



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**



**Tesis**

**FACTORES PREANALÍTICOS QUE AFECTAN LA  
CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO INORGÁNICO EN SUERO  
SANGUÍNEO EN BOVINOS DE CARNE EN URUGUAY**

por

**Br. Matías CAMPOS y Br. Cintia SANGUINETT**

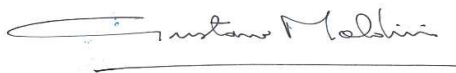
TESIS DE GRADO presentada como uno  
de los requisitos para obtener el título de  
Doctor en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2021**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por:



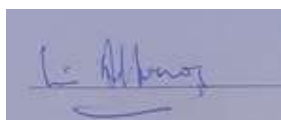
**Gustavo Maldini**

Presidente:



**Carlos Schild**

Segundo miembro:



**Luis Albornoz Lopez**

Tercer miembro:



**Fabiana Boabaid**

Cuarto miembro:



Quinto miembro:

**Anderson Saravia**

Fecha de aprobación: 15/12/2021

Autores:

**Cintia Sanguinet Maciel**

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que nada, un agradecimiento a todos los propietarios de los establecimientos y al personal que en ellos trabajan.

A los veterinarios y amigos que nos acompañaron a realizar el muestro durante la parte experimental y en especial a nuestros tutores Carlos Schild, Anderson Saravia y Fabiana Boabaid por brindarnos todo el apoyo necesario.

A nuestros familiares por brindarnos la oportunidad de estudiar esta hermosa carrera y por el apoyo incondicional.

A los amigos que nos dejó la facultad, quienes siempre nos impulsaron a continuar.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	7
SUMMARY .....	8
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	11
1. Aspectos generales de las carencias de minerales.....	11
2. Carencia de fósforo.....	12
2.1. Importancia y metabolismo del fósforo .....	12
2.2. Aspectos generales de la carencia de fósforo .....	12
2.3. Diagnóstico de la enfermedad. ....	13
2.3.1. Factores in vivo que pueden afectar la concentración de fósforo inorgánico....	14
2.3.2. Factores que pueden afectar la concentración de fósforo inorgánico durante o post-extracción de la muestra.....	15
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVOS.....	17
General .....	17
Específicos .....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
1. Selección de Establecimientos .....	18
2. Muestras y Diseños experimentales .....	19
3. Colecta de las muestras.....	20
4. Procesamiento de las muestras .....	21
5. Análisis estadísticos.....	21
5.1. Modificación de variables .....	21
RESULTADOS .....	22
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIÓN .....	29
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Distribución de los establecimientos donde se realizaron las colectas de los 3 experimentos. Página 19.

Figura 2. Correlación entre la concentración de Pi en sangre obtenida de la vena yugular y de la vena coccígea de las 159 vaquillonas de 1era cría. Página 23.

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Valores esperados de fósforo en sangre para terneros y vacas. Página 14
- Tabla 2. Concentración de fósforo inorgánico y calcio total en sangre según departamento. Página 22.
- Tabla 3. Concentración de fósforo inorgánico y calcio total en sangre según el tipo de muestra (plasma o suero) y según el sitio anatómico de extracción (vena yugular y vena coccígea). Página 22.
- Tabla 4. Concentración de fósforo inorgánico y calcio total en sangre según el grado de hemólisis (GH) (alto o bajo) y según el tipo de muestra (plasma o suero). Página 24.
- Tabla 5. Concentración de fósforo inorgánico y calcio total en sangre según el grado de hemólisis (alto o bajo) y según el sitio anatómico de extracción (vena yugular y vena coccígea). Página 24.
- Tabla 6. Concentración de fósforo inorgánico y calcio total en sangre según el tipo de jeringa (con cono excéntrico y con cono concéntrico) y según el calibre de la aguja (18 G y 22 G). Página 24.
- Tabla 7. Concentración de fósforo inorgánico y calcio total en sangre según el ambiente de P respecto a su concentración en suelo y forraje (bajo y alto) y el uso o no de una suplementación mineral con 8% de P. Página 25.
- Tabla 8. Variación de la concentración de fósforo inorgánico y calcio total en función del tiempo desde la colecta de la muestra y la primera etapa del procesamiento (centrifugado). Página 25.

## RESUMEN

La deficiencia de fósforo (P) es una de las principales carencias de minerales de los sistemas pastoriles extensivos en el norte del país. Esta carencia provoca sub-clínicamente importantes pérdidas económicas. La suplementación mineral y/o fertilización de las pasturas son las mejores herramientas para su control y/o prevención. El primer paso para una adecuada suplementación mineral con P es realizar un correcto diagnóstico. En este sentido la determinación de concentración de P inorgánico (Pi) en sangre es un método útil debido a su practicidad y bajo costo en comparación con la determinación de otros marcadores sanguíneos e incluso con la medición de la concentración de P en otros tipos de muestras. Sin embargo, el Pi tiene algunas limitantes asociadas a la variación generada por la dieta y/o hemólisis.

El objetivo de esta tesis fue evaluar (i) la concentración de Pi en dos tipos de muestras o fluidos sanguíneos (suero o plasma) y (ii) evaluar factores que pueden generar hemólisis durante o post-extracción de la muestra como: el sitio anatómico o calibre de la vasos sanguíneos (vena yugular y vena coccígea), tipo de jeringa (con cono excéntrico y concéntrico), calibre de aguja (22G y 18G) y el tiempo entre la extracción de la muestra y el centrifugado para la separación de plasma/suero (medido cada 8 horas desde la hora 0, en los corrales, hasta la hora 48 post-extracción). Para ello 3 experimentos fueron realizados, donde se obtuvieron muestras de sangre evaluando la concentración de Pi y el grado de hemólisis clasificados como alto (AGH) o bajo (BGH).

Para un mismo animal la concentración de P no evidenció diferencias significativas entre suero y plasma. Adicionalmente en los 3 experimentos las muestras clasificadas con AGH tuvieron ( $p < 0.01$ ) mayor concentración de P (0.51 - 0.86 mg/dL) que las muestras clasificadas con BGH. Las muestras obtenidas de la v. coccígea tuvieron significativamente más Pi (media: 0.37; CI95% 0.17 – 0.57 mg/dL) que las muestras obtenidas de la v. yugular; tal es así, que las muestras de la v. coccígea tuvieron 8.1 veces más chances (IC 95%: 4.6 – 14.4 OR) de tener AGH. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la turbulencia generada debido al tipo de cono de la jeringa o calibre de aguja. Respecto al tiempo, desde la extracción de la muestra y el inicio de su procesamiento, la concentración de Pi incrementó progresivamente 0.16 mg/dL (IC 95%: 0.14 – 0.18 mg/dL) cada 8 horas, siendo ( $p < 0.01$ ) mayor, respecto de la hora 0, a partir de las 24hs post-extracción.

En conclusión, para una mejor interpretación de las concentraciones de Pi, es necesario obtener las muestras de vena yugular y enviarlas al laboratorio antes de las 24 horas para su centrifugado.

## SUMMARY

Phosphorus (P) deficiency is one of the main mineral deficiencies in cattle grazing native grassland in the north of Uruguay. This deficiency causes sub-clinically important economic losses. Mineral supplementation and/or fertilization of pastures are the best tools for its control and/or prevention. The first step for an adequate mineral supplementation with P is a correct diagnosis of the condition. For this purpose, the determination of the concentration of inorganic P in blood (Pi) is a useful method due to its practicality and low cost in comparison with the determination of other blood markers and even with the measurement of the concentration of P in other types of samples. However, Pi has some limitations associated with the variation generated by diet and/or hemolysis.

The aim of this thesis was to evaluate (i) the concentration of Pi in two types of samples or blood fluids (serum or plasma) and (ii) evaluate factors that can generate hemolysis during or post-extraction of the sample such as: the anatomical site or the caliber of the blood vessel (jugular vein and coccygeal vein), type of syringe (with eccentric and concentric cone) and needle caliber (22G and 18G) and the time-lapse between the extraction of the sample and the start of its processing or centrifugation (measured every 8 hours from hour 0, in the paddocks, until 48 hours post-extraction). Therefore 3 experiments were carried out to evaluate the concentration of Pi and the degree of hemolysis - classified as high (AGH) or low (BGH) – of the blood samples.

For the same animal, the P concentration did not show significant differences between serum and plasma. Additionally, in all experiments, the samples classified with AGH had ( $p < 0.01$ ) higher concentration of P (0.51 - 0.86 mg/dL) than the samples classified with BGH. The samples obtained from the coccygeal vein had significantly more Pi (mean: 0.37; CI95% 0.17 - 0.57 mg/dL) than the samples obtained from the jugular vein; such is so, that the samples of the coccygeal vein had 8.1 times more times (95% CI: 4.6 - 14.4 OR) of having AGH. No significant differences were observed in terms of the turbulence generated due to the type of cone of the syringe or needle gauge. Regarding the time, from the extraction of the sample to the beginning of its processing, the concentration of Pi progressively increased 0.16 mg/dL (CI95%: 0.14 - 0.18 mg/dL) every 8 hours, being ( $p < 0.01$ ) higher, with respect to hour 0, from 24 hours post-extraction.

We conclude that for a better interpretation of the Pi concentrations, it is necessary to obtain samples from the jugular vein and send them to the laboratory within 24 hours.



## **INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES**

La cría de ganado de forma extensiva sobre campos naturales es una de las principales actividades del sector ganadero en el norte del País. Esta actividad tradicionalmente ha permitido producir de forma sustentable productos animales que han generado ventajas competitivas posicionando a Uruguay como uno de los principales exportadores latinoamericano de carnes (FAO, 2011). El campo natural, que es la base forrajera de Uruguay, generalmente se maneja con poca tecnología en comparación con otras alternativas de producción de forrajes. Algunas de las principales limitantes para obtener mayor producción de carne, en campo natural, son las carencias minerales, principalmente las carencias de fósforo (P) y sodio (Na) (Ungerfeld, 1998; Uriarte et al., 2000). En general los suelos y las pasturas naturales uruguayas no son capaces de cubrir los requerimientos nutricionales de P, Na, cobre (Cu), zinc (Zn) y selenio (Se) de algunas categorías de los bovinos y en algunas estaciones del año (Ungerfeld, 1998).

Las mejores herramientas para el tratamiento, control y/o prevención de estas enfermedades carenciales son: la suplementación mineral y/o la fertilización de las pasturas (Coates, 1994; Mattioli, 2013; Suttle, 2010; Tokarnia, 2010). Según el censo agropecuario del 2000 solo el 27% de productores uruguayos usaron sales minerales (MGAP, 2003). En dos estudios regionales realizados para saber el estatus mineral de los rodeos uruguayos, incluyendo establecimientos que usaban sales minerales, sobre 36 y 63 predios de cría ubicados en todas las regiones del país revelaron que entre el 27-67 % de los establecimientos tenían deficiencia de P, Zn y Se en un 20-30% de los animales muestreados (Uriarte & Murphy, 1981; Carriquiry & Frade, 2017). Estos datos evidencian la importancia de este grupo de enfermedades para la región y el País.

El primer paso para implementar una estrategia de suplementación mineral es saber si realmente hay alguna deficiencia mineral en los animales (Schild et al., 2021). La observación de signos clínicos como la presencia de pica, osteofagia, alteraciones en la marcha, fracturas múltiples, desmejoramiento en el manto piloso, alopecias, anemias, diarreas y temblores entre otros signos, asociados a una correcta exploración semiológica y prueba de diagnóstico a campo, como la “prueba de la aguja” que nos pueden ayudar a orientar el diagnóstico presuntivo (Suttle, 2010; Tokarnia, 2010). Sin embargo, la determinación de la concentración del o los minerales deficientes en sangre o en alguna de las reservas corporales como hueso o hígado son esenciales para el diagnóstico (Suttle, 2010; Tokarnia, 2010).

La determinación de la concentración sanguínea del o los minerales sospechosos de estar deficientes, en un grupo de 12-15 animales, rápidamente y a abajo costo, nos puede brindar un panorama general del estatus sanitario respecto a las carencias minerales (Read et al., 1986; Schild et al., 2021). Sin

embargo, para una correcta interpretación de los resultados hay que tener en cuenta factores como la edad, estado fisiológico, nivel de producción y calidad la dieta ingerida previamente, ya que pueden influenciar *in vivo* la concentración de mineral en sangre, así como los factores que pueden influenciarlos durante y después de la toma de las muestras (Coates, 1994; Fletcher et al., 2016; Little, 1971; Montiel et al., 2007; Suttle, 2010). No considerar estos factores podría conducirnos a errores en la interpretación de los resultados y por ende en las futuras decisiones en cuanto al manejo nutricional mineral de los animales.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. Aspectos generales de las carencias de minerales

Los minerales son los responsables de importantes y diversas funciones biológicas como la formación ósea, regulación del pH, coagulación sanguínea, activación enzimática, metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas, activación neuromuscular y transcripción genética entre otras (Underwood, 1981). Según los requerimientos diarios en los animales, los minerales se clasifican en macro o microminerales. Los macrominerales [calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg), potasio (K), sodio (Na) y azufre (S)] deben ser ingeridos diariamente en grandes cantidades; mientras que los microminerales [cobalto (Co), cobre (Cu), yodo (I), hierro (Fe), manganeso (Mn), selenio (Se) y zinc (Zn)] son necesarios en pequeñas cantidades diarias (Constable et al., 2017; Suttle 2010). La falta de alguno de ellos puede generar implicancias en la salud y bien estar animal, así como también en la producción animal (Constable et al., 2017; Suttle, 2010; Tokarnia, 2010).

Las carencias de los minerales en los animales, puede clasificarse según la disponibilidad, en primaria, cuando el mineral no está disponible en cantidades necesarias; o secundaria, cuando la absorción del mineral se ve afectada por la presencia de otro mineral (Constable et al., 2017; Suttle, 2010). Adicionalmente según el periodo de evolución en que aparecen los signos en los animales, las carencias pueden clasificarse como aguda cuando los signos se presentan en 24-48 horas (ejemplos: hipocalcemia puerperal, tetania hipomagnesémica) o crónicas cuando los signos se presentan durante meses (ejemplo: osteomalacia, carencia de Zn) (Constable et al., 2017; Tokarnia, 2010).

En general las carencias de minerales presentan cuatro etapas secuenciales incluyendo: depleción; deficiencia; disfunción y enfermedad (Constable et al., 2017; Suttle et al., 2010). La etapa de depleción inicia con una dieta que es incapaz de aportar las necesidades diarias del mineral, de forma tal que los requerimientos netos exceden el fujo neto de absorción intestinal (Constable et al., 2017). Esta etapa puede durar semanas o meses y durante este tiempo el organismo responde con un aumento de la absorción intestinal, disminución de las pérdidas endógenas y disminución o pérdida de las reservas del o los minerales faltantes en la dieta; sin embargo, en esta etapa la concentración plasmática aún puede permanecer normal (Suttle, 2010). En la siguiente etapa (deficiencia), si la falta del mineral en la dieta continua, los mecanismos homeostáticos no logran mantener niveles constantes o necesarios para cumplir con las funciones fisiológicas, evidenciando una disminución de la concentración plasmática o sérica del mineral en cuestión, llevándola por debajo de los valores normales (Constable et al., 2017). Después de un periodo de tiempo variable, la actividad de muchos complejos enzimáticos dependiente de minerales se ve severamente disminuida conduciendo a la etapa de disfunción. Suele haber un

periodo de retraso o fase subclínica, antes de que los cambios o fallas en las funciones celulares se manifiesten como enfermedad clínica (Constable et al., 2017; Suttle, 2010).

## **2. Carencia de fósforo**

### **2.1. IMPORTANCIA Y METABOLISMO DEL FÓSFORO**

El P es de gran importancia para los animales, ya que es un componente del ác. desoxirribonucleico (ADN), ác. ribonucleico (ARN) y de los fosfolípidos que constituyen las membranas celulares. Interviene en la formación de complejos enzimáticos desempeñando funciones tales como la utilización y transferencia de energía mediante ADP (adenosín difosfato), ATP (adenosín trifosfato) y AMP (adenosín monofosfato), lo cual se refleja directamente sobre la glicolisis, gluconeogénesis, transporte de ácidos grasos, síntesis de aminoácidos y actividad de la bomba sodio y potasio (Greco & Stabenfeldt, 2004). Está involucrado en el mecanismo de control del apetito y la eficiencia de utilización de los alimentos, formación ósea y regulación del pH entre otras funciones (Ternouth, 1990).

La absorción ocurre en el intestino en forma de fosfato, con un coeficiente que varía entre el 69 y 100 % (Dixon et al., 2020; Mattioli, 2013). El esqueleto es la mayor reserva de P ya que contiene alrededor de 80% de total del organismo (Suttle, 2010) mientras que el 20% restante está en tejidos blandos, incluyendo el contenido ruminal (Mattioli, 2013; Suttle 2010). Las principales vías de eliminación son la saliva, leche, orina y heces (Mattioli, 2013). En los animales el control metabólico y la movilización de P de las reservas dependen primariamente de la concentración de Ca, paratohormona (PTH) y vitamina D (Dixon et al., 2011; McGrant et al., 2013). Sin embargo, nuevos estudios indican que la homeostasis del P es más compleja involucrando otras hormonas como el factor de crecimiento fibroblástico 23 y un cofactor llamado Klotho (Mattioli, 2020).

### **2.2. ASPECTOS GENERALES DE LA CARENCIA DE FÓSFORO**

La carencia de fósforo (P) es una de las principales carencias de minerales en los sistemas de producción extensivos a nivel mundial (Suttle, 2010; Tokarnia, 2010). Esta enfermedad ocurre primariamente debido al bajo aporte de P proporcionado por el forraje, el cual está directamente relacionado con la baja concentración del mineral asimilable en el suelo. Adicionalmente, la presencia altas concentraciones de Ca y Fe pueden afectar sustancialmente la disponibilidad o absorción de P (Constable et al., 2017).

La enfermedad afecta a varias especies (Craig et al., 2017) pero principalmente a rumiantes, siendo los bovinos más susceptibles que los pequeños rumiantes (Riet-Correa et al., 2012). En Uruguay la enfermedad es conocida en bovinos desde 1917 (Rubino, 1928) y en una amplia región del País la concentración de P en las pasturas naturales (rango: 0.5 a 4.5 g de P/kg/MS) y suelos (rango 2.5 - 9 mg/Kg) son consideradas deficientes (Ungerfeld, 1998; CIAB, 1971) al compararlos con valores esperados (>2.0 g/kg/MS en forraje y > 8 mg/kg en suelo, respectivamente) (Dixon et al., 2020).

En los bovinos, la enfermedad puede ocurrir de forma aguda formando parte del síndrome de vaca caída (Perna, 2009) y de forma crónica localmente conocida como el “mal de las paletas” (Rubino, 1934; Dutra, 2011). La forma aguda ocurre debido a un descenso brusco de la concentración de fósforo inorgánico (Pi) en sangre (<1.2 – 2 mg/dL); mientras que en la forma crónica hay un descenso progresivo (>6 meses) de Pi (<3 mg/dL) y de P en huesos (< 120 mg/mL) asociado a fallas en la osificación del tejido osteoide (Craig et al., 2017; Mcdowell, 1999; Schild et al., 2021). La enfermedad aguda es mayormente observada en rodeos lecheros, mientras que la forma crónica se ve con más frecuencia en rodeos de carne (Call et al., 1987; Shupe et al., 1988). Respecto a la época del año, ambas presentaciones se describen con mayor frecuencia en veranos secos, ya que en estas situaciones las pasturas contienen mayor cantidad de forraje senescente o seco el cual contiene menos P (Judkins 1985; Schild et al., 2021).

Esta carencia genera importantes pérdidas económicas debido las consecuencias subclínicas como baja ganancias de peso, bajo peso de terneros al destete, retraso en el crecimiento, baja producción láctea y baja fertilidad del rodeo (Call et al., 1987; Constable et al., 2017; Dixon et al., 2020; Little, 1970; Suttle, 2010). En la forma aguda los animales evidencian debilidad; dificultad para incorporarse; puede haber o no hemoglobinuria, convulsiones y muerte (Constable et al., 2017; Perna, 2009). La forma crónica se caracteriza por una disminución del consumo voluntario, anormal comportamiento ingestivo de piedras (pica/geofagia), huesos (ostefagia) o carcasas (sarcofagia); alteraciones en la marcha que incluye andar rígido, acortamiento de los pasos; cifosis, posturas antiálgicas y dificultad para incorporarse. En los casos más severos hay alteraciones que incluyen deformaciones óseas y/o múltiples fracturas incluso durante la manipulación de ganado (Barbosa et al., 2018; Cseh et al., 2008; Dixon et al., 2020; Schild et al., 2021). Debido a la pica/osteofagia pueden ocurrir atragantamiento con hueso, perforaciones intestinales y/o intoxicación con toxinas botulínica producida por *Clostridium botulinum* (Cantón et al., 2008; Riet-Correa et al., 2012; Tokarnia, 2010).

### 2.3. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD.

Conocer el estatus o concentración de P en los animales, así como de la concentración de P de la dieta es el primer paso para diagnosticar la deficiencia; adicionalmente nos permite tomar medidas de manejo apropiadas (Schild et al. 2021). El nivel de P en los bovinos incluye: el P disponible para las funciones vitales y el P disponible para un propósito productivo definido como el crecimiento, lactación y/o reproducción (Anderson et al., 2017). En situaciones de carencia muchos de estos propósitos no pueden ser alcanzados en pos de preservar la vida.

El estatus de P incluye varios niveles como: deficiente, marginal, adecuado y excesivo-tóxico (Anderson et al., 2017; Mattioli, 2013; Tokarnia et al., 2000). Estos niveles pueden verse reflejados mediante la concentración sérica o plasmática de Pi, así como también con la concentración de P en los huesos (Little et al., 1971; Little, 1972; Ternouth 1990). A pesar de que ambas mediciones (Pi y P en huesos) son consideradas ideales ambas tienen sus limitantes las cuales deben ser comprendidas para una correcta interpretación de los resultados.

### 2.3.1. Factores *in vivo* que pueden afectar la concentración de fósforo inorgánico

El estado fisiológico como en las últimas semanas de gestación y primeras semanas de lactancia evidencian valores más bajos de Pi que en otros estadios fisiológicos (ej. terneros en crecimiento), posiblemente debido a una movilización de P hacia la glándula mamaria (Benvenuti et al., 2015; Krsmanovic et al., 2015; Sharifi et al., 2007). Valores esperados de P tanto para terneros y vacas se evidencian en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Valores esperados de fósforo inorgánico (Pi) en sangre para bovinos según Mattioli, 2013

Estatus de Pi	Terneros (mg/dL)	Vacas (mg/dL)
Esperado	5.9 – 8	4.6 – 6.2
Marginal	4.0 – 5.9	3.0 – 4.6
Carencial	< 4	< 3

El contenido de P de la dieta se refleja directamente con la concentración de Pi (Underwood, 1981; Dixon et al., 2020) tal es así que animales que pastan praderas fertilizadas con P, o con alta proporción de leguminosas o cuya dieta es complementada con granos y/o suplementos minerales tiene concentraciones Pi mayores en comparación con animales que pastan en praderas con concentraciones bajas en P, predominio de gramíneas nativas y/o sin suplementación mineral (Coates, 1994; Odriozola, 2008; Quigley et al., 2015; Suttle 2010; Underwood, 1981). Algunas enfermedades que causan lesiones renales crónicas, crisis hemolíticas (ej. leptospirosis, babesiosis, anaplasmosis, intoxicación con Cu, etc.); desbalances dietéticos de la relación Ca:P (urolitiasis)

y/o excesos de vitamina D (debido a la intoxicación con plantas calcinogénicas como: *Solanum glaucophyllum* o *Nierembergia rivularis*) pueden evidenciar cambios en concentración de Pi. (Riet-Correa et al., 2008; Machado et al., 2021).

### 2.3.2. Factores que pueden afectar la concentración de fósforo inorgánico durante o post-extracción de la muestra

Debido a que la concentración de P en el interior de los eritrocitos es 10 veces mayor que en el plasma o suero (Mattioli, 2013), la hemólisis o hidrólisis de los glóbulos rojos, da lugar a una mayor cantidad de P libre (Little et al., 1971; Sharifi et al., 2007). Este efecto también ocurre cuando se analiza el Pi de suero obtenido a partir de coágulos sanguíneos de animales muertos, debido a la autólisis (Comunicación Personal Carlos Schild). En este sentido hay factores que durante y después de la toma de las muestras podrían generar hemólisis modificando la verdadera concentración de Pi y por ende la interpretación de los resultados.

En un estudio en vacas lecheras Montiel et al. (2007) observaron que el P en plasma de un mismo animal era mayor que en suero y que las muestras obtenidas de la yugular tuvieron 19% menos P que las muestras obtenidas de la vena coccígea del mismo animal. En otro estudio Fletcher et al. (2016) observaron en 48 vacas de cría en el último tercio de la gestación, buena correlación ( $r^2 = 0.88$ ) entre las muestras obtenidas de la vena coccígea y vena yugular con una diferencia, no significativa, de 0.10 mg P/dL. Estudios más antiguos evidenciaron un aumento de la concentración de P sanguíneo en función del tiempo transcurrido desde la extracción de la muestra hasta su procesado, menos evidente con el uso de ácido tricloroacético al 5% bufferado (Little et al., 1971). Muestras que, durante el trabajo de campo en las mangas, quedan expuestas al sol tienen más hemólisis que muestras del mismo animal pero que durante el trabajo de campo quedaron bajo sombra (Comunicación personal Carlos Schild).

Nuevos indicadores plasmáticos, para monitorear el estatus de P en animales adultos y/o en lactación, están siendo evaluados como la concentración del carbono terminal del teleopeptido del colágeno tipo I (CTX-1), fosfatasa alcalina ósea (BALP) y relación Ca:P (Anderson et al., 2017; Barbosa et al., 2018). En animales con osteomalacia o raquitismo (lesión clásica de la carencia crónica de P) hay un aumento de CTX-1, BALP así como de la relación Ca:P. La concentración de P en hueso es el mejor indicador del estatus, sin embargo, también presenta algunas limitaciones como obtención y el procesamiento de las muestras, por lo que generalmente se restringe su uso para investigación o para diagnóstico en animales muertos (Little, 1972; Read et al., 1986; Malafaia et al., 2017; Schild et al., 2021)

En nuestra región estos biomarcadores aún no han sido probados ni validados, por lo que la fosfatemia, considerando los aspectos antes mencionados, sigue siendo una excelente herramienta para el diagnóstico de la enfermedad (Schild et al., 2021), dada su practicidad y bajo costo. Adicionalmente en la región aún no se han realizado estudios que evalúen la variación de la fosfatemia post-extracción de la muestra.

Este trabajo forma parte de la Tesis de doctorado (PhD) de MSc. MV. Carlos Schild.



## **HIPÓTESIS**

La concentración de P sanguíneo, en bovinos de carne además de ser afectada por factores fisiológicos y nutricionales puede ser modificada por otros factores post-extracción de la muestra, que favorecen la producción de hemólisis dando lugar a resultados e interpretaciones erróneas.

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Evaluar la variación de la concentración de P sanguíneo y el grado de hemólisis preanalítica (post-extracción) en muestras en bovinos de carne frente a diferentes métodos de coleta, al tipo de muestra (plasma y suero) y el tiempo hasta el centrifugado.

### **ESPECÍFICOS**

- 1. Evaluar la variación de concentración sanguínea de P según el tipo de muestra (plasma y suero).
- 2. Evaluar la variación de concentración sanguínea de P y el grado de hemólisis según el sitio anatómico de extracción de la muestra o calibre del vaso sanguíneo (vena yugular y vena coccígea); tipo de flujo generado por el cono de jeringa (excéntrico y concéntrico) y el calibre la aguja (18 G y 22 G).
- 3. Evaluar la variación de concentración sanguínea de P y el grado de hemólisis según el tiempo transcurrido entre la colecta de la muestra y el centrifugado de la misma.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos se utilizaron muestras pertenecientes a tres experimentos realizados con bovinos de carne, criados sobre campo natural. Para los objetivos 1 se diseñó el Experimento 1 debido a que la carencia de P es una enfermedad con una marcada distribución geográfica y para evitar un sesgo relacionado a la concentración de P. Para el objetivo 2 se utilizó información del Experimento 1 y se diseñó el experimento 2, mientras que para el objetivo 3 se diseñó el experimento 3. Por otro lado en si bien en esta tesis se detallan datos de la concentración de calcio, ya que es un mineral cuyo metabolismo está estrictamente relacionado al fósforo, no serán discutidos sus resultados así como tampoco los efectos de la relación Ca:P, enfocándonos específicamente en el fósforo.

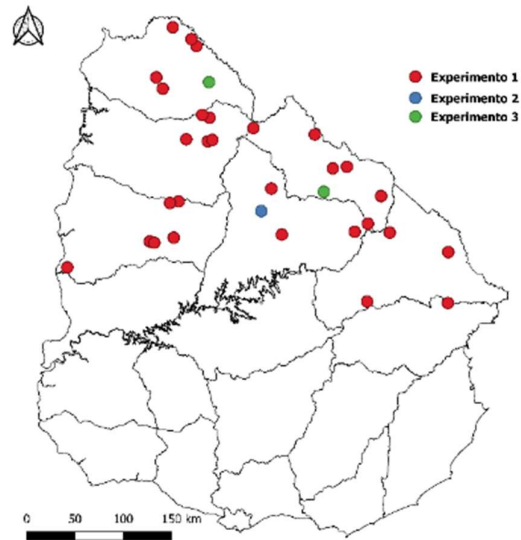
### 1. SELECCIÓN DE ESTABLECIMIENTOS

En el *Experimento 1*, se colectaron muestras de 32 establecimientos de 6 departamentos del norte de Uruguay (Artigas, Cerro Largo, Paysandú, Rivera, Salto y Tacuarembó) que no suplementaban con sales minerales a animales en crecimiento (vaquillonas de 1era cría) y que no habían laboreado la tierra en por los menos los últimos 30 años. En un periodo de 4 meses se realizaron 2 visitas a cada establecimiento, la primera de ellas al inicio de lactancia (octubre 2017) y la segunda durante el entore (enero 2018).

La concentración de P en suelo y forraje de estos establecimientos se detallan en la tesis doctoral de Carlos Schild.

En el *Experimento 2* se colectaron muestras, en marzo de 2019, de un establecimiento ubicado en Tacuarembó (georreferencia: -31.916970; -55.919005) el cual tenía normal concentración de P en el ambiente (18 mg/kg en suelo y 2.1 g/kg MS en el forraje) y animales (5.5 mg/dL en suero sanguíneo de vaquillonas de primera cría).

En el *Experimento 3* se colectaron muestras de dos establecimientos en febrero de 2019. Ambos establecimientos habían sido muestreados previamente durante el Experimento 1. Un establecimiento estaba ubicado en Artigas (georreferencia: -30.7051174; -56.4858369) y tenía baja concentración de P en el ambiente (1 mg/kg en suelo y 1.1 g/kg MS en el forraje) y animales (2.9 mg P/dL en suero sanguíneo de vaquillonas de primera cría). El otro establecimiento estaba ubicado en Rivera (georreferencia: -31.7343466; -55.2308752) en cual tenía normal a marginal concentración de P en ambiente (7.8 mg/kg en suelo y 1.7 g/kg MS en el forraje) y animales (5.3 mg/dL en el suero sanguíneo de vaquillonas de primera cría). En el mapa (**Figura 1**) se presenta la distribución espacial de todos los establecimientos muestreados.



**Figura 1.** Distribución de los establecimientos donde se realizaron las colectas las muestras de los 3 experimentos.

## 2. MUESTRAS Y DISEÑOS EXPERIMENTALES

Para el *Experimento 1*, las muestras se obtuvieron de un grupo de 3-5 vaquillonas de primera cría de 24-36 meses de edad de los 32 establecimientos. Individualmente del mismo animal se colectaron 4 muestras de sangre (1 de la vena yugular sin anticoagulante; 1 de la vena yugular con anticoagulante; 1 de la vena coccígea sin anticoagulante y 1 de la vena coccígea con anticoagulante). En todo el experimento se evaluaron en total las 4 muestras de 159 animales ( $n = 636$ ). El diseño fue un modelo factorial de  $2 \times 2$  y cada animal fue considerado como unidad experimental.

Para el *Experimento 2*, las muestras se obtuvieron de un grupo de 12 vaquillonas de primera cría de 24-36 meses de edad de un establecimiento. Individualmente del mismo animal se colectaron 4 muestras de sangre sin anticoagulante de la v. yugular (1 con aguja de 18 G acoplada a jeringa con cono excéntrico; 1 con aguja de 18 G acoplada a jeringa con cono concéntrico; 1 con aguja de 22 G acoplada a jeringa con cono excéntrico y 1 con aguja de 22 G acoplada a jeringa con cono concéntrico). En todo el experimento se evaluaron en total las 4 muestras de 12 animales ( $n = 48$ ). El diseño fue un modelo factorial de  $2 \times 2$  y cada animal fue considerado como unidad experimental.

Para el *Experimento 3*, las muestras se obtuvieron de un grupo de 16 terneras de 9-12 meses de edad de dos establecimientos. De cada ternera individualmente se colectó una muestra de sangre con anticoagulante de 50cc obtenida de la v. yugular, la cual fue inmediatamente fraccionada en 8 submuestras. Pasado los primeros 20-30 minutos desde su obtención en los corrales (hora 0), una submuestra de cada animal, fue centrifugadas cada 8

horas hasta completar 2 días de estudio (0h, 8h, 16h, 24h, 32h, 40h, 48h). En todo el experimento se evaluaron en total las 7 muestras de las 32 terneras (16 en cada establecimiento) (n = 224). El diseño fue un modelo aleatorizado simple con 7 repeticiones y cada animal fue considerado como unidad experimental.

### 3. COLECTA DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras fueron obtenidas bajo las normas de bien estar animal (protocolo CEUA INIA 2019.3) por Matías Campos y Cintia Sanguinet, ambos estudiantes avanzados en Medicina Veterinaria. Previa extracción todos los animales fueron sujetados utilizando bozal y/o cepo de forma que las vías respiratorias no sean comprimidas.

Para el *Experimento 1* tanto para la extracción de sangre de vena yugular como vena coccígea se utilizaron jeringas de 20 ml con cono excéntrico acopladas a agujas de 18G. Las muestras de sangre fueron colocadas en tubos (*Vacutainer*<sup>®</sup>) de 5 ml con sílice como acelerador de coagulación para suero y de 3 ml con heparina de litio como anticoagulante para plasma, ambos con gel separador. Para disminuir el riesgo de hemólisis posiblemente generado por el sistema de vacío de los tubos y por la turbulencia de la aguja, los tubos fueron abiertos previamente y las agujas fueron desacopladas depositando la sangre por la pared del tubo directamente de las jeringas.

Todos los tubos con las muestras de sangre fueron colocados en conservadoras con refrigerante hasta iniciar su procesamiento. Generalmente a las 8 a 16 horas post-extracción (tiempo estimado entre el inicio de la colecta de las muestras en el establecimiento más lejos y el centrifugado de esta en las instalaciones de INIA Tacuarembó) se realizó la separación del suero y del plasma luego de centrifugar las muestras a 4°C, a 3500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos usando una centrifuga *Thermo electron operation*<sup>®</sup>, *IEC MultiRF*. Posteriormente con pipetas de Pasteur, el suero y plasma fueron transferidos a un eppendorf<sup>®</sup> de 2 ml previamente rotulados, los cuales fueron colocado en freezer a -20°C durante 7-14 días, hasta la finalización del procesamiento.

Para el *Experimento 2*, de cada animal se colectaron las 4 muestras simultáneamente con una diferencia de 1-3 minutos entre una toma y la otra, y con una separación de 10 cm lineales; dos muestras fueron colectadas de la vena yugular izquierda y las dos restantes en la vena yugular derecha. Para la extracción se usaron jeringas de 20 ml con cono excéntrico y jeringas de 10 ml con cono concéntrico ambas acopladas a agujas de 22 y 18 *gauge* (G). Las mismas precauciones para evitar la hemólisis descritas en el Experimento 1 fueron aplicadas. Las muestras de sangre fueron colocadas en tubos sin heparina ya descritos y el resto del procesamiento fue igual que el del Experimento 1.

Para el *Experimento 3* de cada animal y por única vez, se colectó la muestra de sangre de la vena yugular usando jeringas de 60 ml con cono excéntrico acopladas a agujas de 18G y teniendo en cuenta las mismas precauciones para evitar la hemólisis, antes descritas. Cada muestra fue fraccionada en 7 submuestras colocadas en tubos sin anticoagulante ya descritos para obtener el suero. Luego, desde el momento de la extracción en los corrales (hora 0) y cada 8 horas 1 sub-muestra de cada animal fue centrifugada usando una centrifuga portátil (*MRC-Scientific Instrument*<sup>®</sup>, LCEN-324). El resto del procesamiento fue igual que en el Experimento 1.

#### 4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En todas las muestras se realizó la determinación de P y Ca por el método de reacción colorimétrica del fosfomolibdato y o-cresolphthalein complexone respectivamente usando un espectrofotómetro automatizado (*Dimension Rxl Max Siemens Diagnostics*<sup>®</sup>). Con este equipo también fue posible calcular para cada una de las muestras el grado de hemólisis mediante mediciones espectrales de la hemoglobina (Hb) libre, a 405 nm, generando un índice que se describe en una escala de 1 a 6 (1:  $\leq 25$  mg/dL, 2: 26-50 mg/dL, 3: 51-200 mg/dL, 4: 201-300 mg/dL, 5: 301-500 mg/dL y 6:  $> 500$  mg/dL) (Dimension, 2003).

#### 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos fueron colectados y agrupados en planillas usando hojas de cálculos de *Microsoft Excel*<sup>®</sup>. De cada experimento se realizaron análisis descriptivos para obtener las medidas de resumen y dispersión. Además, se realizaron análisis de la varianza, regresión lineal, regresión logística y ecuaciones de estimación generalizadas para determinar diferencias entre medias y relaciones entre las variables estudiadas (concentración de P y Ca, tipo de muestra, grado de hemólisis, sitio anatómico de extracción, tipo de jeringa y aguja y tiempo de inicio del procesamiento de las muestras). Para realizar los análisis se usó el software informático *Stata v.14.0* (Stata corp, Texas).

##### *5.1. Modificación de variables*

El grado de hemólisis de las muestras de los 3 experimentos fue por defecto categorizada en 6 grados, que van consecutivamente desde el 1 al 6, siendo el 1 el de menor hemólisis y el 6 el de mayor. Adicionalmente para simplificar el estudio los grados fueron recategorizados unificando el grado 1-2 como “bajo grado de hemólisis” (BGH,  $<50$  mg Hb/dL) y el grado 3-6 como “alto grado de hemólisis” (AGH,  $>50$  mg Hb/dL).

## RESULTADOS

Los resultados de los tres experimentos realizados se describen en secciones separadas.

### Experimento 1

La media  $\pm$  DE (desvío estándar) de Pi y Ca en las 159 vaquillonas de primera cría fue de  $4.5 \pm 1.3$  mg/dL y  $8.7 \pm 1.0$  mg/dL respectivamente. Las medias de Pi y Ca por departamento fueron distintas estadísticamente ( $p < 0.01$ ) para ambos minerales (**Tabla 2**)

**Tabla 2.** Concentración de fósforo inorgánico (Pi) y calcio total (Ca) en sangre según departamento. Los números son medias  $\pm$  DE (n=159).

Departamento	Pi (mg/dL)		Ca (mg/dL)	
Salto	$4.1 \pm 1.1$	a	$8.5 \pm 1.2$	a
Artigas	$4.2 \pm 1.5$	a	$9.0 \pm 0.8$	Bc
Cerro Largo	$4.2 \pm 0.8$	ab	$9.5 \pm 0.7$	c
Paysandú	$4.8 \pm 1.4$	b	$8.7 \pm 1.1$	ab
Rivera	$4.8 \pm 1.4$	bc	$8.5 \pm 0.9$	a
Tacuarembó	$5.3 \pm 1.2$	c	$8.6 \pm 1.0$	ab

Referencias: DE= desvío estándar mg=miligramo; dL=decilitro. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ )

De acuerdo con el período (lactancia/entore) la concentración de Pi y Ca fue de  $4.5 \pm 1.3$  mg/dL y  $8.2 \pm 1.0$  mg/dL al inicio de lactancia (octubre 2018) y  $4.5 \pm 1.2$  mg/dL y  $9.1 \pm 0.9$  mg/dL durante el entore (enero 2019) respectivamente. No hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre las medias de Pi de las muestras de ambos períodos, pero, si de Ca ( $p < 0.01$ ).

La concentración de Pi y Ca en función del tipo de muestra (plasma o suero) y el sitio anatómico de extracción (vena yugular y vena coccígea) se evidencia en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Concentración de fósforo inorgánico (Pi) y calcio total (Ca) en sangre según el tipo de muestras (plasma o suero) y según el sitio anatómico de extracción (vena yugular y vena coccígea). Los números son promedios  $\pm$  DE ( $n = 159$ ).

	Plasma		Suero		Probabilidad ( <i>p-value</i> )		
	Yugular	Coccígea	Yugular	Coccígea	Tipo	Sitio	Tipo x Sitio
Pi (mg/dL)	$4.4 \pm 1.3$	$4.7 \pm 1.3$	$4.3 \pm 1.3$	$4.8 \pm 1.3$	0.69	<b>&lt;0.01</b>	0.10
Ca (mg/dL)	$8.7 \pm 1.0$	$8.6 \pm 1.0$	$8.7 \pm 1.2$	$8.9 \pm 0.8$	0.14	0.93	0.09

Referencias: DE= desvío estándar mg=miligramo; dL=decilitro.

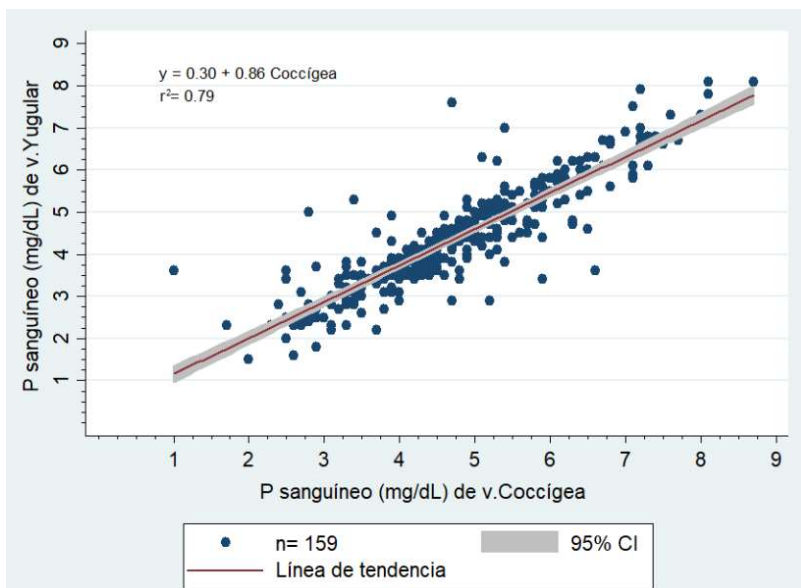
Las muestras obtenidas de la vena coccígea tuvieron  $0.37$  mg/dL (95%CI:  $0.17 - 0.57$  mg/dL) más Pi ( $p < 0.01$ ) que las de la vena yugular. Adicionalmente las medias Pi obtenido de ambas venas estaban fuertemente correlacionados

( $r^2 = 0.79$ ,  $p < 0.01$ ) (**Figura 2**). El modelo estadístico encontrado para predecir los valores de Pi de v. yugular a partir de Pi de v. coccígea es  $y = \alpha + \beta x$ ; donde  $y$  es la concentración de Pi en v. yugular y  $\beta x$  es la concentración de Pi en v. coccígea.

El modelo es:

$$\text{Pi de v. yugular (mg/dL)} = 0.30 + 0.86 \text{ Pi de v. coccígea}$$

**Figura 2.** Correlación entre la concentración de Pi en sangre obtenida de la vena yugular y de la vena coccígea de las 159 vaquillonas de primera cría.



Todas las muestras tuvieron hemólisis, sin embargo, las muestras clasificadas como AGH promediaron 0.51 mg/dL (IC95%: 0.24 – 0.78 mg/dL) más Pi ( $p < 0.01$ ) que las muestras clasificadas con BGH. La concentración de Ca tuvo una tendencia ( $p = 0.09$ ) a ser mayor en las muestras con AGH, con 0.18 mg/dL (IC95%: 0.03 – 0.34 mg/dL) más que en las muestras clasificadas con BGH.

En la **Table 4 y 5** se evidencian las concentraciones de Pi y Ca con BGH y AGH según el tipo de muestra y sitio anatómico de extracción respectivamente. No hubo efecto significativo entre la interacción del grado de hemólisis y el tipo de muestra o el sitio anatómico de la extracción. Sin embargo, el 40.1% de las muestras obtenidas de la v. coccígea fueron clasificadas con AGH, en comparación con las obtenidas de la v. yugular donde solamente el 4.9% de las muestras fueron clasificadas como AGH, siendo estos porcentajes significativamente ( $p < 0.01$ ) distintos. El análisis de regresión logística evidenció que las muestras obtenidas de la v. coccígea ( $p < 0.01$ ) tuvieron 8.1 (IC95%: 4.6 – 14.4 OR) veces más chances de tener AGH que las muestras obtenidas de la v. yugular (OR= 0.12; IC95%: 0.07-0.22).

Para la calcemia hubo diferencias significativas según el tipo muestra y el grado de hemólisis, pero no hubo diferencias en cuanto al sitio anatómico de extracción (**Tabla 4-5**).

**Tabla 4.** Concentración de fósforo inorgánico (Pi) y calcio total (Ca) en sangre según el **grado de hemólisis** (GH) (alto o bajo) y según el **tipo** de muestras (plasma o suero). Los números son promedios  $\pm$  DE (n=159).

	Bajo GH		Alto GH		Probabilidad ( <i>p-value</i> )		
	Plasma	Suero	Plasma	Suero	GH	Tipo	GH x Tipo
Pi (mg/dL)	4.4 $\pm$ 1.3	4.5 $\pm$ 1.3	4.9 $\pm$ 1.3	5.0 $\pm$ 1.5	<b>&lt;0.01</b>	0.66	0.82
Ca (mg/dL)	8.7 $\pm$ 1.0	8.7 $\pm$ 1.1	8.7 $\pm$ 0.9	9.1 $\pm$ 0.7	0.09	<b>0.02</b>	0.08

Referencias: DE= desvío estándar mg=miligramo; dL=decilitro.

**Tabla 5.** Concentración de Pi y Ca en sangre según el **grado de hemólisis** (GH) (alto o bajo) y según el **sitio** anatómico de extracción (vena yugular y vena coccígea). Los números son promedios  $\pm$  DE (n=159).

	Bajo GH		Alto GH		Probabilidad ( <i>p-value</i> )		
	Yugular	Coccígea	Yugular	Coccígea	GH	Sitio	GH x Sitio
Pi (mg/dL)	4.3 $\pm$ 1.2	4.6 $\pm$ 1.3	4.8 $\pm$ 1.2	5.0 $\pm$ 1.4	<b>0.03</b>	0.17	0.87
Ca (mg/dL)	8.7 $\pm$ 1.1	8.7 $\pm$ 0.9	9.2 $\pm$ 0.4	8.8 $\pm$ 0.9	<b>0.03</b>	0.06	0.09

Referencias: DE= desvío estándar mg=miligramo; dL=decilitro.

### Experimento 2

La media  $\pm$  desvío estándar de Pi y Ca en las 12 vaquillonas de primera cría fue de 6.7 $\pm$ 0.9 mg/dL y 10.0 $\pm$ 0.7 mg/dL respectivamente. Las concentraciones de Pi y Ca en suero sanguíneo según la turbulencia generada por el tipo de cono de la jeringa y diámetro de la aguja se evidencian en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Concentración de fósforo inorgánico (Pi) y calcio total (Ca) en sangre según el tipo de **jeringa** (con cono excéntrico y con cono concéntrico) y según el calibre de la **aguja** (18 G y 22 G). Los números son promedios  $\pm$  DE (n=12).

	Jeringa con cono excéntrico		Jeringa con cono concéntrico		Probabilidad ( <i>p-value</i> )		
	18 G	22 G	18 G	22 G	Jeringa	Aguja	Jer x Agu
	Pi (mg/dL)	6.8 $\pm$ 0.9	6.6 $\pm$ 0.9	6.7 $\pm$ 0.9			
Ca (mg/dL)	10.0 $\pm$ 0.8	10.1 $\pm$ 0.7	10.1 $\pm$ 0.7	10.0 $\pm$ 0.7	0.97	0.93	0.77

Referencias: DE= desvío estándar mg=miligramo; dL=decilitro.

Todas las muestras tuvieron hemólisis, sin embargo, las muestras clasificadas como AGH promediaron 0.86 mg/dL (IC95%: 0.08 – 1.65 mg/dL) más Pi ( $p = 0.03$ ) que las muestras clasificadas con BGH. La concentración de Ca no fue afectada por el grado de hemólisis ( $p = 0.5$ ). No hubo asociación entre



el tipo de cono ( $p = 0.54$ ), diámetro de aguja ( $p = 0.55$ ) y la interacción de ambos ( $p = 0.24$ ) con el grado de hemólisis.

### Experimento 3

La media  $\pm$  desvío estándar de Pi y Ca en las 32 terneras fue de  $6.5 \pm 1.2$  mg/dL y  $9.5 \pm 0.5$  mg/dL respectivamente. Las concentraciones de Pi y Ca en función de ambiente y del uso de sales minerales se describe en **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Concentración de fósforo inorgánico (Pi) y calcio total (Ca) en sangre según el ambiente (Amb) de P respecto a su concentración en suelo y forraje (bajo y alto) y el uso o no de **suplementación mineral (SM)** con 8% de P. Los números son promedios  $\pm$  DE (n=8).

	Ambiente Bajo en P		Ambiente Alto en P		Probabilidad ( <i>p-value</i> )		
	Sin SM	Con SM	Sin SM	Con SM	Amb	SM	Amb x SM
Pi (mg/dL)	5.1 $\pm$ 0.8	6.7 $\pm$ 0.7	6.8 $\pm$ 0.7	7.4 $\pm$ 1.2	<0.01	<0.01	<0.01
Ca (mg/dL)	10.1 $\pm$ 0.3	9.5 $\pm$ 0.4	9.1 $\pm$ 0.3	9.4 $\pm$ 0.5	<0.01	<0.01	<0.01

Referencias: DE= desvío estándar mg=miligramo; dL=decilitro.

Respecto al tiempo en que la muestra tarda, desde su colecta en los corrales, en iniciar el centrifugado, la concentración de Pi tuvo un incremento progresivo cada 8 horas de 0.16 mg/dL (IC95%: 0.14 – 0.18 mg/dL) que fue significativamente mayor ( $p < 0.01$ ) a partir de las 24 horas post-extracción de la muestra respecto a la hora 0 (**Tabla 8**).

Todas las muestras tuvieron hemólisis, sin embargo, las muestras clasificadas como AGH promediaron 0.83 mg/dL (IC95%: 0.03 – 1.60 mg/dL) más Pi ( $p = 0.04$ ) que las muestras clasificadas con BGH. No hubo asociación entre el tiempo hasta el centrifugado y el grado de hemólisis ( $p = 0.21$ ). Sin embargo, se observó que a partir de las 40 horas inclusive hubo una diferencia de 1.45 mg P/dL más en las muestras con AGH vs las muestras con BGH.

La concentración de Ca no fue afectada por el tiempo en que la muestra tarda en iniciar el centrifugado ( $p = 0.49$ ), ni por el grado de hemólisis ( $p = 0.12$ ).

**Tabla 8.** Variación de la concentración de fósforo inorgánico (Pi) y calcio total (Ca) en función del tiempo desde la colecta de la muestra en los corrales y el centrifugado para la obtención de suero y plasma. Los números son las medias  $\pm$  DE (n = 32).

<u>Tiempo</u>	Pi (mg/dL)		Ca (mg /dL)	
00 horas	5.9 $\pm$ 1.1	a	9.7 $\pm$ 0.5	a
08 horas	6.2 $\pm$ 1.2	ab	9.5 $\pm$ 0.5	a
16 horas	6.4 $\pm$ 1.2	ab	9.5 $\pm$ 0.5	a
24 horas	6.7 $\pm$ 1.2	bc	9.5 $\pm$ 0.5	a
32 horas	6.8 $\pm$ 1.2	c	9.5 $\pm$ 0.5	a
40 horas	6.8 $\pm$ 1.2	c	9.6 $\pm$ 0.6	a
48 horas	6.9 $\pm$ 1.2	c	9.5 $\pm$ 0.6	a

---

Referencias: DE= desvío estándar mg=miligramo; dL=decilitro. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ )

## DISCUSIÓN

La concentración de Pi tiene gran variación, que en nuestro estudio fue influenciada *in vivo* principalmente debido a dieta (dependiente de la concentración de P en el suelo y forraje nativos de la regiones geográficas, como evidencia el Experimento 1, y por el uso de suplementos mineral, como evidencia el Experimento 3) así como por factores post-extracción de la muestra asociado al grado de hemólisis (en todos los Experimentos), sitio anatómico de extracción de la muestras (Experimento 1) y el tiempo en que las muestras tardan en iniciar el centrifugado para la obtención de suero/plasma (Experimento 3). Resultados similares fueron observados en otros estudios (Little et al., 1971; Montiel et al., 2007; Sharifi et al., 2007; Fletcher et al., 2016).

A diferencia de lo observado por Montiel et al., (2007) y por Fletcher et al., (2016) en nuestro estudio no observamos diferencias estadísticamente significativas entre suero y plasma en lo que respecta a la concentración de Pi, registrando las menores concentraciones en las muestras de suero obtenido a partir de la v. yugular. En este contexto la utilización de suero en lugar de plasma es un medio más económico ya que no requiere el uso de anticoagulantes.

Las muestras obtenidas de la vena coccígea tuvieron más chances de tener mayor hemólisis y por ende mayor Pi similar a lo encontrado por otros estudios (Montiel et al., 2007; Fletcher et al., 2016). Sin embargo, no pudimos encontrar asociación estadística entre el sitio anatómico de extracción y el grado de hemólisis; por lo que es posible que este efecto esté más relacionado con la experiencia del operador, hipótesis que no fue evaluada en este trabajo. En función de nuestros resultados para conocer el estatus de Pi de los animales de nuestra región las muestras deben ser obtenidas preferencialmente la vena yugular. Para obtener este tipo de muestra, es necesario que los productores cuenten en la manga con un cepo, un bozal y/o mocheta, entre otras comodidades. En nuestras condiciones muchos productores no cuentan con estas instalaciones por lo que las muestras obtenidas de la vena coccígea son la única opción; en estos casos es recomendable realizar el ajuste por el modelo de regresión descripto.

Un estudio realizado en humanos, en Paris, demostró que la concentración de P en sangre entera disminuye a las 3 horas de haber obtenido las muestras debido a la glucólisis, sin embargo, en ese mismo estudio en las muestras de plasma hubo un aumento progresivo de Pi, aunque no significativo hasta 6 horas post extracción, debido a la hemólisis (Monneret et al., 2016). En los bovinos de nuestro estudio la concentración de P en suero tuvo un aumento progresivo, aunque sin variaciones estadísticamente significativas durante las primeras 24 horas; este es un tiempo prudencial para el envío de las muestras al laboratorio y así evitar interpretaciones erróneas. Similarmente a lo observado en el trabajo de Monneret et al., (2016), en nuestro estudio, el aumento progresivo de las concentraciones de Pi posiblemente esté asociadas a la hemólisis inherente a la

toma de la muestra. Sin embargo, todas las muestras fueron extraídas de v. yugular de las cuales el 96.1% tenían BGM, lo que evidencia que el aumento progresivo de la concentración de P estuvo más asociado a la autólisis de los eritrocitos más que a la hemólisis generada por la toma de la muestra.

A pesar de la amplia variación que presenta el Pi sanguíneo, esta determinación es de gran utilidad para el diagnóstico de la carencia de P (Dixon et al., 2011; Quigley et al., 2015; Schild et al., 2021) siempre que sean consideradas las variables estudiadas en nuestro trabajo. Dado que Uruguay tiene regiones endémicas de carencia de P, más estudios que nos permitan conocer mejor la biodinámica y metabolismo del fósforo tanto en sangre como en sus reservas óseas deben ser realizados.

## **CONCLUSIÓN**

Para realizar un correcto diagnóstico respecto al estatus de P de los animales o rodeos en nuestras condiciones a través de su determinación en sangre tanto en suero como en plasma, debemos obtener las muestras de la vena yugular y centrifugarlas antes de 24 horas de haberlas obtenido.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, S., Kidd, L., Benvenuti, M., Fletcher, M., Dixon, R. (2017). New candidate marker of phosphorus status in beef breeder cows. *Animal Productions Science*, 57, 2291-2303.
- Barbosa, F., Almeida, V., Albuquerque, R., Rocha, B., Soares, P., Silva Filho, G., Chavez, H., Mendoça, F. (2018). Deficiência de fósforo em caprinos no seminário de Pernambuco. *Pesquisa Veterinaria Brasil* 38(6),1117-1124.
- Benvenuti, M., Dixon, R., Goodwin, K., Kidd, L., Mayer, B., Fletcher, M., Anderson, S. (2015). Responses of *Bos indicus* cows in early lactation to dietary phosphorus deficiency. En *School of Environmental and Rural Science, University of New England (Ed.), Recent Advances in Animal in Australia*, 47-48. Armidale, School of Environmental and Rural Science.
- Call, J.W., Butcher, J.E., Shupe, J.L., Lamb, R.C., Boman, R.L., y Olson, A.E. (1987). Clinical effects of low dietary phosphorus concentrations in feed given to lactating dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*, 48(1), 133-136.
- Cantón, G., Campero, C., Odriozola, E. (2008). Inusual cuadro de deficiencia mineral en vacas lecheras de alta producción. *VI Reunión Argentina de Patología Veterinaria y II Seminario de la subdivisión Argentina de la Fundación Charles Louis Davis*. Corrientes, 16-19 julio. Disponible en el Sitio Argentino de Producción Animal.
- Carriquiry, R., Frade, S. (2017). Estudio de la nutrición mineral de bovinos en pastoreo sobre pasturas naturales del Uruguay. *Salud y bienestar animal*,163,30-32.
- Centro de Investigaciones Alberto Boerger (CIAB). (1971). Fertilización de pasturas. Boletín de divulgación, (5), 12-13. Recuperado de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/5895/1/CIAAB-BD-5-1971.pdf>
- Coates, D. (1994). The effect of phosphorus as fertilizer or supplement on pasture and cattle productivity in the semi-arid tropics of north Queensland. *Tropical Grasslands*, 28,90–108.
- Constable, P., Hinchcliff, K., Done, S., Grünberg, W. (2017). Phosphorus deficiency. En: Constable, P., Hinchcliff, K., Done, S., Grünberg, W. *Veterinary medicine, a Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats*, 11, 1485-149. St Louis: Elsevier.
- Craig, L.E., Dittmer, K.E., y Thompson, K.G. (2016). Rickets and osteomalacia. En Jubb, Kennedy and Palmer's *Pathology of Domestic Animals* (6ª ed., Vol. 1. pp. 68-74). St. Louis: Elsevier Saunders.
- Cseh, S., Odeón, A., Gamieta, I. y Mugarza, S. (2008). Deformaciones articulares en terneros causadas por deficiencia de fósforo. Instituto Nacional de

Tecnología Agropecuaria, EEA Balcarce. Revista Argentina de Producción Animal 28(1): 31-37.

Dimensión Inc (2003). Manual de usuario – *Sistema de química clínica* Dimensión RxL Max, 442-445.

Dixon, R., Coates, D., Holmes, B., English, B., Rolef, J. (2011). Phosphorus nutrition and management – overcoming constraints to wider adoption. En: North Australia Beef Research Council. *Proceeding of the Northern Beef Research Update Conference*, 102-109

Dixon, R., Anderson, S., Kidd, L. and Fletcher, M. (2020). Management of phosphorus nutrition of beef cattle grazing seasonally dry rangelands. *Animal production Science*,60,863-879.

Dutra, F. (2011). Osteomalacia. *Archivo Veterinario del Este*, 10 (3), 1-15.

Food and Agriculture Organization. (2011). *Situación de la lechería en América Latina y el Caribe. Federación Panamericana de Lechería* Recuperado de: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Dairy/Documents/Paper\\_Lecher%C3%ADa\\_AmLatina\\_2011.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Dairy/Documents/Paper_Lecher%C3%ADa_AmLatina_2011.pdf)

Fletcher, M., Goodwin, K., Benvenuti, M., Reid, D., Anderson, S., Kidd, L., Dixon, R. (2016). Blood sampling for P screen – tail versus jugular. En *Proceeding, Northern Beef Research Update Conference* ,191.

Greco, D., Stabenfeldt, G. (2004). Metabolismo del calcio y del fosfato. En Cunningham J. *Fisiología veterinaria*. 3,366 -371. Madrid: Elsevier Saunders.

Judkins, M., Wallace, E., Parker, E., Wright, J. (1985). Performance and phosphorus status of range cows with and without phosphorus supplementation. *Journal of Range Management*,38,139–143.

Krsmanovic, M., Djokovic, R., Giadinis, N., Panousis, N., Bajkovski, D., Savié-Stevanovic, V., Bojkovski, J. (2015). Determination of macroelement parameters in different productive stages of simmental cows. *Israel Journal of Veterinary Medicine*,70 (1), 12-15.

Little, D. (1970). Factors of importance in the phosphorus nutrition of beef cattle in northern *Australian Veterinary Journal*, 46, 241-248.

Little, D. (1972). Bone biopsy in cattle and sheep for studies of phosphorus status. *Australian Veterinary Journal*, 48, 668-670.

Little, D., Robinson, P., Playne, M., Haydock, K. (1971). Factor affecting blood inorganic phosphorus determination in cattle. *Australian Veterinary Journal*,47,153-156.

- McGrath, J., Savage, D., and Godwin, I. (2013). The potential for pharmacological supply of 25-hydroxyvitamin D to increase phosphorus utilization in cattle. *Animal Production Science* ,53,1238-1245.
- Machado, M., Schild, C., Preliasco, M., Balserini, A., Medeiros, M., Barros, S., Riet-Correa, F. (2020). Enzootic calcinosis in sheep in Uruguay: a brief review and report of two outbreaks. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 40(11), 831-836
- McDowell, L.R. (1999). En Minerais para ruminantes sob pastejo em regiões tropicais, enfatizado o Brasil. (3ed., pp 92). University of Florida.
- Malafaia, P., Salcedo, Y., Uscategui, R., Souza, V., Costa, D., Berchielli, T. (2017). A simple and fast sampling method for chemical analyses and densitometry of bones through rib biopsies in cattle. *Pesquisa. Veterinaria Brasileira*. 37(1),31-35.
- Mattioli, G. (2013). Fósforo. En: Nutrición Mineral y Vitamínica de Bovinos. *La Plata, CCB Academic*, 41-60.
- Mattioli, G. (2020). Fósforo. En: curso online de Nutrición Mineral y Vitamínica de los Bovinos, organizado por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata. Nov-dic.
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). (2003). La ganadería en Uruguay Contribución a su conocimiento. Ed. Pereira, G., Rincón, F., Tommasino, H., y Grasso, A. Montevideo: MGAP-DIEA, 48-49.
- Monneret, D., Godmer, A., Le Guen, R., Bravetti, C., Emeraud, C., Marteau, A., Alkouri, R., ... Dominique, B. (2016). Stability of Routine Biochemical Analytes in Whole Blood and Plasma from lithium heparin gel tubes during 6-hr storage. *Journal of clinical laboratory analysis* 30, 602-609.
- Montiel, L., Tremblay, A., Girard, V., Chorfi, Y. (2007). Preanalytical factor affecting blood inorganic phosphate concentration in dairy cows. *Veterinary Clinical Pathology*, 36 (3), 278-280.
- Odriozola, E., Achilles, E., Nuñez, M., Riccio, B., Cseh, S., Cantón, G., Drake, M., Yarrar, M. (2008). Desbalance mineral en bovinos de engorde a corral. *XVII Reunión Científica y Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico*. Santa Fe, 28-31 de octubre. Disponible en el *Sitio Argentino de Producción Animal*.
- Perna, R. (2009). Hipofosfatemia Aguda. *En Manejo Clínico del Síndrome Vaca Caída* ,2, 30-36. Buenos Aires: Inter- Médica.
- Quigley, S., Poppi, D., Schats, T. (2015). Validation and demonstration of a diagnostic tool for phosphorus status of beef cattle. En Final Report Project B.NBP.0537, *Meat & Livestock Australia Limited, Sydney*,2-4.



- Riet-Correa, F., Simones, S., Vasconcelos, J. (2008). Urolitíase em caprinos e ovinos. *Pesquisa veterinaria Brasileira*, 28(6),319-322.
- Riet-Correa, F., Medeiros, R., Tokarnia, C., Carvalho, C., Franklin, F., Dias, A., Silva, S. (2012). Botulism by *Clostridium botulinum* type C in goats associated with osteophagia. *Small Ruminant Research*,106, 201-205.
- Read, M., Engels, E. (1986). Phosphorus and the grazing ruminant. Blood and faecal grab samples as indicators of the P status of cattle. *South African Journal of Animal Science*, 16,18-22.
- Rubino, M. (1928). Contribución al estudio de la osteomalacia en bovinos *Revista Medicina Veterinaria* (Uruguay) ,2, 563–579.
- Rubino, M. (1934). Osteomalacia en los bovinos y metabolismo del fosforo. *Revista Medicina Veterinaria* (Uruguay), 357-358.
- Schild, C.O., Boabaid, F.M., Olivera, L.G.S., Machado, M., Vildoza, A., Saravia, A., Riet-Correa, F. (2021). Osteomalacia as a result of phosphorus deficiency in beef cattle grazing subtropical native pastures in Uruguay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 33(5), 1018-1022.
- Sharifi, K., Mohri, M., Rakhshani, A. (2007). The relationship between blood indicators of phosphorus status in cattle. *Veterinary Clinical Pathology* ,36 (3), 354-357.
- Shupe, J.L., Butcher, J.E., Call, J.W., Olson, A.E., y Blake, J.T. (1988). Clinical signs and bone changes associated with phosphorus deficiency in beef cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 49(9), 1629-1636.
- Suttle, N. (2010). Phosphorus. En *Mineral Nutrition of Livestock*. Suttle N. *British library, London UK* ,4(6), 122-167.
- Ternouth, J. (1990). Phosphorus and beef production in northern Australia. *Tropical Grassland*, 24, 159-169.
- Tokarnia, C., Döbereiner, J., Peixoto, P. (2000). Deficiência minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 20(3),127-138.
- Tokarnia, C. (2010). Deficiência de cálcio e fósforo. En: Tokarnia, C., Peixoto, P., Barbosa, J., Farias, M., Döbereiner, J. (2010). *Deficiência minerais em animais de produção*. Rio de Janeiro, Helianthus, 16-48.
- Underwood, E.J., y Suttle N.F. (1981). The mineral nutrition of livestock (2ª ed.). Slough: CAB.
- Ungerfeld (1998). Fósforo. En: *Factores que Afectan el Contenido de los Minerales en Pasturas Naturales y el Estado Nutricional de Vacunos y Ovinos en Uruguay*. Montevideo, INIA Tacuarembó, 48-77. Disponible en:

<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/9495/1/Factores-que-afectan-el-contenido-UNGERFELD-1998.pdf>. Fecha de consulta: 5 de noviembre de 2019.

- Uriarte, G., Cuenca, L., García, P., Piaggio, L., Podestá, C., McDowell, L. (2000). Effects of mineral supplementation on blood biochemistry of beef cattle in extensive grazing conditions. *21° Congreso Mundial de Buiatría, 28° Jornadas Uruguayas de Buiatría*. Punta del Este, Uruguay, 57.
- Uriarte, G., Murphey, G. (1981) Evaluación preliminar de algunos parámetros sanguíneos seleccionados en ganado de carne en Uruguay. *IX Jornadas de Buiatría*, Paysandú.