



ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL
CAMPUS TERRA DA USC

Diego

Luna Narváez

Tese de doutoramento

*Evaluación diagnóstica del
estatus micromineral en
animales*

Lugo, 2019

PD en Medicina e Sanidade Veterinaria

TESIS DE DOCTORADO

**EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA DEL
ESTATUS MICROMINERAL EN ANIMALES**

Diego Luna Narváez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y SANIDAD VETERINARIA

LUGO

2019



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Evaluación diagnóstica del estatus micromineral en animales

D. Diego Luna Narváez

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirмо que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Lugo, 20 de mayo de 2019

Fdo. Diego Luna Narváez



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Evaluación diagnóstica del estatus micromineral en animales

Dña. M. Marta López Alonso, Profesora Titular del Departamento de Patología Animal de la Universidade de Santiago de Compostela y Dña. Marta I. Miranda Castañón, Profesora Titular del Departamento de Anatomía, Producción Animal y Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidade de Santiago de Compostela

INFORMA/N:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. **Diego Luna Narváez**, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directoras de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Lugo, 20 de mayo de 2019

Fdo. M Marta López Alonso

Fdo. Marta I Miranda Castañón

Son muchas las personas que colaboraron de una forma u otra en la realización de esta investigación y que debo agradecer, en primer lugar lo haré a las doctoras Marta I. Miranda Castañón y Marta López-Alonso, tutoras de la presente tesis doctoral, quienes me apoyaron y guiaron, desde que fueron mis profesoras en la Maestría en Investigación en Medicina y Sanidad Veterinaria de la USC, en todo este tiempo han estado prestas a solventar cualquier duda e inquietud de mi parte.

Junto a ellas y demás miembros del grupo de investigación (Víctor, José Luis, Joaquín, Cristina, Ruth e Inma), tuve la suerte de contar con su compañía y amistad en los cafés de la mañana; momentos en los me hicieron sentir como que me conocieran de toda la vida, gracias, muchas gracias por lo aprendido, no solo en lo académico sino fundamentalmente en lo humano, recuerdos que los tendré por siempre en mi memoria.

No puedo dejar de reconocer mi gratitud a Verónica Piñeiro (RIAIDT), quien participó con los análisis de las muestras de este estudio. Así como también a los colegas brasileños, Francisco Leonardo por su colaboración en el procesamiento de muestras y Antonio Humberto Hamad Minervino, que contribuyó en una de las publicaciones.

Una mención especial merecen mi esposa Yolanda y mis dos pequeños hijos Martina y Daniel, compañeros inseparables en mis viajes a esta maravillosa ciudad de Lugo, de donde guardamos estupendos recuerdos, gracias por comprenderme y ayudarme en todo momento. Mi reconocimiento a mis padres y hermanos, los que con su ejemplo, me enseñaron que en la vida debes esforzarte y ser constante.

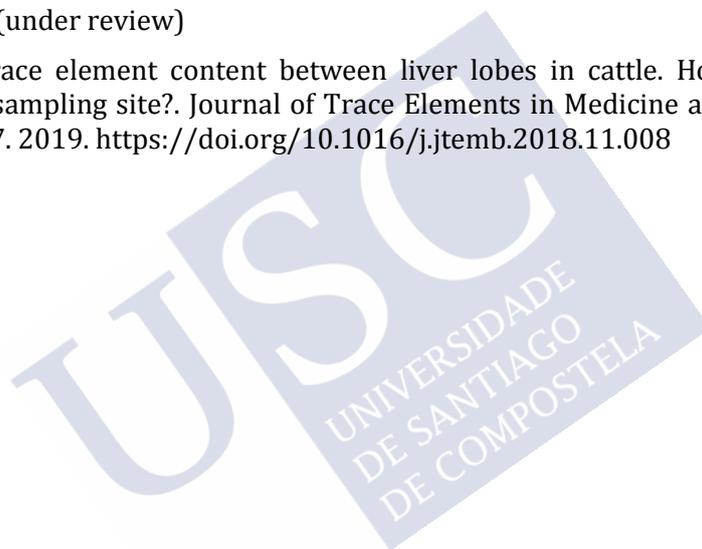
Por último agradezco a la Universidad Central del Ecuador, institución a la cual me siento orgulloso de pertenecer, y que me otorgó el permiso correspondiente para realizar este doctorado.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
RESUMEN/SUMMARY/RESUMO	1
INTRODUCCIÓN	7
1. ESTATUS DE LOS ELEMENTOS TRAZA EN EL GANADO VACUNO	9
1.1. Cobalto	10
1.2. Cobre	11
1.3. Cromo	12
1.4. Hierro	13
1.5. Manganeseo	14
1.6. Molibdeno	15
1.7. Níquel	16
1.8. Selenio	17
1.9. Yodo	18
1.10. Zinc	18
1.11. Muestras a analizar	19
2. MÉTODOS ANALÍTICOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PARA ICP-MS	24
2.1. Preparación de muestras de sangre entera y suero	25
2.2. Diferencias entre suero y plasma	26
3. EL HÍGADO COMO ÓRGANO DIANA EN EL METABOLISMO DE LOS ELEMENTOS TRAZA	27
3.1. Importancia del punto de muestreo	28
4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
OBJETIVOS	37
RESULTADOS y DISCUSIÓN: CAPÍTULO	41
Capítulo 1. Validación de un método simple de preparación de muestras para análisis multielemental en suero bovino	43

	Pág.
Capítulo 2. Determinación de elementos esenciales y tóxicos en sangre en ganado vacuno: suero vs plasma	61
Capítulo 3. Variación en el contenido de los elementos traza entre los lóbulos hepáticos en el ganado vacuno. Importancia del punto de muestreo	77
CONCLUSIONES	91
ANEXOS (Publicaciones)	95
1. Validation of a simple sample preparation method for multielement analysis of bovine serum. PLoS One. Feb 5;14(2):e0211859. 2019. doi: 10.1371/journal.pone.0211859.	99
2. Determination of essential and toxic elements in blood of cattle: serum vs plasma. Animals. (under review)	111
3. Variation in trace element content between liver lobes in cattle. How important is the sampling site?. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 52: 53-57. 2019. https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.11.008	123





RESUMEN
SUMMARY
RESUMO





RESUMEN

Los minerales traza son necesarios para el funcionamiento normal de casi todos los procesos bioquímicos en el organismo. Las deficiencias de los elementos traza son frecuentes en todo el mundo y están estrechamente relacionadas con la mala salud y productividad de los animales; por otro lado, la exposición excesiva también tiene efectos perjudiciales para la salud y la producción. La determinación del estado de los elementos traza es una herramienta de diagnóstico esencial cuando tenemos problemas en el rebaño asociados con la disminución de la productividad, la baja fertilidad y alteraciones de la inmunidad. Dentro de las muestras no invasivas, la medición de las concentraciones de los elementos traza en sangre (suero o plasma) puede proporcionar información útil, si bien el hígado se considera el mejor tejido para evaluar el estado de los elementos traza porque es un órgano de almacenamiento para la mayoría de los elementos. En este estudio desarrollamos un procedimiento de digestión ácida simple de muestras de suero bovino para análisis de elementos traza por espectroscopia de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS). Se trata de un método simple que permite una determinación más exacta y precisa de la mayoría de los elementos traza, tóxicos y esenciales en comparación con el método de dilución alcalina comúnmente utilizado. Así mismo valoramos si había diferencias entre el suero y el plasma en la medición de elementos traza. A nivel hepático, como órgano clave en el metabolismo de los elementos traza, evaluamos el patrón de distribución de los elementos traza en los diferentes lóbulos hepáticos: las caras interna y externa del lóbulo derecho; el lóbulo izquierdo, el lóbulo caudado, el lóbulo cuadrado y el proceso papilar. Observamos que: (1) los elementos traza se distribuyeron de manera desigual en los diferentes lóbulos hepáticos; (2) el lóbulo izquierdo parece tener una mayor capacidad de almacenamiento de elementos traza (lo que podría ser más importante con niveles altos de exposición); y (3) las concentraciones de los principales elementos traza están altamente correlacionadas entre los diferentes lóbulos hepáticos (excepto para el lóbulo caudado y para el selenio).

Palabras clave: elementos traza, suero, plasma, hígado, ICP-MS, ganado vacuno

SUMMARY

Trace minerals are required for the normal functioning of almost all biochemical processes in the body. Trace element deficiencies are frequent worldwide and are closely associated with poor animal health and productivity; however, excessive exposure also has deleterious effects on health and production. Determination of trace element status is an essential diagnostic tool when problems associated with decreased productivity, low fertility and immunity appear in the herd. Within the non-invasive samples, measurement of trace element concentrations in blood (serum or plasma), can provide useful information about the trace element status, even though the liver is generally considered the best tissue for evaluating trace element status in livestock because it is a storage organ for most trace elements. In this study a simple pre-treatment procedure based on single acid digestion was developed for bovine serum samples prior to inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS) based determination of trace element contents. The proposed sample preparation method is a simple method that enables more accurate and precise determination of most of the toxic and essential trace elements in comparison with the commonly used alkali digestion method. We also evaluate if there was differences between serum and plasma in trace elements determination. In liver, as the main organ involved in trace element metabolism, we evaluate the pattern of lobular distribution of trace elements in the hepatic lobes: the internal and external faces of the right lobe, the left lobe, caudate lobe, quadrate lobe and the processus papillaris. The main study findings were: (1) trace elements were unevenly distributed across the liver; (2) the left lobe appeared to have a higher capacity for trace element storage (which could be more important at high levels of exposure); and (3) the concentrations of the main trace elements were highly correlated across the liver (except for the caudate lobe and for selenium).

Keywords: trace elements, serum, plasma, liver, ICP-MS, cattle

RESUMO

Os elementos traza son necesarios para o funcionamento normal de case todos os procesos bioquímicos no organismo. As deficiencias dos elementos traza son frecuentes en todo o mundo e están estreitamente relacionadas coa mala saúde e produtividade dos animais; doutra banda, a exposición excesiva tamén ten efectos prexudiciais para a saúde e a produción. A determinación do estado dos elementos traza é unha ferramenta de diagnóstico esencial cando temos problemas no rabaño asociados coa diminución da produtividade, a baixa fertilidade e alteracións da inmunidade. Dentro das mostras non invasivas, a medición das concentracións dos elementos traza en sangue (soro ou plasma) pode proporcionar información útil, aínda que o fígado considérase o mellor tecido para avaliar o estado dos elementos traza porque é un órgano de almacenamento para a maioría dos elementos. Neste estudo desenvolvemos un procedemento de dixestión ácida simple de mostras de soro bovino para análise de elementos traza por espectroscopia de masas con fonte de plasma acoplado (ICP-MS). Trátase dun método simple que permite unha determinación máis exacta e precisa da maioría dos elementos traza, tóxicos e esenciais en comparación co método de dilución alcalina comunmente utilizado. Así mesmo valoramos si había diferenzas entre o soro e o plasma na medición de elementos traza. A nivel hepático, como órgano esencial no metabolismo dos elementos traza, avaliamos o patrón de distribución dos elementos traza nos diferentes lóbulos hepáticos: as caras interna e externa do lóbulo dereito; o lóbulo esquerdo, o lóbulo caudado, o lóbulo cadrado e o proceso papilar. Observamos que: (1) os elementos traza distribuíronse de xeito desigual nos diferentes lóbulos hepáticos; (2) o lóbulo esquerdo parece ter unha maior capacidade de almacenamento de elementos traza (o que podería ser máis importante con niveis altos de exposición); e (3) as concentracións dos principais elementos traza están altamente correlacionadas entre os diferentes lóbulos hepáticos (excepto para o lóbulo caudado e para o selenio).

Palabras clave: elementos traza, soro, plasma, fígado, ICP-MS, gando vacún



INTRODUCCIÓN





INTRODUCCIÓN

Los elementos traza, microminerales u oligoelementos son esenciales en la nutrición animal ya que juegan un papel importante en la inmunidad, metabolismo oxidativo y energético de los animales, y por lo tanto en su salud, reproducción y productividad. Las raciones pueden ser deficientes en algún mineral, mientras que otros pueden estar en altas concentraciones o incluso a niveles tóxicos. Por lo general se trata de deficiencias múltiples y no es fácil incriminar a un elemento en concreto. La elección del tipo de muestra (sangre entera, suero, plasma, hígado, leche, dieta..., etc.) para el análisis varía con el problema que tiene el rebaño y el elemento en concreto que requiere más atención. Por lo general empezamos muestreando sangre (suero) porque es fácil de obtener y barato y nos da una primera aproximación diagnóstica. A día de hoy, las técnicas de análisis multielemental o multi-elemento como la espectroscopia de plasma (ICP) son la mejor opción para el análisis de minerales.

1. ESTATUS DE LOS ELEMENTOS TRAZA EN EL GANADO VACUNO

Es muy importante conocer la concentración de los elementos traza por las múltiples funciones que cumplen en los animales, teniendo particular importancia en los bovinos que son una especie dedicada a la producción de carne y leche, dependiendo de las características genéticas de cada raza, donde hay una especial consideración en las razas lecheras debido a su alto metabolismo, para la producción láctea, lo que trae de la mano, problemas en la sanidad y reproducción, relacionados con las deficiencias y/o desequilibrios en el estatus de los microminerales. Debido a como lo mencionan varios autores los elementos traza mantienen la inmunidad, función oxidativa y metabolismo energético de los rumiantes (Guyot et al., 2009; López-Alonso, 2012; Overton and Yasui, 2014; Miranda et al., 2015). Además, tanto en la leche, como en la carne se ve reflejado el estatus de los elementos traza. Todo lo mencionado anteriormente se produciría en sistemas intensivos de producción, donde se administran grandes dosis de suplementos minerales y no son usuales las deficiencias primarias sino más bien por interacciones y antagonismos entre los oligoelementos, como por ejemplo lo que sucede entre el cobre, azufre y molibdeno en el rumen, para formar tiomolibdatos unidos al cobre e inhibir su absorción, el exceso de hierro también impide la absorción de cobre en explotaciones extensivas al pastoreo.

También el zinc al igual que el yodo no se absorben adecuadamente cuando los niveles de calcio en la dieta son altos y la interacción negativa entre el cobre y el zinc (Suttle., 2010).

Dentro de los elementos traza los más importantes, en orden de importancia nutricional y clínica son selenio, cobre, zinc, manganeso, yodo, cobalto, cromo y hierro. Estos microminerales son componentes estructurales de órganos y tejidos, también son catalizadores enzimáticos (por ejemplo, la superóxido-dismutasa el cobre, zinc y manganeso, la catalasa el hierro y la glutatión peroxidasa el selenio), de vitaminas (el cobalto es esencial para activar la vitamina B12 en el rumen), hormonas (hormonas tiroideas el yodo), e influye en el metabolismo ruminal (níquel).

1.1. Cobalto (Co)

1.1.1. Funciones y signos de deficiencias

El cobalto es un componente esencial de la vitamina B12 (cobalamina). En rumiantes la microflora del rumen sintetiza cobalamina a partir de fuentes inorgánicas de cobalto, y así los requerimientos de vitamina B12 son satisfechos (Tiffany et al., 2006). La vitamina B12 es un cofactor de las dos principales enzimas en la gluconeogénesis y metabolismo de las grasas; por lo tanto el nivel de cobalto afecta el metabolismo de vacas lecheras (Kincaid et al., 2003), actuando como cofactor para la enzima metilmalonil-CoA mutasa que cataliza la conversión de metilmalonil-CoA a succinil-CoA. Una reacción en la cual la vitamina B12 es un cofactor en la interconversión de succinato y propionato. En los animales rumiantes esta es una reacción particularmente importante en la producción de energía, con la síntesis de glucosa desde propionato (Kincaid and Socha, 2007). La deficiencia de cobalto se manifiesta en deficiencia de vitamina B12 en los rumiantes, con una disminución del apetito, baja conversión alimenticia, reducido crecimiento, pérdida de peso, lipidosis hepática, anemia, inmunosupresión y fallo de la función reproductiva.

1.1.2. Metabolismo

Como señalábamos anteriormente el cobalto es esencial para la absorción de la vitamina B12 en el rumen. La vitamina B12 es almacenada en el hígado, pero luego de administrar cobalto a ovejas en dosis elevadas entre diez y cien veces a dosis marginal durante 36 semanas, se concluyó que el plasma era ligeramente más sensible que el hígado para almacenar la vitamina B12 (Marston, 1970). Similares diferencias mostraron los bovinos alimentados a base de concentrados en los modelos de acumulación de vitamina B12 entre plasma e hígado (Tiffany et al., 2003). Muy poco se conoce acerca de la excreción de la vitamina B12 en los rumiantes, en humanos la principal vía es a través de la bilis y excreción urinaria. En vacas de leche

con un alto consumo de cobalto (17.8–31.0 mg/día) aumenta la concentración de vitamina B12 en la orina con valores máximos aproximados de 12 µg/L que son valores más altos que los encontrados en suero o leche de vacas en lactación (Walker and Elliot, 1972). Las concentraciones de cobalto en el hígado en general reflejan la ingesta de cobalto, siempre que se evite las interferencias analíticas causadas por las altas concentraciones de hierro en el hígado (Kawashima et al., 1997; Underwood and Suttle, 1999).

1.2. Cobre (Cu)

1.2.1. Funciones y signos de deficiencias

El cobre es un componente de muchas enzimas las cuales cumplen funciones catalíticas, estas enzimas incluyen citocromo oxidasa la cual actúa en la producción de adenosintrifosfato, superóxido dismutasa que actúa en la defensa inmune e inactivación de radicales de oxígeno tóxicos, tirosinasa, responsable de la síntesis de melanina; y lisil oxidasa, muy importante en la formación de tejido conectivo. Además otras enzimas contienen cobre y promueven funciones vitales en el crecimiento, inmunidad, y un funcionamiento correcto del sistema nervioso (Prohaska et al., 2006). La concentración de cobre, puede afectar el balance oxidante-antioxidante en vacas lecheras porque es un componente de la superóxido dismutasa y ceruloplasmina (Suttle, 2010).

La biodisponibilidad del cobre está influenciada por la concentración de otros elementos, especialmente molibdeno y azufre, por lo que los requerimientos de cobre no pueden ser adecuadamente definidos sin el conocimiento de la concentración de azufre y molibdeno en la dieta. Además el exceso en la dieta en hierro, zinc y calcio también interfieren en la absorción de cobre (Graham, 1991). El molibdeno puede inhibir el consumo y la utilización de cobre en el rumen, debido a que se une a azufre reducido para formar tetratiomolibdatos que liga al cobre e impide su absorción. Otros tiomolibdatos y molibdatos son absorbidos a la circulación sanguínea y ligan al cobre endógeno y lo hacen no disponible para las enzimas y en definitiva afecta a los procesos metabólicos (Masson, 1982). Además, a nivel sanguíneo (plasma) el molibdeno se liga a proteínas que remueven cobre desde el hígado y exacerbando la eliminación de cobre por la orina, y se acumulan en el riñón complejos cobre-molibdeno (Kincaid and White 1988). Por ello la presencia de complejos cobre-molibdeno en el plasma explica el aumento de cobre en sangre en rumiantes que consumen molibdeno (Suttle and Field, 1968). Incluso aunque el cobre hepático y la actividad de la ceruloplasmina están disminuidos (Kincaid, 1980). Un temprano y dramático signo de deficiencia de cobre es la pérdida del color del pelo, lo cual es más evidente en las vacas de raza de pelo oscuro, además causa pérdidas en la producción,

lo cual es clínicamente caracterizado por el incremento de ingesta de comida, pérdida de ganancia de peso, trastornos reproductivos como, alteración en la duración del ciclo estral, anestro, pérdidas embrionarias tempranas y aumento en la prevalencia de quistes ováricos; además de una mayor incidencia de enfermedades y de la ulceración abomasal que es una característica de la deficiencia marginal de cobre (Herdt and Hoff, 2011).

1.2.2. Metabolismo

El control de los niveles de cobre en el organismo se logra mediante la absorción, el almacenamiento hepático y la secreción biliar; los rumiantes corren riesgo endémico de privación de cobre pero a la vez tienen un deficiente control entre la absorción y el almacenamiento ya que estos tienden a acumular cobre en el hígado, mientras los no rumiantes tienen un excelente control entre la absorción y la excreción biliar logrando mantener equilibrados sus niveles de cobre hepático ante una variada oferta de cobre en la dieta (Suttle, 2010). Cuando el cobre llega al hígado de un bovino adulto entra en un proceso con dos etapas, primero se une al glutatión y luego a las metalotioneinas, antes de ser distribuido entre la secreción biliar, la síntesis de ceruloplasminas y el almacenamiento (Bremner, 1993). La captación celular de cobre fuera del hígado se puede lograr mediante receptores de ceruloplasmina en las membranas celulares (McArdle, 1992; Saenko et al., 1994). La secreción biliar permite tanto el reciclaje entero-hepático de cobre, como la excreción del exceso (Prohaslka, 2006). Las pérdidas de cobre biliar en ovinos pueden aumentar más de cinco veces a medida que el cobre va aumentando su concentración en el hígado, pero esto puede variar dependiendo de la raza (Suttle et al., 2002). Cuando hay altas ingestas de cobre en bovinos se limita su almacenamiento hepático mucho antes que en los ovinos, mediante el mecanismo de secreción biliar (Phillippo y Graca, 1983). Esto se puede explicar por un umbral más bajo de los lisosomas al acumulo de cobre en los bovinos (Lopez-Alonso et al., 2005).

1.3. Cromo (Cr)

1.3.1. Funciones y signos de deficiencias

Su principal acción está relacionada con el metabolismo de la glucosa, ya que interfiere en la función y sensibilidad de la insulina (Spears and Weiss, 2008). Algunos estudios han indicado, que la suplementación con cromo puede tener impacto en la salud y respuesta inmune de los rumiantes (Spears, 2000), lo que es corroborado por estudios que demuestran una disminución del cortisol circulante en vacas alimentadas con cromo, lo cual puede estar relacionado con los efectos sobre el estrés y la función inmune (Kafilzadeh et al., 2012).

1.3.2. Metabolismo

En los últimos años se han llevado a cabo muchos experimentales para explicar el papel del cromo trivalente (Cr III) en el metabolismo de lípidos y carbohidratos y años anteriores se realizaron estudios sobre la fisiología de la deficiencia del cromo, pero muy pocos sobre la estructura, función y mecanismo de acción de la forma biológicamente activa del cromo (III) y las bajas concentraciones de este elemento en los tejidos (Vincent, 2000). Primeramente se identificó un cromo orgánico en la levadura de la cerveza denominado “factor de tolerancia a la glucosa” (GTF) el cual fue muy difícil purificarlo, pero se aisló una proteína de unión al cromo de bajo peso molecular (cromodulina) que facilita la captación de glucosa por las células sensibles a la insulina (Vincent, 2000). Esta cromodulina se puede sintetizar in vivo y el cromo se encuentra en formas similares a GTF en los hígados de mamíferos que reciben cromo inorgánico en sus dietas (Yamamoto et al., 1988). En cuanto al mecanismo de absorción del cromo no está claro todavía, se asume que el cromo absorbido se une a la transferrina plasmática de igual forma que el cromo inyectado (Feng, 2007). Los receptores de la transferrina son activados por la insulina en las membranas celulares e induce un flujo de cromo que conduce a la formación de holocromodulina desde los reservorios de esta apoproteína, y a su vez facilita la captación de insulina por los adipocitos a través de la tirosina quinasa, y por lo tanto sirve como un autoamplificador de la señal de la insulina (Feng, 2007). En los rumiantes el cromo en forma de cromo-metionina pasa la barrera del rumen (Kim et al., 2005) y de esta forma puede introducirse en el organismo del animal como parte de las reservas de metionina, siempre y cuando esta molécula se absorba intacta. El cromo orgánico es más biodisponible que el inorgánico, de hecho se observó la presencia de mayores cantidades de cromo en los tejidos y en la orina en sujetos que reciben más cromo orgánico que de fuentes inorgánicas (NRC, 2005), pero no hay una evidencia clara de una mayor biodisponibilidad dentro de su contexto funcional, por ejemplo el cromo que viene de un núcleo de picolinato de cromo debe ser primero reducido antes de poder participar en el proceso de señalización de la insulina (Vincent., 2000).

1.4. Hierro (Fe)

1.4.1. Funciones y signos de deficiencias

Es un nutriente esencial que se requiere para una amplia variedad de procesos metabólicos y se encuentra en todas las células del cuerpo. Una gran proporción se encuentra como componente de las moléculas de las proteínas hemoglobina y mioglobina. Además está involucrado en la cadena de transporte de electrones y transporte de oxígeno y es indispensable para el normal funcionamiento de todo tipo de células. Se encuentra en el plasma (transferrina), leche (lactoferrina) e hígado

(ferritina y hemosiderina) (Suttle, 2010). Existen enzimas hierro dependientes tales como la catalasa y peroxidasa, son críticas para el control oxígeno reactivo (King, 2000). Como se mencionó anteriormente, puede impedir la absorción o transporte de otros elementos con similar forma divalente, posiblemente por competición de los lugares de unión en la mucosa (Hill and Matrone, 1970). Su deficiencia es normalmente dividida en tres estados: estado 1 disminución de las reservas de hierro en tejidos; estado 2 caracterizado por la reducción de hierro en el suero y aumento de la capacidad de ligar hierro; y estado 3 caracterizado por anemia (Johnson, 1990).

1.4.2. Metabolismo

Es el elemento traza más abundante en el cuerpo, este se absorbe principalmente desde el duodeno mediante un proceso de dos etapas que involucra la captación en la mucosa y la transferencia desde la serosa que se logra mediante hefaestina (un homólogo de la ceruloplasmina dependiente del cobre) y una proteína de transporte, ferroportina en la membrana basolateral. El hierro se absorbe según las necesidades y su absorción se ve afectada aparentemente por factores como la edad y el estatus del hierro en el cuerpo, así como por la fuente dietética (Suttle, 2010). En cuanto a su almacenamiento sus principales compuestos son la ferritina una globulina que puede almacenar en su núcleo hasta 2000 átomos de hierro y se encuentra principalmente en el hígado e intestino, y la hemosiderina que almacena hierro principalmente cuando existen altos niveles de este (Suttle, 2010). Como se ve el hierro se transporta y almacena unido a proteínas, pero cuando las reservas en un tejido se vuelven excesivas por sobrecarga crónica de este, podría aparecer suficiente hierro reactivo que cause daño peroxidativo en órganos como el hígado (Kent and Bahu, 1979). Esto se da porque el hierro libre es citotóxico debido a su alto potencial de reducción-oxidación y su capacidad para generar radicales libres de oxígeno a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton (Jenkins and Kramer, 1988). Las excreciones urinaria y fecal de hierro no desempeñan un papel significativo en la homeostasis del hierro (Kreutzer and Kirchgessner, 1991).

1.5. Manganeso (Mn)

1.5.1. Funciones y signos de deficiencias

Existen pocos estudios acerca de las funciones del manganeso sobre el sistema inmune y metabolismo en el ganado lechero, aunque se menciona que es esencial en el grupo de enzimas que están involucradas en la función inmune y nerviosa, en la protección antioxidante como una parte integral de la superóxido dismutasa y en el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Andrieu, 2008). Además está involucrado en el mantenimiento y desarrollo propio del hueso, ya que el manganeso es necesario para la glicosiltransferasa, enzima involucrada en la síntesis de glicocoaminoglicanos

y glicoproteínas del hueso y matriz del cartílago. Cuando existe deficiencia de manganeso en animales domésticos está asociada con falta del crecimiento por anomalías del esqueleto, ataxia del recién nacido, disturbios de la función reproductiva, también defectos en el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Keen et al., 2000).

1.5.2. Metabolismo

El manganeso tiene una deficiente absorción y control homeostático (Keen et al., 2000). Se absorbe a través del intestino delgado. En humanos se ha reportado una absorción del 3% al 4% del manganeso ingerido en la dieta, incrementándose cuando hay deficiencias de hierro. Así mismo dietas altas en calcio, fósforo y fitatos aumentan las demandas de manganeso (Kaneko et al., 2008). Los mecanismos de absorción del manganeso de la dieta posiblemente son compartidos con el hierro, lo que implica la captación por parte del transportador apical no específico DMT-1 (transportador de metales divalentes) y la unión a la ferritina (Arredondo y Nuñez, 2005). El manganeso que proviene del tracto gastrointestinal e ingresa a la sangre portal, puede permanecer libre o unirse rápidamente a la alfa-2 macroglobulina y a la transferrina, especialmente como Mn^{+3} (Kaneko et al., 2008). El hierro y el manganeso absorbidos, son transportados en el plasma por la transferrina (Davidsson et al., 1989) y una vez en el hígado son captados por receptores de la transferrina (Suttle, 2010). De esta forma el manganeso va a ingresar al hepatocito en donde su destino metabólico no es muy claro, aunque se pueden identificar varios reservorios celulares para el manganeso. El primero representa al manganeso ocupando los lisosomas, esta captación de manganeso por los lisosomas, se considera un paso esencial para su excreción, ya que se piensa que en los lisosomas se concentra el manganeso para el suministro a los canalículos biliares y de esta forma es excretado a través de la bilis, con lo que se logra una regulación de la concentración corporal de manganeso.

1.6. Molibdeno (Mo)

1.6.1. Funciones y signos de deficiencias

Este elemento traza cumple funciones activando enzimas como la xantina deshidrogenasa, sulfato oxidasa y aldehído oxidasa (Johnson, 1997), si bien el rol más importante lo tiene, como señalamos anteriormente, en el metabolismo del cobre. Altos niveles de molibdeno favorecen la deficiencia de cobre (Mc Dowell, 1992).

1.6.2. Metabolismo

Los pastizales provenientes de suelos marinos son ricos en molibdeno, mientras que los que provienen de suelos arenosos contienen bajos niveles de molibdeno (Suttle, 2010). En cuanto a la absorción, en los bovinos se da desde su forma hexavalente

como molibdatos solubles en agua (Ferguson et al., 1943), una vez en el intestino el molibdeno se transporta por un sistema mediado por portadores, en donde el sulfato compite por el mismo portador del molibdeno inhibiendo su transporte en la membrana del intestino, lo que puede disminuir la absorción del molibdeno; el mismo proceso ocurre en los túbulos renales (Failla, 1999; Spears, 2003; Brondino et al., 2006). Cuando existe una alta proporción de cobre y azufre en relación al molibdeno en las dietas, los rumiantes pueden excretar la mayoría del molibdeno ingerido a través de las heces, debido a la formación en el rumen de tiomolibdatos insolubles (Suttle, 2010). Como señalábamos anteriormente, la absorción de molibdato a través de la mucosa intestinal se realiza mediante un proceso activo, mediado por un portador, que lo comparte e inhibe con el sulfato (Mason and Cardin, 1977). Una vez en el plasma el molibdato absorbido normalmente se transporta en estado iónico libre, pero se almacena en los tejidos como molibdopterina, ligándose a la xantina deshidrogenasa y aldehído-oxidasa en el citosol y sulfito-oxidasa en las membranas mitocondriales (Johnson, 1997). La xantina deshidrogenasa tiene una alta actividad en el hígado, células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos, macrófagos y mastocitos (Helsten-Westing et al., 1991), y en la glándula mamaria en estrecha asociación con sulfito oxidasa (Blakistone et al., 1986). La excreción en los no rumiantes parece ser mayormente a través de la orina, pero en los rumiantes las pérdidas fecales y en la leche pueden representar pérdidas significativas (Kaneko et al., 2008). El exceso de molibdeno se excreta predominantemente a través de los túbulos renales, mediante una inhibición competitiva de la reabsorción de molibdatos por sulfatos, aumentándose la excreción urinaria de molibdeno (Bishara and Bray, 1978). Es importante recalcar que en los rumiantes, se da una interacción de tres vías entre cobre, molibdeno y azufre que determina la susceptibilidad del animal en pastoreo a la hipocuprosis, mediante la formación en el rumen de complejos triples, cobre tiomolibdatos que determinan la tolerancia al exceso de molibdeno (Suttle, 2010).

1.7. Niquel (Ni)

1.7.1. Funciones y signos de deficiencias

Es importante en la nutrición de los rumiantes, en los cuales su digestión es fermentativa a través de los microorganismos anaerobios presentes en el rumen, en los que la presencia de níquel es fundamental. Así este oligoelemento influye en el metabolismo ruminal (Spears et al., 1986, Suttle, 2010).

1.7.2. Metabolismo

En cuanto a la absorción se menciona que es deficiente en terneros siendo del 1% al 5% (O'Dell et al., 1971), pero aumenta en ciertos estados fisiológicos como la preñez y

la lactancia al igual que cuando hay déficit de hierro, lo que sugiere un mecanismo de transporte activo compartido por los dos microminerales (NRC, 2005). Una vez en el plasma el níquel se une principalmente a la albúmina y también a la histidina, lo que permite su absorción al interior de las células (Suttle, 2010). El exceso de níquel es principalmente eliminado a través de la orina, más que por las heces (NRC, 2005).

1.8. Selenio (Se)

1.8.1. Funciones y signos de deficiencias

El selenio forma parte de la estructura de la glutatión peroxidasa que actúa a nivel celular (Rotruck et al., 1973). Esta enzima tiene una función antioxidante por inhibición y destrucción de peróxidos, contribuyendo a la integridad de la membrana celular y protegiendo de daños al ADN, lográndose una excelente respuesta inmune (Wintergerst et al., 2007). Cuando existe una deficiencia de selenio pueden presentarse retenciones de placenta, metritis, fallo en la reproducción, retraso en el crecimiento y predisposición a enfermedades infecciosas como la mamitis.

1.8.2. Metabolismo

En los alimentos vegetales encontramos las fuentes dietéticas de selenio, la cantidad de selenio en el suelo varía de región en región y puede determinar la cantidad de selenio en los alimentos donde se puede encontrar como selenometionina y selenocisteína (Kaneko et al., 2008). El selenio en forma inorgánica como selenito se puede absorber pasivamente, en tanto el selenato comparte una vía activa con el molibdato y sulfato, pudiendo ser vulnerable al antagonismo de estos aniones (Cardin and Mason, 1975). La absorción de selenio ocurre principalmente en el duodeno con poca evidencia de captación por el rumen, el abomaso, el yeyuno o el íleon. Si comparamos la absorción de selenio entre no rumiantes y rumiantes en estos últimos su absorción es alrededor de un 40% menor, probablemente por la reducción de selenito a formas insolubles de selenio en el rumen (Kaneko et al., 2008). Mientras que la selenometionina y selenocisteína se absorben en el intestino como moléculas intactas (Vendeland et al., 1992). Los compuestos solubles en agua del selenio parecen tener una rápida distribución en la mayoría de órganos después de ser absorbidos (Kaneko et al., 2008). Cuando se absorbe la selenometionina entra a las reservas de metionina y una proporción variable va donde se requiere metionina y no selenio, pero es posible una conversión parcial a selenocisteína mediante una liasa y adenosilmetionina (NRC, 2005) y la selenocisteína se liga rápidamente a una proteína de transporte en el hígado la selenoproteína P y entonces es enviada al plasma (Davidson and Kennedy, 1993). El selenio inorgánico en formas de selenito o selenato son reducidos a selenido (-SeH) antes de ser incorporados a la selenoproteína P, así el selenio puede ser tomado e incluido en muchas de las selenoproteínas funcionales en

los tejidos (Kaneko et al., 2008; Suttle., 2010). La selenometionina se metaboliza de igual forma sea administrada vía oral o parenteral, luego de pasar por el hígado su depuración en la sangre es muy lenta (vida media en el plasma de 12 días), siendo su mayor parte retenida en el músculo (White et al., 1988). Por el contrario el metabolismo de la selenocisteína y selenio inorgánico es rápido. La selenocisteína se incorpora a la glutatión-peroxidasa 1 en el eritrocito durante la eritropoyesis y la selenometionina puede ingresar al eritrocito como metionina formando parte de la hemoglobina (Beilstein and Whanger, 1986). El hígado procesa todas las formas de selenio del flujo sanguíneo; mientras que los riñones presentan las más altas concentraciones de selenio (tres a seis veces) en comparación con el músculo, siendo menos afectado por las fuentes de selenio (Suttle, 2010). En cuanto a la excreción de selenio se da principalmente a través de la orina dependiendo de un umbral renal, la eliminación a través de la respiración y las heces es importante dependiendo de la especie (Kaneko et al., 2008). Esta última vía de eliminación de selenio es importante en los rumiantes, así en la oveja la secreción biliar de selenio puede llegar al 28% de la ingesta, aunque la mayoría se reabsorbe, el resto contribuye a la eliminación fecal (Langlands et al., 1986).

1.9. Yodo (I)

1.9.1. Funciones y signos de deficiencias

El rol primario del yodo es la síntesis de hormonas por la glándula tiroides, que regulan la energía del metabolismo, la termorregulación, la reproducción, el desarrollo y crecimiento, la circulación y función muscular (Herdt and Hoff, 2011). Las deficiencias de yodo pueden ocurrir en rumiantes en regiones endémicas con suelos deficientes en yodo, por una alimentación con sal no yodada y alimentos que contengan bociógenos (MacDowell, 1992). Los bociógenos impiden la captación de yodo por la glándula tiroides o inhiben a la tiroperoxidasa. Los bociógenos más reseñables son los tiocianatos del trébol blanco y glucosinolatos en semillas de *Brassica* y forrajes como la col, nabos y semillas de canola (Teipathi and Mishra, 2007).

1.9.2. Metabolismo

El yodo se absorbe muy eficientemente desde el tracto digestivo y en los rumiantes se recicla a través del abomaso. El yodo absorbido se transporta al torrente sanguíneo unido libremente a las proteínas plasmáticas. El yodo es captado por la tiroides para su función y una pequeña proporción circula libre en forma iónica y se acumula en tejidos blandos como el músculo y el hígado. El exceso de yodo en la dieta se excreta predominantemente a través de la orina como yoduro, y en los animales lactantes a través de la leche (Suttle, 2010). En la leche se secretan cantidades significativas de

yodo (Rey-Crespo et al., 2013). Hay una clara relación entre el yodo ingerido y el yodo excretado en la leche (Rey-Crespo et al., 2014; López-Alonso et al., 2016).

1.10. Zinc (Zn)

1.10.1. Funciones y signos de deficiencias

Es el elemento traza más abundante a nivel intracelular, forma parte de muchas enzimas y actúa como catalizador, por lo que regula varias funciones en el organismo, además es muy importante en la división celular e interpretación del código genético (Cousins, 2006). Esto es crucial en el sistema inmune por la alta rotación, ritmo de proliferación, diferenciación y apoptosis celular, donde el zinc está involucrado en todos estos procesos (Haase et al., 2006). Otro rol que cumple el zinc es la integridad estructural de los tejidos, por este motivo en el ganado de leche el zinc es esencial en la producción de queratina, la cual cumple un papel importante en el mecanismo de defensa contra patógenos de la glándula mamaria (Andrieu, 2008). Así las deficiencias de zinc en los bovinos se manifiestan con alteraciones dermatológicas como la paraqueratosis cutánea, pérdida del apetito, disminución del crecimiento, caída de la producción láctea, cojeras e inmunosupresión.

1.10.2. Metabolismo

Su absorción ocurre principalmente en el duodeno (Davies, 1980). En los bovinos se absorbe cerca de una tercera parte desde el abomaso. En el intestino se desplaza a través del borde en cepillo de sus células mediante portadores en un mecanismo de transporte activo, que domina la absorción de zinc en ingestas bajas o normales pero la difusión pasiva es más importante en ingestas altas (Kaneko et al., 2008). Una vez absorbido en el intestino pasa a la circulación portal, donde se une libremente con la albúmina plasmática representando las dos terceras partes del zinc plasmático, también está presente en el plasma como una α -2 macroglobulina y como trazas de metalotioneinas. En el hígado el zinc induce la síntesis de metalotioneinas hepáticas que juegan un papel muy importante en la eliminación del zinc del plasma portal (Bremner, 1993; Lee et al., 1994). Cuando el zinc se une a la albúmina luego de pasar por el hígado es captado por endocitosis por células y tejidos (Rowe and Bobilya, 2000). La excreción de zinc ocurre predominantemente a través de las secreciones pancreáticas y las heces, con poco zinc eliminado en la orina (Schryver et al., 1980). El zinc presenta un mecanismo homeostático muy potente y su acumulación está muy relacionada con su absorción (Suttle, 2010).

1.11. Muestras a analizar

Son varios los tipos de muestras que podemos analizar para obtener el estatus de los elementos traza en el ganado vacuno, aquí nos centraremos en la evaluación desde el punto de vista del estado nutricional, siempre tomando en cuenta que es un problema

del rebaño. También se puede realizar mediciones del estado funcional midiendo enzimas de las cuales forman parte estos elementos, como es el caso de la superóxido dismutasa con el cobre, glutatión peroxidasa para el selenio; y hormonas en el caso del yodo con las hormonas tiroideas.

- **Sangre**, la sangre entera, suero y plasma son ampliamente utilizados como muestras para estudios del estatus de los elementos traza en los animales, debido a las facilidades que presta en su obtención, costos y análisis. La mayoría de las veces los análisis se suelen hacer en suero porque no ocasiona complicaciones analíticas por el uso de anticoagulante, además es más estable para el transporte ya que se presentan menos complicaciones asociadas a la hemólisis. Los resultados de plasma y suero se asumen como los mismos, pero, para algunos elementos como el cobre, se sabe que el suero tiene menos cobre que el plasma debido a la retención parcial de cobre en el coágulo (Laven and Livesey, 2006). Para el resto de los elementos no hay estudios concluyentes. Siempre se debe evitar la hemólisis porque podría elevar falsamente las concentraciones de selenio, cobre, hierro, manganeso y zinc. Además no debe demorarse mucho tiempo entre la toma de la muestra y el desuerado y preparación para el análisis, ya que igualmente se corre el riesgo de hemólisis, lo que puede elevar falsamente la concentración de selenio desde los eritrocitos por difusión hacia el suero o plasma, ya que los glóbulos rojos contienen glutatión peroxidasa. Y por último, se deben evitar tubos con tapones de goma que contengan zinc, que podrían ocasionar un falso aumento de zinc en el suero o plasma.

Los niveles de elementos traza en suero o plasma generalmente reflejan el nivel de mineral de “transporte” del órgano de reserva hacia su función fisiológica, y aunque los rangos en sangre son muy estrechos, niveles bajos indican el “comienzo” de la fase de deficiencia.

- **Leche**, es una buena muestra para conocer el estatus de los minerales traza en los animales y de la granja, sobre todo para aquellos elementos que tiene un control homeostático renal y que se sabe que hay una relación directa entre los niveles en dieta y lo que se eliminan en leche, como selenio, yodo y cobalto (Green and Cook, 2010; López-Alonso et al., 2016). La leche de tanque puede dar una idea del estatus mineral de todo el rebaño. Es muy fácil de muestrear. A nivel de laboratorio hay que someterla a una digestión ácida en un sistema de microondas, para las determinaciones de todos los elementos traza esenciales excepto para el yodo con el que se debe realizar una digestión alcalina (Rey-Crespo et al., 2013; López-Alonso et al., 2016; Rodríguez-Bermúdez et al., 2018). Al igual que la sangre es un método, rápido, fácil y no invasivo sin necesidad de mucho manejo de los animales y la resistencia por parte de los propietarios de las granjas para el muestreo.

- **Hígado**, es una excelente muestra para conocer el estado de los minerales traza, en especial de cobre, hierro, selenio y cobalto. Como se explicó anteriormente a través del hígado se metabolizan muchos oligoelementos y también actúa como órgano de reserva, para el cobre y selenio, proporcionando una información más precisa del estado nutricional del rebaño. Las muestras de hígado se pueden obtener de animales que van al matadero, al realizar una necropsia o cirugías y mediante biopsias, estas últimas tienen rechazo por parte de los propietarios por las complicaciones que se podrían suscitar, además de que con la aguja fina, es muy pequeña la muestra obtenida para su análisis, sin proporcionar la cantidad necesaria, sin embargo sería importante el realizarlas (Miranda et al., 2010). Se debe tener precaución cuando los hígados tienen una alta concentración de grasa ya que se incrementa la proporción de materia seca y disminuye la concentración de minerales, debido a que estos no se distribuyen en la porción grasa de las células (Herdt and Hoff, 2011).

1.11.1. Número de muestras

La evaluación del estatus de los elementos traza debe realizarse a nivel de rebaño, para reducir la influencia del azar y de las variaciones individuales. Para esto se realiza el análisis del estado nutricional y/o funcional del rebaño y los animales sanos deben ser muestreados. El número de animales a muestrear depende de la prevalencia de la deficiencia y debe seleccionarse un grupo homogéneo y representativo: 10-15% de la población en estudio. De acuerdo con diferentes autores, este número fluctúa entre 7 y 15 animales (Herdt and Hoff, 2011; Rollin and Guyot, 2013). Los análisis de elementos traza siempre conviene hacerlos por grupo para que resulten económicamente viables, lo ideal es un grupo homogéneo de la población de estudio, alrededor de 15 animales. Se debe prestar atención a la interpretación de los resultados y si hay valores atípicos (grupo heterogéneo) en la población muestreada. En general, si el grupo es homogéneo, se aplica la regla de “todo-nada”, ya que la mayor parte de los animales muestreados (>70%) o son deficientes o están bien (Guyot et al., 2009).

1.11.2. Niveles de referencia

En la **tabla 1**, se presentan los rangos de los principales elementos traza en suero, hígado y leche. Los rangos se definen como deficientes y adecuados, que a su vez se clasifican en leve, moderado o marginal (Puls, 1994; Herdt and Hoff, 2011). Se debe indicar que los valores obtenidos por Puls (1994), fueron analizados mediante técnicas de absorción atómica. Estas técnicas son más antiguas que las técnicas multielementales como a la espectrometría de emisión y/o de masas con fuente de

plasma acoplado, que son las actualmente utilizadas. Los valores de referencia de Herdt and Hoff (2011) son realizados por la técnica de espectrometría de emisión y/o de masas. Debe tomarse en cuenta que si comparamos los valores de referencia para los elementos que están en un menor rango de concentración ($\mu\text{g/L}$: Co, Mn, Mo y Se) son más bajos cuando se analizan por técnicas más actuales (**Tabla 2**) Herdt and Hoff, (2011) si lo comparamos con los valores de Puls (1994) (**Tabla 1**).

Es importante tener en cuenta que los puntos de corte o rangos diagnósticos descritos en la bibliografía muchas veces pueden ser confusos. Debido principalmente a que los rangos son muy estrechos y a veces son muy difíciles de interpretar por la gran variabilidad analítica, si bien hoy en día la mayoría de los análisis se hacen por espectrometría, con nuevos rangos de referencia (Herdt and Hoff, 2011). Además hay factores a tomar en cuenta que pueden variar los resultados de los análisis como anteriormente señalamos, la hemólisis es una gran fuente de variación ya que aumenta artificialmente las concentraciones plasmáticas de cobre, zinc, hierro, manganeso y selenio. La inflamación y las enfermedades incrementan la concentración plasmática de cobre, ya que la proteína inflamatoria ceruloplasmina, que contiene cobre, aumenta en caso de inflamación. También conduce a una disminución de la concentración plasmática de zinc y afecta al metabolismo del selenio y de las hormonas del tiroides.

Los factores fisiológicos, como la gestación, el momento de la lactación, la edad (terneros frente a madres), también pueden influir en los niveles en sangre de elementos traza. Así por ejemplo, el alto nivel de cobre en el suero al inicio de la lactación puede ser explicado, por un aumento en la síntesis de ceruloplasmina que depende de los niveles de estrógenos los cuales aumentan al final de la preñez (Yokus et al., 2004). Por la administración de algunos fármacos como por ejemplo las concentraciones de yodo, tanto en plasma, suero como en leche, pueden estar falsamente aumentadas por el baño de los pezones con yodóforos (Rey-Crespo et al., 2013) y por la aplicación parenteral de algunos antihelmínticos (closantel, nitroxynil).

En la **Tabla 2** se presentan los valores de referencia de Herdt and Hoff (2011) quienes utilizaron la espectrometría de masas con fuente de plasma acoplada (ICP-MS) para el análisis de todos los tipos de muestras. La técnica ICP-MS es muy sensible por lo que mejora los análisis, sobre todo de aquellos elementos que están a bajas o muy bajas concentraciones en suero, como lo son el cromo, cobalto, manganeso, molibdeno, yodo o selenio y los considerados tóxicos. Además es una técnica para análisis multielemental, que permite el análisis conjunto de todos los elementos en una única muestra.

Tabla 1. Valores de referencia de elementos traza en suero, hígado (peso húmedo) y leche (tomados de Puls, 1994).

	Co (µg/L)	Cu (mg/L)	Fe (mg/L)	I (µg/L)	Mn (µg/L)	Mo (µg/L)	Se (µg/L)	Zn (mg/L)
Suero								
Adecuado	0.9-15	0.6-1.5	1.3-2.5	100-400	6-70	10-100	80-300	0.8-1.4
Marginal		0.5-1.2					30-60	0.5-0.6
Deficiencia		0.2-1	0.15-1.3	10-50	5		2-25	0.2-0.4
Alto		2.5-4	4-6	700		80-1000	2500-3500	1.3-16
Tóxico		4-11	18-25				3500-4100	3-15
Leche								
Adecuado	40-1100	0.05-0.6	0.2-0.63	30-300	20-70	18-120	30-50	2.3-4
Marginal		0.02-0.05					11-18	
Deficiencia		0.01-0.02		3-25			2-5	0.5
Hígado								
	Co (µg/Kg)	Cu (mg/Kg)	Fe (mg/Kg)	I (µg/Kg)	Mn (µg/Kg)	Mo (µg/Kg)	Se (µg/Kg)	Zn (mg/Kg)
Adecuado	20-85	25-100	45-300	94-200	2500	140-1400	250-500	25-100
Marginal	5-17	5-25			1500		120-250	25-40
Deficiencia	<5	0.5-10	<30	<94	<1000		20-170	<20-40
Alto		200-550	53-700	>781	45017	2000	750	300
Tóxico		250-800	8923			2000		

Para convertir de gramos a moles: ppm (mg/L o µg/mL)/moles (peso molecular)= mmol/L. Para convertir en µmol/L multiplicar por: 0,017 (Co); 15,74 (Cu); 7,88 (I); 0,018 (Mn); 0,010 (Mo); 0,013 (Se); 15,30 (Zn).

Tabla 2. Valores de referencia de elementos traza en suero e hígado (peso seco) (tomados de Herdt and Hoff, 2011). Analizados por la técnica ICP-MS.

	Co (µg/L)	Cu (mg/L)	Fe mg/L	Mn (µg/L)	Mo (µg/L)	Se (µg/L)	Zn (mg/L)
Suero	0.17-2	0.6-1.1	1.1-2.5	0.9-6.0	2.0-35	65-140	0.6-1.9
Sangre						120-300	
	Co (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)	Fe (mg/Kg)	Mn (mg/Kg)	Mo (mg/Kg)	Se (mg/Kg)	Zn (mg/Kg)
Hígado*	0.10-0.4	50-600	140-1000	5-15	1-4	0.7-2.5	90-400

% materia seca en hígado 27.5% (Miranda *et al.*, 2010): Para convertir de peso seco a peso húmedo multiplicar por 0.275, y viceversa.

2. MÉTODOS ANALÍTICOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PARA ICP-MS

Las concentraciones de elementos traza o microelementos se pueden determinar en cualquier tipo de muestras, tanto biológicas como no biológicas. Centrándonos en el análisis de muestras de origen animal las principales muestras serían sangre (entera, suero, plasma), vísceras (hígado, riñón, músculo, cerebro..., etc.), leche, pelo, orina, heces, saliva,.. etc.; así como los componentes de la ración y de la dieta, o del ambiente que los rodea. Para proceder a su análisis, las muestras deben ser preparadas, por diferentes métodos, según la naturaleza de las mismas para el análisis por la técnica de espectrometría con fuente de plasma acoplado (ICP-MS). El método que se escoja debe evitar la interferencia de la matriz y el taponamiento del equipo, además debería ser sencillo y rápido a la vez.

La técnica de ICP-MS permite realizar una determinación simultánea de varios elementos traza y ultratrazas con bajos límites de detección 0.01-0.1 µg/L en una misma muestra. La fuente de plasma acoplada (ICP) esencialmente lo que hace es ionizar el argón a altas temperaturas, que descompone, atomiza y ioniza la muestra; de esta manera sirve como una fuente de iones para el espectrómetro de masas (MS). Para esto la muestra en solución primeramente es transformada en aerosol, pasa por la cámara de pulverización donde las gotas gruesas son eliminadas hacia afuera y entonces es inyectada en el corazón del ICP en la que se mueve como una fina

muestra en aerosol en el centro del plasma. Parte de los iones así generados son extraídos por una interfaz bombeándolos diferenciadamente dentro del espectrómetro de masas donde son separados y analizados de acuerdo a su relación masa/carga (Beauchemin, 1991). De esta manera son identificados los elementos o microelementos y determinadas sus concentraciones en la muestra para finalmente ser cuantificadas mediante un software. Además de las muestras se preparan blancos analíticos, estándares internos, externos y muestras enriquecidas con material certificado de referencia para un adecuado control de calidad del procedimiento.

2.1. Preparación de muestras de sangre entera y suero

Una vez obtenidas las muestras de sangre entera y/o suero, para su preparación lo primero es preparar los tubos que serán utilizados en el procedimiento. Para esto se usan tubos de polipropileno que son lavados con ácido nítrico al 10 % por un tiempo no menor de 2 horas luego enjuagados 7 veces con agua desionizada y por último secados, los mismos deben analizarse que se encuentren libres de elementos traza (Lu et al., 2015). En la literatura existen diferentes protocolos de preparación de las muestras de sangre entera, plasma y suero por digestión o dilución previas a ser analizadas en el ICP-MS, al final se detallan varios de ellos.

Los procesos de digestión ácida en microondas consumen más tiempo, son más caros y complejos comparados con las diluciones que son más simples de realizar. Una de las más usadas es el método de dilución alcalina que minimiza la interferencia producida por la matriz. Pero no evita completamente la obstrucción del nebulizador, del inyector de la llama o de la interfaz de muestreo en las mediciones a través de ICP-MS, lo que puede reducir la precisión de las determinaciones (Lu et al., 2015), especialmente cuando se analizan muchas muestras con bajas concentraciones de elementos traza. Para prevenir estos problemas se puede utilizar la digestión ácida de muestras en sistemas cerrados de microondas (Barany et al., 1997) pero es un proceso algo más complicado como ya mencionamos anteriormente. A continuación detallamos algunos de los métodos más utilizados.

- Sangre homogenizada con un mezclador Vortex, luego se diluye con Triton (t-octylphenoxy polyethoxy ethanol) en medio ácido (ácido nítrico) y se realiza la lectura de la muestra directamente (Kira et al., 2014).
- Sangre diluida 10 veces en una solución de amonio 25 % Triton X-100 y sal disódica dihidratada de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en agua Millipore (Barany et al., 1997).
- Plasma 0.3 mL diluido con ácido nítrico 0.65 % (w/v) en un volumen de 2.7 mL, en el caso de sangre entera se mezcla 0.4 mL con 3.5 mL de ácido nítrico

0.65 % (w/v) con Triton al 0.1 % y se centrifuga luego de la hemólisis (Goullé et al., 2005).

- Digestión ácida de 1 mL de sangre, se añade 2 mL de ácido nítrico 67-69 %, la mezcla se deja en recipientes cerrados bajo una cubierta durante toda la noche para lograr una pre digestión. Al día siguiente se añaden a las muestras 1 mL de peróxido de hidrógeno dejándoles durante 3 horas a 60^oC y por último las soluciones digeridas se transfieren a tubos de polipropileno Falcon de 15 mL hasta alcanzar un volumen de 10 mL con agua ultra pura desionizada y se almacenan a 20^oC y se analizan (D'Ilio et al., 2010).
- Digestión ácida en microondas: se usan 0.5 mL de sangre o suero que se mezclan con 2 mL de ácido nítrico concentrado y se añaden 3 mL de agua desionizada para luego ser digerida a 250 ^oC y 40 bar durante 30 minutos (Lu et al., 2015).
- Método de dilución alcalina 0.2 mL de sangre o suero se diluyen 1:25 con una solución alcalina compuesta de 2% (w/v) 1-butanol, 0.05% (w/v) EDTA, 0,05 (w/v) triton X-100, 1% (w/v) NH₄OH. Esta mezcla es sonicada durante 5 minutos y centrifugada a 1000 rpm antes del análisis en el ICP-MS (Lu et al., 2015).

Como se ve en los protocolos anteriores se realizan digestiones en medios ácidos a temperatura ambiente, aumentando la temperatura, en sistemas de digestión por microondas o simplemente se diluyen las muestras. También diluciones en medios alcalinos. En los mismos se utilizan compuestos como el EDTA, Triton y el NH₄OH que dan una estabilidad temporal de al menos 48 horas a la solución diluida de sangre a un pH de 8,5 para prevenir cualquier precipitación de la muestra (Subramanian, 1996). El ácido nítrico, mezclado con peróxido de hidrógeno o en el microondas actúa produciendo una fuerte oxidación que permite la liberación del total de los elementos de la matriz orgánica de la muestra (Burguera and Burguera, 2009). El ácido nítrico produce pocas interferencias poliatómicas en comparación con el ácido perclórico o sulfúrico. Por otro lado, el agua desionizada es utilizada para diluir de una forma correcta los residuos de la digestión antes de su análisis (Subramanian, 1996).

El suero, obtenido por centrifugación de la sangre sin anticoagulante es la muestra más utilizada para métodos analíticos ya que es fácil de obtener y evita las complicaciones que se podrían producir por el uso de anticoagulantes. Y como señalábamos anteriormente reflejan el estatus mineral de las reservas de transporte de cada elemento (Herdt and Hoff, 2011).

2.2. Diferencias entre suero y plasma

Como señalábamos anteriormente, en principio los niveles de elementos traza se asume que son iguales en el suero y en el plasma. No obstante, para algunos elementos como el cobre, en los rumiantes se sabe que el suero tiene menos cobre que el plasma debido a la retención parcial de cobre en el coágulo (Laven and Livesey, 2006). La principal diferencia entre el suero y el plasma es que en el suero el fibrinógeno y los factores de coagulación se consumen, aunque se sabe que otras muchas proteínas, agua, sales y células sanguíneas se encuentran atrapadas en el coagulo. Desde el punto de vista del análisis de oligoelementos, el suero y el plasma muestran diferentes matrices y composiciones, ya que algunos elementos unidos a las proteínas pueden quedar secuestrados en el coágulo. Es posible que este proceso de retención en el coagulo también puede afectar a otros minerales, no obstante la información de la que se dispone es escasa; y de ahí que lo hayamos planteado en este estudio.

3. EL HÍGADO COMO ÓRGANO DIANA EN EL METABOLISMO DE LOS ELEMENTOS TRAZA

El hígado es un órgano que cumple múltiples funciones en el organismo de los mamíferos tanto de síntesis, como de catabolismo, excreción y reserva de muchas sustancias químicas necesarias para el normal funcionamiento del resto de tejidos. Esto se logra gracias a su ubicación en la parte craneal del abdomen (con sus 5 lóbulos derecho, izquierdo, caudado, cuadrado y proceso papilar en el bovino) en medio de otras vísceras abdominales, lo que hace que se encuentre entre el sistema vascular de estas vísceras y el sistema vascular sistémico, la sangre aferente llega al hígado por la arteria hepática y también de la vena porta que drena la sangre del intestino delgado, parte final del intestino grueso, el páncreas, bazo y estómago (Kaneko et al, 2008); lo que lo convierte en un órgano fundamental en el metabolismo de la nutrición y dentro de este en la de los macro y microminerales. Su sangre eferente es drenada hacia la vena cava caudal del sistema circulatorio sistémico. La sangre de la vena porta forma un sistema capilar porta venoso con la vena hepática, pasando por los lobulillos hepáticos (unidad anatómica del hígado) constituidos por los hepatocitos, células secretoras de la bilis por donde se eliminan entre otros compuestos, algunos elementos traza, y de esta forma es una de las vías de regulación de su concentración en el organismo animal.

El hígado mediante la síntesis de compuestos como las metaloenzimas, que en su estructura química están conformadas por átomos de elementos traza y que además

se pueden acumular en el hígado, como por ejemplo es el caso de la ceruloplasmina que contiene cobre. En resumen el hígado mediante sus funciones de síntesis, almacenamiento y excreción biliar es fundamental en el metabolismo de los elementos traza (Suttle, 2010).

3.1. Importancia del punto de muestreo

Como se puede ver el hígado es un lugar donde se metabolizan y/o almacenan la mayoría de los elementos traza, pero esto no se realiza de forma homogénea a lo largo de todo el órgano (Miranda et al., 2010), de ahí la importancia del lugar de donde se obtenga la muestra o biopsia para su posterior análisis.

En un estudio realizado en ganado vacuno por Braselton et al. (1997) donde se tomaron muestras de los diferentes lóbulos hepáticos y se compararon los resultados de las concentraciones obtenidas mediante análisis multielemental por ICP-AES de los principales elementos traza (Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, P, Zn, Cd, Na, Ni, V, S y K), se observó que para el cobre, existían diferencias entre los lóbulos, siendo el lóbulo caudado y el proceso papilar los que contenían la mayor concentración de cobre. En cuanto al lóbulo derecho, que es de donde se toman usualmente las biopsias, no presentó ninguna diferencia con los otros lóbulos en ningún elemento estudiado, excepto para el sodio. Otro artículo sobre la distribución del cobre en los hígados de terneros observaron que la distribución del cobre en el hígado no era homogénea, con mayores concentraciones en el lóbulo izquierdo y las menores en los lóbulos caudado y cuadrado (Miranda et al., 2010). Este comportamiento en la acumulación del cobre cuando se administran altas cantidades, se daría por la proximidad de cada lóbulo hepático a los vasos sanguíneos centrales en este caso el lóbulo caudado es el más cercano en comparación al lóbulo izquierdo, lo que proveería de mayor perfusión sanguínea para que el cobre se incorpore a las metaloenzimas y se elimine a través de la bilis (Gooneratne et al., 2005). Este comportamiento en la concentración del cobre hepático varía del observado por Braselton et al. (1997), con dosis bajas de cobre en la dieta, lo que indica que la acumulación hepática de cobre varía de acuerdo a la cantidad de cobre acumulada en el hígado. También influiría la aptitud racial, ya sea para síntesis en las razas de carne y de secreción en las razas para producción lechera. En un estudio reciente observaron que las concentraciones de todos los elementos traza (a excepción del cobre) era la adecuada en sangre, órganos internos (hígado, riñón, bazo, cerebro) y músculo para los grupos de terneros de raza de leche (Holstein-Friesian), razas de carne (Rubia Gallega) y el grupo de terneros cruzados entre las dos razas. La excepción fue el cobre que se encontró en concentraciones por encima de los niveles adecuados en el hígado, particularmente en los terneros

Holstein-Friesian, lo que se explicaría por la alta actividad hepática y baja masa muscular en las razas lecheras (Pereira et al., 2018).

En humanos también se han encontrado diferencias en las concentraciones de elementos traza en los lóbulos hepáticos. Faa et al. (1987) observaron al analizar treinta hígados de recién nacidos, que la mayoría mostraron una mayor concentración de cobre comparándolos con las concentraciones en el hígado de un adulto normal, además el cobre en el hígado no presentaba distribución homogénea a lo largo del órgano. Había una tendencia constante a que el cobre se acumulara en el lóbulo izquierdo más que en el derecho. Los estudios histoquímicos demostraron que cuando el cobre estaba en bajas concentraciones se acumulaba en los hepatocitos periportales y cuando se encontraba en altas concentraciones también lo acumulaban los hepatocitos intralobulares. Liggi et al. (2013) también observaron una distribución heterogénea del cobre en hígado en humanos con enfermedad de Wilson que acumulan altas concentraciones de cobre en el hígado y otros órganos. Las biopsias hepáticas de estos pacientes pusieron de manifiesto que la acumulación hepática de cobre variaba a lo largo del hígado independientemente de los niveles de fibrosis y fenotipos de la enfermedad. A diferencia del cobre, los niveles de zinc eran homogéneos a lo largo del hígado (Coni et al., 1996). Por último a la necropsia de humanos enfermos de beta-talasemia (trastorno hematológico hereditario que reduce la producción de glóbulos rojos) se realizaron cortes histológicos de hígado de los lóbulos derecho e izquierdo coloreándose con tinción de Perls para la detección histoquímica del hierro, concluyendo que el hierro y el fósforo se distribuyen de manera desigual en los enfermos de beta-talasemia, incluso en la etapas previas a la cirrosis (Ambu et al., 1995).

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambu, R., G. Crisponi, R. Sciot, P. Van Eyken, G. Parodo, S. Ianneli, F. Marongiu, R. Silvagni, V. Nurchi, V. Costa, G. Faa, and V.J. Desmet. 1995. Uneven hepatic iron and phosphorus distribution in beta-thalassaemia. *J. Hepatol.* 23:544-549. doi:10.1016/0168-8278(95)80060-3.
- Andrieu, S. 2008. Is there a role for organic trace element supplements in transition cow health?. *Vet. J.* 176:77-83. doi:10.1016/j.tvjl.2007.12.022.
- Arredondo, M., and M.T. Núñez. 2005. Iron and copper metabolism. *Mol. Aspects Med.* 26:313-327. doi:10.1016/j.mam.2005.07.010.
- Barany, E., I.A. Bergdahl, A. Schutz, S. Skerfving, and A. Oskarsson. 1997. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Direct Multi-element Analysis of Diluted Human Blood and Serum. *J. Anal. At. Spectrom.* 12:1005-1009. doi:10.1039/A700904F.

- Beauchemin, D. 1991. Inductively coupled plasma mass spectrometry in hyphenation: a multielemental analysis technique with almost unlimited potential. *Trends Anal. Chem.* 10:71–76. doi:10.1016/0165-9936(91)80031-M.
- Beilstein, M.A., and P.D. Whanger. 1986. Chemical Forms of Selenium in Rat Tissues after Administration of Selenite or Selenomethionine. *J. Nutr.* 116:1711–1719. doi:10.1093/jn/116.9.1711.
- Bishara, H.N. and Bray, A.. 1978. Competition between molybdate and sulfate for renal tubular reabsorption in shee. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 12:123.
- Blakistone, B.A., L.W. Aurand, and H.E. Swaisgood. 1986. Association of Sulfhydryl Oxidase and Xanthine Oxidase in Bovine Mammary Tissue. *J. Dairy Sci.* 69:2803–2809. doi:10.3168/jds.S0022-0302(86)80733-0.
- Braselton, W.E., K.J. Stuart, T.P. Mullaney, and T.H. Herdt. 1997. Biopsy mineral analysis by inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy with ultrasonic nebulization. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 9:395–400. doi:10.1177/104063879700900409.
- Bremner, I. 1993a. Metallothionein in copper deficiency and copper toxicity. Pages 505–515 in In: Anke, M., Meissner, D. and Mills, C.F. (eds) *Proceedings of the Eighth International Symposium on Trace Elements in Man and Animals*. Verlag Media Touristik, Gersdorf, Germany.
- Bremner, I. 1993b. Metallothionein in copper deficiency and toxicity. Pages 507–515 in *Proceedings of the Eighth International Symposium on Trace Elements in Man and Animals*, Gersdorf, Germany.
- Brondino, C.D., M.J. Romão, I. Moura, and J.J. Moura. 2006. Molybdenum and tungsten enzymes: the xanthine oxidase family. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10:109–114. doi:10.1016/j.cbpa.2006.01.034.
- Burguera, J.L., and M. Burguera. 2009. Recent on-line processing procedures for biological samples for determination of trace elements by atomic spectrometric methods. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 64:451–458. doi:10.1016/j.sab.2009.01.004.
- Cardin, C. and M.J. 1975. Sulphate transport dy rat ileum effect of molybdate and other anions.. *Biochem. Biophys. Acta* 394:46–54.
- Coni, P., A. Ravarino, A.M.G. Farci, F. Callea, P. Van Eyken, R. Sciot, R. Ambu, A. Marras, V. Costa, G. Faa, and V.J. Desmet. 1996. Zinc content and distribution in the newborn liver. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 23:125–129. doi:10.1097/00005176-199608000-00005.
- Cook, J.G., and M.J. Green. 2010. Milk production in early lactation in a dairy herd following supplementation with iodine, selenium and cobalt. *Vet. Rec.* 167:788–789. doi:10.1136/vr.c5648.
- Cousins RJ. 2006. Zinc. 9 th. editors In: Bowman BA, Russell RM, ed. *International Life Sciences Institute*, Washington, DC.
- D’Ilio, S., C. Majorani, F. Petrucci, N. Violante, and O. Senofonte. 2010. Method validation for the quantification of As, Cd, Hg and Pb in blood by ICP-MS for monitoring purposes. *Anal. Methods*. doi:10.1039/c0ay00429d.
- Davidson, W.B., and D.G. Kennedy. 1993. Synthesis of [75Se]Selenoproteins Is Greater in Selenium-Deficient Sheep. *J. Nutr.* 123:689–694. doi:10.1093/jn/123.4.689.

- Davidsson, L., B. Lonnerdal, B. Sandstrom, C. Kunz, and C.L. Keen. 1989. Identification of transferrin as the major plasma carrier protein for manganese introduced orally or intravenously or after in vitro addition in the rat. *J. Nutr.* 119:1461–1464. doi:10.1093/jn/119.10.1461.
- Davies, N.T. 1980. Studies on the absorption of zinc by rat intestine. *Br. J. Nutr.* 43:189. doi:10.1079/BJN19800078.
- Faa, G., C. Liguori, A. Columbano, and G. Diaz. 1987. Uneven copper distribution in the human newborn liver. *Hepatology* 7:838–842. doi:10.1002/hep.1840070508.
- Failla, M.L. 1999. Considerations for determining 'optimal nutrition' for copper, zinc, manganese and molybdenum. *Proc. Nutr. Soc.* 58:497–505. doi:10.1017/S0029665199000646.
- Feng, W. 2007. *The Transport of Cr (III): Implications for Function*. J.B. (ed. . Vincent, ed. Elsevier, Amsterdam.
- Ferguson, W.S., A.H. Lewis, and S.J. Watson. 1943. The teart pastures of Somerset: I. The cause and cure of teartness. *J. Agric. Sci.* 33:44. doi:10.1017/S002185960004836X.
- Gooneratne, S.R., B. Laarveld, R.K. Chaplin, and D.A. Christensen. 2005. Profiles of Cu in blood, bile, urine and faeces from Cu-primed lambs: effect of Mo-labelled tetrathiomolybdate on the metabolism of Cu after long-term storage. *Br. J. Nutr.* 61:373. doi:10.1079/bjn19890124.
- Goullé, J.P., L. Mahieu, J. Castermant, N. Neveu, L. Bonneau, G. Lainé, D. Bouige, and C. Lacroix. 2005. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair: Reference values. Page in *Forensic Science International*.
- Graham, T.W. 1991. Trace Element Deficiencies in Cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 7:153–215. doi:10.1016/S0749-0720(15)30816-1.
- Guyot, H., C. Saegerman, P. Lebreton, C. Sandersen, and F. Rollin. 2009a. Epidemiology of trace elements deficiencies in Belgian beef and dairy cattle herds. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 23:116–123. doi:10.1016/J.JTEMB.2009.02.006.
- Guyot, H., C. Saegerman, P. Lebreton, C. Sandersen, and F. Rollin. 2009b. Epidemiology of trace elements deficiencies in Belgian beef and dairy cattle herds. *J. trace Elem. Med. Biol.* 23:116–123.
- Haase, H., E. Mocchegiani, and L. Rink. 2006. Correlation between zinc status and immune function in the elderly. *Biogerontology* 7:421–428. doi:10.1007/s10522-006-9057-3.
- Hellsten-Westing, Y., A. Sollevi, and B. Sjodin. 1991. Plasma accumulation of hypoxanthine, uric acid and creatine kinase following exhausting runs of differing durations in man. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 62:380–384. doi:10.1007/BF00634977.
- Herdt, T.H., and B. Hoff. 2011. The Use of Blood Analysis to Evaluate Trace Mineral Status in Ruminant Livestock. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* doi:10.1016/j.cvfa.2011.02.004.
- Hill, H.C., and M. Gennard. 1970. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. *Fed. Proc.* 4:1481.
- Jenkins, K.J., and J.K.G. Kramer. 1988. Effect of Excess Dietary Iron on Lipid Composition of Calf Liver, Heart, and Skeletal Muscle. *J. Dairy Sci.* 71:435–441. doi:10.3168/jds.S0022-0302(88)79573-9.
- Johnson, J. 1997. *Molybdenum*. Marcel Dekker, New York.

- Johnson, M.A. 1990. Iron: Nutrition Monitoring and Nutrition Status Assessment. *J. Nutr.* 120:1486–1491. doi:10.1093/jn/120.suppl_11.1486.
- Kafilzadeh, F., H.K. Shabankareh, and M.R. Targhibi. 2012. Effect of chromium supplementation on productive and reproductive performances and some metabolic parameters in late gestation and early lactation of dairy cows. *Biol. Trace Elem. Res.* 149:42–49. doi:10.1007/s12011-012-9390-0.
- Kaneko, J.J., J.W. Harvey, and M.L. Bruss. 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6 ed. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.X0001-3>
- Kawashima, T., P.R. Henry, C.B. Ammerman, R.C. Littell, and J. Price. 1997. Bioavailability of cobalt sources for ruminants. 2. Estimation of the relative value of reagent grade and feed grade cobalt sources from tissue cobalt accumulation and vitamin B12 concentrations. *Nutr. Res.* 17:957–974. doi:10.1016/S0271-5317(97)00061-4.
- Keen CL, Ensunsa JL, C.M. 2000. Manganese metabolism in animals and humans including the toxicity of manganese. *Met Ions Biol Syst* 37:89–121.
- Kent, G. and Bahu, R.. 1979. Iron overload. Churchill Livingstone, ed. Edinburgh.
- Kim, C.H., B.K. Park, J.G. Park, H.S. Kim, K.I. Sung, J.S. Shin, and S.J. Ohh. 2010. Estimation of Rumen By-pass Rate of Chromium-methionine Chelates by Ruminant Bacteria Analysis. *J. Anim. Sci. Technol.* 47:759–768. doi:10.5187/jast.2005.47.5.759.
- Kincaid, R.L. 1980. Toxicity of Ammonium Molybdate Added to Drinking Water of Calves. *J. Dairy Sci.* 63:608–610. doi:10.3168/jds.S0022-0302(80)82978-X.
- Kincaid, R.L., L.E. Lefebvre, J.D. Cronrath, M.T. Socha, and A.B. Johnson. 2010. Effect of Dietary Cobalt Supplementation on Cobalt Metabolism and Performance of Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 86:1405–1414. doi:10.3168/jds.s0022-0302(03)73724-2.
- Kincaid, R.L., and M.T. Socha. 2007. Effect of Cobalt Supplementation During Late Gestation and Early Lactation on Milk and Serum Measures. *J. Dairy Sci.* 90:1880–1886. doi:10.3168/jds.2006-296.
- Kincaid, R.L., and C.L. White. 1988. The effects of ammonium tetrathiomolybdate intake on tissue copper and molybdenum in pregnant ewes and lambs.. *J. Anim. Sci.* 66:3252–3258. doi:10.2527/jas1988.66123252x.
- Kira, C.S., A.M. Sakuma, and N. da C. Gouveia. 2014. Fast and simple multi-element determination of essential and toxic metals in whole blood with quadrupole ICP-MS. *J. Appl. Pharm. Sci.* doi:10.7324/JAPS.2014.40507.
- Kreuzer, M., and M. Kirchgessner. 1991. Endogenous iron excretion. *Biol. Trace Elem. Res.* 29:77–92. doi:10.1007/BF03032686.
- Langlands, J., J. Bowles, G. Donald, and A. Smith. 1986. Selenium excretion in sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 37:201. doi:10.1071/AR9860201.
- Laven, R.A., and C.T. Livesey. 2006. An evaluation of the effect of clotting and processing of blood samples on the recovery of copper from bovine blood. *Vet. J.* 171:295–300. doi:10.1016/j.tvjl.2004.11.008.
- Lee, J., B. Treloar, and N. Grace. 1994. Metallothionein and trace element metabolism in sheep tissues in response to high and sustained zinc dosages. 2. Expression of metallothionein m-RNA. *Aust. J. Agric. Res.* 45:321. doi:10.1071/AR9940321.
- López-Alonso, M. 2012. Trace Minerals and Livestock: Not Too Much Not Too Little. *ISRN Vet. Sci.* 2012:1–18. doi:10.5402/2012/704825.

- López-Alonso, M., F. Prieto, M. Miranda, C. Castillo, J. Hernández, and J.L. Benedito. 2005. The role of metallothionein and zinc in hepatic copper accumulation in cattle. *Vet. J.* 169:262–267. doi:10.1016/j.tvjl.2004.01.019.
- López-Alonso, M., F. Rey-Crespo, I. Orjales, R. Rodríguez-Bermúdez, and M. Miranda. 2016. Effects of different strategies of mineral supplementation (marine algae alone or combined with rumen boluses) in organic dairy systems. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. doi:10.1111/jpn.12449.
- Lu, Y., M. Kippler, F. Harari, M. Grandér, B. Palm, H. Nordqvist, and M. Vahter. 2015. Alkali dilution of blood samples for high throughput ICP-MS analysis-comparison with acid digestion. *Clin. Biochem.* doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.12.003.
- Marston, H.R. 2005. The requirement of sheep for cobalt or for vitamin B12. *Br. J. Nutr.* 24:615. doi:10.1079/bjn19700063.
- Mason, J. 1982. The putative role of thiomolybdates in the pathogenesis of Mo-induced hypocupremia and molybdenosis: some recent developments. *Irish Vet. J* 36:164–168.
- Mason, J., and C.J. Cardin. 1977. The competition of molybdate and sulphate ions for a transport system in the ovine small intestine. *Res. Vet. Sci.* 22:313–315. doi:10.1016/S0034-5288(18)33254-5.
- McArdle, H.J. 1992. The transport of iron and copper across the cell membrane: different mechanisms for different metals?. *Proc. Nutr. Soc.* 51:199–209. doi:10.1079/PNS19920030.
- McDowell, L. 1992. *Minerals in Animal and Human Nutrition*. Academic Press, New York.
- Miranda, M., J.L. Benedito, B. Gutiérrez, M. García-Vaquero, I. Blanco-Penedo, and M. López-Alonso. 2010. The interlobular distribution of copper in the liver of beef calves on a high-copper diet. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22:277–281. doi:10.1177/104063871002200221.
- Miranda M, Rey-Crespo F, Herrero-Latorre C, Rigueira L, López-Alonso M. 2015. Perfil mineral (elementos esenciales y tóxicos) en ganado vacuno lechero en explotación ecológica y convencional en España. Page in Libro de ponencias XXI Congreso de Anembe (Burgos) 2015, Burgos.
- NRC (2005). 2005. *Mineral Tolerances of Animals*, 2nd Edn. National Academy of Sciences, 2nd edn. National Academy of Sciences, ed. Washington, DC.
- O'Dell, G.D., W.J. Miller, S.L. Moore, W.A. King, J.C. Ellers, and H. Jurecek. 1971. Effect of Dietary Nickel Level on Excretion and Nickel Content of Tissues in Male Calves. *J. Anim. Sci.* 32:769–773. doi:10.2527/jas1971.324769x.
- Orjales, I., C. Herrero-Latorre, M. Miranda, F. Rey-Crespo, R. Rodríguez-Bermúdez, and M. López-Alonso. 2018. Evaluation of trace element status of organic dairy cattle. *Animal* 12:1296–1305. doi:10.1017/S1751731117002890.
- Overton, T.R., and T. Yasui. 2014. Practical applications of trace minerals for dairy cattle. *J. Anim. Sci.* doi:10.2527/jas.2013-7145.
- Pereira, V., P. Carbajales, M. López-Alonso, and M. Miranda. 2018. Trace Element Concentrations in Beef Cattle Related to the Breed Aptitude. *Biol. Trace Elem. Res.* 186:135–142. doi:10.1007/s12011-018-1276-3.
- Phillippo, M. and Graca, D.S. 1983. Biliary copper secretion in cattle.. *Proc. Nutr. Soc.* 42.

- Prohaska, J.R. 2006. Copper. In: Filer, L.J. and Ziegler, E.E. (Eds) Present Knowledge in Nutrition. 7th edn. International Life Science Institute–Nutrition Foundation, ed. Washington, DC.
- Puls R. 1994. Mineral Levels in Animal Health. Sherpa International. Sherpa International, ed. Clearbrook, British Columbia, Canada.
- Rey-Crespo, F., M. Miranda, and M. López-Alonso. 2013. Essential trace and toxic element concentrations in organic and conventional milk in NW Spain. *Food Chem. Toxicol.* 55:513–518. doi:10.1016/j.fct.2013.01.040.
- Rey-Crespo, F., M. López-Alonso, and M. Miranda. 2014. The use of seaweed from the Galician coast as a mineral supplement in organic dairy cattle. *Animal* 8:580–586. doi:10.1017/S1751731113002474.
- Rodríguez-Bermúdez, R., C. Herrero-Latorre, M. López-Alonso, D.E. Losada, R. Iglesias, and M. Miranda. 2018. Organic cattle products: Authenticating production origin by analysis of serum mineral content. *Food Chem.* 264. doi:10.1016/j.foodchem.2018.05.044.
- Rollin F, Guyot, H. 2013. Manejo de los minerales traza en el ganado. Pages 154–159 in Libro de ponencias XIX Congreso de Anembe, Lleida.
- Rotruck, J.T., A.L. Pope, H.E. Ganther, A.B. Swanson, D.G. Hafeman, and W.G. Hoekstra. 1973. Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. *Science* (80-.). 179:588–590. doi:10.1126/science.179.4073.588.
- Rowe, D.J., and D.J. Bobilya. 2000. Albumin Facilitates Zinc Acquisition by Endothelial Cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 224:178–186. doi:10.1111/j.1525-1373.2000.22418.x.
- Saenko, E.L., Yaroplov, A.I. and Harris, E.D. 1994. Biological functions of caeruloplasmin expressed through copper-binding sites.. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 7, 7:69–88.
- Schryver, H.F., H.F. Hintz, and J.E. Lowe. 1980. Absorption, Excretion and Tissue Distribution of Stable Zinc and ⁶⁵Zinc in Ponies. *J. Anim. Sci.* 51:896–902. doi:10.2527/jas1980.514896x.
- Spears, J.W. 2000. Micronutrients and immune function in cattle. *Proc. Nutr. Soc.* 59:587–594. doi:10.1017/S0029665100000835.
- Spears, J.W. 2003. Trace Mineral Bioavailability in Ruminants. *J. Nutr.* 133:1506S-1509S. doi:10.1093/jn/133.5.1506S.
- Spears, J.W., R.W. Harvey, and L.J. Samsell. 1986. Effects of Dietary Nickel and Protein on Growth, Nitrogen Metabolism and Tissue Concentrations of Nickel, Iron, Zinc, Manganese and Copper in Calves. *J. Nutr.* 116:1873–1882. doi:10.1093/jn/116.10.1873.
- Spears, J.W., and W.P. Weiss. 2008. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet. J.* 176:70–76. doi:10.1016/j.tvjl.2007.12.015.
- Subramanian, K.S. 1996. Determination of metals in biofluids and tissues: Sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 51:291–319. doi:10.1016/0584-8547(95)01425-X.
- Suttle, N.F. 2010. Mineral Nutrition of Livestock: Fourth Edition. Four ed. CABI, Wallingford, UK. <https://doi.org/10.1079/9781845934729.0000>
- Suttle, N.F., and A.C. Field. 1968. Effect of intake of copper, molybdenum and sulphate on copper metabolism in sheep. *J. Comp. Pathol.* 78:351-IN7. doi:10.1016/0021-9975(68)90013-3.

- Suttle, N.F., R.M. Lewis and J. Small. 2002. Effects of breed and family on rate of copper accretion in the liver of purebred Charollais, Suffolk and Texel lambs Effects of breed and family on rate of copper accretion in the liver of purebred Charollais, Suffolk and Texel lambs. *Anim. Sci.* 75:295–302.
- Tiffany, M.E., V. Fellner, and J.W. Spears. 2006. Influence of cobalt concentration on vitamin B12 production and fermentation of mixed ruminal microorganisms grown in continuous culture flow-through fermentors1. *J. Anim. Sci.* 84:635–640. doi:10.2527/2006.843635x.
- Tiffany, M.E., J.W. Spears, L. Xi, and J. Horton. 2003. Influence of dietary cobalt source and concentration on performance , vitamin B 12 status , and ruminal and plasma metabolites in growing and finishing steers The online version of this article , along with updated information and services , is located on 3151–3159.
- Tripathi, M.K., and A.S. Mishra. 2007. Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132:1–27. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.03.003.
- Underwood, E.J. and Suttle, N.. 1999. *The Mineral Nutrition of Livestock*. 3rd edn. CAB International, ed. Wallingford, UK.
- Vendeland, S.C., J.A. Butler, and P.D. Whanger. 1992. Intestinal absorption of selenite, selenate, and selenomethionine in the rat. *J. Nutr. Biochem.* 3:359–365. doi:10.1016/0955-2863(92)90028-H.
- Vincent, J.B. 2000. The Biochemistry of Chromium. *J. Nutr.* 130:715–718. doi:10.1093/jn/130.4.715.
- Walker, C.K., and J.M. Elliot. Lactational Trends in Vitamin B 12 Status on Conventional and Restricted-Roughage Rations. *J. Dairy Sci.* 55:474–479. doi:10.3168/jds.S0022-0302(72)85518-8.
- Walker, C.K., and J.M. Elliot. 2010. Lactational Trends in Vitamin B12 Status on Conventional and Restricted-Roughage Rations. *J. Dairy Sci.* 55:474–479. doi:10.3168/jds.s0022-0302(72)85518-8.
- White, C.L., T.K. Cadwalader, W.G. Hoekstra, and A.L. Pope. 1989. The Metabolism of ⁷⁵Se-Selenomethionine in Sheep Given Supplementary Copper and Molybdenum2. *J. Anim. Sci.* 67:2400–2408. doi:10.2527/jas1989.6792400x.
- Wintergerst, E.S., S. Maggini, and D.H. Hornig. 2007. Contribution of Selected Vitamins and Trace Elements to Immune Function. *Ann. Nutr. Metab.* 51:301–323. doi:10.1159/000107673.
- Yamamoto, A., O. Wada, and H. Suzuki. 1988. Purification and Properties of Biologically Active Chromium Complex from Bovine Colostrum. *J. Nutr.* 118:39–45. doi:10.1093/jn/118.1.39.
- Yokus, B., D.U. Cakir, and D. Kurt. 2004. Effects of Seasonal and Physiological Variations on the Serum Major and Trace Element Levels in Sheep. *Biol. Trace Elem. Res.* 101:241–256. doi:10.1385/BTER:101:3:241.



OBJETIVOS





OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es hacer una evaluación del método diagnóstico del estado de elementos traza en ganado vacuno. Para ello se desarrollarán los siguientes objetivos concretos:

- I. Evaluar un procedimiento rápido y simple de digestión ácida de muestras de suero bovino y compararlo con el método de dilución alcalina para la determinación de elementos traza por espectroscopia de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS).
- II. Evaluar la influencia del tipo de muestra (suero o plasma) en la determinación de elementos esenciales y tóxicos en ganado vacuno.
- III. Establecer el patrón en la distribución interlobular de los elementos traza en el hígado del ganado vacuno para determinar qué área del hígado sería la más adecuada para evaluar el estatus de elementos traza.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULOS







Capítulo 1

Validación de un método simple de preparación de muestras para análisis multielemental en suero bovino

Adaptado de:

Luna D, Miranda M, Minervino AHH, Piñeiro V, Herrero-Latorre C, López-Alonso M. 2019. Validation of a simple sample preparation method for multielement analysis of bovine serum. *PLoS One*. Feb 5;14(2):e0211859. doi: 10.1371/journal.pone.0211859.

RESUMEN

Aquí proponemos un método de digestión ácida simple (DAS) de muestras de suero animal para análisis de elementos traza por espectroscopia de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS). El método fue evaluado en comparación con un procedimiento comúnmente utilizado de dilución de muestras en una solución alcalina (DAK). En el procedimiento de digestión ácida, las alícuotas (1 mL) de suero bovino fueron tratadas a baja temperatura con una mezcla de ácido nítrico concentrado y peróxido de hidrógeno. Los elementos traza (As, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, U y Zn) se determinaron directamente mediante análisis por ICP-MS. Ambos métodos fueron lo suficientemente sensibles para permitir la cuantificación de la mayoría de los elementos traza, con excepción del método DAK para Cd, Hg y Pb. La calidad de los datos fue verificada utilizando material de referencia certificado. Se obtuvieron buenos resultados para el procedimiento DAS en todos elementos, pero las recuperaciones fueron inaceptables con el procedimiento DAK para Se (recuperación: 57%), Cd (154%) y Fe (139%). Se observaron fuertes correlaciones ($R^2 > 0.90$, $P = 0.000$) entre los datos obtenidos por ambos métodos para todos los elementos considerados. El método propuesto de preparación de muestras DAS arrojó resultados satisfactorios para determinar la mayoría de los elementos tóxicos y esenciales evaluados en estudios de monitorización.

Palabras Clave: suero bovino, digestión ácida, dilución alcalina, análisis multielemento, ICP-MS

1. Introducción

La determinación de elementos traza en muestras biológicas y ambientales continúa siendo un desafío debido a las bajas concentraciones de estos elementos y los efectos de matriz no deseados producidos por otros componentes de la muestra. Además de los elementos comúnmente considerados tóxicos (es decir, As, Cd, Pb y Hg), otros metales han sido identificados como potencialmente tóxicos, y al menos diecisiete de los elementos traza esenciales pueden ser tóxicos cuando se consumen en exceso (Suttle, 2010; Nordberg et al., 2014; Minervino et al., 2018). Tanto en animales como en humanos, desequilibrios, o sea bajas y/o altas concentraciones de los elementos traza en los tejidos están directamente relacionado con la patogénesis de numerosas enfermedades; por ejemplo, concentraciones elevadas de Fe y Cu (capaces de inducir

daño oxidativo) han sido detectados en los tejidos del cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y en los cerebros de humanos y animales afectados por otros desórdenes neurológicos (Jomova et al., 2010; Kozłowski et al., 2012; (Sousa et al., 2012). Aunque los elementos tóxicos existen de forma natural, la exposición indeseable a tales elementos está vinculada a las actividades antropogénicas, incluyendo procesos industriales (Barany et al., 1997; Goullé et al., 2005). Los programas de monitorización son esenciales para mejorar el conocimiento sobre los efectos de estos elementos en los organismos vivos y para prevenir los riesgos asociados en animales domésticos, particularmente ganado vacuno (López-Alonso et al., 2017). Los estudios de biomonitorización donde se miden los niveles de elementos tóxicos y esenciales en tejidos animales proporciona una información muy valiosa tanto para la salud animal, como para el medioambiente (particularmente los animales en extensivo que reflejan el grado de contaminación ambiental), como para la salud humana (como constituyentes relevantes de la dieta humana).

Como los laboratorios multidisciplinarios (clínicos, medioambiente, industria, etc.) deben incluir los análisis de los elementos tóxicos y esenciales en sus servicios de rutina, la selección y la preparación previa de las muestras son pasos críticos en los estudios de biomonitorización. La sangre es particularmente útil en este tipo de estudios, ya que son muestras no letales y de fácil obtención. Por otra parte, aunque las concentraciones de los elementos tóxicos y esenciales son más altas en tejidos como el hígado y el riñón que en la sangre, las técnicas modernas de espectroscopia de plasma pueden determinar las concentraciones de metales a niveles de ng L^{-1} , por ello ahora la sangre se considera una muestra adecuada en estudios biológicos y ambientales de monitorización (Barany et al., 1997; D'Illo et al., 2010; Kira et al., 2014; Lu et al., 2015). Además, conocer los niveles de elementos tóxicos a nivel sanguíneo es importante en el diagnóstico clínico tanto en humanos como en animales.

Las concentraciones de elementos traza en sangre se pueden medir en sangre entera o en suero. Aunque los elementos traza están presentes en concentraciones más bajas en el suero que en la sangre entera (por lo general, entorno a dos veces menor: Lu et al., 2015), la información disponible sobre los valores de estos elementos en individuos sanos se refieren principalmente al suero (Puls, 1994; Herdt and Hoff, 2011). Es importante tener en cuenta que la medición de los elementos traza en sangre entera es menos exacta y precisa que en el suero debido a la fuerte influencia de la matriz de la muestra en la medición, la cual, además está muy influenciada por numerosas condiciones fisiológicas y patológicas (Kaneko et al., 2008). Por otro lado, las muestras de suero son más fáciles de preparar que la sangre entera o los tejidos, ya que no se requiere de un procedimiento tan complejo y que lleva tiempo como la digestión ácida en sistema de microondas para eliminar la matriz o, lo que es lo

mismo, digerir la muestra. Así, las muestras de suero se pueden preparar mediante procedimientos simples de dilución. El más comúnmente usado de estos es el método de dilución alcalina (DAK), que permite minimizar la interferencia derivada de la matriz para la determinación de metales en equipos modernos de análisis multielemental como espectroscopia de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS) (Barany et al., 1997; Lu et al., 2015). Sin embargo, el método de dilución alcalina no impide completamente el riesgo de obstruir el nebulizador, el inyector de la llama o la interfaz de muestreo en las mediciones por ICP-MS, lo que puede reducir en gran medida la precisión de las determinaciones (Lu et al., 2015), particularmente durante el análisis de un gran número de muestras con bajas concentraciones de elementos traza. Con el fin de prevenir tales problemas, se utiliza la digestión ácida de muestras en sistemas cerrados de digestión en microondas (a pesar de ser costoso y lento) para determinar las concentraciones metales traza o ultra-traza en un gran número de muestras o micro muestras (Barany et al., 1997).

El objetivo de este estudio fue realizar un procedimiento rápido y simple de digestión ácida de muestras de suero bovino (DAS) y compararlo con el método de dilución alcalina (DAK) para la determinación de elementos traza por ICP-MS.

2. Material y métodos

2.1. Muestras de suero

Las muestras de suero bovino utilizadas en este estudio se recolectaron como parte de un proyecto de nutrición mineral en ganado vacuno. Se tomaron muestras de sangre (10 mL) de la vena coccígea (con mínimo estrés) de las vacas después del ordeño matutino, durante las visitas de rutina a las granjas. Todas las muestras fueron inmediatamente refrigeradas y transportadas al laboratorio. Se obtuvo suero dentro de las 4 h posteriores a la recolección, mediante centrifugación de las muestras de sangre a 3000 rpm durante 15 minutos en tubos para suero de 9 mL (Vacuette, Z Trace Elements Serum Clot Activator; Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria). De cada muestra se obtuvieron 3 submuestras de suero que se almacenaron en tubos Eppendorf y se almacenaron a -20 ° C hasta su posterior análisis. El procedimiento de muestreo ha sido descrito en detalle en López-Alonso et al. (2017). La recolección de muestras y todos los experimentos llevados a cabo con los animales se realizaron de acuerdo a la normativa vigente sobre protección de los animales de experimentación. El Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela (España) evaluó el diseño experimental, verificó y dio permiso para los procedimientos de muestreo llevados a cabo.

2.2. Reactivos

Todas las soluciones fueron preparadas utilizando agua ultra pura con resistencia de $18\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$ (usando un sistema de purificación Mili-Q, Millipore Corp., Bedford, MA). Se utilizaron soluciones estándar de grado ultra puro (1000 mg L^{-1}): Solución multi elementos ICP estándar IV certi-PUR para B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb, Sr y Zn; y ICP estándar certiPur para Hg y Se ambas de Merck (Pool, UK). Los patrones de As, Mo, Sb y U fueron de Panreac (Barcelona, España).

En la preparación del método DAS, las muestras fueron digeridas en ácido nítrico (69%, Hiperpur-Panreac, Barcelona, España) y peróxido de hidrógeno (33% w/v, Panreac, Barcelona, España). En la preparación del método DAK, las muestras fueron digeridas en una mezcla de amonio (NH_4OH , 25%, Merck, Darmstadt, Germany), Triton X100 (Panreac, Barcelona, España), 1-butanol anhidro (Panreac, Barcelona, España), y EDTA (Panreac, Barcelona, España). El material certificado de referencia para validar mediciones mediante ICP-MS fue el NIST SRM-1598a (componentes inorgánicos en suero animal), del National Institute for Standard and Technology, NIST (Gaithersburg, MD, USA).

Los tubos de polipropileno usados para la preparación de muestras y de los patrones se mantuvieron en HNO_3 Hiperpur al 10% durante al menos 24 h, se enjuagaron con agua desionizada y se secaron antes de usarse. Los tubos de muestreo eran específicos para elementos traza y se probó que no había contaminación por elementos traza.

2.3. Preparación de las muestras y las soluciones estándar

En el método DAS las muestras fueron tratadas de la siguiente forma: 1 mL de suero obtenido como se describió en la sección 2.1 que fue mezclado con 1 mL de HNO_3 concentrado y 0.5 mL H_2O_2 en tubos de polipropileno. La mezcla fue mantenida a $60\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas lo que permitió la digestión de las muestras. Los digeridos así obtenidos fueron diluidos añadiendo 2.5 mL de agua ultra pura. Posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y se analizaron mediante ICP-MS.

En el método DAK, 1 mL de suero fue diluido 1:5 con la adición de una solución alcalina que consiste en 2% (w/v) 1-butanol, 0.05% (w/v) EDTA triton X-100 y 1% (w/v) NH_4OH . Esta mezcla fue sonicada durante 5 minutos y centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos antes del análisis por ICP-MS.

Las soluciones estándar para el trabajo de calibración fueron preparadas diariamente mediante la dilución apropiada de los patrones multi-elementales descritos en la sección 2.2. Para el método DAS las soluciones de calibración fueron preparadas en HNO_3 al 20% (w/v) y los estándares internos ($20\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de Ge y Tb) fueron añadidos en línea a una velocidad de flujo de $40\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. Las soluciones de calibración para el

método DAK fueron también preparadas por dilución de los estándares de varios elementos con la misma solución alcalina que se describió anteriormente para la preparación de la muestra.

2.4. Determinación ICP-MS

La determinación de multi-elementos basada en ICP-MS se realizó en un sistema Agilent 7700x ICP-MS (Agilent Technologies, Tokio, Japón) equipado con tecnología de reducción de interferencia en la celda de reacción/colisión. El sistema de introducción continua de muestras consistió en un autoanalizador de inyección automática, una cámara de pulverización de doble paso Scott (Agilent Technologies, Tokyo Japan), un nebulizador de cristal concéntrico MicroMist (Glass Expansion, West Melbourne, Australia), una llama de cuarzo y conos de níquel (Agilent Technologies, Tokyo Japan). Las concentraciones de los elementos fueron cuantificadas usando un software MassHunter Work Station para ICP-MS (version A.8.01.01 Agilent Technologies, Inc. 2012, Tokyo, Japan). Este sistema fue utilizado para el análisis de las soluciones de las muestras obtenidas por ambos tipos de preparación y digestión, DAS y DAK y para el análisis de las muestras de referencia CRM NIST SRM-1598a. Todas las muestras fueron corregidas por los blancos y se analizaron por triplicado, con Ge y Tb como estándares internos. Los parámetros del ICP-MS, las condiciones diarias de trabajo y los isótopos seleccionados para las determinaciones se encuentran resumidos en la **tabla 1**. Las curvas de calibración (en el rango de concentración de 0.2 y 10,000 $\mu\text{g L}^{-1}$) se construyeron diariamente mediante el análisis de soluciones estándar nuevas realizadas inmediatamente antes del análisis de las muestras de suero. En todos los casos, se obtuvieron respuestas lineales con intercepción cero, coeficientes de correlación superior a 0.999 y una desviación estándar relativa (DSR) inferior al 5%.

2.5. Control de Calidad

Se aplicó un programa de control de calidad a la preparación de muestras con los métodos DAS y DAK. Los blancos analíticos (preparados siguiendo exactamente el mismo procedimiento utilizado para las muestras de suero) fueron incluidos en todos los lotes, y los resultados correspondientes se utilizaron para calcular los límites de detección (LOD, calculado como 3 veces la desviación estándar de los blancos) y los límites de cuantificación (LOQ, calculados como 10 veces la desviación estándar de los blancos). La exactitud analítica fue evaluada mediante el uso de un material de referencia certificado (CRM Animal serum NIST1598a) y muestras añadidas a los niveles de concentración apropiados (hasta 2 a 10 veces más altos que los niveles normales en suero). La precisión intra-ensayo e inter-ensayo se midió mediante 10 análisis repetidos de la misma muestra y mediante el análisis de 10 preparaciones diferentes de la misma muestra en diferentes días, respectivamente.

Tabla 1. Condiciones de trabajo del ICP-MS.

Calibración del instrumental	RF Potencia (W)	1550
	Profundidad de la muestra	8
	Flujo del gas (L min ⁻¹)	15
	Cargador de gas (L min ⁻¹)	1.1
	Bomba nebulizadora (rps)	0.1
	T ^a cámara de pulverización (°C)	2
	Replicas	3
	Célula de reacción: gas He (mL min ⁻¹)	3.6
Masas analíticas	⁷ Li, ¹¹ B, ⁵² Cr, ⁵⁵ Mn, ⁵⁶ Fe, ⁵⁹ Co, ⁶⁰ Ni, ⁶³ Cu, ⁶⁶ Zn, ⁷⁵ As, ⁷⁸ Se, ⁸⁸ Sr, ⁹⁵ Mo, ¹¹¹ Cd, ¹²¹ Sb, ¹³⁷ Ba, ²⁰² Hg, ²⁰⁸ Pb, ²³⁸ U,	
Estándares internos	¹⁵⁹ Tb, ⁷² Ge	
Rango de calibración de los estándares (µg L ⁻¹)	Co, Cd, Sb, Hg, U	0.2–10
	Li, Cr, Mn, Ni, As, Se, Sr, Mo, Pb	0.2–100
	B, Fe, Cu, Zn, Ba	10–10000

3. Resultados y discusión

3.1. Calibración y sensibilidad

Las curvas de calibración para todos los elementos analizados en este estudio fueron lineales ($R^2 \geq 0.9999$) en un amplio rango de concentraciones, tanto para los procedimientos de preparación de muestras DAS como para DAK.

Los valores de LOD y LOQ para la determinación mediante ICP-MS basados en los procedimientos de preparación DAS y DAK, así como las concentraciones de los elementos traza en los blancos analíticos se muestran en la **tabla 2**. Los LODs y LOQs de los elementos presentes en altas concentraciones en las muestras de suero generalmente fueron menores (hasta un orden de magnitud inferior para algunos elementos) para muestras procesadas con el método DAK que las procesadas con el método DAS. Ambos procedimientos fueron lo suficientemente sensibles como para permitir la determinación de la mayoría de los elementos traza en las concentraciones que se encuentran comúnmente en las muestras de suero bovino. Sin embargo, el método DAS fue más sensible para la determinación de elementos tóxicos como Cd, Pb, Sb y Sr, presentes a muy bajas concentraciones a nivel de trazas en las muestras de suero. Con el método DAK, estos elementos estaban por debajo del LOQ en una alta proporción de las muestras (entre 65 y 100% según el elemento).

Los niveles de elementos traza en los blancos eran generalmente muy bajos (menor que $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$), lo que indica la alta pureza de los productos químicos utilizados en los procedimientos DAS y DAK, así como la ausencia de contaminación de las muestras durante la preparación y el análisis. En general, las concentraciones medias de la mayoría de los elementos determinados en los blancos fueron varios órdenes de magnitud más bajos que las comúnmente presentes en las muestras de suero. Las únicas excepciones a este patrón fueron algunos elementos presentes en concentraciones muy bajas en muestras de suero, como Cd, Hg y U. No obstante, las concentraciones de estos elementos en los blancos fueron al menos un orden de magnitud inferior a los niveles en el suero, lo que garantiza una determinación precisa después de la corrección del blanco.

Tabla 2. Concentración de elementos traza en los blancos, límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) para la preparación de muestras mediante digestión ácida simple (DAS) y dilución alcalina (DAK). Todos los valores en $\mu\text{g L}^{-1}$.

Elementos	Blancos		LOD		LOQ	
	DAS	DAK	DAS	DAK	DAS	DAK
As	0.038±0.008	0.007±0.001	0.024	0.003	0.121	0.017
B	0.027±0.002	0.094±0.002	0.005	0.007	0.026	0.038
Ba	0.007±0.004	0.026±0.001	0.012	0.004	0.058	0.019
Cd	0.004±0.004	0.017±0.011	0.013	0.033	0.063	0.164
Co	0.006±0.005	0.013±0.003	0.016	0.007	0.081	0.033
Cr	0.076±0.038	0.024±0.001	0.115	0.003	0.576	0.015
Cu	0.050±0.058	0.023±0.004	0.174	0.014	0.871	0.073
Fe	0.364±0.082	0.279±0.031	0.246	0.095	1.230	0.479
Hg	0.042±0.017	0.004±0.003	0.050	0.008	0.248	0.040
Li	0.093±0.063	0.171±0.035	0.189	0.104	0.947	0.519
Mn	0.040±0.051	0.014±0.009	0.154	0.026	0.770	0.130
Mo	0.024±0.028	0.009±0.001	0.084	0.003	0.422	0.015
Ni	0.089±0.043	0.013±0.012	0.129	0.037	0.643	0.185
Pb	0.013±0.010	0.020±0.035	0.030	0.106	0.151	0.531
Sb	0.003±0.001	0.010±0.002	0.003	0.005	0.013	0.025
Se	0.116±0.020	0.026±0.024	0.060	0.071	0.299	0.353
Sr	0.014±0.006	0.016±0.013	0.019	0.039	0.093	0.195
U	0.001±0.000	0.001±0.000	0.001	0.001	0.004	0.007
Zn	0.018±0.006	0.043±0.004	0.017	0.012	0.083	0.062

3.2. Exactitud y precisión

La exactitud del método ICP-MS después de la preparación de las muestras mediante DAS y DAK se evaluó utilizando material de referencia certificado (NIST 1598a) y muestras añadidas (cuando el valor certificado no está disponible o cuando no se detectó el analito). El procedimiento de preparación DAS mostró mejores resultados que el método DAK (**Tabla 3**). La recuperación de los elementos a partir de muestras certificadas preparadas utilizando el método DAS (en el rango de 96-118%) fue aceptable, de acuerdo con la guía de la AOAC para la validación del método (AOAC, 2012) y para la mayoría de los elementos, fueron mucho más altos que los de las muestras tratadas con DAK. La recuperación de los elementos de las muestras certificadas preparadas utilizando el método DAK no fue aceptable para Se (57%), Cd (154%) o Fe (139%) y también fue sub-óptima para Zn (78%). Estos resultados confirman la debilidad previamente descrita para el método DAK (Barany et al., 1997). Los niveles de recuperación insatisfactorios se atribuyen a la interferencia poliatómica (para Se y Zn) y la interferencia que surge de la adsorción en las superficies de los tubos y/o vidrio (para otros elementos). El Se tiene importantes implicaciones en la salud como antiinflamatorio, antitumoral y antioxidante tanto en humanos como en animales (Suttle, 2010; Rayman, 2012). Los niveles séricos de este elemento son lo suficientemente altos como para permitir la identificación de deficiencia/desequilibrio, y la mala recuperación asociada con el método DAK es un serio inconveniente para el análisis del Se. El Se es uno de los elementos cruciales en la salud y producción animal, sobre todo en el manejo de animales en sistemas intensivos. La suplementación dietética y/o la administración parenteral de Se son realizadas de manera rutinaria (Herdt and Hoff, 2011; Overton and Yasui, 2014), para reducir la incidencia de metritis y quistes ováricos durante el posparto y aumentar la fertilidad mediante la prevención de la muerte embrionaria durante el primer mes de gestación (Mehdi and Dufrasne, 2016).

La recuperación a partir de muestras añadidas con elementos no certificados en el material de referencia o elementos que no se detectan generalmente (incrementados a concentraciones hasta 10 veces más altas que los valores habituales en suero) fue adecuada para ambos métodos, con la excepción del Cr por el método DAK. Este aspecto negativo también se describió previamente para el análisis de Cr en sangre humana (Barany et al., 1997), y fue atribuido al alto contenido de carbono contenido en las muestras. Estos hallazgos demuestran los mejores resultados obtenidos con el método DAS que con el método DAK porque la digestión ácida reduce el contenido total de carbono en las muestras de suero.

Tabla 3. Resultado del estudio de exactitud para la preparación de muestras mediante digestión ácida simple (DAS) y dilución alcalina (DAK) basada en el análisis de un material de referencia certificado (Animal Serum NIST 1598a) y de muestras añadidas.

	Material de referencia (Animal serum NIST 1598a)			Muestras añadidas	
	Valor certificado	Recuperación (%)		Recuperación (%)	
	($\mu\text{g L}^{-1}$)	DAS	DAK	DAS	DAK
As	(0.3)*	ND	87	88.1 \pm 9.4	84.2 \pm 6.5
B	—			91.5 \pm 8.2	95.8 \pm 13.1
Ba	—			89.1 \pm 8.4	83.9 \pm 4.1
Cd	0.05 \pm 0.014	109	154		
Co	1.24 \pm 0.07	100	87		
Cr	0.33 \pm 0.08	ND	ND	93.8 \pm 7.4	46.4 \pm 12.0
Cu	1580 \pm 90	105	98		
Fe	1680 \pm 60	114	139		
Hg	0.32 \pm 0.19	90	ND	91.0 \pm 4.9	84.2 \pm 3.2
Li	—			93.1 \pm 5.2	105.1 \pm 11.0
Mn	1.78 \pm 0.33	108	105		
Mo	5.5 \pm 1.0	96	82		
Ni	0.94 \pm 0.18	107	119		
Pb	—			87.6 \pm 9.3	79.4 \pm 5.2
Sb	1.00 \pm 0.15	108	106		
Se	134.4 \pm 5.8	118	57		
Sr	—			96.1 \pm 5.7	99.5 \pm 1.2
U	—			96.4 \pm 11.2	97.4 \pm 27.1
Zn	880 \pm 24	108	78		

* Entre paréntesis valores indicativos. ND: no detectado

Tabla 4. Resultados de la precisión intra e inter-ensayo (expresados como DSR) para para la preparación de muestras mediante la digestión ácida simple (DAS) y la dilución alcalina (DAK).

Elemento	<i>Intra-ensayo (n=10)</i>		<i>Inter-ensayo (n=10)</i>	
	DAS	DAK	DAS	DAK
As	4.60	2.96	3.76	4.16
B	3.12	3.74	4.37	3.95
Ba	4.03	7.55	2.96	2.90
Cd	4.04	15.5	8.85	21.1
Co	1.89	7.91	2.6	6.17
Cr	4.59	11.2	5.43	15.41
Cu	2.64	2.88	2.41	2.56
Fe	1.99	2.37	2.06	2.30
Hg	8.09	12.6	9.00	23.9
Li	8.40	8.65	5.51	8.92
Mn	2.41	4.41	5.06	3.79
Mo	1.08	2.32	1.37	2.24
Ni	3.97	8.22	6.22	10.0
Pb	1.98	11.4	5.83	46.6
Sb	1.48	3.48	1.96	2.87
Se	2.31	2.82	2.80	2.90
Sr	1.97	2.37	1.68	2.24
U	3.02	15.3	7.85	15.6
Zn	1.94	2.47	2.41	2.39

Los resultados de la evaluación de la precisión intra-ensayo (evaluado a partir de 10 repeticiones de la misma muestra) e inter-ensayo (evaluado mediante la preparación de 10 digestiones de la misma muestra en diferentes días) se presentan en la **tabla 4**. El procedimiento de preparación de las muestras por el método DAS produjo un mayor nivel de reproducibilidad que el método DAK. Los valores de la desviación estándar relativa (DSR) para el método DAS en la precisión intra-ensayo fueron más bajos que para el método DAK. En la evaluación inter-ensayo, las medidas de exactitud también fueron mejores para el procedimiento DAS, con resultados no deseados para Cd, Cr, Hg, Pb y U en el procedimiento DAK. En general, los valores de la DSR fueron ligeramente más altos para los elementos presentes en concentraciones más altas en el suero para el método DAS que para el método DAK, aunque en general fueron similares. Sin embargo, para aquellos elementos presentes en concentraciones muy bajas (Ba, Cd, Co, Cr, Hg, Li, Ni, Pb y U) los resultados obtenidos por el método DAS fueron mucho más precisos.

3.3. Tiempo de preparación de la muestra y coste del análisis

La duración de los pasos del análisis es un parámetro importante a considerar al evaluar los procedimientos de preparación de muestras. El método DAK (aprox. 20 min por muestra) es más rápido que el método DAS (2 h 10 min por muestra) debido al paso de digestión más largo en el DAS. Sin embargo, la duración del paso de digestión no requiere la participación directa del analista, que puede realizar otras tareas durante este tiempo.

Ambos métodos de preparación de muestras utilizan material de laboratorio similar y generalmente disponible. Sin embargo, en el procedimiento DAK se requieren productos químicos puros adicionales como butanol, EDTA, Triton X-100 y NH_4OH , lo que aumenta el costo del método. Las muestras obtenidas usando el método DAS son más limpias y contienen menos partículas que las obtenidas por el método DAK. La duración del paso de lavado en medio del análisis ICP-MS de las muestras preparadas utilizando el método DAK debe aumentarse para evitar el bloqueo por obstrucción (restos de muestra) del sistema de introducción de muestras. El tiempo de análisis y el consumo de gas para las mediciones de ICP-MS son por lo tanto más altos con el método DAK que con el método DAS. Además, el sistema ICP también debe limpiarse más a menudo después de procesar las muestras tratadas con el método DAK, lo que reduce el rendimiento del equipo.

3.4. Análisis de las muestras de suero bovino

Las concentraciones de los elementos traza en las muestras de suero bovino preparadas por los dos métodos DAS y DAK fueron medidas bajo las condiciones descritas en la sección 2.4 y fueron comparadas usando un análisis de regresión (ver

Tabla 5). Los resultados son consistentes con los obtenidos en los estudios de exactitud y precisión. El análisis reveló una estrecha correlación entre los dos métodos ($R^2 > 0,90$, $P = 0.000$) para aquellos elementos que presentaron buenos datos en términos de exactitud y precisión. Sin embargo, el análisis de regresión lineal reveló diferencias estadísticamente significativas entre los métodos para algunos elementos, con concentraciones mucho más bajas determinadas con el método DAK: As (95%), Co (23%), Li (52%), Mn (41%) y Zn (47%). Por el contrario, la concentración de Fe en las muestras preparadas por el procedimiento DAS fue 28% más baja que en las preparadas usando el método DAK. Asociaciones más débiles pero aún significativas ($R^2 \approx 0.80$ $P = 0.000$) se observaron en algunos elementos presentes en concentraciones muy bajas en las muestras de suero (Ni y U) o aquellos elementos para los cuales la recuperación analítica no fue satisfactoria (Se en el método DAK). Finalmente, como se esperaba, no se observó ninguna asociación ($P > 0.05$) para Cd, Hg y Pb (porque la mayoría de las muestras estaban por debajo del LOQ para el método DAK) o Cr (debido a la interferencia del carbono en el análisis del método DAK).

4. Conclusiones

Desarrollamos un procedimiento simple de tratamiento previo para muestras de suero bovino antes de la determinación de minerales mediante ICP-MS basada en la digestión con un solo ácido (DAS). La novedosa metodología es muy simple y fácil de replicar, requiere una pequeña cantidad de muestra, produce soluciones limpias y sin partículas además permite el almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente. El método de preparación de muestras propuesto permite una determinación más exacta y precisa de la mayoría de los elementos traza, tóxicos y esenciales en comparación con el método de digestión alcalina comúnmente utilizado. En particular, el procedimiento DAS recientemente desarrollado mejoró en gran medida la exactitud de la determinación para selenio y produjo un aumento significativo en la precisión de la determinación de los elementos presentes en niveles de ultra-traza.

Tabla 5. Comparación de las concentraciones ($\mu\text{g L}^{-1}$) de los elementos traza en suero bovino (n=20) mediante el uso de digestión ácida simple (DAS) y dilución alcalina (DAK) en la preparación de la muestra.

	DAS			DAK			Análisis de regresión lineal			
	Media \pm DS	Mediana	Rango	Media \pm DS	Mediana	Rango	R ²	P	Pendiente	Intersección
As	3.50 \pm 0.09	3.54	(2.72-4.24)	2.52 \pm 0.11	2.65	(1.06-3.04)	0.921	0.000	1.590	0.488
B	311 \pm 9	307	(227-389)	302 \pm 9	311	(209-384)	0.902	0.000	0.914	31.8
Ba	13.2 \pm 1.2	12.1	(6.7-25.2)	12.3 \pm 1.0	11.4	(6.9-24.1)	0.941	0.000	1.023	-0.340
Cd	0.174 \pm 0.020	0.154	(0.082-0.397)	0.134 \pm 0.021	0.097	(ND-0.412)	0.012	0.709	---	---
Co	0.383 \pm 0.015	0.381	(0.245-0.498)	0.311 \pm 0.011	0.312	(0.193-0.397)	0.932	0.000	1.235	-0.003
Cr	4.87 \pm 0.45	5.13	(2.34-9.29)	0.977 \pm 0.179	0.669	(0.83-2.264)	0.004	0.812	---	---
Cu	686 \pm 23	694	(530-869)	658 \pm 19	665	(514-792)	0.945	0.000	1.077	-22.3
Fe	1983 \pm 132	1976	(1137-2996)	2335 \pm 203	2321	(1140-3859)	0.977	0.000	0.722	206
Hg	0.422 \pm 0.064	0.337	(ND-1.240)	0.032 \pm 0.004	0.031	(ND-0.064)	0.107	0.159	---	---
Li	15.6 \pm 0.8	15.8	(10.8-22.7)	10.8 \pm 0.6	10.4	(7.7-15.4)	0.95	0.000	1.524	-1.31
Mn	2.12 \pm 0.11	1.95	(1.30-3.26)	1.87 \pm 0.07	1.81	(1.19-2.65)	0.958	0.000	1.406	-0.500
Mo	196 \pm 38	148	(71-784)	179 \pm 35	133	(67-750)	0.999	0.000	1.041	4.72
Ni	1.89 \pm 0.11	1.87	(1.21-3.04)	0.622 \pm 0.032	0.617	(0.435-0.974)	0.768	0.000	2.933	0.001
Pb	1.16 \pm 0.21	0.97	(0.265-3.05)	0.148 \pm 0.019	0.146	(ND-0.239)	0.016	0.810	---	---
Sb	2.04 \pm 0.10	1.89	(0.075-3.03)	2.10 \pm 0.11	1.89	(1.56-3.17)	0.953	0.000	0.909	0.126
Se	64.8 \pm 3.2	62.2	(39.3-102.3)	29.4 \pm 1.4	27.9	(16.0-41.1)	0.812	0.000	2.093	3.28
Sr	117 \pm 5	117	(79-173)	114 \pm 5	111	(80-165)	0.919	0.000	1.024	0.257
U	0.012 \pm 0.001	0.012	(0.008-0.018)	0.015 \pm 0.001	0.015	(0.010-0.023)	0.788	0.000	0.704	0.001
Zn	859 \pm 50	885	(387-1313)	576 \pm 33	582	(260-888)	0.974	0.000	1.467	-11.5

DS: Desviación estándar; ND: no detectado

Referencias

- AOAC. 2012. AOAC INTERNATIONAL Guidelines for Validation of Botanical Identification Methods. *J. AOAC Int.* 95:268–272. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-447>.
- Barany, E., I.A. Bergdahl, A. Schutz, S. Skerfving, And A. Oskarsson. 1997. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Direct Multi-element Analysis of Diluted Human Blood and Serum. *J. Anal. At. Spectrom.* 12:1005–1009. doi:10.1039/A700904F.
- D'Ilio, S., C. Majorani, F. Petrucci, N. Violante, and O. Senofonte. 2010. Method validation for the quantification of As, Cd, Hg and Pb in blood by ICP-MS for monitoring purposes. *Anal. Methods* 2:2049–2054. doi:10.1039/C0AY00429D.
- Goullé, J.-P., L. Mahieu, J. Castermant, N. Neveu, L. Bonneau, G. Lainé, D. Bouige, and C. Lacroix. 2005. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair: Reference values. *Forensic Sci. Int.* 153:39–44. doi:10.1016/J.FORSCIINT.2005.04.020.
- Herdt, T.H., and B. Hoff. 2011. The Use of Blood Analysis to Evaluate Trace Mineral Status in Ruminant Livestock. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27:255–283. doi:10.1016/J.CVFA.2011.02.004.
- Jomova, K., D. Vondrakova, M. Lawson, and M. Valko. 2010. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol. Cell. Biochem.* 345:91–104. doi:10.1007/s11010-010-0563-x.
- Kaneko, J.J., J.W. Harvey, and M.L. Bruss. 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6 ed. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.X0001-3>.
- López-Alonso, M., F. Rey-Crespo, C. Herrero-Latorre, and M. Miranda. 2017. Identifying sources of metal exposure in organic and conventional dairy farming. *Chemosphere* 185. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.07.112.
- Lu, Y., M. Kippler, F. Harari, M. Grandér, B. Palm, H. Nordqvist, and M. Vahter. 2015. Alkali dilution of blood samples for high throughput ICP-MS analysis—comparison with acid digestion. *Clin. Biochem.* 48:140–147. doi:10.1016/J.CLINBIOCHEM.2014.12.003.
- Mehdi, Y., and I. Dufrasne. 2016. Selenium in cattle: A review. *Molecules* 21. doi:10.3390/molecules21040545.
- Minervino, A.H.H., M. López-Alonso, R.A. Barrêto Júnior, F.A.M.L. Rodrigues, C.A.S.C. Araújo, R.S. Sousa, C.S. Mori, M. Miranda, F.L.C. Oliveira, A.C. Antonelli, and E.L. Ortolani. 2018. Dietary zinc supplementation to prevent chronic copper poisoning in sheep. *Animals*. doi:10.3390/ani8120227.
- Nordberg, G.F., B.A. Fowler, and M. Nordberg. 2014. *Handbook on the Toxicology of Metals: Fourth Edition*. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-07884-5>

- Overton, T.R., and T. Yasui. 2014. Practical applications of trace minerals for dairy cattle^{1,2}. *J. Anim. Sci.* 92:416–426. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7145>
- Puls R. 1994. *Mineral Levels in Animal Health*. second. Clearbrook: Sherpa International, Canada.
- Rayman, M.P. 2012. Selenium and human health. *Lancet* 379:1256–1268. doi:10.1016/S0140-6736(11)61452-9.
- Sousa, I.K.F. De, A.H. Hamad Minervino, R.D.S. Sousa, D.F. Chaves, H.S. Soares, I.D.O. Barros, C.A.S.C. De Araújo, R.A.B. Júnior, and E.L. Ortolani. 2012. Copper deficiency in sheep with high liver iron accumulation. *Vet. Med. Int.* doi:10.1155/2012/207950.
- Suttle, N.F. 2010. *Mineral Nutrition of Livestock: Fourth Edition*. Four ed. CABI, Wallingford, UK. <https://doi.org/10.1079/9781845934729.0000>







Capítulo 2

Determinación de elementos esenciales y tóxicos en sangre: suero vs plasma

Adaptado de:

Luna D, López-Alonso M, Cedeño Y, Miranda M. 2019. Determination of essential and toxic elements in blood of cattle: serum vs plasma. *Animals*. submitted

RESUMEN

Este estudio fue diseñado para evaluar la influencia del tipo de muestra (suero o plasma) en el análisis de elementos esenciales y tóxicos en ganado vacuno. Las muestras de plasma y suero (n = 20) se sometieron a una digestión con ácido y las concentraciones de As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Sb, Se, Sr y Zn se determinaron por espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS). Nuestros resultados indican que las muestras de plasma y suero parecen ser adecuadas e intercambiables para la determinación de la mayoría de los elementos esenciales y tóxicos en la sangre del ganado vacuno. La única excepción parecen ser el Cu y Se para los cuales se encontraron niveles significativamente más bajos (40.9 y 29.9% respectivamente) en el suero. Este hallazgo está bien descrito para el Cu en los rumiantes bovinos y está relacionado con la captura de parte de Cu en el coágulo, pero merece una investigación adicional para el Se en otras especies animales, en particular los rumiantes. Finalmente, señalar que las concentraciones de Mn (9.9%) significativamente mayores en suero en comparación con el plasma podrían estar relacionadas con la hemólisis en algunas muestras. Se debe prestar especial atención para evitar la hemólisis al obtener y procesar las muestras de sangre para evitar una sobreestimación de los elementos que se encuentran en altas concentraciones (Fe, Mn o Zn) dentro de los eritrocitos.

Palabras Clave: elementos esenciales y tóxicos, suero, plasma, ganado vacuno, ICP-MS

1. Introducción

Dos siglos después del descubrimiento de la esencialidad de ciertos elementos como el I o el Fe, los desequilibrios minerales siguen siendo todavía un reto tanto para el hombre como para los animales. Hoy en día, al menos diecisiete elementos son considerados esenciales para un crecimiento apropiado, salud y reproducción (Suttle, 2010); siendo esencial mantener un correcto estatus mineral para asegurar una producción máxima en animales de granja. La exposición del ganado a fuentes antropogénicas de contaminación, pero también a las fuentes naturales de elementos tóxicos, también presenta un gran interés puesto que es bien sabido que los productos animales representan una de las fuentes principales de elementos tóxicos en las dieta humanas, que deberían reducirse a un mínimo (López-Alonso, 2012a).

Los desórdenes de oligoelementos (tanto deficiencias como intoxicaciones) han sido descritos en grandes áreas del mundo, estando principalmente relacionados con el origen geológico del suelo (Suttle, 2010), y continúan apareciendo actualmente asociados a métodos de producción ganadera fuertemente vinculados al suelo, concretamente la ganadería ecológica y otros sistemas sostenibles de producción (López Alonso, 2012b). Es también bien sabido que los desórdenes metabólicos asociados a minerales no sólo están relacionados con deficiencias clínicas (y en menor medida con toxicidades) sino que hoy en día presentan una gran relevancia los problemas subclínicos, que incluyen también interacciones complejas entre elementos (Kendall and Bone, 2006). Además, aunque de forma tradicional se creía que los oligoelementos cuando eran suplementados en las dietas tenían márgenes de seguridad amplios, hoy se sabe que los requisitos óptimos de oligoelemento están dentro de un margen estrecho y que las desviaciones pueden tener importantes consecuencias para el mantenimiento de la salud del rebaño (Ludwick et al., 2008).

La determinación del estatus mineral y la acumulación de elementos tóxicos en animales de granja proporciona información de gran relevancia al veterinario clínico y es una pieza clave para mantener la salud de rebaño (Ludwick et al., 2008). Si bien durante décadas los análisis de oligoelemento era una labor complicada—demandando mucho tiempo y siendo poco precisa para los elementos presentes en concentraciones muy bajas en sangre (por ejemplo Co, Mo o Mn)—hoy en día las modernas técnicas de análisis multielemental como la Espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS), junto con el desarrollo de protocolos para la preparación de muestra para evitar interferencias de matriz (Luna et al., 2019) permiten una determinación rutinaria precisa, rápida y relativamente barata de un gran número de oligoelementos en un análisis de una única muestra de sangre en laboratorios multidisciplinarios.

Un punto importante que a menudo no se tiene en cuenta en la determinación de oligoelementos es la elección de la muestra que debemos enviar al laboratorio. Si bien la determinación en sangre entera (recogida en EDTA, heparina u otro anticoagulante) apenas se emplea debido a su laboriosa preparación, hay poca información sobre la conveniencia de utilizar suero o plasma y de si los resultados son comparables. La diferencia principal entre suero y plasma es que en el suero se consumen el fibrinógeno y los factores de coagulación, si bien también es bien conocido que otras muchas proteínas, agua, sales y células de sangre quedan atrapadas entre las mallas de fibrina (Stachowicz et al., 2018). Desde el punto de vista de análisis de minerales, la composición de la matriz del suero y plasma es diferente y además algún elemento ligado a proteínas plasmáticas puede quedar atrapado en el coágulo. En rumiantes, por ejemplo, está bien documentado que las concentraciones de Cu en suero son entre un 10-30% más bajas que en plasma puesto que la

ceruloplasmina (CP) queda parcialmente atrapada en el coágulo (Telfer et al., 2003, Laven y Livesey, 2006; Laven et al., 2007). Esto hace que las concentraciones de Cu en suero y plasma no sean fácilmente intercambiables. Además, la relación entre los niveles de Cu en suero y plasma es pobre puesto que existe una variabilidad marcada en la pérdida aparente de Cu ligado a CP durante el proceso de coagulación.

La información de la que se dispone sobre el efecto de secuestro en el coágulo sobre otros oligoelementos, así como las interferencias de matriz cuando las muestras de suero o plasma se analizan por ICP-MS es muy escasa, a pesar de que podría ser muy relevante a la hora de determinar el estatus mineral.

Este estudio tiene como objetivo evaluar la influencia del tipo de muestra (suero o plasma) en la determinación de elementos esenciales y tóxicos en ganado vacuno.

2. Material y métodos

2.1. Muestras

Las muestras de sangre de ganado vacuno (n=20) empleadas en este estudio forman parte de un proyecto para valorar el estatus mineral en ganado vacuno. De cada animal se recogieron 2 tipos de muestras de sangre (por triplicado). Para obtener plasma, la sangre entera se recogió en tubos de 9 mL de heparina de sodio (Vacuette®, NH, Greiner bio-un, Kremsmünster, Austria) mientras que para obtener suero las muestras de sangre entera se recogieron en tubos de 9 mL sin aditivos (Vacuette®, Z Activador de Coágulo de Suero de Oligoelementos; Greiner bio-un, Kremsmünster, Austria). Inmediatamente después de su obtención, las muestras se refrigeraron, se transportaron al laboratorio y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min para obtener plasma y suero dentro las 4 horas siguientes a su recogida. A continuación se obtuvieron tres alícuotas de cada muestra que se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis laboratorial.

La recolección de muestras y todos los experimentos llevados a cabo con los animales se realizaron de acuerdo a la normativa vigente sobre protección de los animales de experimentación. El Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela (España) evaluó el diseño experimental, verificó y dio permiso para los procedimientos de muestreo llevados a cabo.

2.2. Reactivos

Todas las soluciones fueron preparadas utilizando agua ultra pura con resistencia de 18M Ω cm⁻¹ (usando un sistema de purificación Mili-Q, Millipore Corp., Bedford, MA). Se utilizaron soluciones estándar de grado ultra puro (1000 mg L⁻¹): Solución multi elementos ICP estándar IV certi-PUR para B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb, Sr y

Zn; y ICP estándar certiPur para Hg y Se ambas de Merck (Pool, UK). Los patrones de As, Mo, Sb y U fueron de Panreac (Barcelona, España). El material certificado de referencia para validar mediciones mediante ICP-MS fue el NIST SRM-1598a (componentes inorgánicos en suero animal), del National Institute for Standard and Technology, NIST (Gaithersburg, MD, USA).

Los tubos de polipropileno usados para la preparación de muestras y de los patrones se mantuvieron en HNO₃ Hiperpur al 10% durante al menos 24 h, se enjuagaron con agua desionizada y se secaron antes de usarse. Los tubos de muestreo eran específicos para elementos traza y se probó que no había contaminación por elementos traza.

2.3. Preparación de las muestras y las soluciones estándar

Las muestras de plasma y suero (1 mL) se sometieron a un procedimiento simple de digestión ácida, como se describe en el capítulo 1 de esta Tesis Doctoral (Luna et al., 2019). Las muestras de plasma y suero fueron tratadas de la siguiente forma: 1 mL de plasma o suero, se añadió 1 mL de HNO₃ concentrado y 0.5 mL H₂O₂ en tubos de polipropileno. La mezcla fue mantenida a 60 °C durante 2 horas lo que permitió la digestión de las muestras. Los digeridos así obtenidos fueron diluidos añadiendo 2.5 mL de agua ultra pura. Posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y se analizaron mediante ICP-MS.

Las soluciones estándar para el trabajo de calibración fueron preparadas diariamente mediante la dilución apropiada de los patrones multi-elementales descritos en la sección 2.2. Las soluciones de calibración fueron preparadas en HNO₃ al 20% (w/v) y los estándares internos (20 µg L⁻¹ de Ge y Tb) fueron añadidos en línea a una velocidad de flujo de 40 µL min⁻¹.

2.4. Determinación por ICP-MS

La determinación de multi-elementos basada en ICP-MS se realizó en un equipo Agilent 7700x ICP-MS (Agilent Technologies, Tokio, Japón) equipado con tecnología de reducción de interferencia en la celda de reacción/colisión. El sistema de introducción continua de muestras consistió en un autoanalizador de inyección automática, una cámara de pulverización de doble paso Scott (Agilent Technologies, Tokyo Japan), un nebulizador de cristal concéntrico MicroMist (Glass Expansion, West Melbourne, Australia), una llama de cuarzo y conos de níquel (Agilent Technologies, Tokyo Japan). Las concentraciones de los elementos fueron cuantificadas usando un software MassHunter Work Station para ICP-MS (version A.8.01.01 Agilent Technologies, Inc. 2012, Tokyo, Japan). Todas las muestras fueron corregidas por los blancos y se analizaron por triplicado, con Ge y Tb como estándares internos. Las curvas de calibración (en el rango de concentración de 0.2 y

10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$) se construyeron diariamente mediante el análisis de soluciones estándar nuevas realizadas inmediatamente antes del análisis de las muestras de suero. En todos los casos, se obtuvieron respuestas lineales con intercepción cero, coeficientes de correlación superior a 0.999 y una desviación estándar relativa (DSR) inferior al 5%.

2.5. Control de Calidad

Durante el estudio se aplicó un programa de control de calidad analítico (**Tabla 1**). Los blancos analíticos (preparados siguiendo exactamente el mismo procedimiento utilizado para las muestras de suero) fueron incluidos en todos los lotes, y los resultados correspondientes se utilizaron para calcular los límites de detección (LOD, calculado como 3 veces la desviación estándar de los blancos); todas las muestras, tanto de suero como de plasma, estaban por encima del LOD. La exactitud analítica fue evaluada mediante el uso de un material de referencia certificado (CRM Animal serum NIST1598a) y muestras añadidas (hasta 2 a 10 veces más altos que los niveles normales en suero).

Además, para evaluar la precisión del análisis cuando se utilizan muestras de plasma o suero, se realizó una prueba intra (evaluada a partir de 10 repeticiones de la misma muestra) e inter-ensayo (evaluada mediante la preparación de 10 soluciones de digestión de la misma muestra en diferentes días) durante el estudio.

2.6. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS para Windows (v.21.0). La precisión del análisis en las muestras de plasma y suero se evaluó mediante el uso de la desviación relativa estándar (DRS). Las diferencias entre las concentraciones de minerales en plasma y suero se verificaron mediante un T-test. La correlación entre las concentraciones de oligoelementos en plasma y suero se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Tabla 1. Resultados del programa de control de calidad analítica.

	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Animal Serum NIST 1598a		Muestras añadidas (% recuperación)	
		Valor certificado ($\mu\text{g L}^{-1}$) ¹	Recuperación (%)	plasma	suero
As	0.002	(0.3) ²	ND	93.8±7.4	84.2±6.5
B	0.001	--		93.1±5.2	95.8±13.1
Ba	0.010	--		91.0±4.9	83.9±4.1
Ca	0.020	96±7	95	101.4±3.8	99.8±5.2
Cd	0.011	0.048±0.004	91	96.1±5.7	99.1±10.1
Co	0.008	1.24±0.07	93	88.8±3.2	91.1±1.7
Cr	0.093	0.33±0.08	ND	91.5±8.2	96.4±12.0
Cu	0.130	1580±90	95	91.1±5.7	96.1±5.7
Fe	0.147	1680±60	102	91.5±8.2	95.8±13.1
Hg	0.050	0.32±0.19	94	89.1±8.4	84.2±3.2
Li	0.141	--		88.1±9.4	105.1±11.0
Mg	0.050	--		92.6±5.2	96.1±5.7
Mn	0.014	1.78±0.33	103	91.5±1.2	88.8±4.4
Mo	0.089	5.5±1.0	98	96.1±5.7	86.1±8.7
Ni	0.112	0.94±0.18	97	97.1±6.9	106.1±5.7
P	0.017	(140)	99	96.1±5.7	101.3±2.6
Pb	0.022	--		89.4±11.9	89.4±5.2
Sb	0.001	1.00±0.15	105	93.1±5.7	96.1±5.7
Se	0.023	134.4±5.8	102	99.1±7.7	98.1±5.2
Sr	0.015	--		105.4±4.8	99.5±1.2
Zn	0.005	880±24	98	91.5±6.5	95.6±6.7

¹ excepto para Ca, Mg y P que están expresados en mg L^{-1} // ² en paréntesis valores indicativos // ND: no detectado // LD: límite de detección

Tabla 2. Resultados del estudio de precisión intra- e inter-ensayo (expresado como DSR) para muestras de plasma y suero.

Elemento	<i>Intra-ensayo</i> (n=10)		<i>Inter-ensayo</i> (n=10)	
	plasma	suero	plasma	suero
As	4.54	5.33	4.36	4.50
B	2.46	2.88	4.19	7.17
Ba	2.55	2.76	5.11	4.51
Ca	1.79	1.93	2.46	2.59
Cd	6.81	6.04	7.49	7.64
Co	2.14	1.89	3.84	3.67
Cr	3.36	4.59	8.22	8.96
Cu	1.83	2.84	2.35	5.24
Fe	1.69	2.20	3.70	4.07
Hg	7.98	8.24	8.33	9.67
Li	4.92	6.84	6.11	6.64
Mg	2.06	2.46	4.57	4.72
Mn	2.91	2.44	2.77	4.74
Mo	1.07	1.14	1.97	2.48
Ni	3.93	3.96	6.76	7.10
P	2.67	3.20	2.96	3.32
Pb	2.46	4.97	5.66	6.79
Sb	2.96	3.27	3.86	3.20
Se	2.86	3.22	3.09	3.28
Sr	2.26	1.87	3.20	2.87
Zn	1.64	2.23	2.10	2.57

3. Resultados y discusión

3.1. Precisión intra e inter-ensayo

Los resultados del estudio de precisión intra- (evaluado en 10 repeticiones de la misma muestra) e inter-ensayo (evaluado en 10 soluciones de la misma muestra preparadas y analizadas en días diferentes) para la determinación de elementos esenciales y tóxicos en muestras de plasma y suero aparecen reflejados en la **Tabla 2**. En general, los resultados son aceptables (<5% intra-ensayo y <10% inter-ensayo para la mayoría de los elementos) con sólo pequeñas diferencias entre las muestras de plasma y de suero, si bien en general la precisión del análisis tendió a ser ligeramente mejor en las muestras de plasma para la mayor parte de los elementos, y particularmente para aquellos de mayor interés para evaluar el estado de salud y nutrición del rebaño (macroelementos y oligoelementos esenciales). Estos resultados eran esperables puesto que los posibles efectos de matriz y/o interferencias en ambos tipo de muestras son similares y posiblemente pequeños tras someter las muestras a una digestión ácida. Este hecho, junto con los bajos límites de detección y los resultados de exactitud del método (determinados a partir de los estudios de recuperación en el material de referencia certificado y en muestras añadidas; **Tabla 1**) garantizan una buena calidad de análisis en cualquier de los dos tipos de muestra.

3.2. Análisis de muestras pareadas de suero y plasma

Los resultados de las concentraciones de elementos esenciales y tóxicos en muestras pareadas de plasma y de suero (n=20) aparecen reflejados en la **Tabla 3**. Dentro de los oligoelementos esenciales, las concentraciones de Cu (40.9%) y Se (29.9%) fueron estadísticamente superiores en plasma que en suero, mientras que para Mn (9.9%) ocurrió lo contrario. La disminución significativa de las concentraciones de Cu en el suero en comparación con el plasma está bien descrita en la literatura científica para ganado vacuno (Laven et al., 2007) y otras especies de rumiantes como ovejas (Laven and Smith, 2008) y cabras (Laven and Lawrence, 2012), a pesar de que no ha sido observada en rumiantes cérvidos como ciervo rojo (Laven and Wilson, 2009) así como en la mayoría de mamíferos (Suttle, 2010). En rumiantes bóvidos ocurre un secuestro significativo de Cu en el coágulo durante las etapas tempranas del proceso de coagulación (Paynter, 1982). En ganado vacuno se ha estimado que las concentraciones de Cu en suero son, por término medio, alrededor 3 $\mu\text{mol/L}$ (190 mg/L) inferiores al equivalente de las concentraciones de Cu en plasma (Laven et al., 2007), si bien el grado en el que ocurre esta retención de Cu en el coágulo es altamente variable.

Tabla 3. Comparación de las concentraciones de elementos esenciales y tóxicos en muestras pareadas (n=20) de plasma y suero bovino. Todos los elementos están expresados en $\mu\text{g L}^{-1}$, excepto para Ca, Mg y P que están expresados en mg L^{-1} .

	plasma			suero			P
	media \pm ES	mediana	rango	media \pm ES	mediana	rango	
As	3.63 \pm 0.11	3.57	2.76-4.42	3.53 \pm 0.09	3.59	2.72-4.24	0.492
B	302 \pm 8	303	234-361	305 \pm 8	306	227-366	0.797
Ba	13.6 \pm 1.05	13.1	7.69-24.3	13.5 \pm 1.20	12.8	6.74-25.2	0.943
Ca	108 \pm 1	109	99-114	107 \pm 1	106	100-114	0.306
Cd	0.158 \pm 0.025	0.129	0.036-0.407	0.169 \pm 0.020	0.140	0.074-0.397	0.715
Co	0.361 \pm 0.012	0.371	0.265-0.460	0.379 \pm 0.015	0.376	0.245-0.498	0.367
Cr	5.72 \pm 0.49	5.28	3.19-10.8	5.06 \pm 0.44	5.30	2.34-9.29	0.326
Cu	965 \pm 36	941	748-1418	685 \pm 21	684	530-869	0.000
Fe	1969 \pm 90	1882	1274-2840	2263 \pm 186	2003	1457-5411	0.852
Hg	0.153 \pm 0.012	0.138	0.087-0.316	0.321 \pm 0.021	0.319	0.195-0.497	0.000
Li	16.0 \pm 0.5	16.0	12.5-20.9	15.5 \pm 0.8	15.8	10.8-22.7	0.549
Mg	36.0 \pm 1.2	35.4	23.5-45.9	37.1 \pm 1.1	38.0	25.0-46.4	0.510
Mn	2.22 \pm 0.05	2.20	1.76-2.72	2.44 \pm 0.103	2.38	1.93-3.72	0.026
Mo	185 \pm 36	135	69-773	191 \pm 36	144	71-784	0.911
Ni	2.16 \pm 0.09	2.09	1.46-2.86	1.88 \pm 0.11	1.85	1.21-3.04	0.051
P	255 \pm 13	266	110-339	265 \pm 13	274	116-379	0.590
Pb	0.659 \pm 0.146	0.457	0.014-2.068	1.188 \pm 0.200	0.970	0.154-3.050	0.043
Sb	1.93 \pm 0.09	1.98	1.27-2.58	2.02 \pm 0.10	1.87	1.49-3.03	0.484
Sr	118 \pm 5	114	84-181	117 \pm 5	117	79-173	0.966
Se	82.6 \pm 4.4	80.1	41.9-113.2	63.6 \pm 2.6	62.2	39.3-93.6	0.001
Zn	952 \pm 47	978	514-1256	862 \pm 47	892	387-1313	0.185

ES: error standard

En general se considera que es la CP--el principal componente de Cu a nivel sanguíneo y que representa aproximadamente el 70-90% del Cu total a nivel plasmático (Frieden, 1980)--la fracción que queda retenida en el coágulo durante el proceso de coagulación, mientras que otros elementos de Cu plasmático (como el enzima Cu-Zn- superóxido dismutasa) no se ven afectados (Paynter, 1982). Si bien se desconocen los mecanismos implicados en la pérdida de CP en el coágulo se ha sugerido que pueda estar implicada una de las proteasas que forman parte de la cascada de la coagulación (Paynter, 1982), activando los residuos de ácido siálico o de sus receptores para inducir su unión. El secuestro de la CP puede ser a través de la unión de los residuos de ácido siálico presente en la CP a receptores en eritrocitos o plaquetas. Alternativamente, el secuestro de CP puede implicar residuos de ácido siálico de plaquetas, y en menor medida en los eritrocitos, los cuales contienen considerablemente menos ácido siálico que las plaquetas (Madoff et al., 1964). Estudios más recientes indican que otras fracciones del Cu plasmático aparte de la CP podrían estar implicados (Laven et al., 2008), si bien no se han propuesto unos mecanismos de acción.

Por otro lado, el posible efecto de retención en el coágulo de otros oligoelementos, y que podría explicar la disminución significativa de Se en el suero encontrado en nuestro estudio, no ha sido descrito en rumiantes o en otra especie animal incluyendo al hombre. En el plasma el Se se encuentra en forma de seleno proteína-P, glutatión peroxidasa y albúmina (Harrison et al., 1996), y a pesar de que es sabido que la enzima glutatión peroxidasa dependiente de Se tiene un papel en la formación del trombo (Wang et al., 1981; Jin et al., 2011). No obstante, no conocemos los mecanismos por los que se pierde Se durante el proceso de coagulación y que pudiera explicar nuestros resultados. Sin embargo, el hecho que la proporción del Cu y Se aparentemente perdido durante la formación de coágulo (estimado como la proporción de Cu y Se en suero/plasma) estén correlacionados en nuestro estudio ($p < 0.05$) parece sugerir que parte del Se en plasma queda retenido en el coágulo durante el proceso de coagulación y merece una investigación más profunda.

Además, tampoco se ha descrito previamente en la literatura científica un aumento de la concentración de Mn en suero en comparación con el plasma como la observada en nuestro estudio. Por el contrario, se han descrito mayores concentraciones de Fe y Zn en suero en el hombre (Killilea et al., 2017). Este hecho se ha atribuido a una pérdida o fuga de mineral de los eritrocitos y hace que sea esencial controlar el proceso de hemólisis durante la extracción de sangre y su posterior manipulación en el laboratorio (Killilea et al., 2017). En el caso del Zn además se ha descrito una liberación significativa de las plaquetas que se agregan o disgregan durante el proceso de coagulación implicado en la preparación de la muestra de suero (Kasperek et al., 1981). En ninguno de los estudios descritos anteriormente se evaluó la

influencia de la hemólisis y/o coagulación en un aumento aparente de la concentración de Mn en suero. Sin embargo, es bien sabido que la mayoría del Mn en la sangre está contenida dentro de los eritrocitos (representando el 68% del total Mn en la sangre, Milne et al., 1990), lo que hace que un pequeño fenómeno de hemólisis pueda liberar una cantidad significativa de Mn al suero. A pesar de que no alcanza una significación estadística, las concentraciones de Fe en el suero en nuestro estudio son numéricamente superiores (15%) a las descritas en el plasma, lo cual podría sugerir que un bajo grado de hemólisis (menos de 0.5 g Hb/L; Killilea et al., 2017) pueda haber ocurrido en algunas de las muestras de suero. Este hecho, junto con la alta asociación (coeficiente de Pearson $r=0.890$) entre la proporción de Fe y Mn en suero/plasma, $p=0.000$) podría indicar que la fuga de los eritrocitos podría ser la razón, al menos en parte, de las mayores concentraciones de Mn y Fe en suero en nuestro estudio.

En cuanto a los elementos tóxicos en nuestro estudio se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de Hg y Pb, siendo éstas aproximadamente el doble en suero en comparación con el plasma. Es bien conocido que tanto el Pb (Bergdah et al., 1997) como el Hg (Weed et al., 1962) tienen una gran afinidad por los eritrocitos y es posible que las concentraciones más altas de estos elementos encontradas en el suero puedan estar relacionadas con un escape o fuga desde los eritrocitos durante la manipulación de la muestra de sangre. Sin embargo, las concentraciones de ambos elementos tóxicos son muy bajas en nuestras muestras (en el rango de 1 $\mu\text{g/L}$, correspondiendo a un nivel muy bajo de exposición medioambiental, Puls, 1994) y la falta de asociaciones significativas entre los ratios suero/plasma con la de otros elementos como Mn y Fe ($p>0.05$) no parece apoyar esta hipótesis. Otra explicación posible podría ser una pequeña contaminación de los tubos para recolección de sangre. De ser el caso se esperaría que afectase en igual medida a todas las muestras de suero, aumentando las concentraciones de estos elementos en suero en todas las muestras en igual medida por encima de las concentraciones de plasma. Si este fuese el caso, las concentraciones de suero y plasma deberían estar también correlacionadas (**Figura 1**), sin embargo la asociación entre ambos fue muy débil para el Hg y no significativa para el Pb.

3.3. Correlaciones entre plasma y suero

Los resultados del análisis de correlación entre las concentraciones plasmáticas y séricas de los elementos estudiados se presentan en la **Figura 1**. En general, se encontraron correlaciones estadísticamente significativas para la mayoría de los elementos (excepto Ni, Pb y Sb) analizados en nuestro estudio. Esta asociación fue muy fuerte para algunos elementos como Mo ($r = 0.999$, $p < 0.001$) pero, en general, buena ($r > 0.8$, $p < 0.001$) para la mayoría de los elementos esenciales que tienen un

interés principal desde el punto de vista de estado de salud y nutricional del rebaño. La variación entre las concentraciones séricas y plasmáticas podría explicarse considerando la variabilidad en el análisis (estudio de precisión intra e inter-ensayo). En el caso del Fe y Mn, en los que se sospechó que los valores altos en algunas muestras de suero podrían deberse a un fenómeno hemolítico, la asociación fue menor ($r = 0.749$ y 0.721) y estuvo influenciada negativamente por estas muestras hemolizadas; de hecho, eliminando estas muestras del análisis la asociación fue más fuerte. Para el Cu, la asociación fue menor ($r = 0.586$, $p < 0.01$) lo cual está de acuerdo con los datos publicados en ganado vacuno que indican que la relación entre el Cu en suero y plasma es pobre debido a la marcada variabilidad en la pérdida aparente de Cu durante la coagulación (Laven et al., 2007). Finalmente, se encontraron asociaciones significativas entre las concentraciones plasmáticas y séricas de los principales elementos tóxicos (excepto Pb) a pesar de estar presentes en concentraciones muy bajas.

4. Conclusiones

Nuestros resultados indican que tanto las muestras de plasma como de suero sanguíneo parecen ser adecuadas e intercambiables para la determinación de la mayoría de los elementos esenciales y tóxicos en ganado vacuno. Las únicas excepciones parecen ser Cu y Se para los cuales se encontraron niveles significativamente más bajos en suero que en plasma; a pesar de que este hallazgo está bien descrito para Cu en los rumiantes bóvidos, merece una investigación adicional en el caso del Se en otras especies animales. Finalmente señalar que se debe prestar especial atención a la hora de obtener y procesar las muestras de sangre para evitar la hemólisis (particularmente en el caso del suero), ya que conduce a una sobreestimación de los elementos que se encuentran en concentraciones altas en el interior de los eritrocitos (Fe, Mn o Zn).

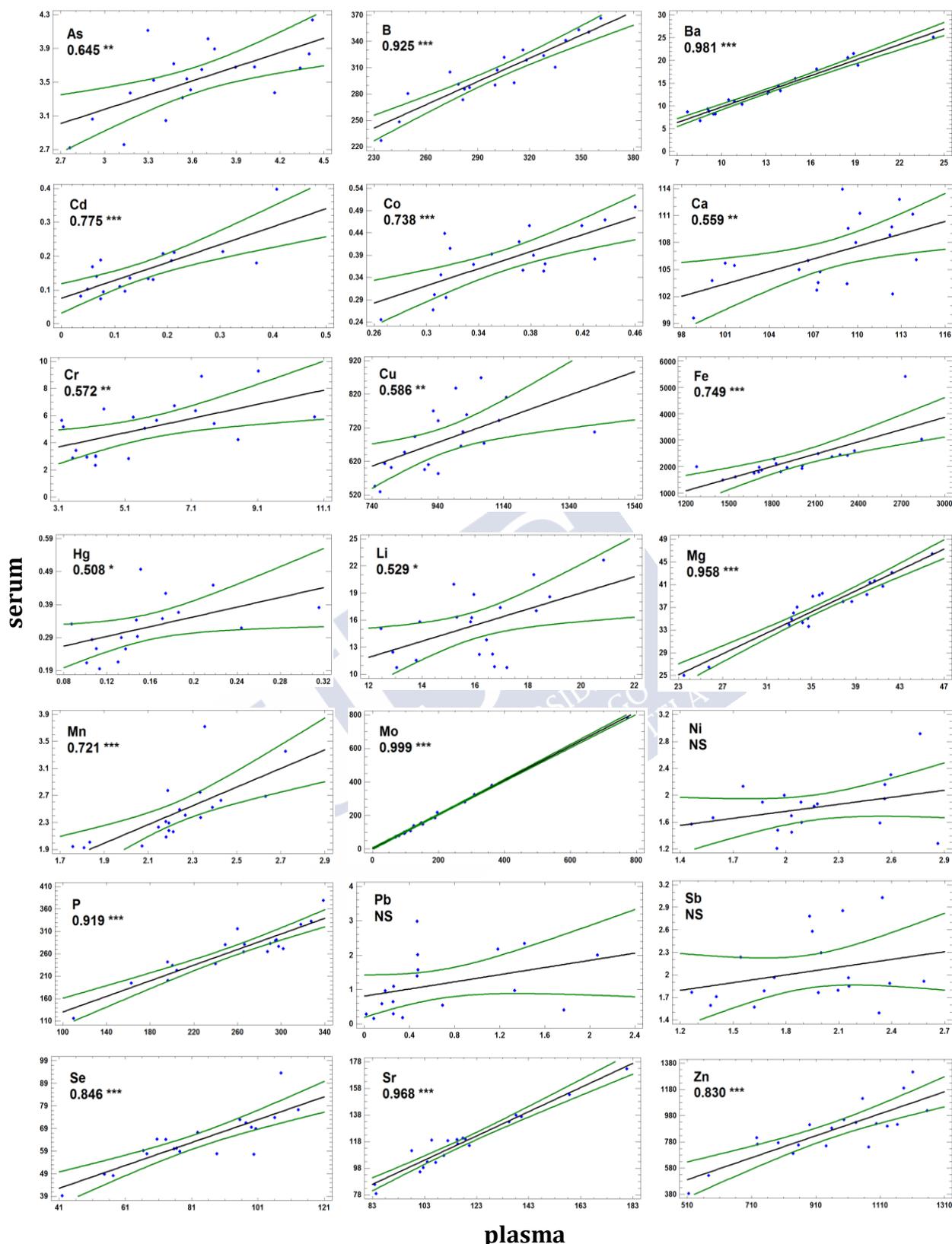


Figura 1. Relación entre las concentraciones de elementos esenciales y tóxicos en suero y plasma (en $\mu\text{g L}^{-1}$, excepto para Ca, P y Mg en mg L^{-1}) expresados como coeficiente de correlación de Pearson (r) y probabilidad (* <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001).

Referencias

- Bergdahl, I.A., A. Grubb, A. Schütz, R.J. Desnick, J.G. Wetmur, S. Sassa, and S. Skerfving. 1997. Lead Binding to δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase (ALAD) in Human Erythrocytes. *Pharmacol. Toxicol.* 81:153–158. doi:10.1111/j.1600-0773.1997.tb02061.x.
- Frieden, E. 1980. Caeruloplasmin: A Multi-Functional Metalloprotein of Vertebrate Plasma. *Ciba Found. Symp.* 79:93–124.
- Harrison, I., D. Littlejohn, and G.S. Fell. 1996. Distribution of selenium in human blood plasma and serum. *Analyst* 121:189–194. doi:10.1039/AN9962100189.
- Jin, R.C., C.E. Mahoney, L. (Coleman) Anderson, F. Ottaviano, K. Croce, J.A. Leopold, Y.-Y. Zhang, S.-S. Tang, D.E. Handy, and J. Loscalzo. 2011. Glutathione Peroxidase-3 Deficiency Promotes Platelet-Dependent Thrombosis In Vivo. *Circulation* 123:1963–1973. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.000034.
- Kendall, N., and P. Bone. 2006. Fertility and trace elements - An underestimated problem. *Cattle Pract.* 14:17–22.
- Killilea, D.W., F. Rohner, S. Ghosh, G.E. Otoo, L. Smith, J.H. Siekmann, and J.C. King. 2017. Identification of a Hemolysis Threshold That Increases Plasma and Serum Zinc Concentration. *J. Nutr.* 147:1218–1225. doi:10.3945/jn.116.247171.
- Laven, R., K. Lawrence, and C. T Livesey. 2007. The assessment of blood copper status in cattle: A comparison of measurements of caeruloplasmin and elemental copper in serum and plasma. *N. Z. Vet. J.* 55:171–176. doi:10.1080/00480169.2007.36763.
- Laven, R.A., and K.E. Lawrence. 2012. An evaluation of the effect of clotting on the recovery of copper from caprine blood. *Vet. J.* 192:232–235. doi:10.1016/j.tvjl.2011.06.005.
- Laven, R.A., K.E. Lawrence, and C.T. Livesey. 2008. An evaluation of the copper sequestered during clotting in cattle: Is it just caeruloplasmin?. *Vet. J.* 176:397–399. doi:10.1016/j.tvjl.2007.03.016.
- Laven, R.A., and C.T. Livesey. 2006. An evaluation of the effect of clotting and processing of blood samples on the recovery of copper from bovine blood. *Vet. J.* 171:295–300. doi:10.1016/j.tvjl.2004.11.008.
- Laven, R.A., and S.L. Smith. 2008. Copper deficiency in sheep: An assessment of the relationship between concentrations of copper in serum and plasma. *N. Z. Vet. J.* 56:334–338. doi:10.1080/00480169.2008.36856.
- Laven, R.A., and P.R. Wilson. 2009. Comparison of concentrations of copper in plasma and serum from farmed red deer (*Cervus elaphus*). *N. Z. Vet. J.* 57:166–169. doi:10.1080/00480169.2009.36897.
- López-Alonso, M. 2012a. Animal feed contamination by toxic metals. In: *Animal Feed Contamination* pp. 183-204. Woodhead Publishing.

- López-Alonso, M. 2012b. Trace Minerals and Livestock: Not Too Much Not Too Little. *ISRN Vet. Sci.* 2012:1–18. doi:10.5402/2012/704825.
- Ludwick, T.P., R.H. Poppenga, P.G. Green, B. Puschner, L.A. Melton, B.R. Hoar, N.L. Nyberg, and J. Maas. 2008. The correlation of potassium content and moisture in bovine liver samples analyzed for trace mineral concentrations. *J. Vet. Diagnostic Investig.* doi:10.1177/104063870802000308.
- Luna, D., M. Miranda, A.H.H. Minervino, V. Piñeiro, C. Herrero-Latorre, and M. López-Alonso. 2019. Validation of a simple sample preparation method for multielement analysis of bovine serum. *PLoS One* 14:e0211859. doi:10.1371/journal.pone.0211859.
- Madoff, M.A., S. Ebbe, and M. Baldini. 1964. Sialic Acid of Human Blood Platelets. *J. Clin. Invest.* 43:870–877. doi:10.1172/JCI104972.
- Milne, D.B., R.L. Sims, and N. V Ralston. 1990. Manganese content of the cellular components of blood. *Clin. Chem.* 36.
- Paynter, D.I. 1982. Differences between serum and plasma ceruloplasmin activities and copper concentrations: Investigation of possible contributing factors. *Aust. J. Biol. Sci.* doi:10.1071/BI9820353.
- Puls R. 1994. *Mineral Levels in Animal Health*. second. Clearbrook: Sherpa International, Canada.
- Stachowicz, A., M. Zabczyk, J. Natorska, M. Suski, R. Olszanecki, R. Korbut, J.R. Wiśniewski, and A. Undas. 2018. Differences in plasma fibrin clot composition in patients with thrombotic antiphospholipid syndrome compared with venous thromboembolism. *Sci. Rep.* 8:17301. doi:10.1038/s41598-018-35034-x.
- Suttle, N.F. 2010. *Mineral Nutrition of Livestock: Fourth Edition*. Four ed. CABI, Wallingford, UK. <https://doi.org/10.1079/9781845934729.0000>
- Telfer, S.B., N. Kendall, D. V Illingworth, and A. Mackenzie. 2004. Molybdenum Toxicity in cattle: an underestimated problem. *Cattle Pract.* 12:259–263.
- Wang, Y.X., K. Böcker, H. Reuter, J. Kiem, K. Kasperek, G. V Iyengar, F. Loogen, R. Gross, and L.E. Feinendegen. 1981. Selenium and myocardial infarction: Glutathione peroxidase in platelets. *Klin. Wochenschr.* 59:817–818. doi:10.1007/BF01724689.
- Weed, R.I., J. Eber, and A. Rothstein. 1962. Interaction of Mercury with Human Erythrocytes. *J. Gen. Physiol.* 45:395–410. doi:10.1085/jgp.45.3.395.



Capítulo 3

Variación en el contenido de los elementos traza entre los lóbulos hepáticos en el ganado vacuno. Importancia del punto de muestreo.

Adaptado de:

Luna D, Miranda M, Pereira V, López-Alonso M. 2019. Variation in trace element content between liver lobes in cattle. How important is the sampling site?. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 52: 53-57. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.11.008>

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue establecer el patrón de distribución lobular de los elementos traza en el hígado del ganado vacuno y determinar qué parte del hígado proporcionaría una estimación precisa del contenido de los elementos traza de todo el órgano. Se tomaron muestras de hígado en el momento del sacrificio de 10 terneros de raza Holstein-Friesian (HF), 10 terneros de Rubia Gallega (RG) y 10 terneros cruces de ambas razas RG x HF, todos con una edad de 10 meses. Se tomaron muestras de 6 regiones del hígado: las caras interna y externa del lóbulo derecho (ID y ED respectivamente); el lóbulo izquierdo (I), el lóbulo caudado (CAU), el lóbulo cuadrado (CUA) y el proceso papilar (PP). Las muestras se sometieron a digestión ácida en un sistema de microondas y los elementos traza se determinaron mediante espectroscopía de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS). La distribución de todos los elementos traza, excepto el cobalto y el zinc, varió significativamente en todo el hígado. En todos los casos, las concentraciones fueron más altas en el lóbulo I y más bajas en CAU. Las variaciones en la distribución entre las otras áreas del hígado (ED, ID, CUA, PP) no fueron significativas. La distribución de los elementos traza puede estar relacionada con la perfusión sanguínea (oxígeno). Además, el contenido de los elementos traza en el lóbulo CAU se correlacionó débilmente con el contenido de los otros lóbulos, y la capacidad del lóbulo I para acumular altos niveles de elementos traza solo se observaría en casos de niveles muy altos de exposición. Teniendo en cuenta los hallazgos principales del estudio, una muestra única de hígado tomada de cualquier región anatómica (excluyendo los lóbulos CAU y I) sería adecuada para determinar el estado de los elementos traza del ganado vacuno.

Palabras Clave: elementos traza, lóbulos hepáticos, ganado vacuno, variabilidad de muestreo

1. Introducción

Los minerales traza son necesarios para el funcionamiento normal de casi todos los procesos bioquímicos en el organismo (Suttle, 2010). Las deficiencias de los elementos traza son frecuentes en todo el mundo y están estrechamente relacionadas con la mala salud y productividad de los animales; sin embargo, la exposición excesiva también tiene efectos perjudiciales para la salud y la producción (López-Alonso, 2012). Además, las interacciones entre elementos traza, particularmente cuando están presentes en concentraciones altas o desequilibradas, determinan en

gran medida las necesidades fisiológicas y con frecuencia están involucradas en la patogénesis de numerosos trastornos en animales de granja (por ejemplo, la interacción entre cobre, azufre y molibdeno, o entre cobre, hierro y zinc en rumiantes: Suttle, 2010). La determinación del estado de los elementos traza es una herramienta de diagnóstico esencial cuando tenemos problemas en el rebaño asociados con la disminución de la productividad, la baja fertilidad y alteraciones de la inmunidad. Dentro de las muestras no invasivas, la medición de las concentraciones de los elementos traza en sangre (suero o plasma) puede proporcionar información útil sobre el estado de los elementos traza, aunque no sea posible discriminar entre deficiente, adecuada o incluso excesiva exposición a los elementos traza en algunas circunstancias. Por ejemplo, en algunos animales las concentraciones de cobre en suero o plasma pueden estar dentro del rango adecuado, pero los niveles hepáticos pueden estar muy bajos (Herdt and Hoff, 2011). Del mismo modo, la deficiencia de cobre puede ser diagnosticada en base a una baja concentración de cobre en suero y/o plasma y un estado tóxico o cercano a tóxico se puede observar tras una necropsia o biopsia hepática (Blakley and Hamilton, 1985; López-Alonso et al, 2006). Además, las concentraciones de los elementos traza en la sangre son generalmente de 1 a 100 veces más bajas que en los tejidos (particularmente del hígado) y varían dentro de un estrecho rango (Herdt and Hoff, 2011), lo que puede hacer el diagnóstico impreciso, particularmente en laboratorios con poca experiencia en el análisis de elementos traza.

Dentro de los tejidos corporales, el hígado es generalmente considerado el mejor tejido para evaluar el estado de los elementos traza en el ganado vacuno porque es un órgano de almacenamiento para la mayoría de los elementos traza y además es de fácil muestreo (Suttle, 2010). Aunque la biopsia hepática in vivo es un procedimiento simple y con bajo riesgo, los ganaderos a menudo se muestran reacios a aceptar que su ganado sea sometido a este procedimiento. Además, la cantidad de muestra obtenida es pequeña y puede ser insuficiente y/o estar contaminada con sangre (Braselton et al., 1997). Sin embargo, se considera que las muestras de hígados post mortem en el momento del sacrificio son muy útiles para el control del estado mineral en el rebaño e incluso se ha propuesto para monitorear procesos desde el punto de vista de la nutrición humana (por ejemplo, para monitorear la acumulación excesiva de cobre en el ganado vacuno: EFSA, 2016). Cuando se recogen muestras de hígado en el momento del sacrificio, es importante recordar que los elementos traza no se distribuyen de forma homogénea en todo el órgano. Aunque los datos disponibles en ganado son limitados (Braselton et al., 1995; Miranda et al., 2010), se ha demostrado en humanos una distribución heterogénea de los elementos traza en el parénquima hepático (Faa et al., 1987; Ambu et al., 1995; Liggi et al., 2013). Los estudios recientes también indican posibles diferencias en el metabolismo de los

elementos traza entre razas según su aptitud, esto es las de tipo catabólico o de secreción (típico de las razas de ordeño) o las de tipo anabólico o de acreción (característico de las razas de carne) (Bellmann et al., 2004; Pfuhl et al., 2007; Pereira et al., 2018), lo que podría conducir a diferentes patrones en la distribución hepática de los elementos traza. Esto añade una mayor incertidumbre al análisis de las concentraciones hepáticas de elementos traza.

Este estudio se realizó para establecer el patrón en la distribución interlobular de los elementos traza en el hígado del ganado vacuno y que puede estar relacionado con el metabolismo hepático y/o puede variar entre las razas, dependiendo de su aptitud. El objetivo general fue determinar qué área del hígado sería la más adecuada para evaluar el estatus de elementos traza.

2. Material y métodos

2.1. Muestras de hígado

Las muestras de hígado se obtuvieron de terneros que pertenecían a un amplio proyecto de evaluación del estado de los elementos traza. Los terneros se criaron en un cebadero comercial y recibieron una dieta típica o estándar de cría de ganado vacuno de carne. La dieta consistía en un concentrado a base de maíz, cebada y soja con un suplemento o premix mineral estándar (en mg/ kg de concentrado Co: 0,40, Cr: 2,91, Cu: 22,1, Fe: 163, Mn: 101, Mo: 1,12, Ni: 2,12, Se: 0,249, Zn: 102) y paja de cebada (ca. 1kg/animal/día). Más información detallada sobre los animales y las dietas aparece publicado previamente (Pereira et al., 2018).

Se recogieron muestras de hígado de 30 terneros, machos, de 10 meses de edad en el momento del sacrificio en un matadero comercial. De los 30 animales, 10 eran Holstein-Friesian (HF), 10 Rubia Gallega (RG) y 10 cruces de ambas razas RGxHF. El hígado se extrajo de la canal inmediatamente después del sacrificio y se tomaron muestras de aproximadamente 5 cm de largo x 3,5 cm de ancho x 3,5 cm de alto de 6 puntos del hígado (**gráfico 1**): caras interna y externa del lóbulo derecho (ID y ED, respectivamente), el lóbulo izquierdo (I), lóbulo caudado (CAU), lóbulo cuadrado (CUA) y del proceso papilar (PP). El lóbulo derecho externo ED es el lóbulo generalmente muestreado en procedimientos de biopsia hepática (Braselton et al., 1997; Miranda et al., 2010).

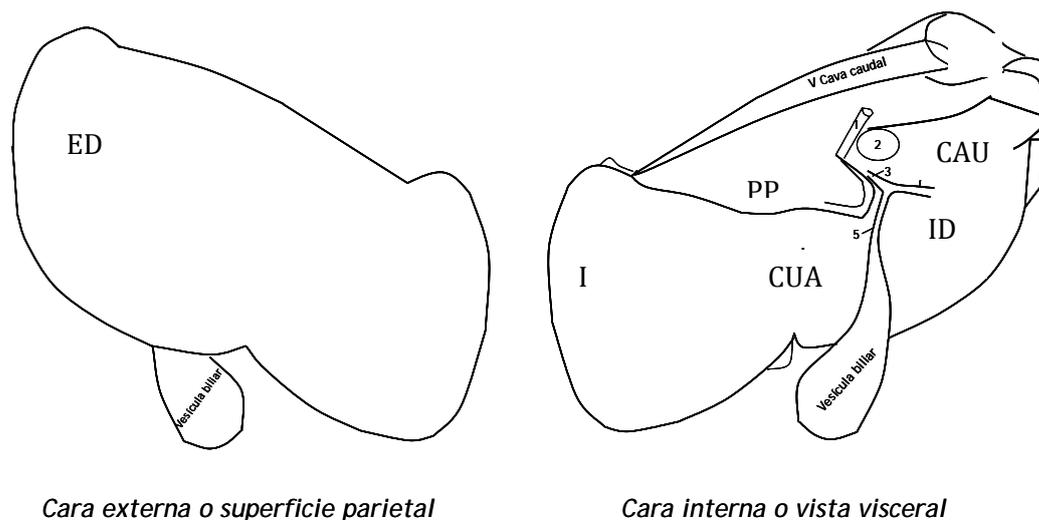


Gráfico 1. Puntos de toma de muestras: lóbulos hepáticos. Cara externa: ED: lóbulo derecho externo. Cara interna: ID: lóbulo derecho interno; CAU: lóbulo caudado; PP: proceso o apófisis papilar; CUA: lóbulo cuadrado I: lóbulo izquierdo. 1: arteria hepática; 2: vena porta; 3: conducto hepático; 4: conducto colédoco; 5: conducto cístico. (Imagen modificada del Popesko (1998). Atlas de anatomía topográfica de los animales domésticos).

2.2. Preparación y análisis de muestras

En el laboratorio, las muestras de hígado se separaron del tejido conectivo y los vasos sanguíneos principales y luego se homogeneizaron. Las sub-muestras de aproximadamente 2 gramos fueron digeridas en 5 mL de ácido nítrico al 69% y 2 mL de peróxido de hidrógeno 33% p/v en un sistema de digestión por microondas (Milestone, Ethos Plus). Las muestras digeridas fueron transferidas a tubos de polipropileno y se diluyeron hasta 25 mL con agua ultra pura mili-Q. Las concentraciones de los elementos traza (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se y Zn) se determinaron mediante espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS). Se aplicó un programa de control de calidad analítico durante todo el estudio. Los valores los blancos se monitorearon a lo largo del análisis y se restaron de las lecturas para el cálculo de los valores finales. Los límites de la detección (LoD) se calcularon como tres veces la desviación estándar de los blancos. Ninguna muestra estuvo por debajo del límite de detección. La exactitud y precisión del método fue determinada con material de referencia certificado (1577c Bovine Liver, National Institute of Standards & Technology, USA). La recuperación analítica fue de 103.7% (Co), 96.2 (Cr), 99.2 (Cu), 99.1 (Fe), 100.3 (Mn), 100.6 (Mo), 11.9 (Ni), 98.4 (Se) y 100.2 (Zn).

2.3. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con SPSS para Windows (v. 21). La normalidad de la distribución de los datos se verificó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para evaluar la influencia de los lóbulos hepáticos y la raza de los animales sobre los niveles de elementos traza se realizó un modelo lineal general (MLG). Para evaluar las diferencias en las concentraciones de elementos traza entre los lóbulos hepáticos se realizaron las pruebas post hoc DHS Tukey. Las correlaciones entre los elementos traza y los lóbulos hepáticos fueron evaluadas por el coeficiente de correlación de Pearson a un nivel de significación de $P < 0.05$.

3. Resultados y discusión

En la **tabla 1** se presentan los resultados del modelo lineal general por el que se evaluaron el efecto del lóbulo (ID, ED, I, CAU, CUA y PP) y de las razas (HF, RG, y RG x HF) en la distribución de los elementos traza en el hígado. Tanto el lóbulo como la raza son factores importantes en el análisis para la mayoría de los elementos traza. No se encontraron interacciones significativas entre el lóbulo y la raza para ningún elemento traza, lo que indica que la distribución de los elementos traza en el hígado es la misma en todas las razas de estudio (HF, RG, RG x HF), no habiendo diferencias entre ellas. En consecuencia, en el presente artículo se presentan y analizan todo el conjunto de animales ($n=30$), sin diferenciar por razas.

Tabla 1. Resumen del análisis del modelo lineal general de las concentraciones de elementos traza en el hígado, con la raza y lóbulo hepático como factores principales.

	raza	lóbulo	raza*lóbulo	R ²
Co	F _{2,179} = 7.511 ***	F _{5,179} = 0.403	F _{10,179} = 1.207	0.152
Cr	F _{2,179} = 1.270	F _{5,179} = 12.508 ***	F _{10,179} = 1.023	0.317
Cu	F _{2,179} = 12.324 ***	F _{5,179} = 2.768 *	F _{10,179} = 0.134	0.197
Fe	F _{2,179} = 0.736	F _{5,179} = 3.732 **	F _{10,179} = 0.391	0.129
Mn	F _{2,179} = 6.432 **	F _{5,179} = 5.165 ***	F _{10,179} = 0.519	0.213
Mo	F _{2,179} = 17.121 ***	F _{5,179} = 12.572 ***	F _{10,179} = 0.216	0.380
Ni	F _{2,179} = 0.213	F _{5,179} = 3,184 **	F _{10,179} = 0.756	0.191
Se	F _{2,179} = 0.565	F _{5,179} = 7.293 ***	F _{10,179} = 1.518	0.246
Zn	F _{2,179} = 4.774 **	F _{5,179} = 0.719	F _{10,179} = 0.028	0.077

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

En la **figura 1** se presenta la distribución de los elementos traza dentro de las diferentes áreas del hígado muestreadas. En general, los niveles de los elementos traza de todos los terneros incluidos en el estudio fueron adecuados (de acuerdo con Puls, 1994; Herdt and Hoff, 2011), únicamente las concentraciones del cobre fueron superiores a las adecuadas para el ganado vacuno. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución intrahepática de todos los elementos traza, excepto para el cobalto y el zinc. En todos los casos, las concentraciones fueron más altas en el lóbulo I y más bajas en el lóbulo CAU. Un patrón similar ha sido anteriormente descrito para el cobre en bovinos que recibieron una suplementación alta de cobre (Miranda et al., 2010) y puede estar relacionado con la proximidad del área del hígado a los vasos centrales. La perfusión de oxígeno puede ser mayor en las áreas más próximas a los vasos centrales (por ejemplo en el lóbulo CAU) y aportar una mayor actividad metabólica relacionada con la incorporación de los elementos traza en las enzimas para su exportación a tejidos (ceruloplasmina o ferritina, para el transporte de cobre y hierro, respectivamente) o por la excreción biliar. Por el contrario, la perfusión de oxígeno y la actividad metabólica puede ser más baja en regiones más alejadas de los vasos centrales (esto es, lóbulo I), lo que en consecuencia puede conducir a una mayor acumulación de los elementos traza.

Este patrón de acumulación de los elementos traza dentro del hígado (concentraciones más altas en el lóbulo I), pueden ser particularmente importantes en animales expuestos a concentraciones de elementos traza por encima de las necesidades fisiológicas, en la que se mantiene la homeostasis de los elementos traza, en gran medida, por la excreción biliar (Gooneratne et al., 1989).

Una distribución inter-lobular similar ha sido descrita en pacientes humanos con acumulación crónica de cobre (enfermedad de Wilson) y enfermedades de acumulación de hierro (Liggi et al., 2013; Ambu et al., 1995, respectivamente). En el caso de nuestro estudio, como en las explotaciones intensivas en general (López-Alonso, 2012), los terneros recibieron un suplemento mineral por encima de las necesidades fisiológicas y por lo tanto, es posible que las concentraciones más altas de los elementos traza en el lóbulo izquierdo puedan representar “depósitos” de los elementos traza (por ejemplo, cobre y zinc unidos a metalotioneínas, López-Alonso et al., 2005).

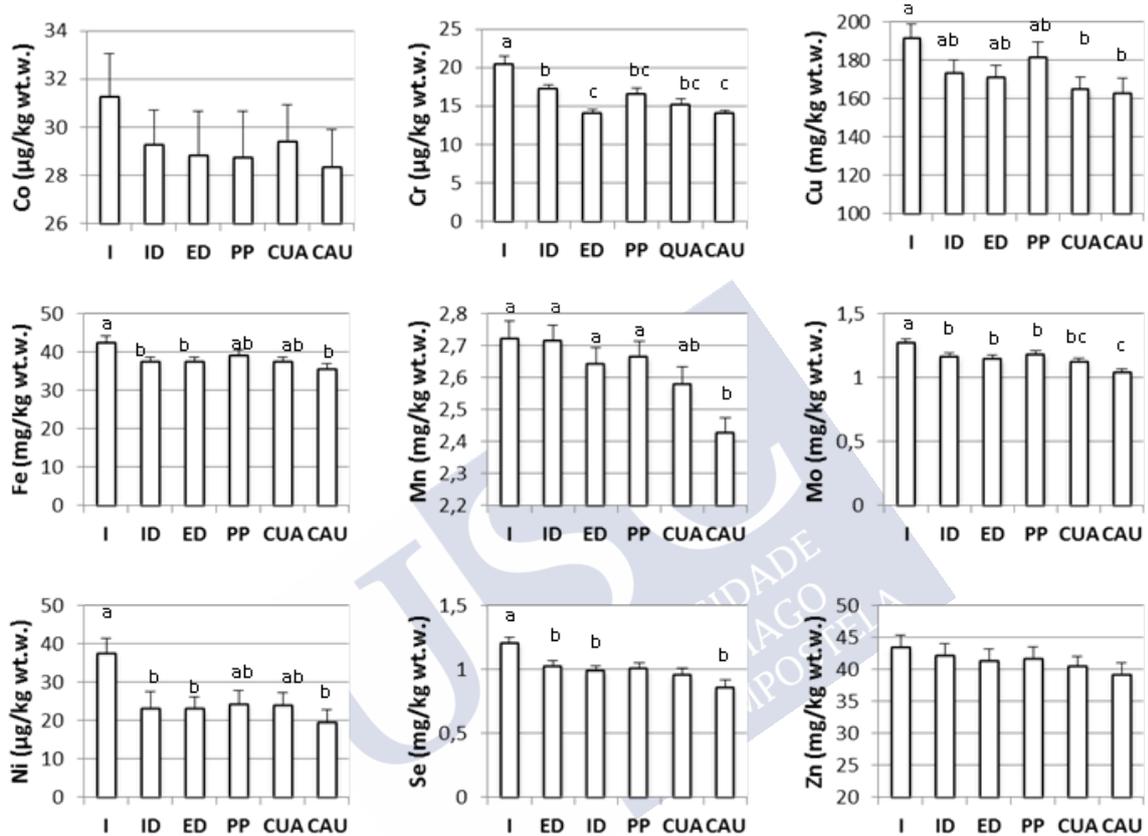


Figura 1. Concentración de elementos traza en los lóbulos del hígado (I: lóbulo izquierdo, ID: lóbulo derecho interno, ED: lóbulo derecho externo, PP: proceso papilar, CUA: lóbulo cuadrado, CAU: lóbulo caudado). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los lóbulos para $P < 0.05$. wt.t.: peso húmedo.

Si nuestra hipótesis fuera cierta, probablemente se observen diferencias más débiles o nulas entre el lóbulo izquierdo y otras áreas del hígado en animales con un bajo nivel de exposición a elementos traza. De hecho, Braselton et al. (1995) observaron concentraciones más bajas de cobre y hierro en el lóbulo izquierdo que en los otros lóbulos hepáticos en ganado vacuno con niveles bajos de elementos traza.

Para entender mejor la mayor acumulación de los elementos traza en el lóbulo izquierdo en el ganado vacuno en nuestro estudio, se evaluó la proporción (en %) de las concentraciones de elementos traza en los diferentes lóbulos hepáticos en relación con el lóbulo izquierdo (eje Y) en relación a las concentraciones de elementos traza en el lóbulo izquierdo (eje X) (**figura 2**). En general, los puntos por encima/por debajo del 100% indican concentraciones de elementos traza superiores/inferiores (respectivamente) en cada lóbulo en relación con el lóbulo izquierdo. Para la mayoría de los elementos traza, una gran proporción de la nube de puntos estaba por encima del 100% en los terneros que mostraron las menores concentraciones de elementos traza en el lóbulo izquierdo, pero disminuyó gradualmente a medida que aumentaban las concentraciones de elementos traza en el lóbulo izquierdo.

Para aquellos elementos traza suministrados en concentraciones más altas en el suplemento mineral del alimento concentrado en relación con las necesidades fisiológicas (cobre, manganeso y zinc), la mayor parte de la nube de puntos estaban por debajo del 100% del rango de concentraciones en el lóbulo izquierdo. Estos resultados sugieren además que la capacidad de almacenamiento del lóbulo izquierdo es mayor y/o comienza antes que el resto de las áreas del hígado, lo que hace que el lóbulo izquierdo sea la muestra menos apropiada para evaluar el estatus de los elementos traza. Por el contrario, la mayor capacidad de almacenamiento del lóbulo izquierdo sería interesante para biomonitorizar en casos de una acumulación excesiva en el hígado de un elemento traza que pueda tener consecuencias negativas para la salud animal o del consumidor (por ejemplo, para controlar la acumulación crónica de cobre en el ganado vacuno).

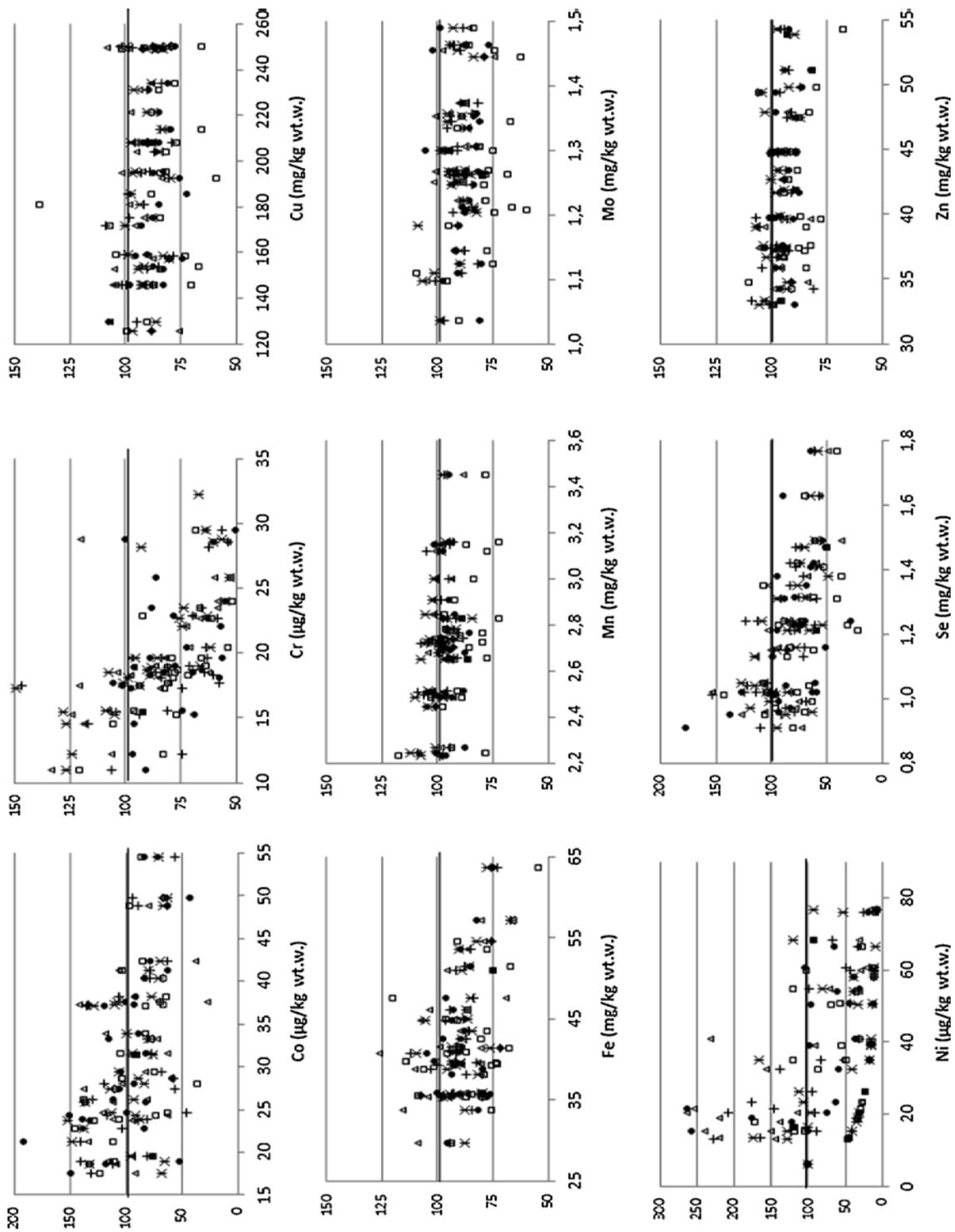


Figura 2. Gráfico mostrando la proporción (en %) de las concentraciones de los elementos traza en los diferentes lóbulos hepáticos en relación con el lóbulo izquierdo (eje Y) contra las concentración de los elemento traza en el lóbulo izquierdo (eje X). (Δ: proceso papilar, □: lóbulo caudado, ●: lóbulo cuadrado, +: lóbulo derecho externo, *: lóbulo derecho interno).

Tabla 2. Correlaciones de Pearson entre los lóbulos hepáticos (PP: proceso papilar, CAU: lóbulo caudado, CUA: lóbulo cuadrado, ED: lóbulo derecho externo, ID: lóbulo derecho interno, I: lóbulo izquierdo). *p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001.

	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Se	Zn
PP vs CAU	0.340	0.060	0.773***	0.422*	0.445*	0.642***	-0.009	0.267	0.921***
PP vs CUA	0.310	0.602***	0.925***	0.617***	0.834***	0.675***	0.061	0.274	0.970***
PP vs ED	0.618***	0.195	0.930***	0.790***	0.841***	0.869***	0.117	0.064	0.973***
PP vs ID	0.568**	-0.162	0.925***	0.814***	0.830***	0.763***	0.010	0.239	0.979***
PP vs I	0.492**	0.202	0.931***	0.671***	0.882***	0.758***	-0.224	-0.169	0.975***
CAU vs CUA	0.223	0.156	0.764***	0.630***	0.377*	0.479*	0.114	0.257	0.892***
CAU vs ED	0.333	0.482**	0.817***	0.608***	0.414*	0.672***	0.368*	0.420*	0.913***
CAU vs ID	0.466**	0.107	0.773***	0.597***	0.499**	0.676***	0.215	0.198	0.906***
CAU vs I	0.639***	0.127	0.725***	0.507***	0.388*	0.459*	0.347	-0.050	0.916***
CUA vs ED	0.353	0.032	0.897***	0.781***	0.875***	0.715***	0.119	-0.199	0.958***
CUA vs ID	0.568**	-0.120	0.915***	0.769***	0.821***	0.684***	0.202	-0.171	0.969***
CUA vs I	0.462*	0.369*	0.930***	0.814***	0.907***	0.746***	0.211	0.089	0.968***
ED vs ID	0.489**	0.206	0.921***	0.886***	0.816***	0.767***	0.126	0.284	0.971***
ED vs I	0.587**	0.125	0.919***	0.740***	0.851***	0.813***	-0.030	0.025	0.969***
ID vs I	0.569**	0.207	0.940***	0.828***	0.839***	0.734***	0.276	-0.002	0.978***

La **figura 2** también permite evaluar la variabilidad en la acumulación de los elementos traza dentro del hígado en relación con el lóbulo izquierdo. La variabilidad en general fue inferior al 50% (la mayoría de las muestras se encuentran entre el 75-125% de las del lóbulo I) para la mayoría de los elementos traza presentes en concentraciones de mg/kg de peso húmedo en el hígado (cobre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc), excepto el selenio. Para aquellos elementos que presentan concentraciones bajas (cobalto, cromo, y níquel), en rango de microgramos ($\mu\text{g}/\text{kg}$, peso húmedo), el nivel de variabilidad fue mayor (hasta 300% para níquel), con una tendencia hacia concentraciones más altas en el lóbulo izquierdo a mayor nivel de acumulación de elementos traza.

Las correlaciones entre las concentraciones de los elementos traza dentro de los diferentes lóbulos hepáticos se muestran en la **tabla 2**. Para los principales elementos traza, las correlaciones fueron generalmente muy altas y similares entre todos los lóbulos, hepáticos, con la excepción del lóbulo CAU ($\text{Cu} > 0.915$; $\text{Zn} > 0.906$; $\text{Mn} > 0.816$; $\text{Mo} > 0.675$; $\text{Fe} > 0.617$ para $P < 0.001$ en todos los casos). Estos resultados sugieren nuevamente una mayor actividad metabólica del lóbulo caudado para enviar los elementos traza a los tejidos (es decir, ceruploplasma o ferritina) y/o a la excreción biliar. Por otra parte, de nuevo, la única excepción fue el selenio, para el cual no hubo asociaciones significativas entre los lóbulos. Las razones por las que el selenio presenta esta distribución diferente en comparación con los principales elementos traza (cobre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc) no se conocen y necesitarían ser investigados en el futuro. Para los elementos traza presentes en bajas concentraciones (cobalto, cromo y níquel) las correlaciones entre los lóbulos fueron muy débiles ($P < 0.01$). En conjunto, estos hallazgos indican que el patrón de distribución de los principales elementos traza (excepto el selenio) a través del hígado fue muy similar en los animales de este estudio y por consiguiente, el análisis de una sola muestra de cualquiera de estos lóbulos (exceptuando el lóbulo CAU) sería representativa de todo el órgano.

4. Conclusiones

Una única muestra del hígado de la misma región anatómica (excluyendo los lóbulos caudado e izquierdo) sería adecuada para determinar el estatus de los elementos traza en el ganado vacuno. Esta propuesta se basa en los principales resultados del estudio, en los cuales: (1) los elementos traza se distribuyeron de manera desigual en los diferentes lóbulos hepáticos; (2) el lóbulo izquierdo parece tener una mayor capacidad de almacenamiento de elementos traza (lo que podría ser más importante con niveles altos de exposición); y (3) las concentraciones de los principales elementos traza están altamente correlacionadas entre los diferentes lóbulos

hepáticos (excepto para el lóbulo caudado y para el selenio). El lóbulo izquierdo es un buen punto de muestreo en casos de riesgo de acumulación hepática de altos niveles de elementos traza, como por ejemplo en casos de riesgo de toxicidad crónica por cobre.

Referencias

- Ambu, R., G. Crisponi, R. Sciot, P. Van Eyken, G. Parodo, S. Ianneli, F. Marongiu, R. Silvagni, V. Nurchi, V. Costa, G. Faa, and V.J. Desmet. 1995. Uneven hepatic iron and phosphorus distribution in beta-thalassemia. *J. Hepatol.* 23:544–549. doi:10.1016/0168-8278(95)80060-3.
- Bellmann, O., J. Wegner, C. Rehfeldt, F. Teuscher, F. Schneider, J. Voigt, M. Derno, H. Sauerwein, J. Weingärtner, and K. Ender. 2004. Beef versus dairy cattle: A comparison of metabolically relevant hormones, enzymes, and metabolites. *Livest. Prod. Sci.* 89:41–54. doi:10.1016/j.livprodsci.2003.12.007.
- Blakley, B.R., and D.L. Hamilton. 1985. Ceruloplasmin as an indicator of copper status in cattle and sheep. *Can. J. Comp. Med. Rev. Can. Med. Comp.* 49:405–8.
- Braselton, W.E., K.J. Stuart, T.P. Mullaney, and T.H. Herdt. 1997. Biopsy Mineral Analysis by Inductively Coupled Plasma--Atomic Emission Spectroscopy with Ultrasonic Nebulization. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 9:395–400. doi:10.1177/104063879700900409.
- EFSA. 2016. Revision of the currently authorised maximum copper content in complete feed. *EFSA J.* 14:e04563. doi:doi:10.2903/j.efsa.2016.4563.
- Faa, G., C. Liguori, A. Columbano, and G. Diaz. 1987. Uneven copper distribution in the human newborn liver. *Hepatology* 7:838–842. doi:10.1002/hep.1840070508.
- Gooneratne, S.R., B. Laarveld, R.K. Chaplin, and D.A. Christensen. 1989. Profiles of ⁶⁷Cu in blood, bile, urine and faeces from ⁶⁷Cu-primed lambs: Effect of ⁹⁹Mo-labelled tetrathiomolybdate on the metabolism of ⁶⁷Cu after long-term storage. *Br. J. Nutr.* 61:373–385. doi:S0007114589000425 [pii].
- Herdt, T.H., and B. Hoff. 2011. The Use of Blood Analysis to Evaluate Trace Mineral Status in Ruminant Livestock. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27:255–283. doi:10.1016/j.CVFA.2011.02.004.
- Liggi, M., C. Mais, M. Demurtas, O. Sorbello, E. Demelia, A. Civolani, and L. Demelia. 2013. Uneven distribution of hepatic copper concentration and diagnostic value of double-sample biopsy in Wilson's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 48:1452–1458. doi:10.3109/00365521.2013.845904.
- López-Alonso, M. 2012. Trace Minerals and Livestock: Not Too Much Not Too Little. *ISRN Vet. Sci.* 2012:1–18. doi:10.5402/2012/704825.

- López-Alonso, M., A. Crespo, M. Miranda, C. Castillo, J. Hernández, and J.L. Benedito. 2006. Assessment of some blood parameters as potential markers of hepatic copper accumulation in cattle. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 18:71–75. doi:10.1177/104063870601800109.
- López-Alonso, M., F. Prieto, M. Miranda, C. Castillo, J. Hernández, and J.L. Benedito. 2005. The role of metallothionein and zinc in hepatic copper accumulation in cattle. *Vet. J.* 169:262–267. doi:10.1016/j.tvjl.2004.01.019.
- Miranda, M., J.L. Benedito, B. Gutiérrez, M. García-Vaquero, I. Blanco-Penedo, and M. López-Alonso. 2010. The interlobular distribution of copper in the liver of beef calves on a high-copper diet. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22:277–281.
- Pereira, V., P. Carbajales, M. López-Alonso, and M. Miranda. 2018. Trace Element Concentrations in Beef Cattle Related to the Breed Aptitude. *Biol. Trace Elem. Res.* doi:10.1007/s12011-018-1276-3.
- Pfuhl, R., O. Bellmann, C. Kühn, F. Teuscher, K. Ender, and J. Wegner. 2007. Beef versus dairy cattle: a comparison of feed conversion, carcass composition, and meat quality. *Arch. Tierz* 50:59–70.
- Popesko, P. 1998. *Atlas de anatomía topográfica de los animales domésticos*. 2ª ed. Masson SA.
- Puls R. 1994. *Mineral Levels in Animal Health*. second. Clearbrook: Sherpa International, Canada.
- Suttle, N.F. 2010. *Mineral Nutrition of Livestock: Fourth Edition*. Four ed. CABI, Wallingford, UK. <https://doi.org/10.1079/9781845934729.0000>.

CONCLUSIONES





CONCLUSIONES

- I. Desarrollamos un procedimiento simple de tratamiento para muestras de suero bovino para la determinación de minerales mediante ICP-MS basada en una digestión ácida simple (DAS) con un solo ácido. La novedosa metodología es muy simple y fácil de replicar, requiere una pequeña cantidad de muestra, produce soluciones limpias y sin partículas, además permite el almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente. El método de preparación de muestras propuesto permite una determinación más exacta y precisa de la mayoría de los elementos traza, tóxicos y esenciales en comparación con el método de digestión alcalina comúnmente utilizado. En particular, el procedimiento DAS recientemente desarrollado mejoró en gran medida la exactitud de la determinación para selenio y produjo un aumento significativo en la precisión de la determinación de los elementos presentes en niveles de ultra-traza.
- II. Nuestros resultados indican que tanto las muestras de plasma como de suero sanguíneo parecen ser adecuadas e intercambiables para la determinación de la mayoría de los elementos esenciales y tóxicos en ganado vacuno. Las únicas excepciones parecen ser cobre y selenio, para los cuales se encontraron niveles significativamente más bajos en suero que en plasma; a pesar de que este hallazgo está bien descrito para cobre en los ruminantes bóvidos, merece una investigación adicional en el caso del selenio en otras especies animales. Finalmente señalar que se debe prestar especial atención a la hora de obtener y procesar las muestras de sangre para evitar la hemólisis (particularmente en el caso del suero) ya que conduce a una sobreestimación de los elementos que se encuentran en concentraciones altas en el interior de los eritrocitos (hierro, manganeso o zinc).
- III. Una única muestra del hígado de la misma región anatómica (excluyendo los lóbulos caudado e izquierdo) sería adecuada para determinar el estatus de los elementos traza en el ganado vacuno. Esta propuesta se basa en los principales

resultados del estudio, en los cuales: (1) los elementos traza se distribuyeron de manera desigual en los diferentes lóbulos hepáticos; (2) el lóbulo izquierdo parece tener una mayor capacidad de almacenamiento de elementos traza (lo que podría ser más importante con niveles altos de exposición); y (3) las concentraciones de los principales elementos traza están altamente correlacionadas entre los diferentes lóbulos hepáticos (excepto para el lóbulo caudado y para el selenio). El lóbulo izquierdo es un buen punto de muestreo en casos de riesgo de acumulación hepática de altos niveles de elementos traza, como por ejemplo en casos de riesgo de toxicidad crónica por cobre.



ANEXOS/PUBLICACIONES



ANEXOS

En este apartado se engloban las publicaciones a las que dio lugar la investigación llevada a cabo durante la realización de esta Tesis Doctoral. Se desarrollaron dos artículos en muestras sanguíneas, uno de ellos en los que se propone el método de preparación de las muestras de suero (artículo 1 de este anexo), publicado en 2019 en la revista *Plos One*; y otro en el que se evalúan las diferencias entre el análisis a partir de suero o plasma (artículo 2 de este anexo), que actualmente está en fase de revisión en la revista *Animals*. Por último, teniendo en cuenta que el hígado es un órgano clave en el metabolismo y acumulación de la mayoría de los elementos esenciales y tóxicos, nos planteamos evaluar si la distribución a lo largo del órgano es o no homogénea, de cara a establecer el punto óptimo de muestreo (artículo 3 de este anexo), publicado en 2019 en la revista *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*.



Publicación 1

Luna D, Miranda M, Minervino AHH, Piñeiro V, Herrero-Latorre C, López-Alonso M. 2019. Validation of a simple sample preparation method for multielement analysis of bovine serum. *PLoS One*. Feb 5;14(2):e0211859. doi: 10.1371/journal.pone.0211859.



Publicación 2

Luna D, López-Alonso M, Cedeño Y, Miranda M. 2019. Determination of essential and toxic elements in blood of cattle: serum vs plasma. *Animals*. submitted



Publicación 3

Luna D, Miranda M, Pereira V, López-Alonso M. 2019. Variation in trace element content between liver lobes in cattle. How important is the sampling site?. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 52: 53-57. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.11.008>



Los minerales traza son necesarios para el funcionamiento fisiológico del organismo. La determinación de los elementos traza es esencial, dentro de las muestras no invasivas, la medición de los elementos traza en sangre (suero o plasma) puede proporcionar información útil, si bien el hígado se considera el mejor tejido porque es un órgano de almacenamiento para la mayoría de los elementos. En este estudio desarrollamos un procedimiento de digestión ácida simple de muestras de suero bovino para análisis de elementos traza por ICP-MS y evaluamos la distribución intrahepática de los elementos traza con el objetivo de mejorar el diagnóstico del estatus micromineral en animales.