II: grupo I - de $16,3 \pm 2,0$ para $35,0 \pm 3,3$ $\mu\text{mol/d}$; grupo II - de $14,2 \pm 1,3$ para $24,7 \pm 1,7$ $\mu\text{mol/d}$; e, grupo III - de $16,6 \pm 1,2$ para $46,5 \pm 6,0$ $\mu\text{mol/d}$. A excreção urinária de cálcio diminuiu nos três grupos ($p < 0,001$), embora no grupo II os valores tenham se mantido significativamente mais altos (62 ± 12 $\mu\text{mol/d}$) do que no grupo I (33 ± 3 $\mu\text{mol/d}$) e no grupo III (23 ± 2 $\mu\text{mol/d}$) ($p < 0,01$). Da mesma maneira, a excreção urinária de magnésio diminuiu nos três grupos ($p < 0,001$), com valores significativamente menores no grupo III (209 ± 10 $\mu\text{mol/d}$) do que nos grupos I e II (252 ± 13 e 245 ± 12 $\mu\text{mol/d}$, respectivamente) ($p < 0,05$). A excreção urinária de fósforo foi mais alta no grupo III ($2,53 \pm 0,94$ mmol/d) do que no grupo II ($2,12 \pm 0,10$ mmol/d) ($p < 0,05$) no início do experimento. Os valores diminuíram nos três grupos após sobrecarga em OxNa ($p < 0,001$). Nenhuma diferença foi observada no final do estudo (grupo I - $2,11 \pm 0,09$; grupo II - $1,94 \pm 0,10$; e, grupo III - $2,12 \pm 0,12$ mmol/d). No início do experimento, a excreção urinária de sódio foi menor no grupo II ($3,7 \pm 0,22$ mmol/d) do que nos dois outros grupos (grupo I - $4,4 \pm 0,13$ e grupo III - $4,51 \pm 0,16$ mmol/d) ($p < 0,01$). A sobrecarga em OxNa diminuiu a excreção nos três grupos ($p < 0,001$), não

havendo diferença significativa entre eles no final do período experimental. A excreção urinária de creatinina foi semelhante nos três grupos antes e após a introdução de OxNa à dieta.

Tabela 9. Concentração, segundo o tipo de água administrada, dos constituintes urinários dos animais que receberam dieta deficiente em Ca (0,1%), antes e após sobrecarga em oxalato de sódio

URINA	ANTES DA CARGA (dia 7)			CARGA EM OxNa (dia 21)		
	Grupo I Badoit (n=13)	Grupo II Contrexéville (n=14)	Grupo III Evian (n=13)	Group I Badoit (n=13)	Group II Contrexéville (n=14)	Group III Evian (n=13)
(mmol/l)						
cálcio	2,9 ± 0,5	4,4 ± 0,6	3,8 ± 0,7	1,1 ± 0,1	2,3 ± 0,3 *	1,0 ± 0,1
oxalato	0,54 ± 0,03	0,64 ± 0,10	0,77 ± 0,16	1,03 ± 0,07	1,00 ± 0,17	1,82 ± 0,20 **
magnésio	11,0 ± 1,1	11,1 ± 1,0	10,9 ± 0,8	7,8 ± 0,7	9,0 ± 0,8	9,1 ± 0,9
fósforo	85 ± 9	96 ± 12	101 ± 7	67 ± 7	73 ± 9	94 ± 9
sódio	164 ± 15	164 ± 16	176 ± 12	135 ± 16	127 ± 18	174 ± 18
creatinina	3,67 ± 0,45	4,70 ± 0,78	3,83 ± 0,32	3,07 ± 0,47	3,13 ± 0,55	4,25 ± 0,45
uréia	1001 ± 102	1114 ± 114	1130 ± 83	781 ± 88	780 ± 116	1060 ± 103

Valores expressos como média ± erro médio padrão; * p<0,001 e ** p<0,01 entre o grupo indicado e os dois outros grupos

Tabela 10. Enzimúria, produto e razão molar oxalo-cálcica segundo o tipo de água administrada, dos animais que receberam dieta deficiente em Ca (0,1%), antes e após sobrecarga em oxalato de sódio

URINA	ANTES DA CARGA (dia 7)			CARGA EM OxNa (dia 21)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III
	Badoit (n=13)	Contrexéville (n=14)	Evian (n=13)	Badoit (n=13)	Contrexéville (n=14)	Evian (n=13)
AAP (UI/creat)	6,3 ± 0,7	5,4 ± 0,5	6,1 ± 0,2	9,6 ± 1,3	9,8 ± 1,3	10,8 ± 1,1
GGT (UI/creat)	93,5 ± 21,5	102,4 ± 11,0	92,6 ± 13,1	121,1 ± 10,3	103,6 ± 10,7	85,2 ± 8,1
pCaOx	1,6 ± 0,24	2,8 ± 0,53	2,9 ± 0,71	1,1 ± 0,2	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,4
Ca/Ox	5,8 ± 1,2	8,5 ± 1,4	6,4 ± 1,4	1,1 ± 0,2	3,1 ± 0,6 *	0,6 ± 0,06

Valores expressos como média ± erro médio padrão; * p<0,001 entre o grupo indicado e os dois outros grupos

pCaOx = produto molar oxalo-cálcico (mmol)²; Ca/Ox = razão molar oxalo-cálcica

AAP = alanina aminopeptidase; GGT = gama-glutamiltanspeptidase

Tabela 11. Excreção, segundo o tipo de água administrada, dos constituintes urinários dos animais que receberam dieta deficiente em Ca (0,1%), antes e após sobrecarga em oxalato de sódio

URINA	ANTES DA CARGA (dia 7)			CARGA EM OxNa (dia 21)		
	Grupo I Badoit (n=13)	Grupo II Contrexéville (n=14)	Grupo III Evian (n=13)	Grupo I Badoit (n=13)	Grupo II Contrexéville (n=14)	Grupo III Evian (n=13)
cálcio	74 ± 8	110 ± 15	97 ± 19	38 ± 3	62 ± 12 *	23 ± 2
oxalato	16,3 ± 2	14,2 ± 1,3	16,6 ± 1,2	35,0 ± 3,3	24,7 ± 1,7	46,5 ± 6,0 §
magnésio	290 ± 10	260 ± 20	280 ± 10	250 ± 10	250 ± 10	210 ± 10 *
creatinina	104 ± 14	106 ± 18	90 ± 7	94 ± 15	84 ± 16	95 ± 11
fósforo	2.250 ± 100	2.120 ± 100	2.530 ± 940 °	2.110 ± 90	1.940 ± 100	2120 ± 120
sódio	4.400 ± 130	3.730 ± 220 **	4.510 ± 160	4.200 ± 180	3.330 ± 350	3930 ± 297

Valores expressos como média ± erro médio padrão

* p<0,05 e ** p<0,01 entre o grupo indicado e os dois outros grupos; § p<0,01 e ° p<0,05 entre grupo III vs grupo II

Bioquímica plasmática. Como mostrado na tabela 12, a concentração plasmática de cálcio, fósforo, creatinina uréia e proteína foi semelhante nos três grupos no início do experimento. A sobrecarga em OxNa não alterou as concentrações de creatinina, proteínas e de cálcio. No entanto, a adição do regime hiperoxalúrico acarretou redução nas concentrações do fósforo e da uréia de modo comparável nos três grupos ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente).

Nenhum caso de insuficiência renal foi observado antes e após a introdução de OxNa na dieta, como demonstrado pelos valores do *clearance* de creatinina: grupo I - $2,05 \pm 0,12$ no início e $1,76 \pm 0,08$ no final; grupo II $2,00 \pm 0,09$ e $1,67 \pm 0,07$; e, grupo III - $1,72 \pm 0,07$ e $1,73 \pm 0,04$ ml/min).

Radiologia. A análise radiológica não revelou calcificações no parênquima renal de qualquer dos animais estudados.

Histologia. A análise histológica dos rins evidenciou dilatação de alguns túbulos corticais em um caso nos grupos II e III, depósitos de cálcio no lúmen tubular em dois ratos do grupo III, principalmente na medula, mas não se verificou qualquer lesão intersticial. No rim de um dos ratos do grupo I, havia necrose de células tubulares e túbulos corticais dilatados. Congestão de capilares glomerulares e peritubulares foi observada em quase todos os casos.

Tabela 12. Concentração, segundo o tipo de água administrada, dos constituintes plasmáticos dos animais que receberam dieta deficiente em Ca (0,1%), antes e após sobrecarga em oxalato de sódio

PLASMA	ANTES DA CARGA (dia 7)			CARGA EM O _x Na (dia 21)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III
	Badoit (n=13)	Contrexéville (n=14)	Evian (n=13)	Badoit (n=13)	Contrexéville (n=14)	Evian (n=13)
cálcio (mmol/l)	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,1
fósforo (mmol/l)	2,8 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1
creatinina (μmol/l)	34,8 ± 0,9	36,7 ± 1,4	36,4 ± 1,5	37,0 ± 1,2	35,4 ± 1,6	37,7 ± 1,5
uréia (mmol/l)	9,0 ± 0,3	9,3 ± 0,4	9,4 ± 0,4	8,5 ± 0,3	8,3 ± 0,3	8,7 ± 0,3
proteínas (g/l)	59,0 ± 1,4	61,0 ± 1,3	60,6 ± 1,6	61,0 ± 1,7	56,4 ± 1,4	59,5 ± 1,2

Valores expressos como média ± erro médio padrão

4. 2. Dieta normal em Ca (1,0%)

Parâmetros biológicos. Os resultados dos parâmetros biológicos desta série de animais são mostrados na tabela 13 e são semelhantes àqueles observados nos animais submetidos à dieta deficiente em Ca. Não houve diferença no ganho de peso, na quantidade de alimento ingerido e no volume urinário entre os grupos; entretanto, o consumo de água foi maior no grupo I do que nos demais ($p < 0,01$). Da mesma forma que a ingesta alimentar, a carga oral em oxalato também foi similar: grupo I - $6,11 \pm 0,08$; grupo II - $5,72 \pm 0,08$; e, grupo III - $6,16 \pm 0,10$ mg/d. Estes parâmetros foram comparáveis durante todo o período experimental, por esta razão mostramos apenas os resultados obtidos no 7° e 21° dias.

Cristalúria. O pH urinário foi semelhante entre os grupos no início e no final do período experimental (grupo I - $7,2 \pm 0,3$ vs $7,0 \pm 0,1$; grupo II - $6,6 \pm 0,1$ vs $6,9 \pm 0,2$; e, grupo III - $6,8 \pm 0,1$ vs $6,8 \pm 0,1$).

Cristais de COM na forma oval, com tamanho de 5-8 μ , foram observados na urina dos animais de todos os grupos somente após a sobrecarga em OxNa, e não houve diferença entre eles: grupo I - $1,16 \pm 0,9$; grupo II - $3,4 \pm 2,0$; e, grupo III - $1,7 \pm 0,8$ cristais/ mm^3) (figura 7). Cristais de COD não foram visualizados.

Tabela 13. Parâmetros biológicos dos diferentes grupos de animais que receberam dieta normal em Ca (1,0%), antes e após sobrecarga em oxalato de sódio

Parâmetros	ANTES DA CARGA (dia 7)			CARGA EM OxNa (dia 21)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III
	Badoit	Contrexéville	Evian	Badoit	Contrexéville	Evian
	(n=9)	(n=8)	(n=8)	(n=9)	(n=8)	(n=8)
ração ingerida (g)	30,1 ± 1,7	28,1 ± 1,2	28,6 ± 1,2	28,9 ± 1,3	25,5 ± 2,1	30,4 ± 1,5
peso corporal (g)	356 ± 6	350 ± 4	362 ± 4	449 ± 11	426 ± 10	447 ± 7
água ingerida (ml)	59,9 ± 8,0 *	31,2 ± 4,9	40,5 ± 4,3	62,2 ± 5,3 *	36,2 ± 7,1	45,5 ± 3,1
volume urinário (ml)	34,0 ± 6,0	21,3 ± 3,3	28,0 ± 3,1	36,7 ± 3,7	25,3 ± 4,7	30,3 ± 3,2

Valores expressos como média ± erro médio padrão; * p<0,01 entre o grupo indicado e os dois outros grupos

concentrações
nos três
ações
rês

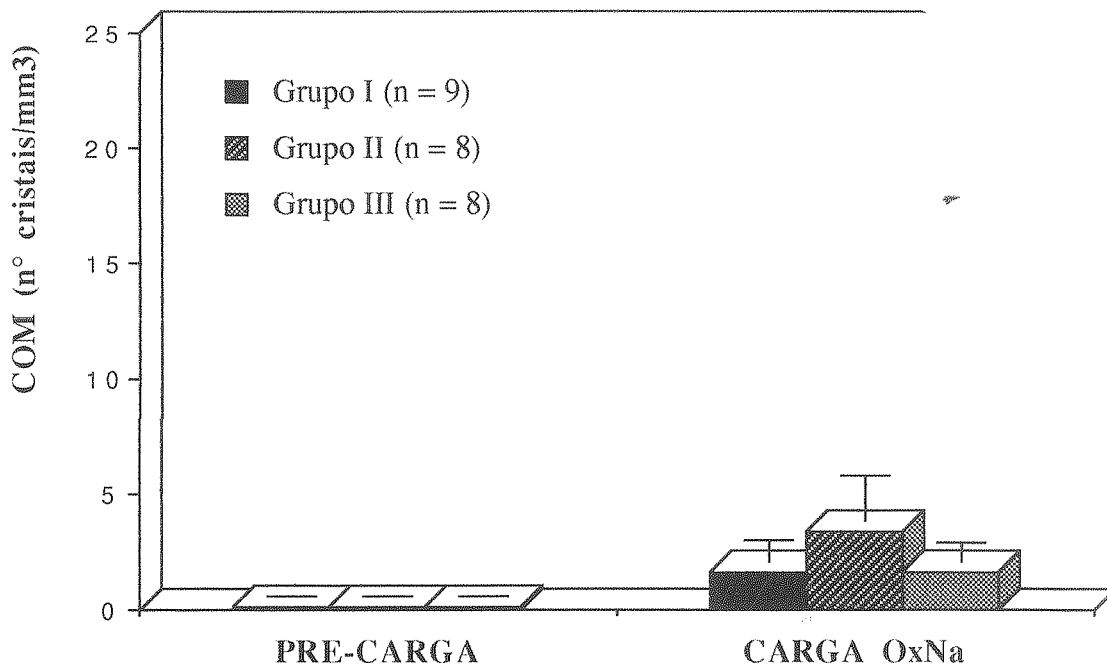


Figura 7. Eliminação de cristais de oxalato de cálcio monohidratado após sobrecarga em oxalato de sódio, nos animais que receberam dieta normal em Ca (1,0%).

Bioquímica urinária. Como mostrado na tabela 14, as concentrações de cálcio, oxalato, magnésio, fósforo e creatinina foram semelhantes nos três grupos no início do experimento. Após sobrecarga de OxNa, as concentrações urinárias de cálcio e de magnésio diminuíram de modo semelhante nos três grupos ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente), enquanto que as de oxalato, fósforo e creatinina não se alteraram. A concentração de sulfato urinário no início do experimento foi significativamente maior no grupo II ($61,0 \pm 4,6$ mmol/l) do que nos grupos I e III ($35,9 \pm 3,7$ e $37,3 \pm 6,1$ mmol/l, respectivamente). A sobrecarga em OxNa reduziu a concentração de sulfato urinário nos três grupos, de modo comparável: grupo I - $32,5 \pm 4,3$; grupo II - $44,9 \pm 3,8$; e, grupo III, $33,7 \pm 4,7$ mmol/l. O produto molar e a razão molar oxalo-cálcica foram semelhantes entre os grupos antes e após a adição de OxNa à dieta.

A tabela 15 mostra que a excreção urinária de cálcio, oxalato, magnésio, fósforo e creatinina foi semelhante nos três grupos no início do experimento e não foi alterada pela sobrecarga de OxNa. No início do experimento, a excreção de sulfato foi maior no grupo II ($1,52 \pm 0,11$ mmol/d) do que nos grupos I e III ($1,09 \pm 0,11$ e $1,08 \pm 0,1$ mmol/d, respectivamente) ($p < 0,01$). A adição de OxNa à dieta não modificou esta excreção: grupo I - $0,99 \pm 0,09$; grupo II - $1,38 \pm 0,14$; e, grupo III - $1,0 \pm 0,1$ mmol/d ($p < 0,01$).

Tabela 14. Concentração, segundo o tipo de água administrada, dos constituintes urinários dos animais que receberam dieta normal em Ca (1,0%), antes e após sobrecarga em oxalato de sódio

URINA	ANTES DA CARGA (dia 7)			CARGA EN OxNa (dia 21)		
	Grupo I Badoit (n=9)	Grupo II Contrexéville (n=8)	Grupo III Evian (n=8)	Grupo I Badoit (n=9)	Grupo II Contrexéville (n=8)	Grupo III Evian (n=8)
cálcio	5,2 ± 1,1	6,4 ± 0,7	5,7 ± 1,3	4,4 ± 0,7	5,0 ± 0,5	3,8 ± 0,6
oxalato	0,41 ± 0,04	0,45 ± 0,04	0,36 ± 0,02	0,43 ± 0,06	0,50 ± 0,07	0,41 ± 0,04
magnésio	5,7 ± 1,2	6,6 ± 0,7	5,1 ± 0,9	4,1 ± 0,5	5,0 ± 0,7	3,8 ± 0,4
fósforo	22,3 ± 2,1	35,0 ± 5,6	30,0 ± 4,9	25,8 ± 3,2	31,4 ± 6,0	28,8 ± 2,2
creatinina	4,1 ± 0,6	5,1 ± 0,7	4,0 ± 0,5	3,8 ± 0,6	4,7 ± 0,4	3,7 ± 0,4
sulfatos	35,9 ± 3,7	61,0 ± 4,6 *	37,3 ± 6,1	32,5 ± 4,3	44,9 ± 3,8	33,7 ± 4,7
pCaOx	2,0 ± 0,4	2,9 ± 0,4	2,0 ± 0,4	1,9 ± 0,5	2,3 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Ca/Ox	14,7 ± 3,6	15,3 ± 2,5	16,7 ± 4,2	11,8 ± 2,9	11,8 ± 2,3	10,1 ± 2,2

Valores expressos como média ± erro médio padrão; * p<0,01 entre o grupo indicado e os dois outros grupos
pCaOx = produto molar oxalo-cálcico (mmol/l)²; Ca/Ox = razão molar oxalo-cálcica

Tabela 15. Excreção, segundo o tipo de água administrada, de constituintes urinários dos animais que receberam dieta normal em Ca (1,0%), antes e após sobrecarga em oxalato de sódio

URINE ($\mu\text{mol/d}$)	ANTES DA CARGA (dia 7)			CARGA EM OxNa (dia 21)		
	Grupo I Badoit (n=9)	Grupo II Contrexéville (n=8)	Grupo III Evian (n=8)	Grupo I Badoit (n=9)	Grupo II Contrexéville (n=8)	Grupo III Evian (n=8)
cálcio	150 \pm 40	170 \pm 30	160 \pm 30	150 \pm 20	130 \pm 30	120 \pm 30
oxalato	14,9 \pm 3,5	10,9 \pm 0,7	11,1 \pm 1,6	14,5 \pm 1,4	11,4 \pm 1,6	11,7 \pm 0,8
magnésio	150 \pm 20	160 \pm 10	140 \pm 10	140 \pm 10	120 \pm 20	110 \pm 20
fósforo	740 \pm 90	840 \pm 100	840 \pm 90	900 \pm 100	740 \pm 140	840 \pm 80
creatinina	120 \pm 10	120 \pm 10	110 \pm 10	120 \pm 10	100 \pm 20	100 \pm 10
sulfato	1.090 \pm 110	1.520 \pm 110 *	1.080 \pm 100	990 \pm 90	1.380 \pm 140 *	1.000 \pm 100

Valores expressos como média \pm erro médio padrão; * p < 0,01 entre o grupo indicado e os dois outros grupos

Bioquímica plasmática. Como mostrado na tabela 16, as concentrações plasmáticas de cálcio e de creatinina foram semelhantes nos três grupos no início do experimento e mantiveram-se inalteradas após a adição de OxNa à dieta. A concentração de fósforo foi similar nos três grupos no início do experimento e diminuiu, em igual magnitude entre os grupos, após a sobrecarga ($p < 0,001$): $2,5 \pm 0,1$ para $1,9 \pm 0,1$ no grupo I; de $2,5 \pm 0,2$ para $2,1 \pm 0,1$ no grupo II; e, de $2,4 \pm 0,2$ para $2,0 \pm 0,1$ mmol/l no grupo III.

Nenhum caso de insuficiência renal foi observado antes e após a introdução de OxNa na dieta, como demonstrado pelos valores do *clearance* de creatinina: grupo I - $2,74 \pm 0,28$ no início e $2,44 \pm 0,11$ no final; grupo II $2,04 \pm 0,27$ e $2,21 \pm 0,09$; e, grupo III - $2,09 \pm 0,24$ e $2,07 \pm 0,05$ ml/min).

Radiologia e histologia. Nenhuma anormalidade radiológica ou histológica foi evidenciada nos animais dos três grupos.

Tabela 16. Concentração, segundo o tipo de água administrada, dos constituintes plasmáticos dos animais que receberam dieta normal em Ca (1,0%), antes e após sobrecarga em oxalato de sódio

PLASMA	ANTES DA CARGA (dia 7)			CARGA EM OxNa (dia 21)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III
	Badoit (n=9)	Contrexéville (n=8)	Evian (n=8)	Badoit (n=9)	Contrexéville (n=8)	Evian (n=8)
cálcio (mmol/l)	2,4 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,6 ± 0,1
fósforo (mmol/l)	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,4 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1
creatinina (μmol/l)	35,3 ± 0,9	37,1 ± 1,0	37,1 ± 0,9	39,6 ± 1,4	37,5 ± 1,5	37,5 ± 1,8

Valores expressos em média ± erro médio padrão

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados deste estudo foram:

(i) nos animais submetidos à dieta pobre em Ca (0,1%), a sobrecarga em oxalato de sódio induziu a formação de cristais de oxalato de cálcio mono (COM) e dihidratado (COD);

(ii) A formação de cristais de COM foi significativamente maior nos animais que receberam água com o mais baixo teor em cálcio e magnésio, enquanto que a de cristais de COD não foi influenciada pelo teor em mineral da água;

(iii) nos animais submetidos à dieta normal em Ca (1,0%), a sobrecarga em oxalato de sódio induziu a formação de cristais de COM, com magnitude não influenciada pelo teor em mineral da água;

(iv) a excreção urinária da alanina aminopeptidase aumentou após sobrecarga oral em oxalato, enquanto que a excreção de gama-glutamiltanspeptidase não se alterou. Não houve correlação entre intensidade de enzimúria e magnitude de excreção do oxalato ou de cristais na urina.

A hiperossalúria é considerada um importante fator de risco para a nefrolitíase oxalo-cálcica [73,74] e, como descrito anteriormente, ela pode ser induzida experimentalmente em animais através da administração de oxalato de sódio. No nosso estudo preliminar encontramos que a adição de oxalato de sódio à dieta, na concentração de 20 mg/100g, acarretou aumento da excreção urinária de oxalato e induziu a formação de cristais de oxalato de cálcio, semelhante ao observado na hiperossalúria moderada no homem. Além disso,

a via de administração oral permite estudar a interação do oxalato com outros fatores dietéticos.

Nos animais submetidos à dieta pobre em cálcio (0,1%), a excreção urinária de oxalato aumentou em todos os grupos após sobrecarga em oxalato de sódio. Este aumento foi significativamente maior no grupo de ratos que receberam água com o mais baixo teor em minerais (grupo III - Evian®: Ca=78 mg/l; Mg=24 mg/l) do que nos outros dois grupos (grupo I - Badoit®: Ca=222 mg/l; Mg=92 mg/l; e, grupo II - Contrexéville®: Ca=467 mg/l; Mg=84 mg/l). Esta diferença pode ser explicada pela interação do oxalato com outros íons na luz intestinal. A absorção intestinal do oxalato ocorre através de um processo de difusão passiva [35]. Com a redução do cálcio da dieta, restaria na luz intestinal uma maior quantidade de oxalato na forma livre, disponível para a absorção. Contrariamente, com o aumento no aporte de cálcio e magnésio, através de ingestão de água rica em minerais, uma maior proporção de oxalato formaria complexos insolúveis, sendo posteriormente eliminados pelas fezes.

É interessante notar que a ingestão de água dos animais do grupo I (Badoit®) foi aproximadamente duas vezes maior do que a dos outros dois grupos (Contrexéville® e Evian®), fenômeno observado nos experimentos com dieta pobre e com dieta normal em cálcio. Em decorrência, a ingestão de cálcio dos animais que receberam água com moderado teor em cálcio (grupo I), foi semelhante àquela dos animais que receberam água rica em cálcio (grupo II). Entretanto, a excreção urinária de cálcio naquele grupo foi somente a metade da observada no grupo II. Podemos especular que o fato da Badoit® ser uma água gasosa poderia ter estimulado uma maior perda por perspiração. Isto explicaria porque, apesar da maior ingestão hídrica, o volume

urinário nestes animais foi semelhante ao dos demais. Além disso, parte do cálcio consumido pode ter formado complexos de fosfato e carbonato de cálcio na luz intestinal, com posterior eliminação pelas fezes. A presença de maior quantidade de bicarbonato na Badoit® favoreceria esta precipitação.

Diversos estudos avaliando o papel do magnésio na excreção urinária do oxalato têm mostrado resultados discordantes. Zarembski e Hodgkinson demonstraram que os principais fatores que influenciam a excreção urinária do oxalato no homem são o conteúdo de cálcio e de oxalato da dieta e o fluxo urinário, enquanto que nenhuma influência foi observada com o magnésio e com o bicarbonato de sódio [75]. Posteriormente, o próprio Hodgkinson mostrou uma relação direta entre a excreção de oxalato, de cálcio e de magnésio, tanto em indivíduos normais quanto em litiásicos [76]. Madorsky e Finlayson estudando a absorção de oxalato em segmentos intestinais de rato, observaram que a adição de cálcio e magnésio na solução teste não influenciou os resultados [77]. Em nosso estudo, a redução na excreção urinária de magnésio, observada com a adição de oxalato na dieta, mostra que o magnésio influencia a absorção intestinal do oxalato, muito embora o óxido de magnésio seja quarenta vezes mais solúvel do que o oxalato de cálcio. Este efeito poderia explicar em parte o sucesso da utilização do magnésio no tratamento de pacientes portadores de litíase cálcica [78]. Entretanto, nos animais submetidos à dieta normal em cálcio, não observamos nenhum efeito da sobrecarga em oxalato na excreção urinária do magnésio, provavelmente porque o conteúdo de cálcio na luz intestinal foi suficiente para formar complexos com os íons oxalato. Nestas condições, o magnésio deixaria de exercer um papel significativo na absorção intestinal e na excreção urinária de oxalato. É possível que as diferentes concentrações de cálcio da dieta

utilizadas nestes estudos justifiquem, em parte, os resultados discordantes.

A redução da fosforemia após sobrecarga em oxalato não é facilmente explicada. Nos animais submetidos a dieta pobre em cálcio, a ocorrência de hiperparatireoidismo secundário poderia justificá-la. Entretanto, a excreção urinária de fósforo diminuiu e a calcemia não se alterou. Além do mais, redução da fosforemia também foi observada nos animais que receberam dieta normal em cálcio. É possível que o fato dos animais não estarem em jejum tenha influenciado o resultado.

Nos animais submetidos a dieta pobre em cálcio, a formação de cristais de oxalato de cálcio foi induzida pela sobrecarga em oxalato de sódio. A excreção destes cristais na forma monohidratada foi significativamente maior nos animais que apresentaram maior concentração e excreção de oxalato urinário (grupo III). A formação de cristais na forma dihidratada foi maior no grupo de animais com maior excreção em cálcio urinário, porém esta diferença não foi significativa.

Nos animais que receberam dieta normal em cálcio, nenhuma diferença foi observada na cristalúria ou nos vários parâmetros bioquímicos, antes e após sobrecarga em oxalato.

Diversos estudos têm mostrado que a intensidade de excreção de cristais de oxalato de cálcio na urina está associada à magnitude da oxalúria [26,79,80]. Daudon e cols. estudaram 1500 amostras urinárias de pacientes litiásicos e concluíram que na urina humana, a razão oxalo-cálcica (Ca/Ox) parece ser o fator mais importante na formação das fases cristalinas, enquanto que o produto oxalo-cálcico (pCaOx) é responsável pelo risco de cristalização [81]. Estes autores observaram uma frequência de cristalúria oxalo-cálcica

espontânea em 5% das amostras com pCaOx inferior a 0,5 (mmol/l)², e esta aumentou gradativamente até 100%, quando o pCaOx foi maior do que 3,5 (mmol/l)². Entretanto, o risco de cristalização na urina de indivíduos normais é menor do que na de pacientes litiásicos. Assim, ao analisar amostras de urinas com pCaOx entre 2,0 e 2,5 (mmol/l)², estes autores encontraram cristais de oxalato de cálcio em 33% dos indivíduos normais e em 65% dos litiásicos (81). Esta diferença se deve provavelmente à presença de substância(s) inibidora(s) da cristalização presente(s) na urina dos indivíduos normais. Cristais de oxalato de cálcio monohidratado foram observados em 95,7% das amostras urinárias com Ca/Ox inferior a 6, enquanto que naquelas com Ca/Ox superior a 14, quase 100% dos cristais eram de oxalato de cálcio dihidratado. Para valores intermediários, as duas formas de cristais foram observadas [81].

Em nosso estudo, nos animais submetidos à dieta pobre em cálcio, os valores iniciais de pCaOx foram inferiores a 3 (mmol/l)² e não houve formação de cristais de oxalato de cálcio. Após sobrecarga em oxalato, cristais de oxalato de cálcio monohidratado foram observados, muito embora o pCaOx tenha diminuído em todos os grupos. Além disso, nos animais que receberam dieta normal em cálcio, não houve formação de cristais de oxalato de cálcio, mesmo com pCaOx semelhante àqueles com dieta pobre em cálcio. Nós concluímos que os valores limítrofes que determinam o risco de cristalização oxalo-cálcica na urina de humanos não são válidos para o modelo de ratos. É possível que esta diferença seja causada pela maior força iônica urinária nos ratos. Boistelle e cols. mostraram que, para uma concentração fixa de oxalato e de cálcio, uma elevação na força iônica de 0,02 para 0,15 reduzia a saturação oxalo-cálcica à metade [82]. Assim, a força iônica exerce

um efeito solubilizante. A intensidade do processo de cristalização depende de um nível de saturação acima do produto de formação (figura 8), mas vários autores acreditam que a razão oxalo-cálcica também o influencia [83]. Nos ratos que receberam dieta pobre em cálcio e enriquecida em oxalato, houve formação de cristais de oxalato de cálcio monohidratado nas amostras de urina com Ca/Ox inferior a 4. Ela foi maior nos animais que apresentaram menor Ca/Ox e maior excreção de oxalato urinário (grupo III). Em relação aos cristais de oxalato de cálcio dihidratado, observou-se uma maior formação de cristais nas amostras de urina dos animais que apresentaram Ca/Ox superior a 3 e maior excreção urinária de cálcio urinário (grupo II). Estes dados confirmam que a formação de cristais de oxalato de cálcio monohidratado é dependente da hiperoxalúria, enquanto que a formação de cristais de oxalato de cálcio dihidratado é influenciada pela razão oxalo-cálcica e pela força iônica. Nos animais que receberam dieta normal em cálcio, a Ca/Ox foi maior do que 10 e houve formação somente de cristais de oxalato de cálcio monohidratado. Contudo, não houve diferença significativa na excreção urinária de oxalato e de cálcio nos três grupos. É possível que cristais de oxalato de cálcio dihidratado de pequeno tamanho (1-2 μ) não tenham sido detectados pela microscopia óptica. Esta possibilidade não pode ser completamente afastada, porém tem sido demonstrado que pequenos aumentos na concentração urinária do oxalato são muito mais importantes no processo de cristalização do que grandes aumentos na concentração de cálcio (83,84). A formação de complexos de oxalato de cálcio é monomérica e na urina normal a relação cálcio/oxalato é de 5:1 (84,85). Assim, qualquer aumento na concentração urinária do cálcio iônico é contrabalanceado por uma queda proporcional na concentração do oxalato, reduzindo desta forma o

risco de cristalização oxalo-cálcica [79]. Ao contrário, um aumento na concentração urinária do oxalato ionizado não reduz significativamente a concentração do cálcio iônico, exceto nas urinas com altas concentrações em oxalato, como ocorre na hiperoxalúria primária e entérica. Desta forma, qualquer tratamento que reduza a concentração do cálcio urinário, mas ao mesmo tempo aumente a concentração do oxalato, aumentará o risco litogênico, através da formação de cristais de oxalato de cálcio, mesmo que a saturação urinária permaneça inalterada [83]. Nossos dados confirmam a observação de outros autores sobre a importância da determinação do tipo, número e tamanho dos cristais presentes na urina, para avaliar a gravidade do risco cristalogênico [80,83,86]. Nos animais que apresentaram maior excreção urinária de oxalato, o número e tamanho de cristais de oxalato de cálcio monohidratado também foi maior .

Excreção aumentada de enzimas urinárias tem sido relatada em pacientes portadores de litíase renal e nos modelos de indução experimental de hiperoxalúria [87-90]. A alanina aminopeptidase (AAP) está presente na borda em escova do túbulo proximal e, devido ao seu grande peso molecular (240 000 d), não é livremente filtrada pelo glomérulo. A gama-glutamyltranspeptidase (GGT) está localizada na superfície luminal da borda em escova e é mais ativa na porção final do túbulo proximal, especialmente na *pars recta* [91]. No nosso estudo, nos animais submetidos à dieta pobre em cálcio, a sobrecarga em oxalato induziu um aumento na excreção urinária da AAP, porém não da GGT. Congelamento da amostra de urina pode levar à perda da atividade da GGT [92], mas esta possibilidade pode ser afastada, uma vez que as dosagens das duas enzimas foram realizadas no mesmo dia da coleta da urina. Duas hipóteses podem ser aventadas: (i) embora ambas as enzimas

estejam localizadas na superfície das células do túbulo proximal, a AAP seria mais facilmente liberada durante agressão mínima, podendo ser um marcador mais precoce de lesão tubular; (ii) falha técnica poderia ter ocorrido, já que não temos um controle positivo. Como os valores das enzimas foram relacionados à excreção de creatinina urinária, diferenças no débito urinário não interferiram nos resultados. Baggio e cols. estudaram a excreção urinária de N-acetil- β -glucosaminidase, enzima de conversão da angiotensina I, β -galactosidase e GGT, em pacientes com nefrolitíase cálcica idiopática e em animais após injeção intraperitoneal de oxalato de sódio. Os resultados mostraram que a excreção das quatro enzimas aumentou em todos os pacientes. Nenhuma correlação foi observada entre a intensidade da enzimúria e a presença de cálculo no trato urinário, a excreção urinária de oxalato, de cálcio ou de ácido úrico. Infelizmente, a cristalúria não foi analisada [93]. Nossos resultados demonstram ausência de correlação entre a atividade da AAP e a excreção urinária de oxalato, como também a intensidade da cristalúria. Em animais, somente a injeção de altas doses de oxalato de sódio induziu um aumento na atividade das enzimas urinárias [93]. Este achado reforça a nossa hipótese que a AAP seja um marcador mais precoce de agressão tubular.

Inúmeros estudos têm relatado a ocorrência de hiperoxalúria em indivíduos portadores de litíase oxalo-cálcica [75,94-97]. Vários mecanismos têm sido propostos para explicá-la, incluindo produção endógena aumentada, hiperabsorção intestinal de oxalato, consumo elevado de alimentos ricos em oxalato, tais como espinafre, beterraba, chá, chocolate, amendoim [84,98-100]. Absorção intestinal aumentada de oxalato tem sido relatada por alguns autores [95,99,101], mas não por outros [102]. Nos indivíduos normais, a contribuição

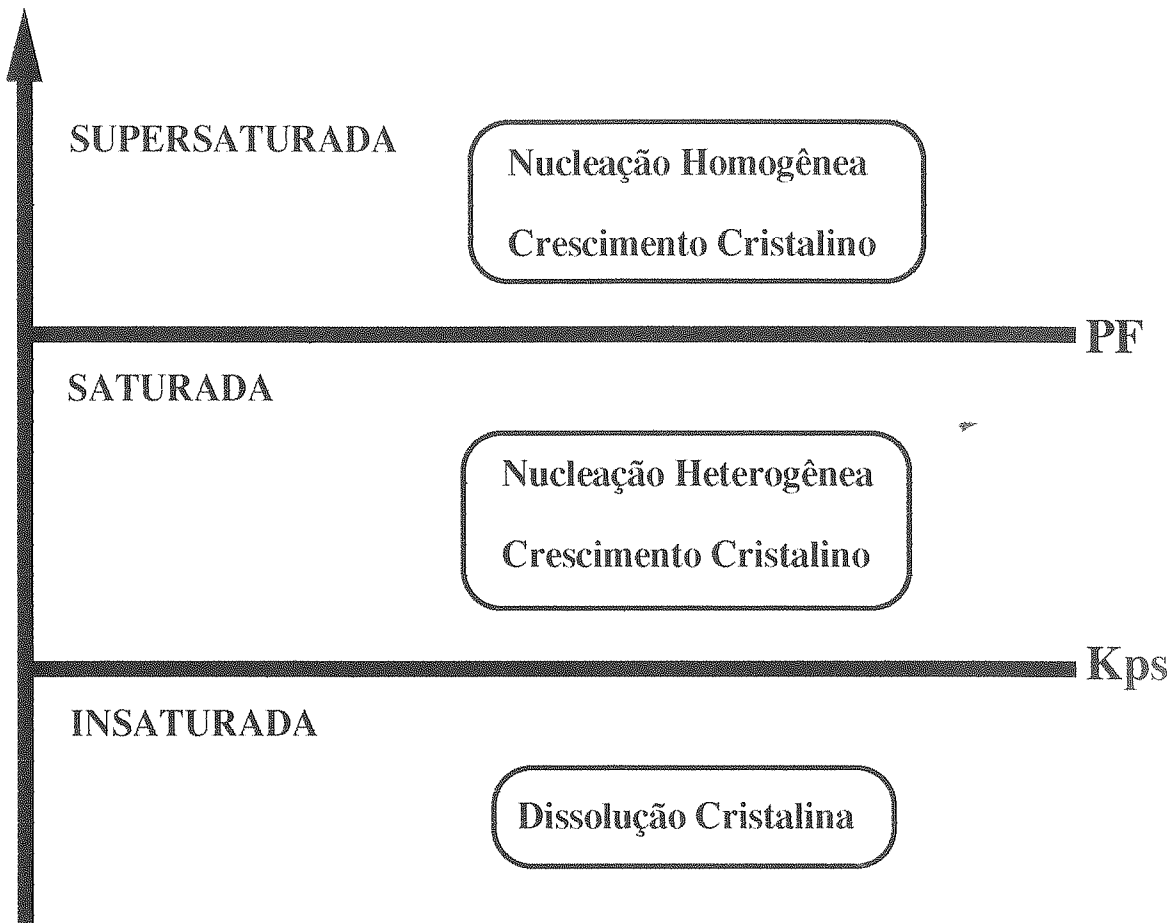
da dieta na excreção urinária de oxalato é menor do que 15% [98,99,101-104]. Vários autores têm demonstrado uma correlação inversa entre a ingestão de cálcio e a excreção urinária de oxalato, com maiores valores de oxalúria sendo observados com dieta pobre em cálcio do que com dieta normal [75,94-96,98,99]. Galosy e cols. avaliaram a excreção urinária de oxalato em 107 pacientes litiásicos com hipercalcúria absorptiva, 34 litiásicos com absorção intestinal normal de cálcio e 34 indivíduos controle. Estes autores observaram que a excreção urinária do oxalato não foi dependente da ingestão ou da absorção de cálcio. Além disso, a prescrição de uma dieta pobre em cálcio nos pacientes litiásicos com hiperabsorção intestinal de cálcio não necessariamente aumentou a excreção urinária do oxalato [105].

Jaeger e cols. analisaram o efeito do conteúdo de cálcio da água em quatro pacientes litiásicos com hipercalcúria absorptiva. Eles mostraram que a ingestão de água rica em cálcio tornou os pacientes marcadamente hipercalcúricos, enquanto que a água pobre em cálcio acarretou aparecimento de hiperoxalúria [106]. Entretanto, os pacientes estavam com dieta livre e a ingestão de oxalato não foi avaliada. Outros autores também estudaram o efeito do conteúdo de cálcio da água em pacientes litiásicos com dieta enriquecida em oxalato. A ingestão de água pobre em cálcio foi associada à hiperoxalúria, enquanto que a ingestão de água rica em cálcio acarretou redução urinária do oxalato [107,108].

Durante muitos anos, restrição de cálcio na dieta tem sido recomendada para pacientes portadores de litíase cálcica urinária [109]. Esta prática deve ser desencorajada uma vez que a redução na excreção urinária de cálcio é acompanhada de um aumento na excreção do oxalato. Nossos dados mostram

que a ingesta de cálcio deve ser suficientemente alta para reduzir a absorção intestinal do oxalato, como sugerido recentemente por um grande estudo epidemiológico realizado por Curhan e cols. [110]. Nos indivíduos com dieta pobre em cálcio, a ingesta de água dura pode ter um efeito protetor. Baseado nestes dados, sugerimos que indivíduos que consomem água branda deveriam compensar a relativa deficiência de cálcio através da ingesta alimentar, para prevenir o risco de formação de cristais de oxalato de cálcio.

saturação



PF = produto de formação; Kps = produto de solubilidade

Figura 8. Esquema mostrando os estados de saturação e cristalização urinária

6. CONCLUSÕES

1. Em ratos Wistar submetidos a dieta pobre em cálcio (0,1%), a sobrecarga oral em oxalato de sódio, na concentração de 20 mg%, acarretou aumento na excreção urinária de oxalato e redução na excreção urinária de cálcio e de magnésio. O oxalato formaria complexos pouco solúveis com o cálcio e o magnésio na luz intestinal, que seriam eliminados pelas fezes. Com a redução da ingesta alimentar de cálcio, restaria na luz intestinal uma maior quantidade de oxalato na forma livre, disponível para a absorção;

2. Nestes animais, a sobrecarga em oxalato induziu a formação de cristais de oxalato de cálcio mono e dihidratado. A excreção de cristais na forma monohidratada foi maior nos animais que receberam água com menor teor em cálcio e magnésio, enquanto que a excreção de cristais na forma dihidratada não foi influenciada pelo teor em mineral da água;

3. Nos animais submetidos a dieta normal em cálcio (1,0%), a sobrecarga oral em oxalato de sódio, na concentração de 20 mg%, não modificou a excreção urinária de cálcio, oxalato e de magnésio. O conteúdo de cálcio na luz intestinal foi suficiente para formar complexos com os íons oxalato e impedir a sua absorção. Neste caso, o magnésio deixaria de exercer um papel significativo na absorção intestinal e excreção urinária do oxalato;

4. A sobrecarga oral em oxalato induziu, nestes animais, a formação de cristais de oxalato monohidratado, porém a excreção destes cristais não foi influenciada pelo teor em mineral da água;

5. Neste modelo de indução experimental de cristalúria oxalo-cálcica, nenhum animal apresentou insuficiência renal, precipitação intratubular de cristais ou formação de cálculo no trato urinário;

6. Em animais submetidos a dieta pobre em cálcio (0,1%), a sobrecarga oral em oxalato induziu aumento na atividade urinária da enzima alanina aminopeptidase, porém não da gama-glutamiltanspeptidase. Mas, esse aumento não apresentou correlação com a excreção urinária de cristais e de oxalato.

Esses dados sugerem que a alanina aminopeptidase possa ser um marcador precoce de agressão tubular, induzida pela presença de cristais ou oxalúria, porém sua atividade não estaria correlacionada ao grau de lesão;

7. Os resultados deste estudo nos permitem sugerir:

7.1. A prescrição de dieta restrita em cálcio, apesar de reduzir a excreção urinária do cálcio, tende a aumentar o risco litogênico devido ao concomitante aumento na excreção urinária do oxalato.

7.2. Nos indivíduos com ingesta alimentar pobre em cálcio, o consumo de água dura pode ter um efeito protetor.

7.3. Em regiões abastecidas com água branda, os indivíduos deveriam compensar a relativa deficiência de cálcio através da ingesta alimentar, para prevenir o risco de formação de cristais de oxalato de cálcio.

7. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de cálcio da água na formação de cristais de oxalato de cálcio, em animais submetidos a dieta deficiente (0,1%) ou a dieta normal em Ca (1,0%). Quarenta ratos adultos, machos, Wistar AF, foram submetidos a dieta deficiente em Ca (0,1%) e água mineral *ad libitum*, durante 21 dias. Após uma semana de adaptação à gaiola metabólica, os animais foram divididos em 3 grupos, que receberam aporte de água com diferentes teores de cálcio: grupo I (n=13), Ca=222 mg/l, Badoit®; grupo II (n=14), Ca=467 mg/l, Contrexéville®; e, grupo III (n=13), Ca=78 mg/l, Evian®. Simultaneamente, oxalato de sódio (OxNa) a 20 mg/100 g foi adicionado à dieta. Outra série de 25 ratos (grupo I, n=9; grupo II, n=8; grupo III, n=8), foi submetida ao mesmo protocolo, sendo que o conteúdo de Ca da dieta era normal-alta (1%). No 7º e 21º dias do protocolo experimental foram realizadas análises bioquímicas e de cristalúria. No final do estudo os animais foram sacrificados, tendo o trato urinário sido cuidadosamente dissecado para pesquisa de cálculos e os rins retirados para análise radiológica e histológica.

Dieta pobre em Ca (0,1%). Nos animais submetidos a dieta pobre em Ca (0,1%), cristais de COM foram observados na urina somente após a sobrecarga oral em oxalato, com um número médio significativamente maior no grupo III ($16,7 \pm 4,5$ cristais/mm³) do que nos grupos I ($2,5 \pm 1,5$ cristais/mm³) e II ($4,1 \pm 1,5$ cristais/mm³) ($p < 0,01$). Cristais de COD foram vistos apenas no final do estudo e não houve diferença entre os grupos. O produto oxalo-cálcico reduziu-se ($p < 0,005$) de modo semelhante nos três grupos no final do experimento. A adição de oxalato de cálcio também acarretou diminuição da razão molar oxalo-cálcica ($p < 0,001$), porém com valores significativamente maiores no grupo II ($3,1 \pm 0,6$ mmol²) do que nos grupos I ($1,1 \pm 0,2$ mmol²) e III ($0,6 \pm 0,06$ mmol²). A adição de OxNa à dieta acarretou redução na concentração de cálcio ($p < 0,001$) e de magnésio ($p < 0,01$) na urina de 24 horas, além de aumento na concentração urinária de oxalato ($p < 0,001$), em todos os grupos. A concentração plasmática de cálcio e de creatinina não se alterou no final do estudo, enquanto que a de fósforo diminuiu de modo comparável nos três grupos. A atividade da enzima urinária AAP aumentou ($p < 0,001$) de modo semelhante nos animais dos três grupos, após sobrecarga em

oxalato. A atividade da enzima GGT não se modificou com a adição de oxalato na dieta. A análise radiológica e histológica não revelou alterações em qualquer dos animais estudados.

Dieta normal em Ca (1,0%). Nos animais submetidos a dieta normal em Ca (1,0%), a sobrecarga oral em oxalato induziu a formação de cristais de COM, porém não houve diferença significativa entre os grupos. As concentrações urinárias de cálcio e de magnésio diminuíram no final do estudo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente), enquanto que a excreção destes íons não se modificou. A adição de OxNa à dieta não modificou a concentração e a excreção de oxalato urinário, bem como o produto e a razão molar oxalo-cálcica. A concentração e excreção de sulfato urinário foi significativamente maior no grupo II do que nos grupos I e III no início do estudo e diminuiu nos três grupos de modo comparável no final do estudo. A função renal permaneceu estável em todos os animais. As análises radiológicas e histológicas não revelaram alterações em qualquer dos animais estudados.

Concluimos que o grau de dureza da água pode influenciar a formação de cristais de oxalato de cálcio, quando a ingestão alimentar em Ca é pobre. Portanto, podemos inferir que a prescrição de dieta pobre em Ca nos indivíduos portadores de litíase oxalo-cálcica tende a aumentar a excreção de oxalato urinário, acentuando o risco litogênico.

V. PARTE 3

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA CRISTALÚRIA NA PRÁTICA CLÍNICA

1. INTRODUÇÃO

A formação de um cálculo renal depende basicamente de cinco etapas: formação de uma fase insolúvel (saturação urinária), formação de cristais (nucleação homogênea e heterogênea), aumento do tamanho e/ou agregação das partículas formadas, retenção destas partículas em qualquer região do trato urinário, e crescimento do núcleo com formação de cálculo [111-113]. Os principais fatores que controlam este processo são: a saturação urinária, os fatores inibidores e os fatores promotores [113,114].

Robertson e cols. foram os primeiros a demonstrar uma correlação entre cristalúria e saturação urinária [115]. Segundo estes autores, níveis elevados de saturação urinária favoreceriam a formação de grandes cristais e a agregação cristalina, enquanto que a presença de inibidores bloquearia este processo. Assim, o volume de cristais presente na urina de pacientes litásicos era maior que aquele de indivíduos saudáveis, sendo esta diferença produzida pelo maior número e tamanho dos cristais excretados na urina de pacientes litiásicos [115]. Estes dados foram confirmados por alguns autores [116,117], mas não por outros [118]. Analisando a cristalúria e as excreções urinárias de oxalato, cálcio e de fosfato em 7 indivíduos litiásicos, Ahlstrand e cols. não encontraram correlação entre o volume de cristais de oxalato de cálcio e a saturação destes constituintes urinários. Entretanto, forte correlação foi demonstrada entre volume de cristais de fosfato de cálcio e a saturação urinária fosfocálcica [118].

Diferenças observadas na freqüência e nos tipos de cristais entre indivíduos normais e litiásicos têm sido descritas por vários autores [80,119,120], confirmando a importância do estudo da cristalúria na

1. INTRODUÇÃO

A formação de um cálculo renal depende basicamente de cinco etapas: formação de uma fase insolúvel (saturação urinária), formação de cristais (nucleação homogênea e heterogênea), aumento do tamanho e/ou agregação das partículas formadas, retenção destas partículas em qualquer região do trato urinário, e crescimento do núcleo com formação de cálculo [111-113]. Os principais fatores que controlam este processo são: a saturação urinária, os fatores inibidores e os fatores promotores [113,114].

Robertson e cols. foram os primeiros a demonstrar uma correlação entre cristalúria e saturação urinária [115]. Segundo estes autores, níveis elevados de saturação urinária favoreceriam a formação de grandes cristais e a agregação cristalina, enquanto que a presença de inibidores bloquearia este processo. Assim, o volume de cristais presente na urina de pacientes litásicos era maior que aquele de indivíduos saudáveis, sendo esta diferença produzida pelo maior número e tamanho dos cristais excretados na urina de pacientes litiásicos [115]. Estes dados foram confirmados por alguns autores [116,117], mas não por outros [118]. Analisando a cristalúria e as excreções urinárias de oxalato, cálcio e de fosfato em 7 indivíduos litiásicos, Ahlstrand e cols. não encontraram correlação entre o volume de cristais de oxalato de cálcio e a saturação destes constituintes urinários. Entretanto, forte correlação foi demonstrada entre volume de cristais de fosfato de cálcio e a saturação urinária fosfocálcica [118].

Diferenças observadas na frequência e nos tipos de cristais entre indivíduos normais e litiásicos têm sido descritas por vários autores [80,119,120], confirmando a importância do estudo da cristalúria na

investigação de pacientes litíasicos. Embora a presença de cristais na urina não seja por si só patológica, este exame permite diagnosticar certas doenças metabólicas e iatrogênicas, detectar a presença de saturação urinária e o risco litogênico potencial, bem como sugerir possíveis distúrbios metabólicos como causa da saturação urinária. Além disso, possibilita também estudar o efeito de diferentes tratamentos sobre o risco cristalogênico [121,122]. Apesar destes aspectos positivos, a cristalúria tem sido um método pouco difundido e utilizado na prática clínica, provavelmente devido às dificuldades encontradas na sua interpretação e à pequena experiência com a utilização desta técnica no diagnóstico e seguimento de portadores de litíase urinária.

1. 2. CRISTALÚRIA

Estudos têm sido realizados para caracterizar os diferentes tipos de cristais, suas formas de apresentação, e correlacioná-los com o quadro clínico [123-128]. Até o presente momento, foram identificados mais de 40 diferentes espécies de cristais, sendo 18 de origem iatrogênica, cujo aparecimento pode ser correlacionado ao uso de medicamentos [128]. Com base nos dados da literatura, particularmente nas publicações de Daudon e cols. [41,125,126,128], descreveremos a seguir as espécies de maior importância na prática clínica, seja por apresentarem uma elevada frequência ou por serem indicativos de distúrbios metabólicos específicos.

Ao final deste capítulo, os principais tipos e formas de cristais são mostrados em fotos obtidas da nossa própria casuística e do material gentilmente cedido por M. Daudon, Laboratoire de Biochimie A et Unité INSERM U90-Groupe Hospitalier Necker-Enfants Malades.

1. 2. 1. Oxalato de cálcio dihidratado, Vedelita (COD).

Cristais de oxalato de cálcio dihidratado é uma forma cálcio-dependente e pode ser encontrada em urinas hipercalciúricas normo ou moderadamente hiperoxalúricas [126]. No entanto, a sua presença não é por si só patológica, uma vez que 12% das amostras matinais de indivíduos normais podem apresentar estes cristais [128]. A identificação de cristais de COD na urina significa a presença de uma saturação oxalo-cálcica. Alguns aspectos da cristalização, no entanto, têm importância clínica:

(i) a morfologia habitualmente encontrada na urina é a bipiramidal ou em envelope, podendo ocasionalmente se apresentar como gêmeos interpenetrantes [123,124]. A cristalização na forma hexagonal ocorre em urina com elevado grau de saturação oxalo-cálcica. e sua presença, independente da quantidade, é indicativa de hipercalciúria importante [128];

(ii) os cristais de COD habitualmente são de tamanho inferior a 12 μ . A detecção de cristais superiores a 20 μ significa a presença de hipercalciúria e hiperoxalúria associadas, aumentando o risco de formação de cálculo. Cristais de tamanho superior a 35 μ são quase sempre indicativos de processo litogênico ativo, mesmo em indivíduos sem antecedentes de litíase urinária [128].

Exemplos de algumas formas de cristais de COD são mostrados nas figuras 9a-9d, 10

1. 2. 2. Oxalato de cálcio monohidratado, Vevelita (COM).

Os cristais de COM são altamente polarizantes e as formas mais freqüentemente encontradas na urina são as formas oval, hematiforme e em

halteres [123,124,125]. Esta espécie cristalina é oxalo-dependente e a sua presença na urina, a despeito da quantidade, é sempre indicativa de hiperoxalúria de concentração [126]. Como pode ser visto na figura 12, a detecção de cristais de COM em número superior a $200/\text{mm}^3$ deve orientar para a pesquisa de hiperoxalúria importante, como aquela observada na hiperoxalúria primária e intestinal [128].

1. 2. 3. Fosfato ácido de cálcio dihidratado (Bruxita)

A bruxita é uma forma de fosfato de cálcio que se cristaliza em urina moderadamente ácida, sendo raramente vista em urina de indivíduos normais [126]. Como mostra a figura 13, estes cristais tendem a se agregar em forma de fogueira e a sua presença, independente da quantidade, sugere hipercalcúria e um defeito menor de acidificação urinária [126]. A presença de um número de cristais superior a $500/\text{mm}^3$ ocorre em urinas com elevada saturação fosfo-cálcica, devendo orientar para a pesquisa de hiperparatireoidismo primário [128].

1. 2. 4. Fosfato de Cálcio Amorfo Carbonatado Complexo (PACC)

Estes cristais são comumente observados na urina de indivíduos normais, especialmente após a alimentação, não tendo significado clínico particular. Quando encontrados com frequência ou em abundância, na urina matinal de indivíduos portadores de litíase fosfo-cálcica ou de acidose tubular renal, podem indicar um risco de recidiva da doença calculosa [126,128]. Como observado nas figuras 15 e 16, os cristais de PACC são grânulos não polarizantes, podendo formar cilindros de cristais e placas vitrosas. A ausência de polarização auxilia a diferenciá-los dos cristais de urato amorfo

complexo, que são grânulos polarizantes (figuras 26 e 27).

1. 2. 5. Fosfato de Amônio Magnésiano Hexahidratado (Estruvita)

A formação de cristais de estruvita ocorre preferencialmente em urina alcalina. A sua presença quase sempre indica infecção por microrganismos produtores de urease, mais comumente pertencentes às espécies *Proteus*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Ureaplasma* [126,128]. Nestes casos, geralmente se associam a cristais de PACC e de urato ácido de amônio, como pode ser visto nas figuras 17,18. A presença de cristais de estruvita em urina estéril tem sido descrita [129].

1. 2. 6. Urato Ácido de Amônio (UAA)

Como descrito anteriormente, cristais de UAA associados a urina francamente alcalina indicam a presença de infecção por microrganismos produtores de urease. Porém, a observação destes cristais em urina com pH inferior a 6,6 sugere hiperamoniogênese renal associada a hiperuricosúria e deve orientar para a pesquisa de diarreia crônica, abuso de laxativo ou carência nutricional em fósforo [128].

Estes cristais podem ser vistos na figura 20

1. 2. 7. Ácido Úrico

Três formas de ácido úrico são conhecidas: ácido úrico dihidratado (AUD), ácido úrico anidro (AUA), e urato amorfo complexo (UAC). A forma mais freqüente é a dihidratada, sendo a forma anidra raramente observada. A presença de cristais de AUD e AUA significa hiperacidez urinária, que pode estar associada ou não a hiperuricosúria. Ao contrário,

cristais de UAC são observados em urinas hiperuricosúricas [126].

Como podem ser vistos nas figuras 21 a 26, os cristais de AUD e AUA são altamente polarizantes e policrômios, enquanto que os cristais de UAC se precipitam na forma de grânulos ou esferas (figuras 27 e 28).

1. 2. 8. Cistina

A presença de um único cristal de cistina leva ao diagnóstico de cistinúria e a quantificação destes cristais pode ser útil na avaliação da resposta terapêutica. Eles estão presentes em aproximadamente 90% das urinas de indivíduos portadores de cistinúria não tratados [126]. Nos casos suspeitos, a pesquisa de cristais no sedimento urinário e na urina conservada a +4°C pode aumentar a capacidade de detecção da doença [126]. Como pode ser visto na figura 29, o cristal de cistina é um hexágono com lados e ângulos opostos iguais, podendo ou não ser polarizantes, dependendo da espessura do cristal. A agregação ocorre tipicamente com os lados dos cristais superpostos paralelamente.

1. 2. 9. 2,8-Dihidroxiadenina

Estes cristais estão presentes em quase 100% das urinas de indivíduos portadores de deficiência homozigótica da enzima adenina fosforibosil transferase não tratados. Na análise química dos cálculos, a 2,8 dihidroxiadenina é quase sempre confundida com ácido úrico, daí a importância de pesquisar a existência de cristais na urina [126]. Do mesmo modo que na cistinúria, a pesquisa de cristais de 2,8 dihidroxiadenina no sedimento urinário e na urina conservada a +4°C pode aumentar a capacidade de detecção da doença [126]. A figura 31 mostra o cristal de 2,8

dihidroxiadenina. Cuidado deve ser tomado para não confundí-los com grãos de amido vistos na luz polarizada (figuras 32,33).

1. 2. 10. Cristalúria de Origem Medicamentosa

A saturação urinária de medicamentos pode ser desencadeada pela redução no volume urinário, grau de acidez urinária, prescrição de doses elevadas e/ou tratamento por tempo prolongado. Hematúria, insuficiência renal aguda e formação de cálculos renais têm sido descritas após uso de diversos tipos de medicamentos [41,130], sendo um dos exemplos mais importantes na atualidade, a ocorrência de insuficiência renal aguda desencadeada pelo uso de sulfadiazina, utilizada no tratamento da toxoplasmose cerebral em pacientes aids. A identificação do agente causal permite estabelecer um tratamento específico [131]. Daudon e cols; analisaram 7000 cristalúrias através de microscopia óptica com luz polarizada e espectrofotometria infra-vermelha. Cristalúria de origem medicamentosa foi observada em 64 casos (0,6% do total de amostras e 6,5% das cristalúrias positivas), sendo identificados 10 drogas diferentes [132]. Na França, os principais medicamentos implicados são as sulfas (63,4%), glafenina (13,3%) e quinolonas (10%), enquanto que nos EUA é o triamtereno [133]. As figuras 34 a 36 mostram cristais de sulfametoxazol, sulfadiazina e amoxicilina. Os cristais de sulfametoxazol podem ser facilmente confundidos com cristais de ácido úrico.

1. 2. 11. Taxa de Agregação

Um agregado cristalino é formado pelo acoplamento de três ou mais cristais, independente da espécie [125]. Taxas elevadas de agregação cristalina

sugerem deficiência de inibidores da agregação. Nos indivíduos normais, a taxa de agregação é geralmente inferior a 5%, enquanto que nos pacientes litiásicos ela é mais elevada, variando de 7 a 10%, podendo atingir valores superiores a 25% [128]. Figura 37 mostra um exemplo de agregados de cristais de COD.

A tabela 17 resume os principais critérios de interpretação da cristalúria

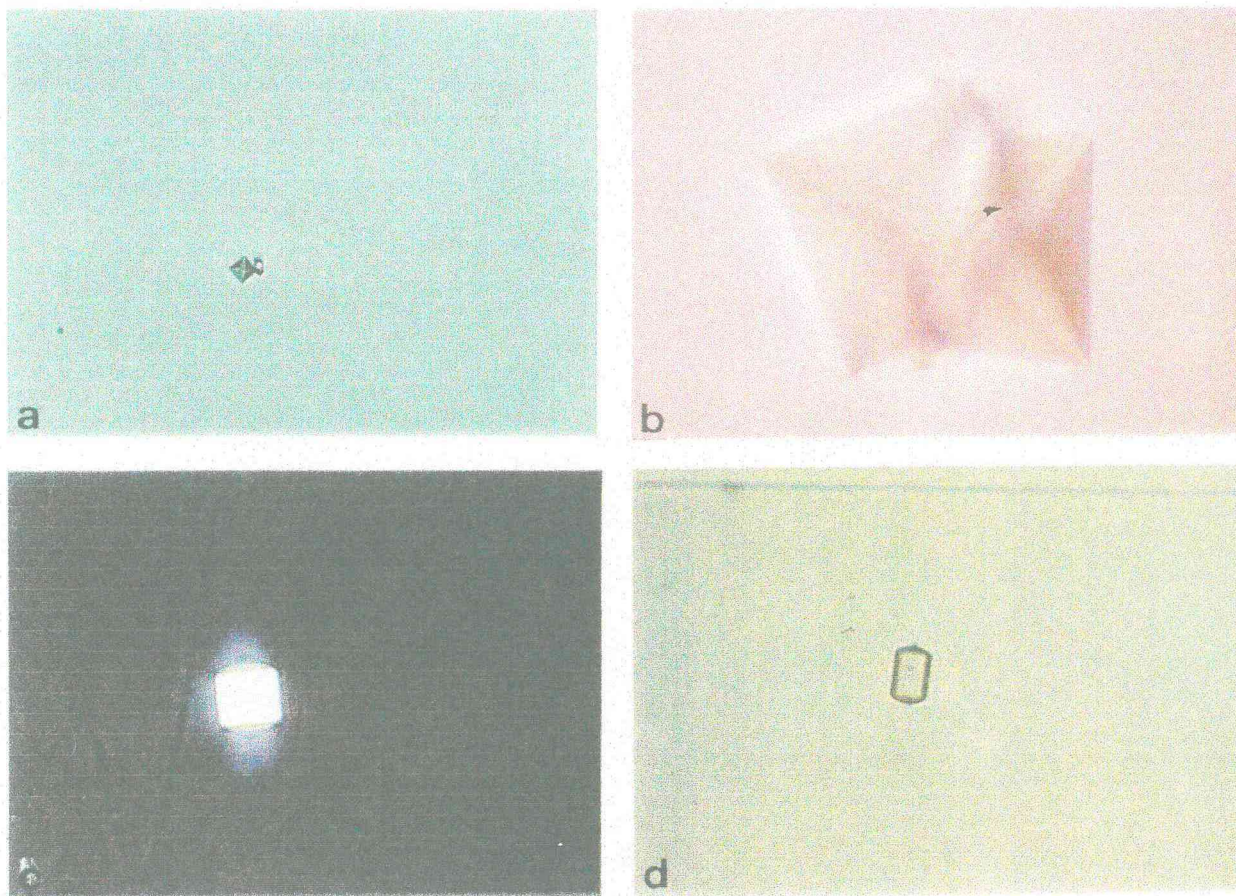


Figura 9. Cristais de oxalato de cálcio dihidratado: (a) forma bipiramidal (20 μ) e retangular com losango polarizante central (12 μ); (b) gêmeos interpenetrantes formados de cristais bipiramidais; (c) forma hexagonal indicativa de hipercalciúria importante; (d) forma retangular de bordos arredondados.

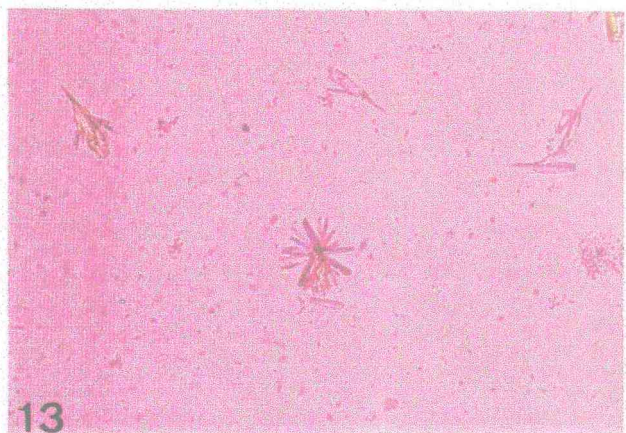
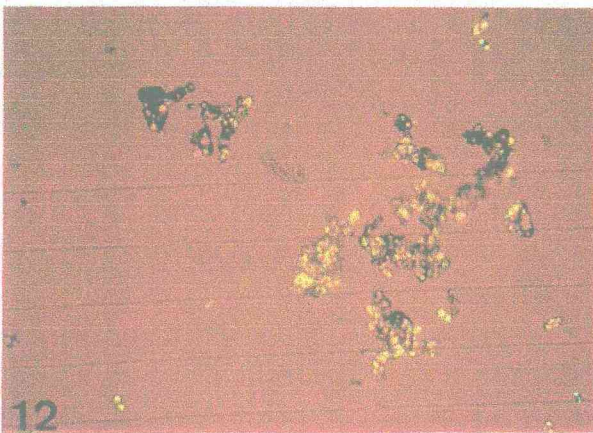
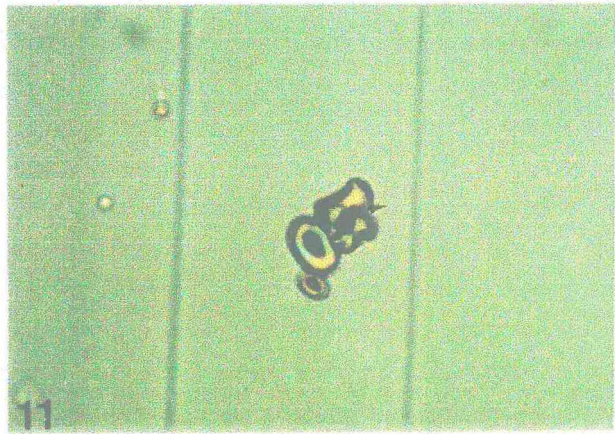
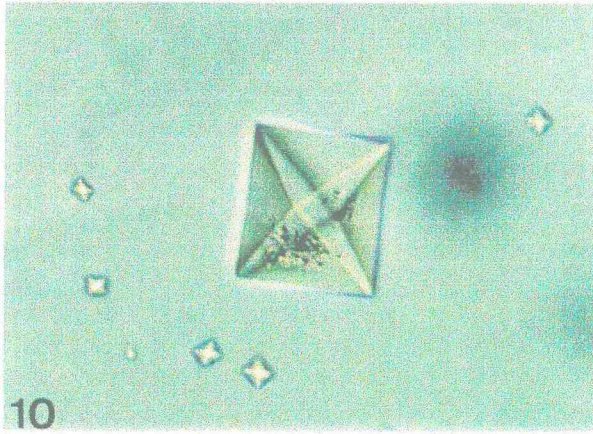


Figura 10. Cristais de oxalato de cálcio dihidratado forma bipiramidal ($60\ \mu$).

Figura 11. Cristais de oxalato de cálcio monohidratado na forma hematiforme e em halteres.

Figura 12. Cristais de oxalato de cálcio monohidratado observados na hiperoxalúria primária (gentilmente cedido por M. Daudon).

Figura 13. Cristais de bruxita (gentilmente cedido por M. Daudon).

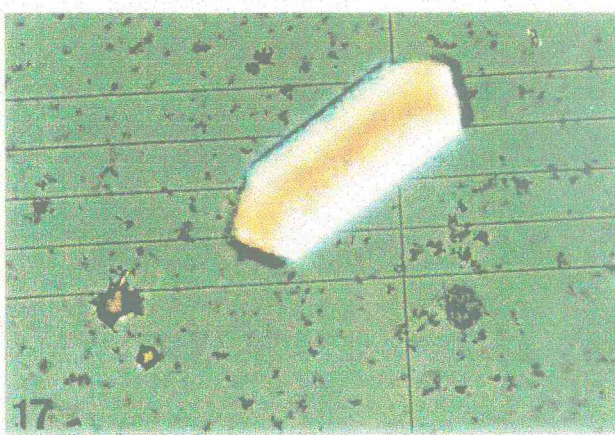
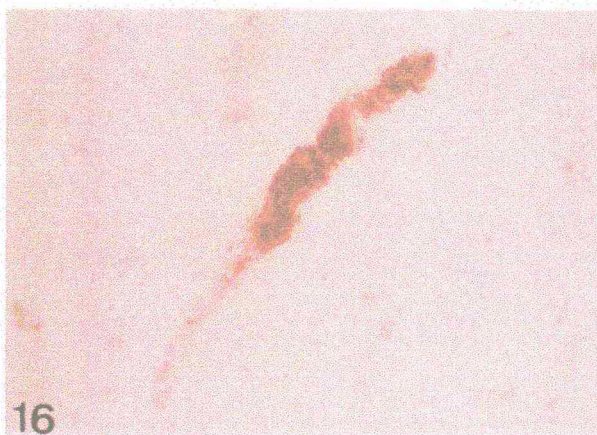
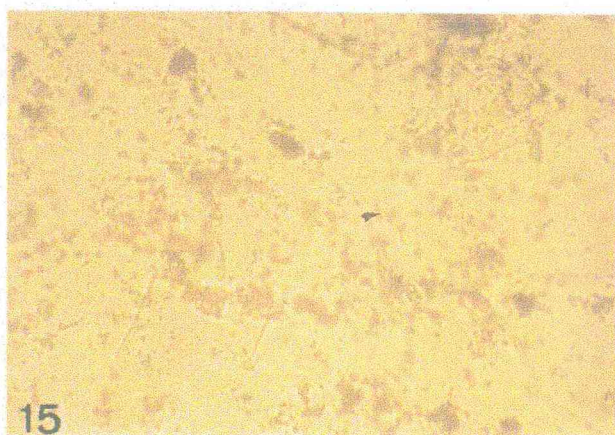
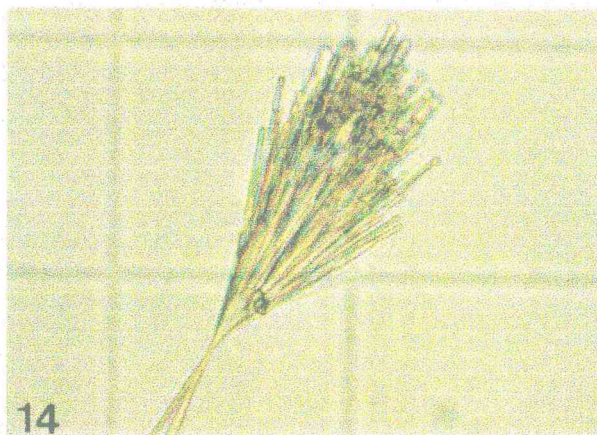


Figura 14. Cristais de bruxita formando agregados.

Figura 15. Cristais de fosfato de cálcio amorfo carbonatado complexo formando placas vitrosas (gentilmente cedido por M. Daudon).

Figura 16. Cristais de fosfato de cálcio amorfo carbonatado complexo formando cilindros (gentilmente cedido por M. Daudon).

Figura 17. Cristais de fosfato de cálcio amorfo carbonatado complexo, estruvita e urato ácido de amônio vistos na luz polarizada, pH urinário 8,5.

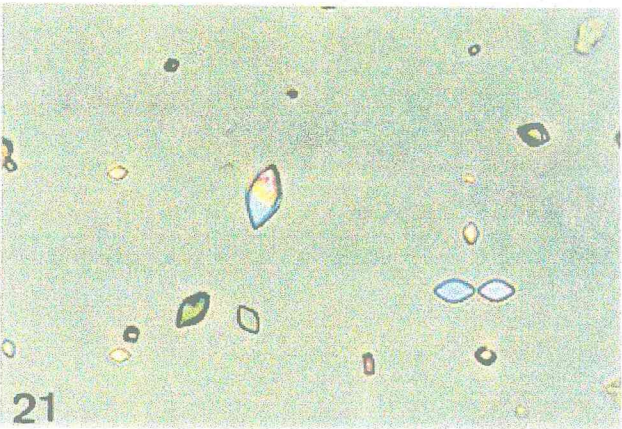
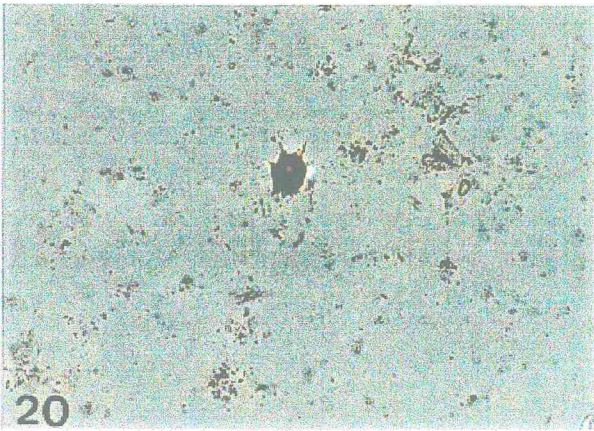
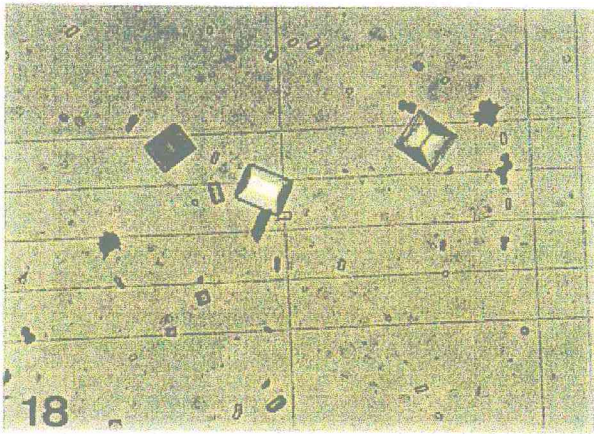


Figura 18. Cristais de estruvita e urato ácido de amônio vistos na luz branca, pH urinário 8,5.

Figura 19. Cristal de estruvita em forma de samambaia, pH urinário 8,2.

Figura 20. Cristais de urato ácido de amônio e fosfato de cálcio amorfo carbonatado complexo, pH urinário 7,7.

Figura 21. Cristais de ácido úrico dihidratado, pH urinário 5,8.

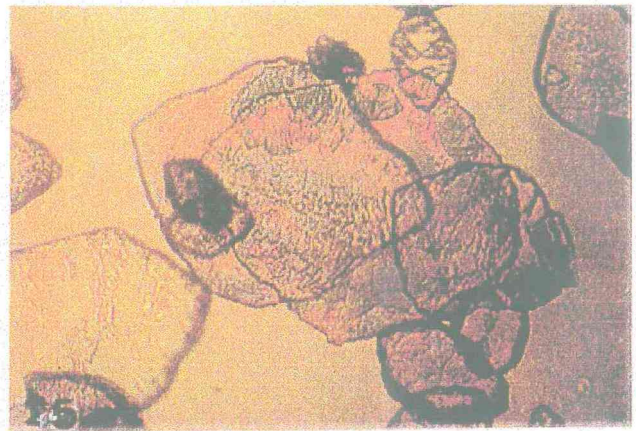
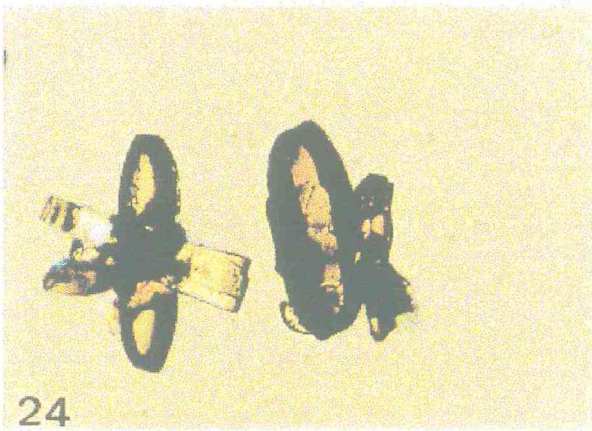
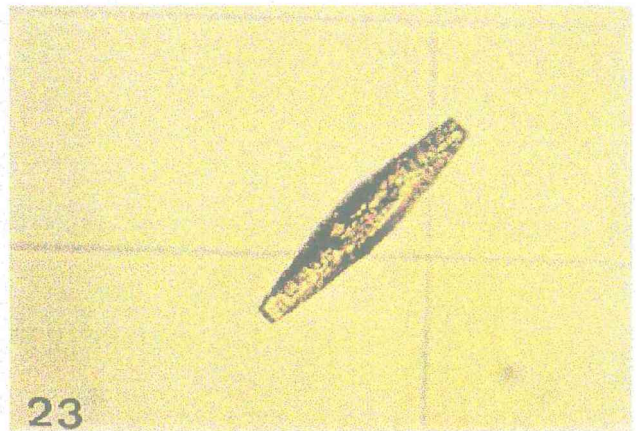
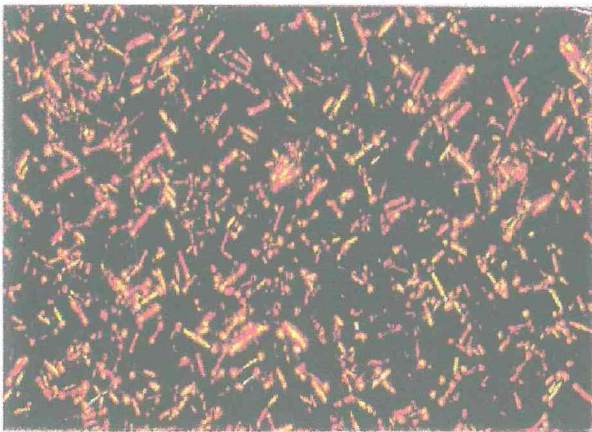


Figura 22. Cristais de ácido úrico dihidratado em forma de bastões (gentilmente cedido por M. Daudon).

Figura 23. Cristais de ácido úrico dihidratado em forma de charuto (gentilmente cedido por M. Daudon).

Figura 24. Cristais de ácido úrico anidro, pH urinário 4,7.

Figura 25. Cristais de ácido úrico anidro (gentilmente cedido por M. Daudon).

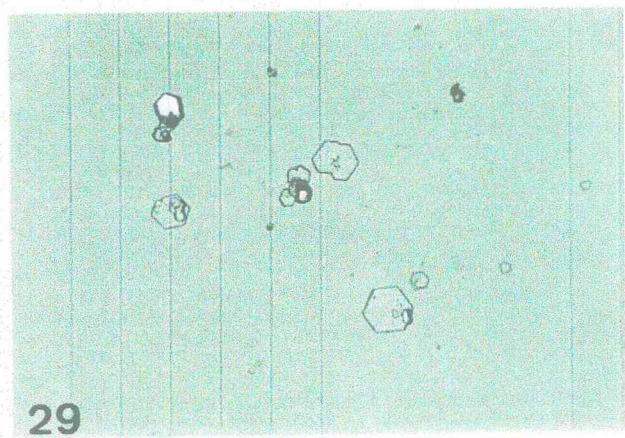
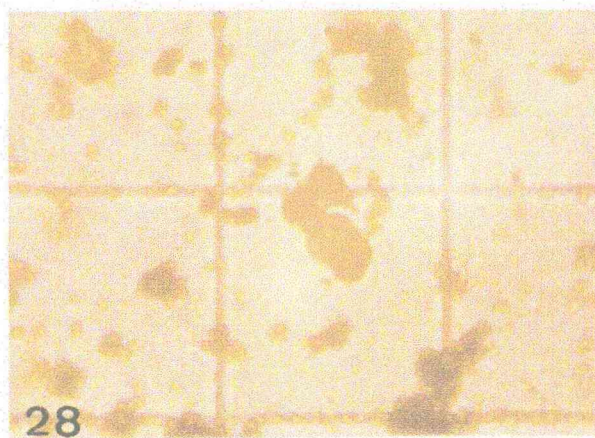
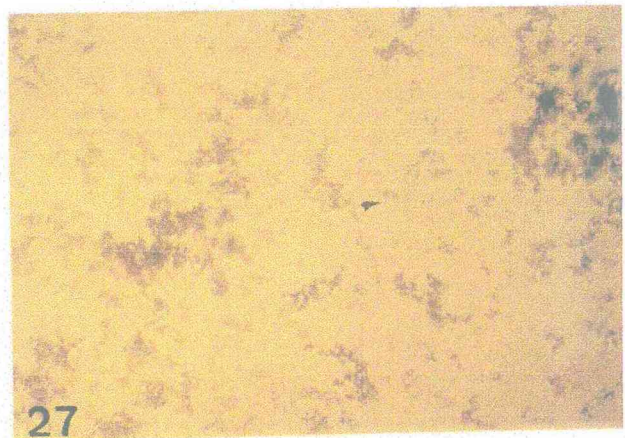
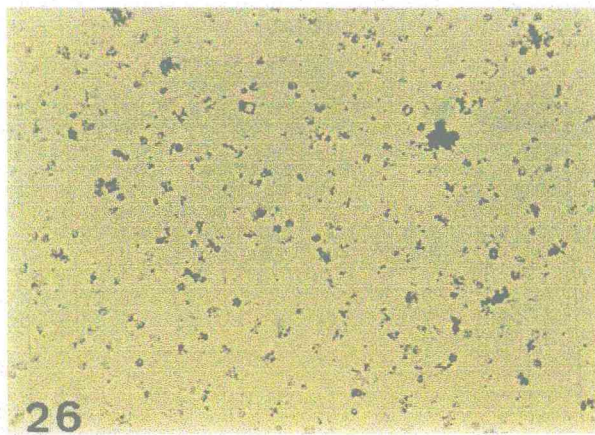


Figura 26. Cristais de fosfato de cálcio amorfo carbonatado complexo pH urinário 8,2.

Figura 27. Cristais de urato amorfo complexo (gentilmente cedido por M. Daudon).

Figura 28. Cristais de urato amorfo complexo em forma de esferas (gentilmente cedido por M. Daudon).

Figura 29. Cristais de cistina, pH urinário 6,2.

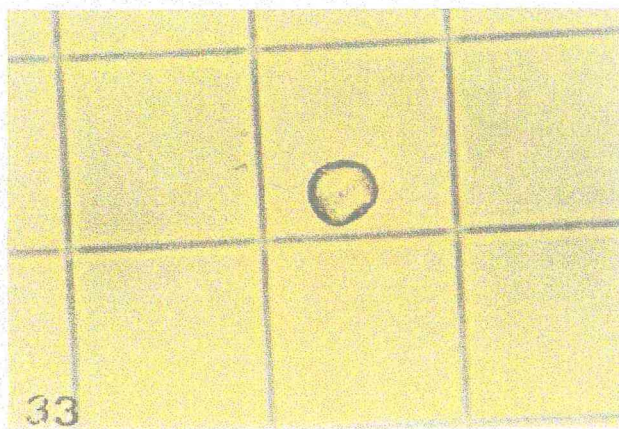
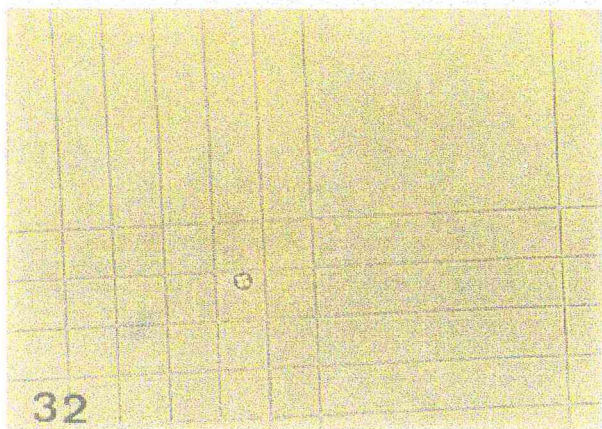
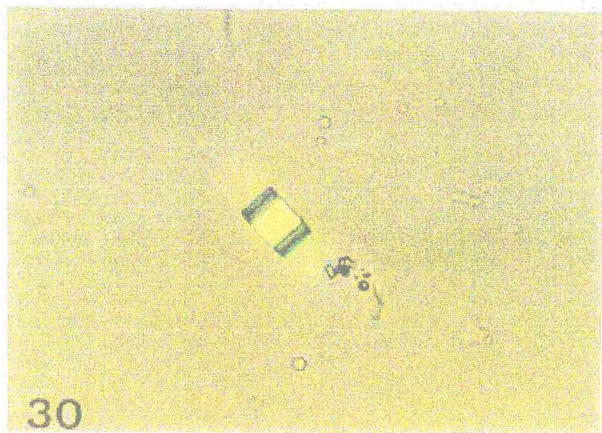


Figura 30. Cristal de cistina, pH urinário 6,8.

Figura 31. Cristais de 2,8 dihidroxiadenina vistos na luz polarizada (gentilmente cedido por M. Daudon).

Figura 32. Grão de amido visto na luz polarizada.

Figura 33. Gão de amido visto na luz branca.

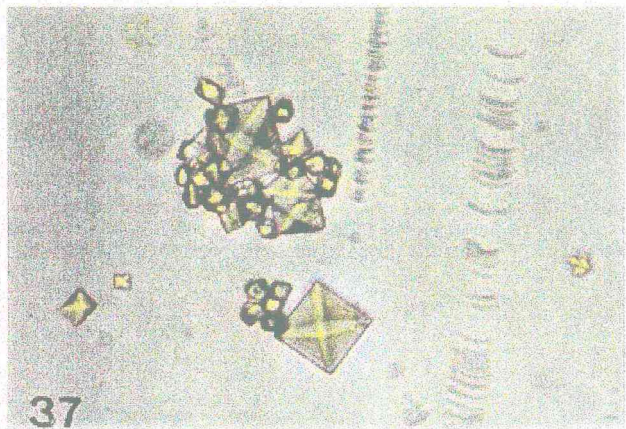
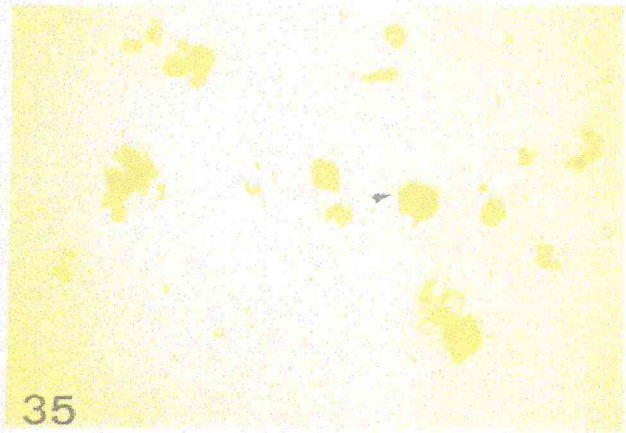
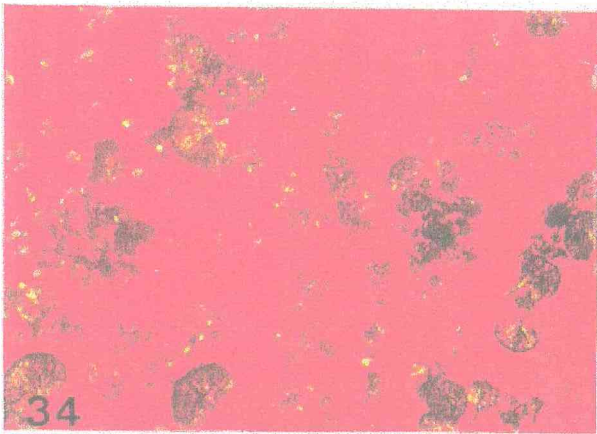


Figura 34. Cristais de n-acetil sulfadiazina (gentilmente cedido por M. Daudon)

Figura 35. Cristais de bactrim n-acetilado (gentilmente cedido por M. Daudon)

Figura 36. Cristais de amoxicilina trihidratada (gentilmente cedido por M. Daudon)

Figura 37. Agregados de oxalato de cálcio dihidratado

Tabela 17. Critérios de interpretação da cristalúria

CRITÉRIOS	NATUREZA DOS CRISTAIS	INTERPRETAÇÃO	
Natureza	cistina	anomalia tubular	
Química	dihidroxiadenina, xantina	defeito enzimático	
	estruvita, urato ácido de amônio	infecção por microorganismos produtores de urease	
	medicamentos	litíase iatrogênica, insuficiência renal aguda	
Natureza	oxalato de cálcio monohidratado	hiperoxalúria	
Cristalina	bruxita	hipercalcúria sem hiperoxalúria	
Face Cristalina	oxalato de cálcio dihidratado hexagonal	hipercalcúria importante	
Frequência	oxalato de cálcio	normal = 12%	litiásicos = 60%
	fosfatos de cálcio	normal = 20% (PACC, CA *)	litiásicos > 50%
Quantidade	bruxita	hiperparatireoidismo primário	
	oxalato de cálcio monohidratado	hiperoxalúria primária	
Tamanho dos Cristais	oxalato de cálcio dihidratado	hiperoxalúria + hipercalcúria	
	cistina	saturação elevada em cistina	
Agregação	oxalato de cálcio	normal ≤ 5%	litiásicos = 7-10%
Cristalina §		taxa de agregação superior = saturação elevada ou deficiência em inibidores	

* PACC = fosfato de cálcio amorfo carbonatado complexo; CA = carbapatita

§ valor expressa percentagem de agregados/número de cristais isolados

Tabela extraída da referência 128

1. 3. ANÁLISE DO CÁLCULO

A semelhança entre os cristais presentes na urina e no cálculo sugere que o estudo da cristalúria poderia ampliar os nossos conhecimentos sobre a formação e crescimento de cálculo urinário. Finlayson e cols. definem cálculo urinário como qualquer objeto que resulte da passagem da fase líquida para a fase sólida. Como esta definição engloba a formação de matrix e de cristais, milhões de cálculos seriam formados; entretanto, a maioria seria eliminada sem dor e não causaria a doença calculosa. Esta ocorreria quando um cálculo urinário causasse obstáculo à passagem da urina ao seu redor. Assim, o tamanho mínimo do cálculo dependeria basicamente do sistema de detecção utilizado [134]. Qualquer que seja o tamanho do cálculo, cada camada apresenta características próprias e fornece informações sobre o meio em que ele foi formado.

Diversas técnicas de análise têm sido utilizadas para estudar os cálculos urinários, sendo a análise química a mais empregada em nosso meio. Esta técnica, porém, apresenta alguns inconvenientes que dificultam a sua interpretação [128,135]:

- (i) resultados falso positivos e falso negativos podem ser freqüentes dependendo da especificidade da reação e da qualidade dos reativos empregados,
- (ii) a sensibilidade do método aos diversos componentes do cálculo é diferente, podendo subestimar constituintes principais e superestimar elementos minoritários;
- (iii) não fornece informações sobre a fase cristalina, não diferenciando, por exemplo, a forma monohidratada da forma dihidratada do oxalato de cálcio;

- (iv) necessita de grandes quantidades da amostra, dificultando a análise de pequenos cálculos;
- (v) sua utilização é limitada às espécies mais frequentemente encontradas, não sendo capaz de detectar constituintes mais raros, como 2,8 dihidroxiadenina e medicamentos.

A estrutura global do cálculo depende não só da forma e do tamanho dos cristais, mas também é influenciada pela capacidade de se agregar e crescer segundo direção privilegiada, dando origem a estruturas com graus de organização, homogeneidade e dureza diferentes. Desta forma, na maioria dos casos, o exame óptico do cálculo permite estudar a organização estrutural das camadas periféricas e do núcleo, a morfologia dos cristais, determinar as espécies cristalinas mais frequentes e pesquisar a presença de corpos estranhos servindo de núcleo para a formação do cálculo.

1. 3. 1. Análise Morfológica dos Cálculos

Daudon e cols. estudaram a estrutura morfológica de um grande número de cálculos e correlacionaram este resultado com a análise espectrofotométrica e química do cálculo e da urina, e com o quadro clínico do paciente [128,135,136]. Com base nos dados, estabeleceram uma classificação morfo-constitucional com 6 tipos e 20 subtipos de cálculos:

- (i) Tipo I: oxalato de cálcio monohidratado (COM);
- (ii) Tipo II: oxalato de cálcio dihidratado (COD);
- (iii) Tipo III: ácido úrico e uratos
- (iv) Tipo IV: fosfatos cálcicos e magnesianos
- (v) Tipo V: cistina

(IV) Tipo VI: cálculos ricos em proteínas

A tabela 18 mostra as características morfológicas da camada superficial e das camadas internas, visualizadas na secção do cálculo, de cada subtipo de cálculo. O estudo morfológico permite classificar aproximadamente 90% dos cálculos e estabelecer o seu constituinte principal em 97% dos casos.

O estudo da saturação urinária e do quadro clínico de cada paciente possibilitou os autores já citados estabelecer a(s) etiologia(s) mais freqüentemente encontrada(s) em cada subtipo de cálculo. Esta correlação é mostrada na tabela 19.

Tabela 18. Classificação e descrição morfológica dos diversos subtipos de cálculos urinários, segundo Daudon e cols. *

SUBTIPOS	CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS GERAIS	
	SUPERFICIE	SECÇÃO
Ia	aspecto muriforme ou de mamelão, liso presença de umbilicação central (origem papilar) cor: castanho escuro	compacta, concêntrica cristalização radial cor: castanho escuro a quase preto
Ib	aspecto rugoso e de mamelões fraturados ausência de umbilicação cor: castanho escuro a quase preto	compacta, cristalina, desorganizada, às vezes lacunar cor: castanho escuro
Ic	aspecto liso ou em forma de brotos cor: clara, às vezes creme (característico)	mais ou menos compacta, desorganizada, cristalina, finamente granulosa; pequenos cristais prismáticos fundidos cor: castanho claro a creme
Id	aspecto liso cor: castanho-amarelada	compacta, microcristalina, concêntrica, dispostas em camadas finas e cerradas, sem organização radial
IIa	aspecto espiculado, com cristais bipiramidais achatados e entrelaçados, brilhantes, translúcidos, com ângulos e arestas salientes cor: castanho claro a creme	cristalina, radial, ligeiramente frouxa cor: castanho a amarelo claro
IIb	aspecto espiculado, com cristais entrelaçados, suaves, espessos, opacos, com ângulos e arestas pouco salientes cor: cinza claro a castanho-amarelada	cristalina, compacta, desorganizada cor: cinza claro a castanho-amarelada

(continuação)

SUBTIPOS	SUPERFICIE
IIc	aspecto rugoso, microcristalino cor: cinza claro a castanho-amarelada
IIIa	aspecto homogêneo, cristalino, liso ou com formação de pequenos brotos cor: cinza claro, amarelada, ocre ou alaranjada
IIIb	aspecto heterogêneo, cristalino e/ou microcristalino, rugoso, com áreas de porosidade cor: heterogênea, creme a castanho-avermelhada
IIIc	aspecto homogêneo, rugoso, microcristalino e ligeiramente poroso cor: creme a castanho-acinzentada
IIId	aspecto heterogêneo, microcristalino, com porosidade acentuada cor: cinza a castanho
IVa1	aspecto homogêneo, microcristalino, rugoso ou com formação de finos brotos cor: esbranquiçada a bege
IVa2	aspecto homogêneo, cristalino, envernizado, ligeiramente liso, com aspereza semelhante à sílica cor: castanho-amarelada

SECÇÃO

microcristalina, camada periférica concêntrica difusa; centro desorganizado e ligeiramente frouxo
cor: cinza claro a castanho-amarelado escuro

compacta, concêntrica, com cristalização radial
cor: ocre a vermelho-tijolo

ligeiramente compacta, cristalina, desorganizada
cor: laranja a vermelho-tijolo

compacta, microcristalina, geralmente desorganizada
cor: cinza a castanho-acinzentada

heterogênea, em camadas ligeiramente concêntricas, frouxas, com porosidade localizada
cor: cinza claro a castanho

microcristalina, friável, com concentricidade mais ou menos nítida
cor: esbranquiçada a bege

concêntrica, mais ou menos folheada, em camadas cristalinas espessas castanho-amareladas e microcristalinas mais finas de cor bege

(continuação)

SUBTIPOS	SUPERFICIE	SECÇÃO
IVb	aspecto heterogêneo, rugoso, poroso, com formação de brotos e depósitos cristalinos ou microcristalinos, difusos, ligeiramente confluentes cor: esbranquiçada e castanho-amarelada a castanho escuro	heterogênea, concêntrica, com camadas microcristalinas, espessas e esbranquiçadas, alternadas com camadas cristalinas finas castanho-amareladas
IVc	aspecto homogêneo, cristalino, composto de cristais com graus variáveis de fusão, ângulos e arestas pouco salientes cor: esbranquiçada	estrutura frouxa, cristalina, com organização radial grosseira e concentricidade mais ou menos nítida. presença quase constante de outros constituintes moldando a morfologia cor: esbranquiçada
IVd	aspecto homogêneo, cristalino, finamente rugoso ou em aspecto de couve-flor, frequentemente translúcido cor: creme a cinza claro	compacta, concêntrica, com cristalização radial cor: creme a cinza claro
Va	aspecto homogêneo, cristalino, granuloso, com cristais pouco angulosos ou em forma de brotos, mais ou menos translúcidos e céreos cor: amarelada a castanho-amarelada	homogênea, com cristalização radial, grosseira e difusa cor: amarelada a castanho-amarelo claro
Vb	aspecto homogêneo, microcristalino, ligeiramente liso cor: creme a amarelada	periferia: heterogênea, compacta, microcristalina, finamente concêntrica, de cor creme centro: cristalina e desorganizada, de cor amarelada a castanho amarelo-claro
VIa	cálculo mole, não estruturado, liso, homogêneo cor: esbranquiçada a castanho claro	homogênea, desorganizada, idêntica à superfície Presença de focos de mineralização secundária cor: esbranquiçada a castanho claro

(continuação)

SUBTIPOS	SUPERFICIE	SECÇÃO
IVb	aspecto heterogêneo, rugoso, poroso, com formação de brotos e depósitos cristalinos ou microcristalinos, difusos, ligeiramente confluentes cor: esbranquiçada e castanho-amarelada a castanho escuro	heterogênea, concêntrica, com camadas microcristalinas, espessas e esbranquiçadas, alternadas com camadas cristalinas finas castanho-amareladas
IVc	aspecto homogêneo, cristalino, composto de cristais com graus variáveis de fusão, ângulos e arestas pouco salientes cor: esbranquiçada	estrutura frouxa, cristalina, com organização radial grosseira e concentricidade mais ou menos nítida. presença quase constante de outros constituintes moldando a morfologia cor: esbranquiçada
IVd	aspecto homogêneo, cristalino, finamente rugoso ou em aspecto de couve-flor, frequentemente translúcido cor: creme a cinza claro	compacta, concêntrica, com cristalização radial cor: creme a cinza claro
Va	aspecto homogêneo, cristalino, granuloso, com cristais pouco angulosos ou em forma de brotos, mais ou menos translúcidos e céreos cor: amarelada a castanho-amarelada	homogênea, com cristalização radial, grosseira e difusa cor: amarelada a castanho-amarelo claro
Vb	aspecto homogêneo, microcristalino, ligeiramente liso cor: creme a amarelada	periferia: heterogênea, compacta, microcristalina, finamente concêntrica, de cor creme centro: cristalina e desorganizada, de cor amarelada a castanho amarelo-claro
VIa	cálculo mole, não estruturado, liso, homogêneo cor: esbranquiçada a castanho claro	homogênea, desorganizada, idêntica à superfície Presença de focos de mineralização secundária cor: esbranquiçada a castanho claro

(continuação)

SUBTIPOS	SUPERFICIE
VIb	aspecto heterogêneo, irregular, rugoso e em escamas cor: castanho quase preto, com áreas de cor variável, segundo os constituintes associados

Referências 128,135

SECÇÃO

heterogênea, mais ou menos estruturada, friável,
com concentricidade grosseira e folheada
cor: castanho escuro, com áreas de cor variável,
segundo os constituintes associados
(amarelo-esverdeada para o triamtereno,
castanho-chocolate para a vevelita)

Tabela 19. Composição química e etiologias mais freqüentemente encontradas em cada subtipo morfológico de cálculo, segundo Daudon e cols. *

SUBTIPOS	COMPOSIÇÃO	ETIOLOGIAS
Ia	oxalato de cálcio monohidratado	hiperoxalúria intermitente calcificação papilar rim esponjoso medular
Ib	oxalato de cálcio monohidratado	hiperoxalúria estase devido a anomalia urológica
Ic	oxalato de cálcio monohidratado	hiperoxalúria primária
Id	oxalato de cálcio monohidratado	estase?
IIa	oxalato de cálcio dihidratado	hipercalcúria de qualquer origem
IIb	oxalato de cálcio monohidratado + oxalato de cálcio dihidratado	hipercalcúria intermitente hipercalcúria + hiperoxalúria estase
IIc	oxalato de cálcio dihidratado	hipercalcúria estase
IIIa	ácido úrico anidro	estase hiperuricosúria intermitente
IIIb	ácido úrico anidro + ácido úrico dihidratado	hiperuricosúria
IIIc	uratos diversos e urato ácido de amônio	terapêutica alcalinizante em pacientes com cálculo de ácido úrico

(continuação)

SUBTIPOS	COMPOSIÇÃO	ETIOLOGIAS
IIIId	urato ácido de amônio	terapêutica alcalinizante infecção urinária amoniogênica
IVa1	carbapatita (fosfato de cálcio carbonatado cristalizado)	hiperparatireoidismo primário infecção urinária acidose tubular distal
IVa2	carbapatita + proteína em pequena quantidade	acidose tubular distal cálculos prostáticos
IVb	carbapatita + estruvita + urato ácido de amônio	infecção urinária alcalinizante pielonefrite
IVc	estruvita ± carbapatita	infecção urinária alcalinizante pielonefrite
IVd	bruxita	hiperparatireoidismo primário ?
Va	cistina	cistinúria-lisinúria
Vb	cistina + pequena quantidade de carbapatita	cistinúria-lisinúria + tratamento alcalinizante
VIa	Proteína ± carbapatita, fosfatos amorfos e estruvita	pielonefrite
VIIb	proteínas ± constituintes diversos (oxalato de cálcio monohidratado, medicamentos)	litíase medicamentosa proteinúria decorrente de lesão tubular

* Referências 128, 135

2. OBJETIVOS

Avaliar o papel da cristalúria na prática clínica, através da análise de cristais presentes na urina e do estudo morfológico de cálculos urinários observados em indivíduos da região de Fortaleza, atendidos no Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará, visando:

(i) determinar sensibilidade e especificidade da cristalúria como método auxiliar de diagnóstico na litíase urinária;

(ii) identificar espécies e formas de cristais urinários mais freqüentes nesta população;

(iii) identificar os tipos morfológicos de cálculos urinários mais freqüentes, verificando a associação entre estes e as espécies cristalinas observadas na urina.

3. CASUISTICA E MÉTODOS

3. 1. População

O estudo compreende todos os exames de cristalúria e de análise morfológica de cálculos urinários por nós realizados, no Laboratório de Cristalúria do Centro de Pesquisas em Doenças Hepato-Renais, da Universidade Federal do Ceará, num período de três anos, de setembro de 1993 a setembro de 1996.

Foram analisadas 755 cristalúrias provenientes de 464 pacientes, sendo 238 (51,3%) do sexo masculino e 226 (48,7%) do sexo feminino, com média de idade de 32,1 anos (3 meses a 75 anos), \pm SEM 0,74. Informações sobre o quadro clínico que motivou a solicitação da cristalúria puderam ser obtidas em 719 amostras.

Foram igualmente avaliados 310 cálculos oriundos de 145 pacientes, sendo 51,4% destes, do sexo masculino e 48,6% do sexo feminino, com média de idade de 34,9 anos (4 a 75 anos), \pm SEM 1,2.

Em 86 casos, a análise morfológica dos cálculos foi comparada com aquela da cristalúria, com a finalidade de avaliar a taxa de concordância entre a saturação urinária, sugerida pela espécie cristalina presente na urina, e os distúrbios metabólicos encontrados mais freqüentemente em cada tipo de cálculo.

3. 2. Procedimentos

3. 2. 1. Cristalúria

A primeira micção matinal, com o indivíduo em jejum, foi coletada em

recipiente não estéril, conservada a 37°C e analisada até 2 horas após sua emissão. O volume, pH e densidade da urina foram determinados. O pH urinário foi medido utilizando fita com variação de 0,3 u (Duotest®). Após homogeneização manual da urina, uma alíquota foi retirada do quarto inferior do frasco e colocada em Célula de Malassez para a pesquisa de cristais, utilizando microscopia óptica com luz polarizada (NIKKON). Os diferentes tipos de cristais, suas formas e agregados foram avaliados e quantificados em objetiva de 40x. O tamanho médio e máximo de cada forma de cristal e seus agregados foram determinados. Na avaliação das espécies em forma de grânulos, foram consideradas positivas as amostras contendo um número superior a 10 cristais/mm³. Nestes casos, a apreciação da cristalúria foi semi-quantitativa.

A seguir, uma nova alíquota de 10 ml de urina foi centrifugada a 3000 rpm, durante 10 minutos, sendo o sedimento avaliado para pesquisa de cristais. Nos casos de suspeita de litíase metabólica congênita ou de litíase medicamentosa, a urina foi também conservada a 4°C, durante 24 horas, para posterior análise.

3. 2. 2. Análise morfológica do cálculo urinário

Utilizando lupa de 10 mm com capacidade de aumento de 10 vezes (Prolabo), foi realizada uma análise cuidadosa das características morfológicas da face externa e das camadas internas do cálculo, visualizadas após secção com lâmina de bisturi. Com base na classificação morfológica, foram determinados os constituintes majoritários e minoritários de cada cálculo.

3. 3. Análise estatística

Foram construídas tabelas de contingência para as variáveis discretas e a análise foi realizada usando o teste qui-quadrado de Pearson, para teste de homogeneidade e teste de independência. O teste F da análise de variância para um fator foi usado para as variáveis contínuas.

Os intervalos de confiança para as proporções foram calculados com 95% de confiança segundo a fórmula:

$p \pm 1,96 \times \sqrt{(p \times q / n)}$, onde $q = 1-p$ e $n =$ número da amostra

Os resultados são expressos como média \pm erro médio padrão (SEM).

4. RESULTADOS

Os resultados das análises de cristalúria e dos cálculos são apresentados separadamente.

4. 1. Cristalúria

Como mostra a **tabela 20**, a maioria dos 464 pacientes incluídos no estudo estão distribuídos na faixa etária de 20 a 40 anos.

Cristais foram detectados em 288 das 755 amostras de urina, o que representa uma chance de positividade na amostra global entre 34,6% e 41,6%, com um coeficiente de confiança de 95%. Em 141 amostras (18,7%), foi informado que o paciente fazia uso de medicação específica para algum tipo de distúrbio metabólico, não havendo informações disponíveis em 350 delas (46,3%).

Como mostra a **tabela 21**, diversas situações clínicas motivaram a solicitação da cristalúria: 423 amostras de urina eram provenientes de indivíduos com litíase urinária comprovada; 52 amostras provinham de indivíduos com dor lombar sugestiva de litíase, porém sem comprovação clínica ou radiológica; 68 de transplantados renais; 48 de potenciais doadores de rim; 18 de indivíduos com hematúria; 75 eram decorrentes de investigação familiar de litíase; e 72 de outras situações diversas. Cristais urinários foram detectados em amostras de todos os grupos, com uma maior frequência naquelas provenientes de pacientes litíásicos (40,7%), o que representa uma especificidade de 63,9% (58,3% - 69,5%). É interessante ressaltar que 14 dos 48 (29,2%) indivíduos candidatos a doadores para transplante renal apresentavam cristalúria positiva. Estes grupos não diferiram quanto a idade,

pH e densidade urinária.

Na **tabela 22** podemos ver a distribuição das médias de idade, volume, pH e densidade urinária segundo a presença ou ausência de cristais nas amostras de urina. Diferença significativa foi observada quanto à densidade urinária ($p < 0,001$), com as amostras positivas apresentando valores maiores ($1017 \pm 0,4$) do que aquelas negativas ($1014 \pm 0,3$). Como mostra a **figura 38**, das 288 amostras de urina positivas, 167 (58%) eram provenientes de indivíduos do sexo masculino e 121 (42%) do sexo feminino, enquanto que das 467 amostras negativas, 216 (46%) eram do sexo masculino e 251 (54%) do sexo feminino ($p \geq 0,00173$, g.l.=1).

A **figura 39** mostra que os cristais mais frequentes nas 288 amostras de urina positivas foram os de oxalato de cálcio dihidratado - COD (41,3%), seguido dos cristais de oxalato de cálcio monohidratado - COM (31,9%), ácido úrico dihidratado - AUD (22,2%), fosfato de cálcio amorfo carbonatado complexo - PACC (20,8%), bruxita - bru (7,3%), cistina - cis (5,2%) e estruvita - estru (2,8%). Em 10% das amostras, o tipo de cristal não pôde ser identificado devido ao seu pequeno tamanho ou à apresentação em forma inabitual. Como mostra a **figura 40**, a associação entre espécies cristalinas foi observada em 89 (31%) amostras de urina, sendo as mais frequentes aquelas entre cristais de oxalato de cálcio mono e dihidratado (48,4%).

Na **tabela 23** podemos observar a distribuição das médias de idade, pH e densidade urinária segundo as diferentes espécies cristalinas que foram identificadas. Nas amostras não houve diferença significativa quanto à média de idade em que foram observadas as diferentes espécies de cristais. Os cristais de PACC, cistina e estruvita se precipitaram em urinas com pH médio

superior a 6,0, enquanto o pH médio para a precipitação de cristais de AUD, COD, COM e bruxita foi inferior a 6,0. Como pode ser visto na **figura 41**, os cristais de COD, COM e de cistina foram mais freqüentes no sexo masculino do que no feminino, sendo pertencentes a indivíduos daquele sexo 60,5% das amostras de urina contendo cristais de COD ($p \geq 0,02012$); 60,9% das amostras contendo COM ($p \geq 0,03787$) e 78,9% daquelas em que foram observados cristais de cistina ($p \geq 0,01271$), (g.l.=1, para cada todas as espécies de cristais analisadas).

As amostras de urina de indivíduos candidatos a doação para transplante renal apresentaram uma positividade de 1,9% em relação à amostra global e de 29,2% em relação ao número de candidatos avaliados. Neste grupo foram observados cristais de PACC em 7 amostras (53,8%), cristais de COD em 5 (38,5%), de COM em 4 (30,8%), de bruxita em 1 (7,7%), sendo que em 4 amostras mais de uma espécie cristalina foi observada. Em 7 das 13 amostras (53,8%), havia formação de agregados.

Os cristais de oxalato de cálcio mono e dihidratado foram avaliados quanto ao seu tamanho e à sua forma mais freqüente. Como pode ser visto na **tabela 24**, 71,8% dos cristais de COD e 67,5% dos cristais de COM apresentavam tamanho inferior a 10 μ . Cristais de COD e de COM superiores a 40 μ ocorreram em 3,4% e 1,9% das amostras, respectivamente. Oito formas de cristais de COD foram observadas na urina, sendo mais freqüente a forma bipiramidal (90%, e menos freqüente a forma hexagonal (3,4%). Em 66% das amostras foram observados cristais de COM na forma oval e em 43,5% delas, na forma hematiforme.

Tabela 20. Distribuição de 464 pacientes segundo a faixa etária

IDADE (anos)		n	%
≥	<		
0	10	43	10,0
10	20	46	10,7
20	30	86	20,0
30	40	125	29,1
40	50	75	17,4
50	60	33	7,7
60	70	19	4,4
70	80	3	0,7
TOTAL		430 *	100

* Informações não foram obtidas em 34 pacientes

Tabela 21. Distribuição da frequência de cristalúria positiva, observada em 755 amostras de urina, de acordo com os grupos clínicos estudados

GRUPOS CLINICOS	Número de amostras	Cristalúria positiva	Cristalúria (+)/ grupos **	Cristalúria (+)/ total de urinas **
	n	n	%	%
litíase urinária	423	172	40,7 (36,0-45,4)	22,8 (19,8-25,8)
dor lombar	52	15	28,8 (16,5-41,1)	2 (1-3)
transplante renal	68	28	41,2 (29,5-52,9)	3,7 (2,4-5,0)
candidato a doação renal	48	14	29,2 (16,3-42,1)	1,9 (0,9-2,9)
hematúria	18	3	16,7 (0-33,9)	0,4 (0-0,9)
investigação familiar	75	21	28 (17,8-38,2)	2,8 (1,6-4,0)
outros	36	13	36,1 (20,4-51,8)	1,7 (0,8-2,6)
não identificado	36	22	61,1 (45,2-77)	2,9 (1,7-4,1)
TOTAL	755 *	288	-	38,1 (34,6-41,6)

*um paciente submetido a transplante renal também apresentou litíase urinária

** valores entre prênteses () indicam intervalo de confiança com coeficiente de 95%

Tabela 22. Distribuição das médias de idade, volume urinário, pH e densidade, segundo a presença ou ausência de cristais na urina

PARAMETROS	CRISTALURIA		p
	Positiva	Negativa	
idade (anos)	32,5 ± 0,9	33,8 ± 15,2	0,25
volume urinário (ml)	236 ± 8,5	252 ± 7,1	0,13
pH urinário	5,9 ± 0,1	5,9 ± 0,1	0,53
densidade urinária	1017 ± 0,4	1014 ± 0,3	0,0001

Valores expressos em média ± erro médio padrão

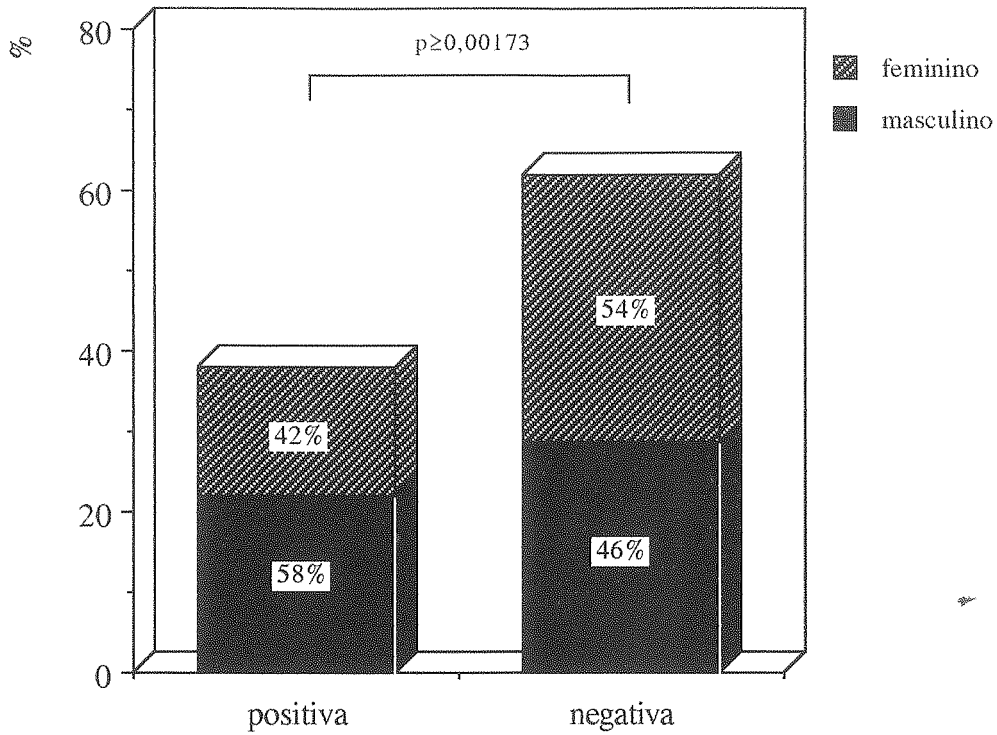


Figura 38. Resultados de cristalúria distribuídos segundo o sexo

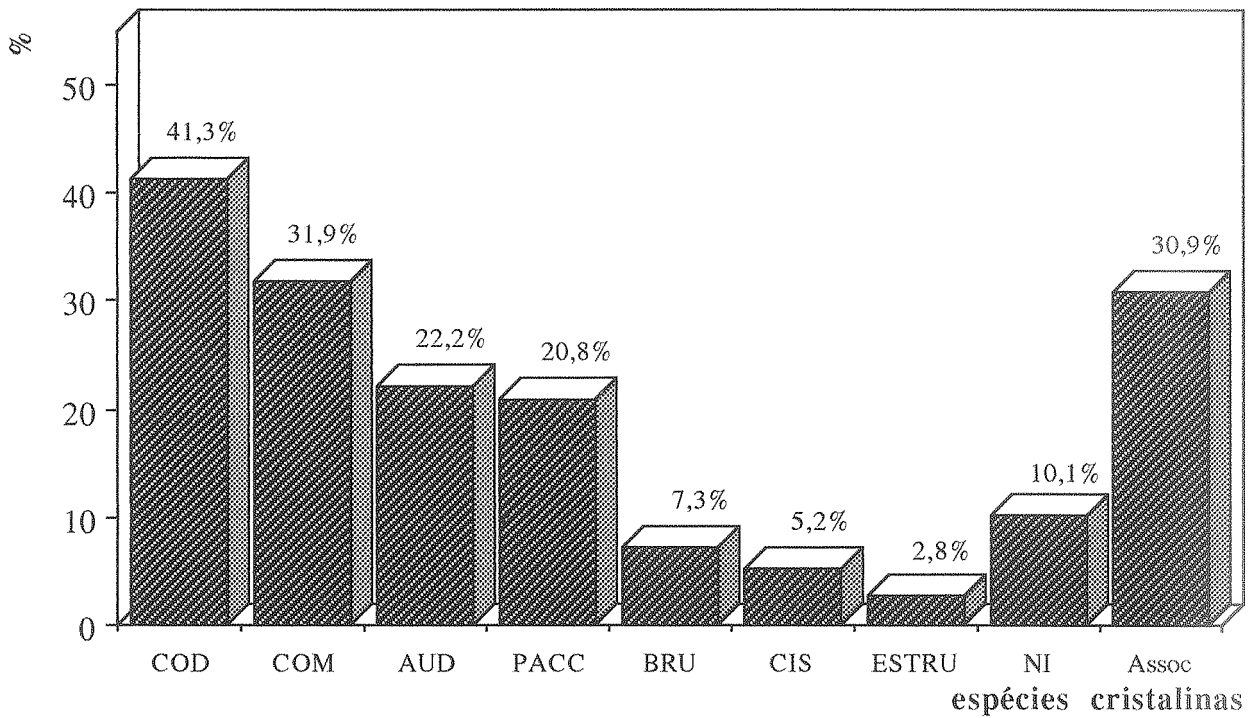


Figura 39. Distribuição de freqüência das espécies cristalinas em 288 amostras de urina

Tabela 23. Distribuição das médias de idade, do pH urinário e densidade urinária, segundo as espécies cristalinas ocorrendo isoladamente

Espécies	n	Idade (anos)	pH urinário	Densidade
COD	53	29,6 ± 2,0	5,8 ± 0,1	1021 ± 0,7
COM	35	33,6 ± 2,5	5,9 ± 0,1	1014 ± 0,9
AUD	42	37,8 ± 3,0	5,4 ± 0,1	1018 ± 1,1
PACC	34	33,2 ± 2,3	6,5 ± 0,1	1015 ± 1,0
Bruxita	3	44,0 ± 7,0	5,9 ± 0,0	1020 ± 2,3
Cistina	13	26,2 ± 1,0	6,4 ± 0,1	1014 ± 0,7
Estruvita	4	34,0 ± 11,5	6,6 ± 0,4	1014 ± 3,9
NI	13	35,5 ± 4,1	5,9 ± 0,1	1012 ± 2,6

Valores expressos como média ± erro médio padrão

COD = oxalato de cálcio dihidratado; COM = oxalato de cálcio monohidratado

AUD = ácido úrico dihidratado; PACC = fosfato de cálcio amorfo carbonatado complexo

NI = não identificado

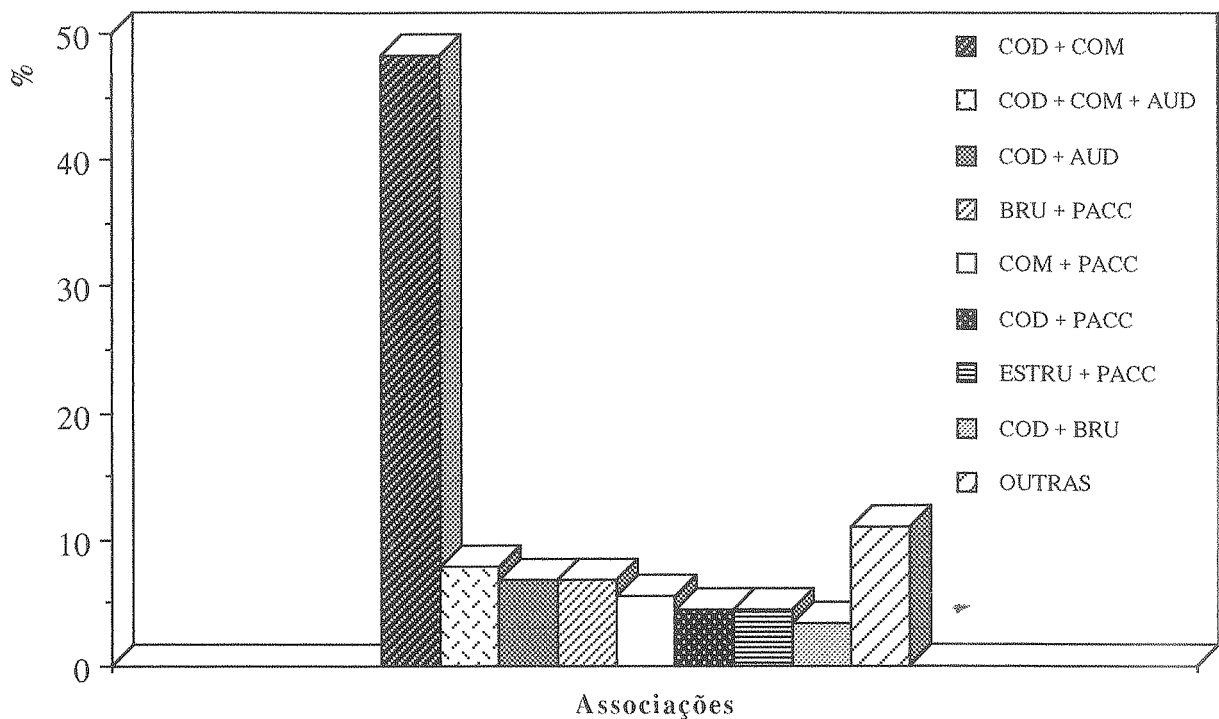


Figura 40. Distribuição das espécies cristalinas mais frequentemente associadas, observadas em 89 amostras de urina

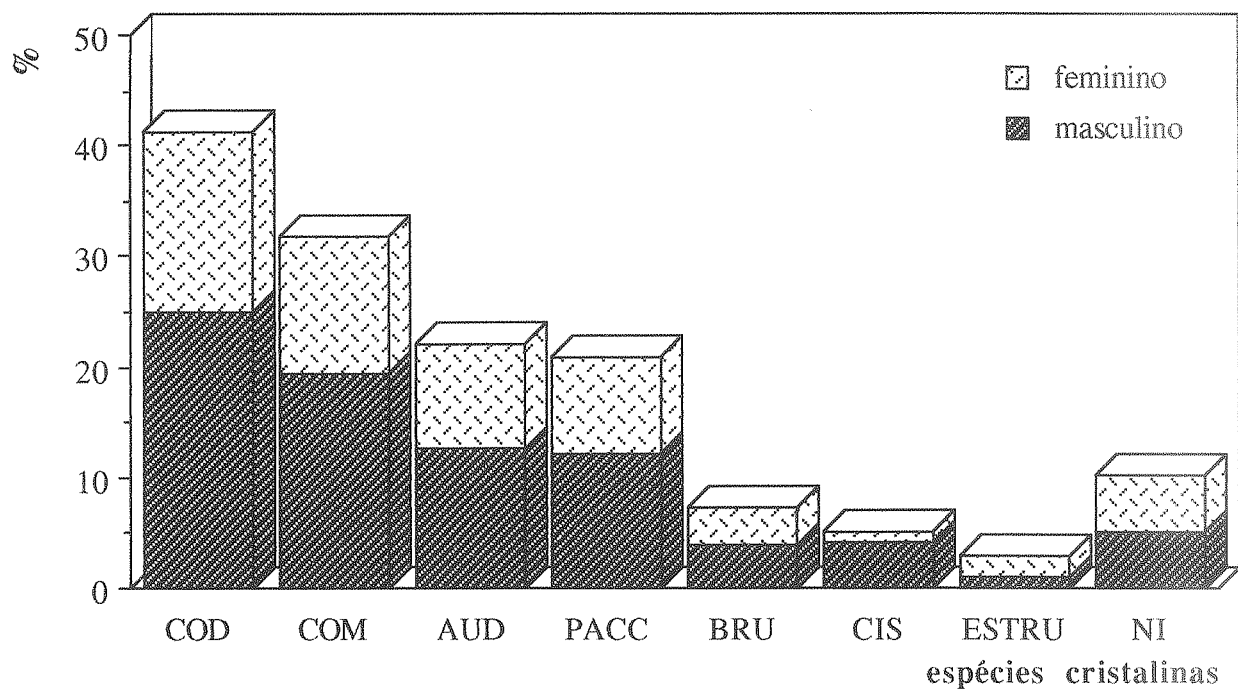


Figura 41. Distribuição das espécie cristalinas observadas de acordo com o sexo, em 288 amostras

Tabela 24. Distribuição dos cristais de oxalato de cálcio mono e dihidratado de acordo com o tamanho

Tamanho (μ)		COD		COM	
\geq	<	n	%	n	%
0	10	127	70,9	106	67,5
10	20	28	15,8	31	19,7
20	30	9	5,0	15	9,6
30	40	7	3,9	2	1,3
	≥ 40	6	3,4	3	1,9
TOTAL		177	100	157	100

COD = cristais de oxalato de cálcio dihidratado

COM = cristais de oxalato de cálcio monohidratado

4.2. Análise morfológica dos cálculos urinários

Dos 145 pacientes analisados, 60% eliminaram múltiplos cálculos e apenas 40% dos pacientes eliminaram um cálculo único. Diante deste comportamento, nos pacientes portadores de litíase múltipla consideramos para análise somente os cálculos com tipagens morfológicas diferentes, o que resultou numa proporção de 156 cálculos para 145 pacientes. Destes, 12 (7,7%) eram coraliformes. Como observado em relação à cristalúria, a maioria dos indivíduos que eliminaram cálculos encontravam-se na faixa etária entre 20 e 40 anos (tabela 25). O modo de eliminação foi identificado em 137 cálculos e assim distribuídos: 47,4%-espontânea, 41,6%-cirúrgica e 11%-litotripsia.

A tabela 26 mostra que o constituinte majoritário dos cálculos mais freqüentemente observado foi o oxalato de cálcio monohidratado - tipo I (44,2%), seguido de oxalato de cálcio dihidratado - tipo II (37,2%), fosfatos - tipo IV (17,3%), ácido úrico - tipo III (13,5%), cistina - tipo V (2,6%) e do tipo VI (0,6%). O constituinte minoritário mais freqüente foi o fosfato (19,2%), seguido do oxalato de cálcio dihidratado (12,8%) e oxalato de cálcio monohidratado (10,2%). Em 3 casos (1,9%) a classificação morfológica não foi possível devido ao pequeno tamanho da amostra. Os cálculos puros foram observados em 72 amostras: 26 (36,1%) do tipo I, 15 (20,8%) do tipo II, 15 (20,8%) do tipo IV, 14 (19,5%) do tipo III e 2 (2,8%) do tipo V. Como podemos ver na tabela 27, os cálculos do tipo IV predominou no sexo feminino, enquanto que os ácido úrico e cistina foram mais freqüentes no sexo masculino, como único componente ou constituinte majoritário. Os cálculos do tipo II puros foram mais freqüentes nas mulheres, porém os cálculos

mistos, contendo oxalato de cálcio dihidratado como componente majoritário, predominaram nos homens. Não observamos diferença na distribuição dos sexos nos cálculos do tipo I puro, enquanto que o tipo I como componente majoritário foi ligeiramente mais freqüente no sexo feminino.

Comparando as análises morfológicas dos cálculos com dados da cristalúria, verificamos que a cristalúria foi positiva em 48 das 86 amostras de urina, mostrando uma chance de positividade nestes pacientes entre 45,4% e 66,2%, com um coeficiente de confiança de 95%. Dos 48 cálculos, 22 (45,8%) eram puros e 26 (54,2%) mistos. A **tabela 28** mostra a freqüência e as chances de serem encontrados cristais que indiquem a presença de saturação urinária compatível com a composição dos cálculos puros ou mistos. Nos cálculos puros, a cristalúria foi concordante com a tipagem morfológica em 100% dos cálculos dos tipos II, III e V, 83% dos cálculos do tipo I, e 50% daqueles do tipo IV. Nos cálculos mistos, cristalúria concordante com o componente majoritário ou minoritário de cada cálculo foi observada em 64,3% (39,3-89,3%) dos cálculos do tipo I, 50% (32,1-68%) dos cálculos do tipo II e 41,2% (17,9-64,5%) daqueles do tipo IV. No único cálculo em que o ácido úrico foi componente minoritário, o exame de urina mostrou cristais de COD. Dos 4 pacientes portadores de cistinúria que eliminaram cálculos, 3 apresentavam cristais de cistina na urina. A chance de encontrar cristais compatíveis com pelo menos um dos constituintes dos cálculos foi de 64% (53,9-64,1%, com um coeficiente de confiança de 95%)

As **figuras 42 a 59** mostram alguns exemplos dos tipos de cálculos observados na nossa casuística.

Tabela 25. Distribuição de 145 pacientes segundo a faixa etária

IDADE (anos)		n	%
≥	<		
0	10	2	1,7
10	20	6	5,2
20	30	23	19,8
30	40	39	33,6
40	50	21	18,1
50	60	17	14,7
60	70	7	6,0
70	80	1	0,9
TOTAL		116 *	100

* Informação não foi obtida em 29 pacientes

Tabela 25. Distribuição de 145 pacientes segundo a faixa etária

IDADE (anos)		n	%
≥	<		
0	10	2	1,7
10	20	6	5,2
20	30	23	19,8
30	40	39	33,6
40	50	21	18,1
50	60	17	14,7
60	70	7	6,0
70	80	1	0,9
TOTAL		116 *	100

* Informação não foi obtida em 29 pacientes

Tabela 26. Distribuição dos 156 cálculos * (72 puros e 81 mistos), segundo os constituintes majoritários e minoritários

TIPOS DE CALCULOS	PUROS		COMPONENTES			
	n	%	Majoritário		Majoritário	
	n	%	n	%	n	%
I	26	36,1	69	44,2	16	10,2
II	15	20,8	58	37,2	20	12,8
III	14	19,5	21	13,5	0	0
IV	15	20,8	27	17,3	29	19,2
V	2	2,8	4	2,6	0	0
VI	-	-	1	0,6	2	1,3
TOTAL	72	100	180	-	67	-

* Em 3 casos (1,9%) a classificação morfológica não pôde ser determinada

Tabela 27. Distribuição dos cálculos puros e dos constituintes majoritários segundo o sexo

Tipos de Cálculos	PURO				MAJORITARIO			
	masculino		feminino		masculino		feminino	
	n	%	n	%	n	%	n	%
I	13	50	13	50	32	48,5	34	51,5
II	2	13,3	13	86,7	31	54,5	26	45,6
III	13	92,9	1	7,1	18	94,7	1	5,3
IV	3	20	12	80	11	40,7	16	59,3
V	2	100	0	-	3	75	1	25

Tabela 28. Percentuais de concordância entre a análise da cristalúria e a tipagem morfológica realizada em 48 cálculos de pacientes com cristalúria positiva

TIPOS DE CALCULOS	Cálculos Puros		Cálculos Mistos	
	n	Concordância (%)	n	Concordância (%)
I	6	83,3	14	64,3 (39,3-89,3)*
II	7	100	30	50 (32,1-68)*
III	4	100	1	0
IV	2	50	17	41,2 (17,9-64,5)*
V	2	100	1	100
VI	1	0	-	-

* Os valores entre parênteses () indicam intervalo de confiança com coeficiente de 95%

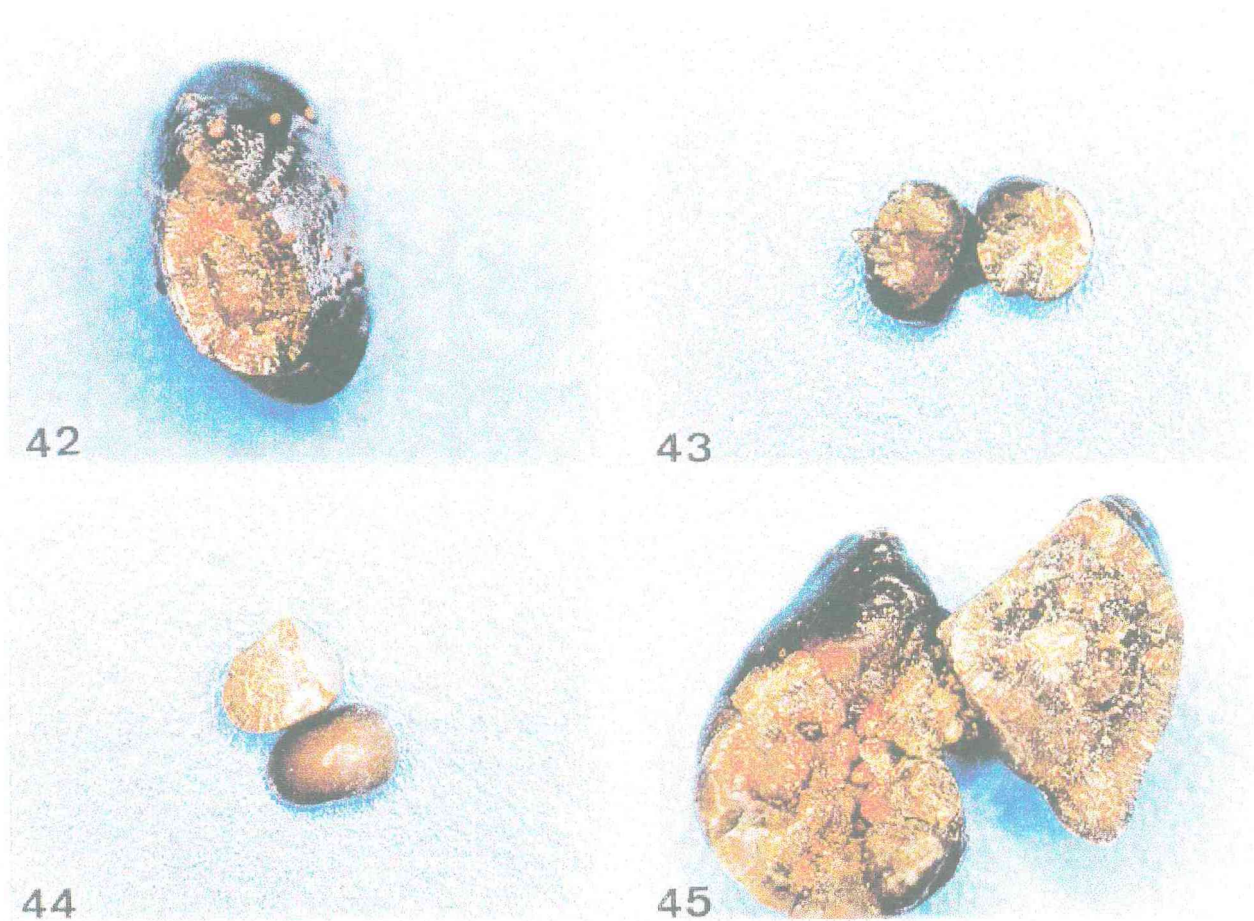


Figura 42. Cálculo de oxalato de cálcio monohidratado (Tipo Ia)

Figura 43. Cálculo de oxalato de cálcio monohidratado, secção (Tipo Ia)

Figura 44. Cálculo de oxalato de cálcio monohidratado (Tipo Ia + Id)

Figura 45. Cálculo de oxalato de cálcio monohidratado, secção (Tipo Ia + Ib)



Figura 46. Cálculo de oxalato de cálcio dihidratado (Tipo IIa)

Figura 47. Cálculo de oxalato de cálcio di e monohidratado (Tipo IIa + Ia)

Figura 48. Cálculo de oxalato de cálcio dihidratado, secção (Tipo IIa)

Figura 49. Cálculo de oxalato de cálcio dihidratado e carbapatita (Tipo IIa + IVa)



Figura 50. Cálculo misto: núcleo Ia, camada média IIa+ IVa, camada periférica IIa + Ia + IVa

Figura 51. Cálculo de ácido úrico, secção (Tipo IIIa)

Figura 52. Cálculo ácido úrico (Tipo IIIb)

Figura 53. Cálculo misto (Tipo IIa+ Ia + IVa)



Figura 54. Cálculo de fosfato: superfície IVb + Ia, camada média IVb, núcleo IVc + IVa

Figura 55. Cálculo de fosfato: superfície IVb + Ia

Figura 56. Cálculo de fosfato: nucleação sobre um fil de sutura

Figura 57. Cálculo de cistina, coraliforme (Tipo Va)

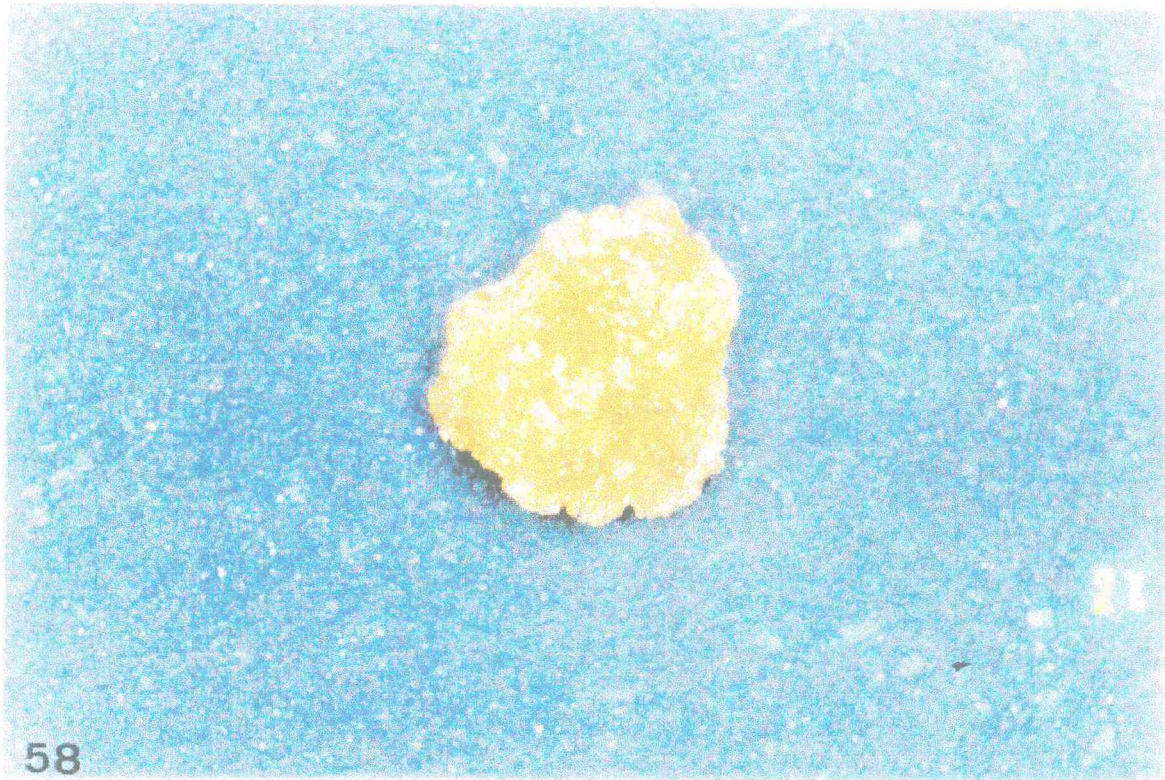


Figura 58. Cálculo de cistina (Tipo Va)

Figura 59. Cálculo de cistina de paciente com terapêutica alcalinizante (Tipo Va + IVa)



Figura 58. Cálculo de cistina (Tipo Va)

Figura 59. Cálculo de cistina de paciente com terapêutica alcalinizante (Tipo Va + IVa)

5. DISCUSSÃO

A formação de cristais é um passo obrigatório no processo litogênico e está relacionada ao grau de saturação urinária e à presença de inibidores da cristalização. Robertson e cols. demonstraram que indivíduos litiásicos excretavam cristais em maior número e tamanho, quando comparados com os indivíduos normais [115]. A frequência com que é detectada a presença de cristais na urina varia de acordo com os grupos de indivíduos analisados. Em população de indivíduos ditos normais ou não selecionados esta varia de 2% a 22% [119,121,137-140]. Quando analisamos a população de indivíduos litiásicos, esta frequência se eleva, com valores variando de 22 a 59% [119,121,139,140].

Em nossa casuística, a chance de encontrar cristais na urina variou de 34,6% a 41,6%. No entanto, esta população engloba diversas categorias de indivíduos, incluindo potenciais doadores de rim e indivíduos em investigação familiar de litíase. Os pacientes portadores de litíase comprovada representaram 56% da população analisada e cristalúria positiva foi observada em 40,7% deles (36-45,4%), revelando uma especificidade entre 58,3% e 69,5%, com um coeficiente de confiança de 95%.

Verificamos em nossa população uma influência da densidade urinária mais elevada e do sexo masculino na positividade da cristalúria. Cottet e cols.[141] analisaram a relação entre a densidade urinária e a presença de cristais. Estes autores concluíram que a ausência de cristais em urina com densidade inferior a 1010 pode não ter significado clínico. Entretanto, quando a densidade é superior a 1025-1035, a ausência de cristais fala em favor da normalidade da urina, pelo menos no que diz respeito à saturação urinária. Em nosso estudo, a densidade urinária das amostras negativas foi de

1014 ± 0,3, enquanto que aquela das amostras positivas foi de 1017 ± 0,4. No entanto, outros autores não encontraram relação entre densidade e presença de cristais [116].

Daudon e cols. analisaram 7000 amostras de urina e mostraram que os cristais de estruvita foram os mais freqüentes (34%), seguido dos cristais de oxalato de cálcio dihidratado (33%), fosfato de cálcio amorfo carbonatado complexo (23%), ácido úrico dihidratado (11%), oxalato de cálcio monohidratado (8%), bruxita (3%) e, raramente, de cistina [119,125]. Hallson e cols. também relataram uma predominância de cristais de fosfato de cálcio, tanto em indivíduos normais (11%) quanto em litiásicos (32%). Neste estudo, os cristais de oxalato de cálcio foram observados em 12% das amostras de urina de litiásicos e em 9% daquelas de indivíduos normais [121].

Nossa casuística mostra que a maioria dos cristais observados foi de oxalato de cálcio, com a forma dihidratada predominando (41,3%) sobre a forma monohidratada (31,9%). Do mesmo modo, naquelas amostras contendo mais de uma forma de cristal, predominou a associação destas duas formas. Os fosfatos de cálcio foram a quarta espécie mais freqüentemente encontrada, sendo que a maioria precipitou como fosfato amorfo.

É interessante ressaltar que observamos uma elevada freqüência de cristais de ácido úrico (22,2%), quando comparada com o que é descrito na literatura, onde os valores têm variado de 3,6% a 11,6% [119,125,138,139]. Ribeiro e cols. analisando 41 crianças portadoras de litíase renal em Fortaleza, mostraram que a hiperuricosúria foi o distúrbio metabólico mais freqüente, ocorrendo em 56,3% dos casos [142]. Estes dados sugerem que o ácido úrico deve ter um papel importante na fisiopatogenia da litíase na

Região.

O ácido úrico é um ácido orgânico fraco com um pK fisiologicamente importante, de 5,5. Os fatores implicados na sua cristalização são: pH urinário abaixo de 5,5, diurese reduzida e hiperuricosúria [143]. Estes cristais podem ocorrer em urinas não hiperuricosúricas, não sendo, portanto, detectados nas avaliações metabólicas habituais. Nestes casos, o tratamento deve visar o aumento do volume urinário, alcalinizar a urina e reduzir a ingesta de purinas, não sendo indicado o uso de inibidores da xantina-oxidase.

A cistinúria é uma doença relativamente rara e a presença de cristais de cistina na urina tem sido relatada ser de 1‰ [125]. A elevada frequência destes cristais na nossa amostra pode ser explicada pela investigação familiar de indivíduos portadores desta patologia, através da realização da cristalúria. O fato de observarmos cálculos de cistina em 2,6% das amostras reforça esta hipótese. Em nossa casuística, os cristais de estruvita representaram apenas 2,8% das amostras positivas, ao contrário do que foi relatado por Daudon e cols.[119].

No que diz respeito à forma e ao tamanho dos cristais de COD, nossos dados estão de acordo com a literatura [115,116,144], mostrando que a maioria destes cristais são observados na forma bipiramidal e têm pequeno tamanho, habitualmente inferior a 12 μ . No entanto, existem divergências com relação à distribuição das formas de cristais segundo o sexo. Nosso estudo mostrou uma predominância do sexo masculino em ambas as formas de cristais, enquanto que Daudon e cols. relataram um predomínio da forma monohidratada no sexo feminino, e igualdade de frequência entre os sexos na forma dihidratada [119,139].

A presença de cristais tem sido observada na urina de indivíduos

normais, sendo mais freqüentes aqueles de oxalato de cálcio dihidratado na forma bipiramidal [139], ou de fosfato de cálcio [121,140]. Entretanto, agregados estão ausentes ou ocorrem em pequena quantidade, geralmente inferior a 6% [121,137,138]. A nossa população de indivíduos saudáveis é representada pelos candidatos a doação para transplante renal. Dos 48 indivíduos analisados, 14 apresentavam cristais de oxalato ou de fosfato na urina, sendo que em 4 deles foi detectado mais de um tipo de cristal e em 7 (53,8%) havia formação de agregados.

Vários métodos físicos têm sido utilizados para estudar a arquitetura e a composição dos cálculos urinários [124,145-149]. No entanto, são metodologias caras e sofisticadas e que não estão disponíveis para uso rotineiro na maioria dos laboratórios clínicos. A análise química, embora seja um método de fácil acesso, fornece apenas informações sobre composição global do cálculo, não diferenciando o núcleo das camadas média e periférica. Além disso, não distingue a forma monohidratada do oxalato de cálcio da forma dihidratada. Pelas razões expostas, optamos por utilizar a classificação morfológica proposta por Daudon e cols.[128,135], uma vez que a mesma suprime parte destas dificuldades e não requer uma metodologia sofisticada.

Dos 310 cálculos analisados em nossa casuística, a morfologia não pôde ser determinada em 3 deles, devido ao pequeno tamanho da amostra. É interessante notar que em 13 ocasiões, a análise foi realizada em fragmentos de litotripsia. Daudon e cols. analisaram 219 desses fragmentos e puderam reconstituir a composição e a estrutura global em 75% das amostras [150]. Os fragmentos foram coletados durante 1 a 2 semanas após o início do tratamento. Na nossa análise pudemos somente determinar o tipo morfológico das amostras em questão.

Na análise de nossos dados, optamos por incluir na amostragem apenas um dos múltiplos cálculos eliminados por um mesmo paciente, desde que apresentassem a mesma tipagem morfológica. Tem sido mostrado que a maioria dos pacientes com litíase recidivante tendem a formar cálculos com as mesmas características [136]. Esta nossa medida visou evitar o vício de amostragem, que poderia aumentar a freqüência de um determinado tipo de cálculo.

Em concordância com os dados da literatura, a maioria dos cálculos por nós analisados eram compostos de oxalato de cálcio. Contudo, o tipo monohidratado foi o constituinte mais freqüentemente encontrado, sendo observado em 44,2% dos cálculos mistos e em 36,1% dos cálculos puros. O oxalato de cálcio dihidratado foi observado em 37,2% dos cálculos mistos e em 20,8% dos cálculos puros. A composição dos cálculos mistos de oxalato de cálcio é semelhante àquela relatada por Daudon e cols. [128,136,151]. Entretanto, a freqüência dos cálculos puros de oxalato de cálcio monohidratado foi inferior à nossa (17%). Os cálculos de fosfatos puros apresentaram uma freqüência semelhante àquela dos cálculos de oxalato de cálcio dihidratado. Nos cálculos mistos, o fosfato foi o constituinte minoritário mais freqüente, sendo observado em 19,2% das amostras.

Em concordância com os dados observados na análise da cristalúria, os cálculos de ácido úrico foram observados com uma freqüência maior (19,5%) do que a relatada por outros autores (11%) [128,152]. Esta observação indica que os cristais de ácido úrico não agiriam apenas como indutores da nucleação heterogênea de cristais de oxalato de cálcio [153,154], mas representariam uma elevada freqüência deste distúrbio metabólico na nossa população.

Ao contrário do observado na cristalúria, os cálculos mistos de oxalato

de cálcio monohidratado foram mais freqüentes no sexo feminino, enquanto que nos cálculos puros foi observado uma igualdade na distribuição dos sexos.

Na comparação entre análise da cristalúria e análise morfológica de cálculos urinários, o resultado foi concordante 83-100% dos cálculos de oxalato de cálcio mono e dihidratado, de ácido úrico e de cistina. Nos cálculos mistos, esta taxa de concordância com o componente majoritário ou minoritário foi menor. Quando analisamos a taxa de concordância global, observamos que a chance dos cristais urinários detectarem pelo menos um dos constituintes dos cálculos variou de 53,9 a 64,1%.

Nossos dados corroboram, portanto, a utilidade e importância da cristalúria na prática clínica, especialmente em nosso meio, onde, além da carência em recursos diagnósticos, é de extrema relevância a realização de estudos epidemiológicos que possam fornecer informações adequadas e confiáveis sobre a prevalência de alterações metabólicas que favorecem a litogênese.

No nosso conhecimento, este é o primeiro estudo realizado no Brasil em que se busca verificar através da análise de cristalúria a prevalência de diferentes causas de litíase, confrontando estas informações aos dados obtidos através da análise morfológica de cálculos urinários. Acreditamos ter iniciado um processo de validação de um recurso diagnóstico valioso.

Os dados deste trabalho assumem ainda maior relevância diante da escassez de informações relacionadas à ocorrência de litíase urinária na região Nordeste. Segundo os nossos resultados, o oxalato e o ácido úrico desempenham um papel importante na fisiopatogenia da litíase nesta Região, onde também parecem ser menos freqüentes, em comparação ao que é

descrito na literatura, os cálculos decorrentes de infecção. Não temos uma avaliação nutricional da nossa população, mas algumas hipótese podem ser levantadas para tentar explicar estes achados. Uma possibilidade é que uma ingestão reduzida em cálcio numa região abastecida por água branda favorecesse a absorção do oxalato. Outra possibilidade é que um consumo aumentado de peixes e frutos-do-mar justificasse a frequência elevada de cristais e cálculos de ácido úrico na população, por se tratar de uma região litoral, ou então, uma ingestão elevada de aves e vísceras pela população carente.

Nossos dados sugerem portanto que fatores ambientais e culturais influenciem e sejam responsáveis por peculiaridades locais no processo de cristalização.

6. CONCLUSÕES

1. A chance de identificar a presença de cristais na urina variou de 34,6% a 41,6% na população analisada;
2. Em pacientes litiásicos, o exame mostrou uma sensibilidade de 40,7% e uma especificidade de 63,9%, com um coeficiente de confiança de 95%;
3. Cristalúria positiva foi encontrada em 29,2% de amostras provenientes de indivíduos saudáveis, sendo observado uma frequência elevada de formas associadas e de agregados;
4. Os cristais mais freqüentes, em ordem decrescente, foram os de oxalato de cálcio dihidratado, oxalato de cálcio monohidratado, ácido úrico dihidratado, fosfato de cálcio amorfo carbonatado complexo, bruxita, cistina e estruvita;
5. A maioria dos cálculos analisados eram de oxalato de cálcio, sendo o oxalato monohidratado o constituinte mais freqüentemente observado. Os cristais e cálculos de ácido úrico ocorreram com uma frequência maior do que aquela relatada na literatura. Estes dados sugerem que o oxalato e o ácido úrico desempenham um importante papel na litogênese da Região;
6. Nos cálculos puros, a análise da cristalúria foi concordante com a tipagem morfológica dos cálculos em 83-100%, exceto para os cálculos de fosfato. Nestes, a concordância foi de 50%;
7. Na amostra global, a chance da cristalúria sugerir pelo menos um dos constituintes do cálculos foi de 41,2% (17,9-64,5%);

8. Com base nestes resultados podemos sugerir que:

8. 1. O exame da cristalúria seja realizado de rotina nos pacientes portadores de litíase urinária, na investigação familiar de casos suspeitos de doença metabólica congênita, na avaliação de potenciais candidatos a doação em transplante renal;

8. 2. Em 41,2% dos casos, este recurso diagnóstico permite inferir corretamente pelo menos um dos constituintes que compoem o cálculo urinário. Nos cálculos puros, exceto para os de fosfato, esta chance se eleva, variando de 83 a 100%;

8. 3. A análise morfológica do cálculo permite classificar a maioria dos cálculos urinários, incluindo alguns fragmentos de litotripsia;

8. 4. Os dois métodos podem ser úteis no diagnóstico e na orientação do tratamento de pacientes litiásicos, especialmente nos serviços que não dispõem de dosagens de oxalato urinário. Além disso, a análise da cristalúria permite avaliar a cristalização de ácido úrico em urinas não hiperuricosúricas;

8. 5. O oxalato e o ácido úrico são fatores de risco litogênico importantes na nossa Região. É possível que fatores locais ambientais e culturais exerçam influência considerável sobre os mecanismos de cristalização.

7. RESUMO

Este estudo foi realizado no período de setembro de 1993 a setembro de 1996, e compreende a análise de 755 cristalúrias provenientes de 464 pacientes, com média de idade de 32,1 anos \pm SEM 0,74, e o estudo morfológico de 156 cálculos urinários oriundos de 145 pacientes, com média de idade de 34,9 anos \pm SEM 1,2. Várias causas motivaram a solicitação do exame de cristalúria: litíase renal = 423, dor lombar = 52, transplante renal = 68, candidatos a doação em transplante renal = 48, investigação familiar de litíase = 75. Cristalúria positiva foi observada em 288 amostras (34,6-41,6%). Nos pacientes litíasicos, este exame mostrou uma sensibilidade de 40,7% e especificidade de 63,9%. Densidade urinária mais elevada e predomínio do sexo masculino foram observados nas amostras positivas em relação às negativas. Os cristais mais frequentes, em ordem decrescente, foram os de oxalato de cálcio dihidratado, oxalato de cálcio monohidratado, ácido úrico dihidratado, fosfato de cálcio amorfo carbonatado complexo, bruxita, cistina e estruvita. Associações de espécies cristalinas ocorreram em 31% das amostras positivas. Os cristais de oxalato de cálcio foram mais frequentes no sexo masculino. Dos 156 cálculos analisados, o oxalato de cálcio monohidratado foi o constituinte majoritário mais frequente, enquanto que o fosfato foi o minoritário. O segundo constituinte mais frequente, tanto majoritário quanto minoritário, foi o oxalato de cálcio dihidratado. Os cálculos puros foram observados em 72 amostras: tipo I = 36,1%, tipo II = 20,8%, tipo IV = 20,8%, tipo III = 19,5%, tipo V = 2,8%. Houve predomínio do sexo feminino nos cálculos do tipo II puro e IV, e do sexo masculino nos tipos III e V. A cristalúria foi positiva em 48 de 86 pacientes que eliminaram cálculos (chance entre 45,4% a 66,2%). Os cristais foram concordantes com a tipagem morfológica em 83-100% dos cálculos dos tipos I, II, III e V puros. Nos cálculos do tipo IV, esta taxa foi de apenas 50%. Na amostra global, a chance da cristalúria inferir corretamente pelo menos um dos constituintes que compõem os cálculos foi de 41,2%. Sendo o primeiro estudo associando informação sobre prevalência de cristalúria e análise de cálculo realizado na região Nordeste, podemos sugerir que oxalato e ácido úrico têm um importante papel na fisiopatogenia da litíase urinária na região, provavelmente devido a fatores locais ambientais e culturais. Sugerimos que estes métodos sejam utilizados na prática clínica, especialmente na avaliação e seguimento de pacientes litíasicos, bem como na investigação familiar de litíase.



CONSIDERAÇÕES FINAIS



A prevalência da litíase urinária tem aumentado nos Estados Unidos e em vários países da Europa [12,13]. Estudos têm mostrado que alguns aspectos da formação dos cálculos urinários têm se modificado ao longo dos anos, especialmente nos países industrializados.

Na atualidade, o oxalato de cálcio representa a principal causa de litíase urinária. Fatores ambientais e mudanças nos hábitos alimentares têm sido responsabilizados, em parte, pelas alterações observadas no comportamento desta patologia [14,15]. A ingesta alimentar em cálcio tem recebido enfoque especial, principalmente pelo fato da hiper calciúria ser o distúrbio metabólico mais frequentemente estudado. A partir da classificação proposta por Pak e cols., os pacientes apresentando hiper calciúria do tipo absorptiva foram aconselhados a manter uma ingesta alimentar de cálcio de aproximadamente 400 mg/dia [16]. Na avaliação da ingesta alimentar, o conteúdo de cálcio da água tem sido muitas vezes negligenciado. No entanto, vários estudos têm mostrado uma menor prevalência de litíase urinária nas regiões abastecidas com água dura [60-65]. Com base nestes dados, avaliamos o efeito de teores diferentes de cálcio de três diferentes tipos de água mineral - 78 mg/l, 222 mg/l e 476 mg/l, na formação de cristalúria oxalo-cálcica. Utilizando o modelo experimental de sobrecarga oral de oxalato, em ratos Wistar submetidos a dieta pobre (0,1%) e normal em Ca (1,0%), verificamos que nos animais submetidos a dieta pobre em Ca, a sobrecarga em oxalato acarretou maior formação de cristais de oxalato de cálcio naqueles animais que receberam água com menor teor em Ca, onde também foi observado um aumento na oxalúria e uma redução na calciúria. Nos animais que receberam dieta normal em cálcio, a formação de cristais de oxalato de cálcio não foi influenciada pelo teor em mineral da água. Assim, a redução na ingesta

alimentar de cálcio favorece a absorção do oxalato, aumentando o risco litogênico.

A partir da análise de cristalúria e do estudo morfológico de cálculos urinários, observamos que na região Nordeste do Brasil, o oxalato e o ácido úrico representam importantes fatores litogênicos. É possível que hábitos alimentares locais, associados a fatores ambientais possam justificar estes achados, sendo possível especular entre eles, o baixo teor em cálcio da água disponível para o consumo da população e a ingesta aumentada de frutos do mar, vísceras e aves.

Com base nestas observações sugerimos que seja dada uma maior importância na avaliação do oxalato e do ácido úrico nos pacientes portadores de litíase renal desta Região, com especial enfoque nos hábitos alimentares e no teor de cálcio da ingesta. A recomendação de dieta reduzida em cálcio deve ser evitada, pois pode agravar o risco litogênico e acarretar balanço negativo em cálcio. A realização do exame de cristalúria e a análise morfológica dos cálculos podem oferecer importantes informações na avaliação e seguimento dos pacientes litiásicos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goldman IL, Resnick MI, Buck AC. (1990) The history of urinary lithiasis and its treatment. In Wickham J E A, Buck A C (eds): **Renal Tract Stone: Metabolic Basis and Clinical Practice**. Churchill Livingstone, London, pp 3-18.
2. Griffith DP, Osborne CA. (1987) Infection (urease) stones. **Min. Electrol. Metab.** 13: 278-285.
3. Griffith DP. (1978) Struvite stones. **Kidney Int.** 13: 372-382.
4. Faure G, Sarromon JP. (1982) La lithiase coralliforme. **J. Urol. (Paris)** 88: 413-501.
5. Vries A, Sperling O. (1974) Recent data on uric acid lithiasis. In Hamburger J, Crosnier J, Maxwell MH (eds): **Advances in Nephrology**. Year Book Medical Publishers Inc, Chicago, 3: pp 89-114.
6. Richet G. (1995) The chemistry of urinary stones around 1800: A first in clinical chemistry. **Kidney Int.** 48: 876-886.
7. Daudon M, Hennequin C, Bader C, Jungers P, Lacour B, Drüeke T. (1994) Inhibiteurs de cristallisation dans l'urine. In Funck-Bretano JL, Bach JF, Kreis H, Grünfeld JP (eds): **Actualités Néphrologiques Jean Hamburger**. Médecine-Sciences Flammarion, Paris, pp 165-220.
8. Iancu TC, Danpure CJ. (1987) Primary hyperoxaluria type I: ultrastructural observations in liver biopsies. **J. Inher. Metab. Dis.** 10: 330-338.
9. Danpure CJ, Cooper PJ, Wise PJ, Jennings PR. (1989) An enzyme trafficking defect in two patients with primary hyperoxaluria type 1: Peroxisomal Alanine/Glyoxylate Aminotransferase rerouted to mitochondria. **J. Cell Biol.** 108: 1345-1352.

10. Watts RWE, Danpure CJ, De Pauw L, Toussaint C and the European Study Group on Transplantation in Hyperoxaluria Type 1. (1991) Combined liver-kidney and isolated liver transplantations for primary hyperoxaluria type 1: The European Experience. *Nephrol. Dial. Transplant.* 6: 502-511.
11. Spirnak JP, Resnick MI. (1990) Extracorporeal shock wave lithotripsy. In Resnick and Pak (eds): *Urolithiasis: a Medical and Surgical Reference*. W B Saunders Company, Philadelphia pp 321-361.
12. Johnson CM, Wilson DM, O'Fallon WM, Malek RS, Kurland LT. (1979) Renal stone epidemiology: a 25-year study in Rochester, Minnesota. *Kidney Int.* 16: 624-631.
13. Sierakowski R, Finlayson B, Landes RR, Finalyson CD, Sierakowski N. (1978) The frequency of urolithiasis in hospital discharge diagnose in the United States. *Invest. Urol.* 15: 438-441.
14. Asper R. (1984) Epidemiology and socioeconomic aspects of urolithiasis. *Urol. Res.* 12: 1-5.
15. Jaeger P, Hess B, Takkinen R, Zipperle L. (1994) Déterminants nutritionnels de la lithiase urinaire. In Funck-Bretano JL, Bach JF, Kreis H, Grünfeld JP (eds): *Actualités Néphrologiques Jean Hamburger*. Médecine-Sciences Flammarion, Paris, pp 221-229.
16. Pak C Y C, Kaplan R, Bone H, Townsend J, Waters O. (1975) A simple test for the diagnostic of absorptive, resorptive and renal hypercalciurias. *N. Engl. J. Med.* 292: 497-500.
17. Coe FL, Favus MJ, Crockett T, Strauss AL, Parks JH, Porat A, Gantt CL, Sherwood LM. (1982) Effects of low-calcium diet on urine calcium excretion, parathyroid function and serum 1,25(OH)₂D₃ levels in patients with idiopathic hypercalciuria and in normal subjects. *Am. J. Med.* 72: 25-32.

18. Thomas J, Charransol G, Barthelemy C, Thomas E, Legrand JC, Desgrez P, Steg A. (1983) Oxalurie dans la lithiase urinaire. *Presse Med* 12 (32): 1991-1994.
19. Larsson L, Tiselius HG. (1987) Hyperoxaluria. *Min. Elec. Metab.* 13: 242-250.
20. Olthuis FMFG, Markslag AMG, Elhorst JTK, Dagneaux PGLCK. (1977) Urinary oxalate estimation. *Clin. Chim. Acta* 75: 123-128.
21. Kok DJ, Papapoulos SE, Blomen LJMJ, Bijvoet OLM. (1988) Modulation of calcium oxalate monohydrate crystallization kinetics in vitro. *Kidney Int.* 34: 346-350.
22. Gershoff SN, Andrus SB. (1961) Dietary magnesium, calcium, and vitamin B6 and experimental nephropathies in rats: calcium oxalate calculi, apatite nephrocalcinosis. *J. Nutrition* 73: 308-316.
23. Faragalla FF, Gershoff SN. (1963) Interrelations among magnesium, vitamin B6, sulfur and phosphorus in the formation of kidney stones in the rat. *J. Nutrition* 81: 60-66.
24. Andrus SB, Gershoff SN, Faragalla FF, Prien EL. (1960) Production of calcium oxalate renal calculi in vitamin B6-deficient rats. *Lab. Invest.* 9: 7-27.
25. Melon JM, Thomas J, Pierre R. (1971) La lithiase oxalique expérimentale à l'acide glyoxylique chez le rat. Essai de prévention par la succinimide. *Thérapie XXVI*: 991-998.
26. Khan SR, Finlayson B, Thomas JrWC, Hackett RL. (1984) Relationship between experimentally induced crystalluria and relative supersaturation of various stone salts in rats. *Urol. Res.* 12: 271-273.
27. Roberts JA, Seibold HR. (1969) Ethylene glycol toxicity in the monkey. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 15: 624-631.

28. Price CJ, Kimmel CA, Tyl RW, Marr MC. (1985) The developmental toxicity of ethylene glycol in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 81: 113-127.
29. Parry MF, Wallach D. (1974) Ethylene glycol poisoning. *Am. J. Med.* 57: 143-150.
30. Terlinsky AS, Grochowski J, Geoly KL, Stauch BS, Hefter L. (1981) Identification of atypical calcium oxalate crystalluria following ethylene glycol ingestion. *Am. J. Clin. Pathol.* 76: 223-226.
31. Jacobsen D, Åkesson I, Shefter E. (1982) Urinary calcium oxalate monohydrate crystals in ethylene glycol poisoning. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 42: 231-234.
32. Godolphin W, Meagher EP, Sanders HD, Frohlich J. (1980) Unusual calcium oxalate crystals in ethylene glycol poisoning. *Clin. Toxicol.* 16 (4): 479-486.
33. Hagler L, Herman RH. (1973) Oxalate metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 26: 758-765.
34. Williams AW, Wilson DM. (1990) Dietary intake, absorption, metabolism, and excretion of oxalate. *Semin. Nephrol.* 10 (1): 2-8.
35. Binder HJ. (1974) Intestinal oxalate absorption. *Gastroenterology.* 67: 441-446.
36. Farooqui S, Mahmood A, Nath R, Thind SK. (1981) Nutrition & urolithiasis: part I - intestinal absorption of oxalate in vitamin B₆ deficient rats. *Indian J. Exp. Biol.* 19: 551-554.
37. Hatch M, Freel RW, Goldner AM, Earnest DL. (1984) Oxalate and chloride absorption by the rabbit colon: sensitivity to metabolic and anion transport inhibitors. *Gut* 25: 232-237.
38. Williams HE, Wandzilak TR. (1989) Oxalate synthesis, transport and the hyperoxaluric syndromes. *J. Urol.* 141: 742-749.

39. Greger R, Lang F, Oberleithner H, Deetjen P. (1978) Handling of oxalate by the rat kidney. *Pflügers Arch.* 374: 243-248.
40. Grases F, Millan A, Conte A. (1990) Production of calcium oxalate monohydrate, dihydrate or trihydrate. A comparative study. *Urol. Res.* 18: 17-20.
41. Daudon M, Réveillaud RJ. (1986) Cristalluries médicamenteuses: mythes et réalités. *Ann. Biol. Clin.* 44: 25-34.
42. Dykstra MJ, Hackett RL. (1979) Ultrastructural events in early calcium oxalate crystals formation in rats. *Kidney Int.* 15: 640-650.
43. Khan SR, Hackett RL (1980) The use of SEM in the study of oxalate induced experimental nephrolithiasis. *Scann. Elec. Microsc.* III: 379-386.
44. Mijan JL, Aneiros J, O'Valle F, Zuloaga A, Martinez JL, Camara M. (1988) Experimental oxalosis in rats: an electron microscopic study. *Urol. Int.* 43: 19-23.
45. Robinson M, Pond CL, Laurie RD, Bercz JP, Henningsen G, Condie LW. (1990) Subacute and subchronic toxicity of ethylene glycol administered in drinking water to Sprague-Dawley rats. *Drug Chem. Toxicol.* 13 (1): 43-70.
46. Bove KE. (1966) Ethylene glycol toxicity. *Am. J. Clin. Pathol.* 45 (1): 46-50.
47. Gessner PK, Parke DV, Williams RT. (1961) The metabolism of ¹⁴C-labelled ethylene glycol. *Biochem. J.* 79: 482-489.
48. Melnick RL. (1984) Toxicities of ethylene glycol and ethylene glycol monoethyl ether in Fischer 344/N rats and B6C3F₁ mice. *Environ. Health Perspect.* 57: 147-155.
49. Rushton HG, Spector M. (1982) Effects of magnesium deficiency on intratubular calcium oxalate formation and crystalluria in hyperoxaluric rats. *Am. J. Urol.* 127: 598-604.

50. Rushton HG, Spector M, Rdgers AL, Hughson M, Magura CE. (1981) Developmental aspects of calcium oxalate tubular deposits and calculi induced in rat kidneys. *Inv. Urol.* 19 (1): 52-57.
51. Lyon ES, Borden TA, Vermeulen CW. (1966) Experimental oxalate lithiasis produced with ethylene glycol. *Invest. Urol.* 4(2): 143-151.
52. Cifuentes JLRGZM, Garcia JMC. (1977) Efecto del magnesio sobre la litiasis experimental oxalo-cálcica desarrollada con etilenglicol. *Rev. Clin. Esp.* 147 (1): 11-14.
53. Blood FR. (1965) Chronic toxicity of ethylene glycol in the rat. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 3: 229-234.
54. Hodgkinson A. (1978) Oxalic acid metabolism in rat. *J. Nutr.* 108: 1155-1161.
55. Khan SR, Hackett RL. (1985) Calcium oxalate urolithiasis in the rat: is it a model for human stone disease? A review of recent literature. *Scann. Elec. Microsc.* II: 759-774.
56. Khan SR, Finlayson B, Hackett RL. (1979) Histologic study of the early events in oxalate induced intranephronic calculosis. *Invest. Urol.* 17 (3): 199-202.
57. Khan SR, Finlayson B, Hackett RL. (1979) Scanning electron microscopy of calcium oxalate crystal formation in experimental nephrolithiasis. *Lab. Invest.* 41 (6): 504-510.
58. Ribaya JD, Gershoff SN. (1982) Factors affecting endogenous oxalate synthesis and its excretion in feces and urine in rats. *J. Nutr.* 112: 2161-2169.
59. Pak CYC, Sakhaee K, Crowther C, Brinkley L. (1980) Evidence justifying a high fluid intake in treatment of nephrolithiasis. *Ann. Intern. Med.* 93 (Part 1): 36-39.

60. Juuti M, Heinonen OP. (1980) Incidence of urolithiasis and composition of household water in Southern Finland. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 14: 181-187.
61. Sierakowski R, Finlayson B, Landes R. (1979) Stone incidence as related to water hardness in different geographical regions of the United States. *Urol. Res.* 7: 157-160.
62. Churchill D, Bryant D, Fodor G, Gault MH. (1978) Drinking water hardness and urolithiasis. *Ann. Intern. Med.* 88(4): 513-514.
63. Rose GA, Westbury EJ. (1975) The influence of calcium content of water, intake of vegetables and fruit and of other food factors upon the incidence of renal calculi. *Urol. Res.* 3: 61-66.
64. Mates J. (1969) External factors in the genesis of urolithiasis. In; *Proceedings of renal stone research symposium*. Hodgkinson A, Nordin BEC (eds). Churchill Livingstone, London, pp 59.
65. Sakly R, Hamdaoui M, Kammoun A, Ben Khamsa M, Kallal Z. (1990) Etude sur les caracteristiques physico-chimiques des eaux des puits dans la region de Kairouan et l'incidence des lithiases renales. *Tunisie Med.* 68 (4): 291-297.
66. Donaldson D, Pryce JD, Rose GA, Tovey JE. (1979) Tap water calcium and its relationship to renal calculi and 24h urinary calcium output in Great Britain. *Urol. Res.* 7: 273-276.
67. Churchill DN, Maloney CM, Bear J, Bryant DG, Fodor G, Gault MH. (1980) Urolithiasis - a study of drinking water hardness and genetic factors. *J. Chron. Dis.* 33: 727-731.
68. Shuster J, Finlayson B, Scheaffer R, Sierakowski R, Zoltek J, Dzegede S. (1982) Water hardness and urinary stone disease. *J. Urol.* 128: 422-425.

69. Torrez Ramírez C, Navarro-Sánchez Ortiz A, Zuluaga Gómez A, Aguilar Ruiz J, Espejo Maldonado E, Abad Menor F. (1981) Influencias estacionales de la edad, sexo y composición del agua bebida sobre los cólicos nefríticos. *Arch. Esp. Urol.* 34 (4): 273-288.
70. Dauncey MJ, Widdowson EM. (1972) Urinary excretion of calcium, magnesium, sodium, and potassium in hard and soft water areas. *Lancet* 1: 711-715.
71. Shuster J, Finlayson B, Scheaffer RL, Sierakowski R, Zoltek J, Dzegede S. (1985) Primary liquid intake and urinary stone disease. *J. Chron. Dis.* 38 (11): 907-914.
72. Shuster J, Jenkins A, Logan C, Barnett T, Riehle R, Zacksoń D, Wolfe H, Dale R, Daley M, Malik I, Schnarch S. (1992) Soft drink consumption and urinary stone recurrence: a randomized prevention trial. *J. Clin. Epidemiol.* 45 (8): 911-916.
73. Broadus AE, Thier SO. (1979) Metabolic basis of renal-stone disease. *N. Engl. J. Med.* 300: 839-845.
74. Khan SR. (1991) Pathogenesis of oxalate urolithiasis: lessons from experimental studies with rats. *Am. J. Kidney Dis.* 17 (4): 398-401.
75. Zarembski PM, Hodgkinson A. (1969) Some factors influencing the urinary excretion of oxalic acid in man. *Clin. Chim. Acta* 25: 1-10.
76. Hodgkinson A. (1974) Relations between oxalic acid, calcium, magnesium and creatinine excretion in normal men and male patients with calcium oxalate kidney stones. *Clin. Sci. Mol. Med.* 46: 357-367.
77. Madorsky ML, Finlayson B. (1977) Oxalate absorption from intestinal segments of rats. *Invest. Urol.* 14 (4): 274-277.
78. Jungers P. (1989) Traitement médical de la lithiase calcique. In Jungers P, Daudon M, Le Duc A (eds): *Lithiase Urinaire*. Médecine-Sciences, Flammarion, France, pp 524-574.

79. Robertson WG, Peacock M. (1980) The cause of idiopathic calcium stone disease: hypercalciuria or hyperoxaluria? *Nephron* 26: 105-110.
80. Werness PG, Bergert JH, Smith LH. (1981) Crystalluria. *J. Crystal Growth* 53: 166-181.
81. Daudon M. (1989) Modèles de cristallisation. In Jungers P, Daudon M, Le Duc A (eds): *Lithiase Urinaire*. Médecine-Sciences, Flammarion, France, pp 158-195.
82. Boistelle R. (1986) The concepts of crystal growth from solution. In Grünfeld JP, Maxwell MH, Bach JF, Crosnier J, Funck-Bretano JL (eds) *Advances in Nephrology*. Year Book Medical Publishers, Chicago, 15: pp 173-218.
83. Robertson WG, Scurr DS, Bridge CM. (1981) Factors influencing the crystallization of calcium oxalate in urine - A critique. *J. Crystal Growth* 53: 182-194.
84. Smith LH. (1991) Diet and hyperoxaluria in the syndrome of idiopathic calcium oxalate urolithiasis. *Am. J. Kidney Dis.* 4: 370-375.
85. Kok DJ, Khan SR (199) Calcium oxalate nephrolithiasis, a free or fixed particle disease. *Kidney Int.* 46: 847-854.
86. Robertson WG. (1969) A method for measuring calcium crystalluria. *Clin. Chim. Acta* 26: 105-110.
87. Kregzde J, Lambert LL, Davidson WD. (1969) Lysozymuria in renal calculus following spinal cord injury. *Urol. Int.* 24: 310-317.
88. Ching KN, Karam JH, Choy FB, Kolb FO, Grodsky GM. (1972) Hyperinsulinuria in patients with renal calculi. *Clin. Chim. Acta* 40: 383-389.
89. Backman U, Danielson BG, Sohtell M. (1976) Urinary excretion of B₂-microglobulin in renal stone patients under normal conditions and during acidosis and alkalosis. *Scand. J. Urol. Nephrol. suppl.* 35: 76-90.

90. Khan SR, Shevock PN, Hackett RL. (1989) Urinary enzymes and calcium oxalate urolithiasis. *J. Urol.* 142: 846-849.
91. Guder WG, Ross BD. (1984) Enzyme distribution along the nephron. *Kidney Int.* 26: 101-111.
92. Stokke O. (1974) Preservation of gamma-glutamyl transpeptidase activity in human urine. *Clin. Chim. Acta* 57: 143-148.
93. Baggio B, Gambaro G, Ossi E, Favaro S, Borsatti A. (1983) Increased urinary excretion of renal enzymes in idiopathic calcium oxalate nephrolithiasis. *J. Urol.* 129: 1161-1162.
94. Marangella M, Fruttero B, Bruno M, Linari F. (1982) Hyperoxaluria in idiopathic calcium stone disease: further evidence of intestinal hyperabsorption of oxalate. *Clin. Sci.* 63: 381-385.
95. Bataille P, Charransol G, Gregoire I, Daigre JL, Coevoet B, Makdassi R, Pruna A, Locquet P, Sueur JP, Fournier A. (1983) Effect of calcium restriction on renal excretion of oxalate and the probability of stones in the various pathophysiological groups with calcium stones. *J. Urol.* 130: 218-223.
96. Jaeger P, Portmann L, Jacquet AF, Burckhardt P. (1985) Influence of the calcium content of the diet on the incidence of mild hyperoxaluria in idiopathic renal stone formers. *Am. J. Nephrol.* 5: 40-44.
97. Laminski NA, Meyers AM, Kruger M, Sonnekus MI, Margolius LP. (1991) Hyperoxaluria in patients with recurrent calcium oxalate calculi: dietary and other risk factors. *Br. J. Urol.* 68: 454-458.
98. Pinto B, Crespí G, Solé-Balcells F, Barceló P. (1974) Patterns of oxalate metabolism in recurrent oxalate stone formers. *Kidney Int.* 5: 285-291.
99. Hodgkinson A. (1978) Evidence of increased oxalate absorption in patients with calcium-containing renal stones. *Clin. Sci. Mol. Med.* 54: 291-294.

100. Williams HE. (1978) Oxalic acid and the hyperoxaluric syndromes. *Kidney Int.* 13: 410-417.
101. Schwille PO, Hanisch E, Scholz D. (1984) Postprandial hyperoxaluria and intestinal oxalate absorption in idiopathic renal stone disease. *J. Urol.* 132: 650-655.
102. Marshall RW, Cochran M, Hodgkinson A. (1972) Relationships between calcium and oxalic acid intake in the diet and their excretion in the urine of normal and renal-stone-forming subjects. *Clin. Sci.* 43: 91-99.
103. Barilla DE, Notz C, Kennedy D, Pak CYC. (1978) Renal oxalate excretion following oral oxalate loads in patients with ileal disease and with renal and absorptive hypercalciurias. *Am. J. Med.* 64: 579-585.
104. Tiselius HG, Ahlstrand C, Lundström B, Nilsson MA. (1981) [¹⁴C] Oxalate absorption by normal persons, calcium oxalate stone formers, and patients with surgically disturbed intestinal function. *Clin. Chem.* 27 (10): 1682-1685).
105. Galosy R, Clarke L, Ward DL, Pak CYC. (1980) Renal oxalate excretion in calcium urolithiasis. *J. Urol.* 123: 320-323.
106. Jaeger P, Portmann L, Jacquet AF, Burckhardt P. (1984) Drinking water for stone formers: is the calcium content relevant? *Eur. Urol.* 10: 53-54.
107. Sommariva M, Rigatti P, Viola MR. (1987) Profilassi della recidiva della litiasi urinaria: acque minerali ad alto o basso contenuto di calcio? *Min. Med.* 78: 1823-1829.
108. Ackermann D, Baumann JM, Futterlieb A, Zingg EJ. (1988) Influence of calcium content in mineral water on chemistry and crystallization conditions in urine of calcium stone formers. *Eur. Urol.* 14: 305-308.
109. Pak CYC, Smith LH, Resnick MI, Weinerth JL. (1984) Dietary management of idiopathic calcium urolithiasis. *J. Urol.* 131: 850-852.

110. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer J. (1993) A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N. Engl. J. Med.* 328: 833-838.
111. Daudon M. (1989) Mécanismes de la lithogénèse. In Jungers P, Daudon M, Le Duc A (eds): *Lithiase Urinaire*. Médecine-Sciences, Flammarion, France, pp 114-157.
112. Boistelle R. (1985) Concepts de la cristallisation en solution. In Crosnier J, Funck-Bretano JL, Bach JF, Grünfeld JP (eds): *Actualités Néphrologiques*. Médecine-Sciences Flammarion, Paris, pp 159-222.
113. Robertson WG, Peacock M, Marshall RW, Marshall DH, Nordin BEC. (1976) Saturation-inhibition index as a measure of the risk of calcium oxalate stone formation in the urinary tract. *N. Engl. J. Med.* 294: 249-252.
114. Pak CYC, Galosy RA. (1980) Propensity for spontaneous nucleation of calcium oxalate. Quantitative assessment by urinary FPR-APR discriminant score. *Am. J. Med.* 69: 681-689.
115. Robertson WG, Peacock M, Nordin BEC. (1969) Calcium crystalluria in recurrent renal-stone formers. *Lancet* 5: 21-24.
116. Crassweller PO, Brandes L, Katirtzoglou A, Oreopoulos DG. (1979) Studies of crystalluria in recurrent calcium lithiasis. *Can J. Surg.* 22(6): 527-529.
117. Hallson PC, Rose GA. (1989) Risk factors for urinary calcium oxalate crystals as revealed by their specific enzymatic assay. *Br. J. Urol.* 64: 451-457.
118. Ahlstrand C, Tiselius HG, Larsson L. (1984) Studies on crystalluria in calcium oxalate stone formers. *Urol. Res.* 12:103-106.

119. Daudon M, Protat MF, Réveillaud RJ, Rouchon M. (1983) Etude de la cristallurie spontanée par spectroscopie infrarouge. Recherche de corrélations entre les cristaux, les calculs, les germes et le sexe des malades. *Ann. Biol. Clin.* 41: 199-207.
120. Robertson WG, Peacock M. (1972) Calcium oxalate crystalluria and inhibitors of crystallization in recurrent renal stone-formers. *Clin. Sci.* 43: 499-506.
121. Hallson PC, Rose GA. (1976) Crystalluria in normal subjects and in stone formers with and without thiazide and cellulose phosphate treatment. *Br. J. Urol.* 48: 515-524.
122. Buli P, Brunocilla E, Tiozzi E, Platania A, Cortecchia V* (1984) Etude de la cristallurie lors du traitement prophylactique de la lithiase urinaire par l'allopurinol, l'hydrochlorothiazide, l'oxyde de manganèse, les diphosphonates et l'acide propionhydroxamique. *Néphrol.* 5: 213-216.
123. Catalina F, Cifuentes D. (1971) Estudio de las cristalurias oxalocalcicas. *Arch. Espan. Urol.* 24: 147-164.
124. Khan SR, Hackett RL. (1986) Identification of urinary stone and sediment crystals by scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. *J. Urol.* 135: 818-825.
125. Daudon M. (1987) Cristallurie. I. Aspects pratiques et interprétation. *Feuillets de Biologie* 28: 25-40.
126. Daudon M. (1987) Cristallurie. II. Aspects pratiques et interprétation. *Feuillets de Biologie* 28: 41-47.
127. Daudon M, Marfisi C, Lacour B, Bader C. (1991) Investigation of urinary crystals by Fourier transform infrared microscopy. *Clin. Chem.* 37(1): 83-87.

128. Daudon M. (1989) Méthodes d'analyse des calculs et des cristaux urinaires. Classification morpho-constitutionnelle des calculs. In Jungers P, Daudon M, Le Duc A (eds): **Lithiase Urinaire**. Médecine-Sciences, Flammarion, France, pp 35-113.
129. Boistelle R, Abbona F, Berland Y, Gravuillemin M, Olmer M. (1984) Les domaines de nucléation du phosphate ammoniacomagnésien dans les urines stériles alcalines ou acides. **Néphrol.** 5: 217-221.
130. Cochat P, Cochat N, Jouvenet M, Floret D, Wright C, Martin X, Vallon JJ, David L. (1990) Ceftriaxone-associated nephrolithiasis. **Nephrol. Dial. Transplant.** 5: 974-976.
131. Fariñas MC, Echevarría S, Sampedro I, González A, Pérez del Molino A, González-Macias J. (1993) Renal failure due to sulphadiazine in AIDS patients with cerebral toxoplasmosis. **J. Int. Med.** 233: 365-367.
132. Daudon M, Réveillaud RJ. (1987) Calculs et cristalluries d'origine médicamenteuse. **Act. Pharm. Biol. Clin.** 4: 468-471.
133. Ettinger B, Olroyd NO, Sorgel F. (1980) Triamterene nephrolithiasis. **JAMA** 244: 2443-2445.
134. Finlayson B, Khan SR, Hackett RL. (1984) Mechanisms of stone formation-an overview. **Scann. Elec. Microsc.** III: 1419-1425.
135. Daudon M, Réveillaud RJ. (1985) Revue critique des méthodes d'analyse des calculs urinaires. In Crosnier J, Funck-Bretano JL, Bach JF, Grünfeld JP (eds): **Actualités Néphrologiques**. Médecine-Sciences Flammarion, Paris, pp 203-224.
136. Daudon M, Réveillaud RJ. (1986) Typage morphologique des calculs oxalocalciques et données étiopathogéniques. **Sem. Hôp. Paris** 62(40): 3159-3168.
137. Elliot JS, Rabinowitz IN, Silvert M. (1976) Calcium oxalate crystalluria. **J. Urol.** 116: 773-775.

138. Abdel-Halim RE. (1993) Crystalluria and its possible significance. A patient-control study. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 27: 145-149.
139. Nguyen HV, Daudon M, Réveillaud RJ, Jungers P. (1987) Etude de la cristallurie spontanée chez les lithiasiques oxalo-calciques. *Néphrol.* 8: 65-69.
140. Hallson PC, Rose GA. (1989) Measurement of calcium phosphate crystalluria: influence of pH and osmolality and invariable presence of oxalate. *Br. J. Urol.* 64: 458-462.
141. Cottet J, Vittu C. (1953) Sédiment et lithiase urinaire. *Presse Med.* 34: 703-704
142. Ribeiro KLC, Rocha KV, Paiva AS, Borges ES, Dantas ABL, Maciel JAP. (1993) Estudo de 41 casos de urolitíase na infância. Abstract publicado nos anais da 7º **Jornada Brasileira de Nefrologia Pediátrica**, pp 64.
143. Riese RJ, Sakhaee K. (1992) Uric acid nephrolithiasis: pathogenesis and treatment. *J. Urol.* 148: 765-771.
144. Elliot JS, Rabinowitz IN. (1980) Calcium oxalate crystalluria: crystal size in urine. *J. Urol.* 123: 324-327.
145. Daudon M, Protat MF, Réveillaud RJ. (1978) Analyse des calculs par spectrophotométrie infrarouge. Avantages et limites de la méthode. *Ann. Biol. Cli.* 36: 475-489.
146. Iwata H, Nishio S, Wakatsuki A, Ochi K, Takeuchi M. (1985) Architecture of calcium oxalate monohydrate urinary calculi. *J. Urol.* 133: 334-338.
147. Saint A, Dyson NA. (1990) Nuclear techniques for the analysis of urinary calculi. *Br. J. Urol.* 66: 232-239.
148. Söhnel O, Grases F. (1993) Fine structure of calcium oxalate monohydrate renal calculi. *Nephron* 63: 176-182.

149. Prien EL. (1963) Crystallographic analysis of urinary calculi: a 23-year survey study. *J. Urol.* 89 (6): 917-924.
150. Daudon M, Nguyen HV, Réveillaud RJ, Teillac P, Lombard M, Joerg A, Cortesse A, Le Duc A. (1990) Faut-il toujours analyser les fragments de calculs expulsés après lithotritie extracorporelle? *Presse Méd.* 19 (6): 251-254.
151. Daudon M, Réveillaud RJ. (1984) Whewellite et weddellite: vers des étiopathogénies différentes. Intérêt du typage morphologique des calculs. *Néphrol.* 5: 195-201.
152. Leusmann DB. (1991) A classification of urinary calculi with respect to their composition and micromorphology. *Scand. J. Urol.* 25: 141-150.
153. Grover PK, Ryall RL, Marshall VR. (1990) Effect of urate on calcium oxalate crystallization in human urine: evidence for a promotory role of hyperuricosuria in urolithiasis. *Clin. Sci.* 79: 9-15.
154. Grover PK, Ryall RL. (1994) Urate and calcium oxalate stones: from repute to rhetoric to reality. *Miner. Electrolyte. Metab.* 20: 361-370.