

Uso de la Excreción de Creatinina como Método Alternativo a la Colecta Total de Orina en Vacas Holstein

Use of the Creatinine Excretion as Alternative Method to Total Urine Collection in Holstein Cows

Libardo Escobar Puerta¹; Diana María Bolívar Vergara² y Diana Espinoza García³

Resumen. La investigación en producción animal requiere la recolección total de orina, para estimar la excreción de compuestos nitrogenados y derivados púricos, lo cual trae grandes dificultades, siendo necesario buscar técnicas alternas. El objetivo de este trabajo fue determinar el volumen de orina de vacas Holstein por colecta total con arneses y por muestras puntuales "spot", utilizando la excreción de creatinina como marcador interno y evaluar la variación en la excreción diaria de creatinina utilizando colectas durante siete días. El volumen de orina observado (colecta total) y el estimado (muestra spot) fueron comparados por una prueba de medias de datos apareados (5% de probabilidad). La comparación entre días de colecta se realizó mediante un modelo mixto con medidas repetidas en el tiempo, del mismo animal (efecto aleatorio) y día de evaluación (efecto fijo). Se utilizó el procedimiento MIXED y el comando REPEATED del programa SAS (2001). Para la correlación entre el volumen de orina observado y estimado se utilizó PROC CORR y para la regresión PROC REG de SAS (2001). La excreción de creatinina promedio fue de 29,89 mg/kg PV/día. No se encontró diferencia entre las dos técnicas. El volumen de orina obtenido fue 19,8 L y el estimado 19,7 L. Se encontró una alta correlación entre las dos técnicas ($r=0,82$; $P<0,001$). No hubo efecto del número de días sobre la excreción de creatinina. Se concluye que la toma de muestras puntuales de orina, es un buen estimador del volumen urinario y que 24 horas de recolección de orina son suficientes para determinar la excreción de creatinina con precisión.

Palabras clave: Muestra puntual, nutrición, ruminantes, volumen urinario.

Abstract. The research in animal production requires the total harvesting of tinkles to estimate the excretion of nitrogenated compounds and puric derivatives, which brings great difficulties, doing necessary the search of alternating techniques. The objective of this work was to determine the volume of tinkles of Holstein cows by collects total with harness and the gathering samples spot using the excretion creatinine like internal marker and evaluate the variation in daily creatinine excretion using collections for seven days. A paired test (5% probability) was used to compare observed (total collection) and estimated (samples spot) urine volumes. Number of sampling days was compared by mixed model with repeated measures over time, the same animal (random effect) and day (fixed effects). Also was used the MIXED procedure and REPEATED command (SAS, 2001). The correlation between observed and estimated urine volume was performed by PROC CORR and regression was performed by PROC REG (SAS, 2001). The creatinine excretion average was 29.89 mg/kg of BW. It was not difference between the two techniques. The urine volume obtained was 19.8 L and the estimated urine volume was 19.7 L. There was a high correlation between the two techniques ($r=0.82$; $P<0.001$). Urinary excretion of creatinine was not affected by the number of urinary collection days. It was concluded that spot samples of urine, is a good estimator of the urinary volume and 24 hours of urine collection were required to accurate determine creatinine excretion

Key words: Nutrition, ruminants, samples spot, urinary volume.

La investigación en áreas como la nutrición, producción y salud animal, requiere de la recolección total de orina producida por los animales. Esta actividad trae implícitas dificultades como el uso de sondas y arneses, necesidad de evitar la contaminación de la orina con las heces, estrés en los animales (producto del encierro y de los aditamentos puestos en ellos) y la excreción de grandes volúmenes de orina en vacas de alta producción, la convierte en una actividad bastante compleja.

Adicionalmente surge la preocupación por el bienestar de los animales utilizados en la investigación, siendo necesaria la búsqueda de técnicas alternas que se puedan aplicar a un gran número de animales sin importar el estado fisiológico en que se encuentren. Una de las técnicas propuestas por varios autores, es la colecta de muestras puntuales "spot" de orina utilizando la excreción de creatinina como marcador interno (Chen *et al.*, 1995; Shingfield y Offer, 1999;

¹ Zootecnista. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779. Medellín, Colombia. <branikii@yahoo.com>

² Profesora Asistente. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779. Medellín, Colombia. <dmboliva@unal.edu.co>

³ Zootecnista. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779. Medellín, Colombia. <despino@unal.edu.co>

Recibido: Mayo 27 de 2009; Aceptado: Mayo 10 de 2010.

Broderick y MerChen, 1992; Pimpa *et al.*, 2003; Mendonça *et al.*, 2006; Leal *et al.*, 2007ab; Chizzotti *et al.*, 2008), la cual se presenta como una alternativa simple, económica y no invasiva, que puede usarse en un gran número de animales ya que la recolección total de orina puede obviarse. Esta técnica podría permitir estimar la excreción de compuestos nitrogenados y derivados púricos, los cuales se utilizan para determinar la síntesis de proteína microbiana, sin la colecta total de orina (Oliveira *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 1995; Leal *et al.*, 2007a; Chizzotti *et al.*, 2008).

Esta técnica permite estimar el volumen de orina, basada en el supuesto que la excreción de creatinina es relativamente constante por individuo y está en función de su peso vivo (PV). Se encuentran varios registros en la literatura demostrando que este supuesto es cierto, como los realizados por Topps y Elliot (1967); Orskov y Macleod (1982); Santos *et al.* (2001); Vagnoni *et al.* (1997); Valadares *et al.* (1997a); Valadares *et al.* (1999); Rennó *et al.* (2008).

La creatinina es un metabolito que cumple con los requisitos para ser considerada como un marcador interno ya que se produce a una tasa constante a partir de la fosfocreatina y es distribuida a través del agua corporal, excretándose a una tasa constante con una baja variabilidad durante el día (Orskov y MacLeod, 1982; Harper *et al.*, 1982). Este metabolito es formado en el tejido muscular por la remoción irreversible y no enzimática de agua del fosfato de creatina, compuesto que almacena energía durante la contracción muscular intensa (Harper *et al.*, 1982). La excreción diaria de creatinina por unidad de peso corporal de los animales no es afectada por la dieta (Silva *et al.*, 2001; Leal *et al.*, 2007a; Chizzotti *et al.*, 2008; Rennó *et al.*, 2008), la raza (Rennó *et al.*, 2008) y el nivel de producción de leche (Chizzotti *et al.*, 2008), pero puede ser influenciada por la edad y condición corporal del animal (Leal *et al.*, 2007ab). Teniendo en cuenta que la excreción de creatinina, depende del metabolismo proteico de la masa muscular, animales que presenten proporciones diferentes de tejidos, músculo y grasa, en cada fase de desarrollo, pueden presentar variaciones en la excreción diaria de creatinina, expresada en relación al PV del animal (Leal *et al.*, 2007b). Chizzotti *et al.* (2008), sugieren que la excreción de creatinina puede variar con el grado de madurez y crecimiento de los animales. Niveles elevados solamente se presentan cuando se altera la función renal (Dukes, 1967).

Walker y Faichney (1964) afirman que la excreción diaria de creatinina parece ser constante para un individuo pero no entre individuos y que el 78% de la varianza en la excreción urinaria de creatinina parece ser debida a la individualidad animal y el 8% de la varianza es debida al efecto de la dieta. Dadas estas condiciones, es de esperar que el hecho de usar un solo valor de referencia para la estimación de la excreción de creatinina en relación con el peso metabólico, conduzca a errores en la estimación mayores del 10%. Chen *et al.* (1992), recomiendan efectuar mediciones por lo menos durante dos días consecutivos a la misma hora, para aumentar la precisión; sin embargo, en la literatura se registran tiempos de colecta que varían, reportándose nueve (Siddons *et al.*, 1985), siete (Krishna y Ranjhan, 1982), seis (Orskov y MacLeod, 1982; Leal *et al.*, 2007a; Nsahlai, Osuji y Umunna, 2000), cinco (Susmel *et al.*, 1995; Chen y Gomez, 1992), tres (Coto, Rodríguez e Infante, 1988), hasta un día (Valadares *et al.*, 1997b; Oliveira *et al.*, 2001; Chizzotti *et al.*, 2008; Rennó *et al.*, 2008).

Los valores de excreción diaria de creatinina en orina, mencionados en varios trabajos para animales de diferentes razas, estados fisiológicos y alimentados con diferentes dietas, varían dentro de un rango estrecho. Valadares *et al.* (1997a) reportaron para novillas cebú y vacas gestantes, una excreción promedio de 24,04 y 21,47 mg·kg⁻¹ de peso vivo (PV), respectivamente. Silva *et al.* (2001), encontraron en vacas lactantes (Holandés x Gyr) una excreción de 23,60 mg·kg⁻¹ PV y Valadares *et al.* (1999) en vacas lactantes de la raza Holstein, 29 mg/kg PV. Rennó *et al.* (2000), reportaron para novillos enteros cebuínos (Nellore) y mestizos (Limousin*Nellore y Simental*Nellore), un valor promedio de 27,36 mg·kg⁻¹ PV. Rennó *et al.* (2008), establecieron una excreción de este metabolito de 26,61; 28,68; 28,72 y 27,04 mg·kg⁻¹ PV para novillos Holstein, ½ Holstein ½ Guzerá y ½ Holstein-Gyr ½ Cebú, respectivamente. Barbosa *et al.* (2006) encontraron para ganado Nellore en cuatro categorías, novillas, machos castrados, machos enteros y vacas lactantes, una media de 27,1 mg·kg⁻¹ PV. Leal *et al.* (2007a) en machos castrados Holstein, midieron una excreción de 25,47mg·kg⁻¹ PV. Chizzotti *et al.* (2008), obtuvieron en toros Holstein en crecimiento y en vacas lactantes Holstein, un promedio de 0,248±0,008 mmol·kg⁻¹ PV y 0,212±0,004 mmol·kg⁻¹ PV, respectivamente.

En varios estudios se ha informado sobre producciones de orina por colecta total, similares a las obtenidas a

partir de muestras puntuales "spot", con producciones de orina muy variables. Valadares *et al.* (1999) notificaron volúmenes obtenidos por colecta total con arnés entre 31,5 y 48,4 kg·día⁻¹ y estimados a través de la excreción de creatinina, entre 30,0 y 47,3 kg·día⁻¹; Silva *et al.* (2001), para vacas cruzadas Holstein x Gir en estado de lactancia 10,87 L·día⁻¹ (colecta total) y 11,11 L·día⁻¹ (muestra "spot") y Santos *et al.* (2001) para vacas Holstein en estado de lactancia encontraron valores de 12,52 L·día⁻¹ y 12,47 L·día⁻¹ por colecta total y estimado por muestra "spot", respectivamente.

El objetivo de este trabajo fue determinar el volumen de orina de vacas Holstein a través de dos técnicas, la colecta total con arneses y la recolección de muestras puntuales "spot" utilizando la excreción de creatinina como marcador interno. Se evaluó la variación en la excreción diaria de creatinina utilizando colectas durante siete días consecutivos. La información obtenida servirá como soporte para futuras investigaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El trabajo se realizó en el Centro de Producción Paysandú, propiedad de la Universidad Nacional de Colombia, ubicado en el municipio de Santa Elena (Antioquia), a 2.500 msnm, con una temperatura de 17 °C, en una zona de vida clasificada como bosque húmedo montano bajo.



Animales y dieta. Se utilizaron cuatro vacas horras de raza Holstein, con un peso promedio de 735 kg. Se manejaron estabuladas, en puestos individuales. La dieta consistió en forraje fresco de pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) con 50 días de rebrote y agua a voluntad, más cuatro kg de concentrado por día.

Período de evaluación. El experimento se realizó durante 14 días, siete días de adaptación (a la dieta, a los arneses y a la estabulación) y siete días de muestreo.

Descripción de las técnicas. Las dos técnicas fueron ejecutadas simultáneamente, en los cuatro animales. Durante los días de muestreo la orina se recogió por medio de arneses (Figura 1), y depositada en un recipiente. La recolección de orina se realizó al final de cada tiempo, de 8:00 a 12:00, 12:00 a 16:00, 16:00 a 20:00, 20:00 a 24:00 y de 24:00 a 8:00 horas, según propuesta de Chen *et al.* (1992). Al final de cada tiempo la orina colectada fue pesada, homogenizada y se tomaron dos muestras de 50 mL cada una, la primera denominada muestra puntual "spot" y la segunda fue refrigerada, mezclada y homogenizada con las muestras de los otros tiempos del día, para posteriormente formar una muestra representativa de orina de 24 horas. Todas las muestras se congelaron y almacenaron para determinar después su concentración de creatinina.



Figura 1. Arnés utilizado en vacas Holstein para la colecta total de orina.

Para determinar la excreción de creatinina diaria se utilizaron dos metodologías diferentes. La primera metodología se denominó promedio de mezclas (PM), la cual consistió en multiplicar la concentración de creatinina de cada mezcla diaria ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), por el volumen de orina obtenido en el respectivo día ($\text{L}\cdot\text{día}^{-1}$). Posteriormente se dividió este valor por el PV (kg) respectivo de cada animal, para determinar la excreción de creatinina promedio diario ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PV/día) y al final se promediaron los datos de los cuatro animales.

La segunda metodología se denominó promedio por tiempos (PPT). Esta consistió en multiplicar la concentración de cada tiempo del día ($\text{mg}\cdot\text{L}\cdot\text{tiempo}$), por el volumen obtenido en cada tiempo ($\text{L}\cdot\text{tiempo}$) y se sumaron los cinco valores obtenidos de excreción de creatinina diaria ($\text{mg}/\text{día}$). Este resultado se dividió por el PV (kg) respectivo de cada animal. Para determinar la excreción de creatinina promedio diaria ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PV/día), se promediaron los datos de los siete días de cada animal, y al final se promediaron los datos de los cuatro animales.

Determinación cuantitativa y colorimétrica de creatinina en orina. El método utilizado fue el de Jaffé cinético sin desproteinización. Perasso y Mazziotta (2004), reportaron que este método se comporta mejor con respecto a Jaffé con desproteinización punto final y Jaffé sin desproteinización punto final. Para lo cual se utilizó un kit de BioSystems Creatinina. La muestra fue diluida 1:50 con agua destilada. Se realizaron dos lecturas de la absorbancia a 500 nm., después de 30 segundos (A_1) y de 90 segundos (A_2).

La concentración de creatinina de la muestra se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$C_{\text{ muestra}} = \frac{(A_2 - A_1)_{\text{ muestra}}}{(A_2 - A_1)_{\text{ patrón}}} * C_{\text{ patrón}} * \text{factor de dilución de la muestra}$$

Donde: C = Concentración en mg de creatinina/dL de orina; A_1 = Absorbancia lectura uno en nm.; A_2 = Absorbancia lectura dos en nm. Factor de dilución de la muestra: 1:50

El volumen estimado de orina (L) se determinó con la siguiente fórmula (Valadares *et al.*, 1999):

$$Ve = PV * ECe / CC$$

donde: Ve = volumen estimado de orina en L; PV = peso vivo en kg; ECe = excreción de creatinina estimada por

PM o PPT en mg/kg PV/día; CC = Concentración de creatinina de las muestras puntual "spot" de cada día ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Análisis estadístico. Para comparar el volumen de orina observado (colecta total) y el estimado (muestra spot) por las dos metodologías, se realizó una comparación de medias de datos apareados (prueba de t, al 5% de probabilidad). La comparación entre días de colecta se realizó mediante un modelo mixto con medidas repetidas en el tiempo (siete mediciones durante los días de muestreo), del mismo animal (efecto aleatorio) y día de evaluación como efecto fijo. Se utilizó el procedimiento MIXED y el comando REPEATED del programa SAS (2001), el cual tiene en cuenta efectos aleatorios y permite modelar la estructura de covarianza de los datos. Se tuvo en cuenta la combinación de estructura autoregresiva de primer orden dentro de individuos y efecto aleatorio entre individuos (Littell, Henry y Ammerman, 1998; Littell, Pendergast y Natajan, 2000; Oliver, Rosel y Murria, 2000).

Se determinó la correlación entre el volumen de orina obtenido por colecta total con arneses y el obtenido a partir de muestras puntuales "spot" utilizando la excreción de creatinina como marcador interno, utilizando el procedimiento PROC CORR de SAS, (2001). Igualmente, se realizó un análisis de regresión entre los valores de orina obtenidos por las dos técnicas, utilizando el procedimiento PROC REG de SAS (2001). Para comparar la excreción de creatinina entre el intervalo diurno y nocturno, se utilizó un diseño completamente al azar con el procedimiento GLM SAS (2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración y excreción de creatinina en orina. Al analizar las dos metodologías para estimar la excreción de creatinina (promedio mezclas y promedio por tiempos), no se encontró diferencia significativa entre estas ($P > 0,05$), en ninguna de las formas de expresión ($\text{mg}\cdot\text{día}^{-1}$ y $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PV/día) (Tabla 1). Estos resultados indican que es posible calcular la excreción de creatinina de las dos formas, pudiéndose recomendar la determinación en la mezcla, lo cual facilita el trabajo y disminuye los costos.

La excreción de creatinina promedio para los cuatro animales (peso promedio 735 kg) durante todo el período de medición fue 29,89 y 29,51 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PV/

día, para PM y PPT, respectivamente. Estos valores fueron similares a los reportados por Valadares *et al.* (1999) quienes obtuvieron valores de 29 mg·kg⁻¹ PV/día, para vacas lactantes de raza Holstein; por Rennó *et al.* (2000) de 27,36 mg·kg⁻¹ PV/día para novillos y por Barbosa *et al.* (2006), para ganado Nellore en cuatro categorías, novillas, machos castrados, machos enteros y vacas lactantes (27,1 mg·kg⁻¹ PV). No obstante fueron levemente superiores a los logrados por Valadares *et al.* (1997b) en experimentos con vacas lecheras preñadas y lactantes, quienes registraron valores de 25,5 y 25,6 mg·kg⁻¹ PV/día respectivamente; por Valadares *et al.*

(1997a) de 24,04 mg·kg⁻¹ PV/día en novillas cebú. Igualmente fueron superiores al mencionado por Silva *et al.* (2001), quienes encontraron una excreción de 23,60 mg·kg⁻¹ PV/día en vacas lactantes cruzadas (Holandés x Gyr) y por Leal *et al.* (2007a) en machos castrados Holstein (25,47 mg·kg⁻¹ PV). Al expresar la excreción de creatinina en mg·kg⁻¹ de W^{0,75}·día, el promedio fue de 153,13 (Tabla 2), el cual fue notablemente superior a los informados por Valadares *et al.* (1997b) de 145,34, 130,87, 133,98, 119,84, 127,47, 115,75 mg·kg⁻¹ de W^{0,75}·día para los tiempos de colecta de 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente.

Tabla 1. Excreción diaria de creatinina en orina en vacas Holstein, determinada por dos metodologías.

Metodología	Excreción de creatinina (mg·día ⁻¹)	CV
Promedio mezcla	21877 ± 2828 ^a	12,93
Promedio por tiempos	21533 ± 2224 ^a	10,33
	Excreción de creatinina mg·kg ⁻¹ PV/ día	
Promedio mezcla	29,89 ± 2,92 ^b	9,80
Promedio por tiempos	29,51 ± 2,84 ^b	9,63

Medias seguidas por letras iguales no difieren estadísticamente (P<0,05) por prueba de T.

Promedio mezcla = concentración determinada en una muestra compuesta por la mezcla de orina producida en todos los tiempos de colecta

Promedio por tiempos= sumatoria de la concentración determinada en la orina producida en cada tiempo

Tabla 2. Estimadores estadísticos obtenidos para la excreción de creatinina (EC) en la orina de vacas Holstein, durante los días de muestreo.

EC (PM) ¹	Días de colecta							Media	CV
	1	2	3	4	5	6	7		
mg·kg ⁻¹ PV	30,94	30,05	27,04	29,52	28,81	29,13	31,05	29,89	9,80
mg·kg ^{0,75}	160,64	155,84	140,20	153,49	149,65	151,17	160,92	153,13	8,15

¹ Promedio mezcla (creatinina determinada en una muestra compuesta por la mezcla de orina producida en todos los tiempos de colecta)

Efecto relativo a los días de muestreo no significativo (P>0,05)

La excreción de creatinina en orina por día es expresada en diferentes unidades, siendo las más utilizadas mg·kg⁻¹ PV/día y mg·kg⁻¹ W^{0,75} · día, debido a que estas relacionan la excreción con el peso del animal, permitiendo hacer comparaciones entre animales. La creatinina excretada vía orina y expresada en mg·kg⁻¹ PV/día, es relativamente constante entre individuos,

presentando una variación mínima (Chen *et al.*, 1995; Dukes, 1967; Topps y Elliot, 1967; Orskov y Macleod, 1982; Valadares *et al.*, 1997b y Valadares *et al.*, 1999). Sin embargo, teniendo en cuenta que la producción diaria de creatina y, consecuentemente, la excreción de creatinina, depende del metabolismo proteico de la masa muscular, animales que presenten

proporciones diferentes de tejidos, músculo y grasa, en cada fase de desarrollo, posiblemente registrarán variaciones en la excreción diaria de creatinina, expresada en relación al PV del animal (Leal *et al.*, 2007b). Leal *et al.* (2007a) adicionalmente señalaron que los animales adultos presentan menor variación en la composición corporal y, por tanto, en la excreción de creatinina en relación al PV. En los estudios consultados se utilizaron animales en diferente estado de madurez y condición corporal, lo que puede explicar las diferencias encontradas entre estos.

Al analizar la excreción de creatinina en un mismo animal durante los diferentes días, esta presentó poca variación, ya que los coeficientes de variación estuvieron entre 6,7 y 10,8. Estos se pueden considerar normales si se comparan con los expresados por Chen *et al.* (1992) para novillos Holstein, los cuales estuvieron entre 4,2 y 17,87. Los coeficientes de variación (teniendo en cuenta los tratamientos, animales y días de medición), reportados en diferentes trabajos son de 12,26, en vacas lactantes Holandesas x Gyr (Silva *et al.*, 2001), 12,39 en vacas lecheras preñadas y lactantes (Valadares *et al.*, 1997a), 7,4 en vacas lecheras (Valadares *et al.*, 1997b) y 12,4 en ovejas (Chen *et al.*, 1995). La variación entre animales y entre días para cada animal, encontrada en este trabajo, concuerda con lo registrado por Walker y Faichney (1964) y Dukes (1967), quienes afirman que la excreción diaria de creatinina parece ser constante para un individuo pero no entre individuos y que gran parte de la varianza en la excreción urinaria de creatinina parece ser debida a la individualidad animal.

Al comparar la excreción de creatinina entre los siete días de medición, no se encontró diferencia significativa ($P > 0,05$) entre días, en ninguna de las dos formas de expresión ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PV y $\text{mg} \cdot \text{kg}^{0,75}$) (Tabla 2). Además, la correlación entre el volumen de orina real (colecta total) y el volumen estimado (muestra spot) teniendo en cuenta las mediciones realizadas durante uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis y siete días, estuvieron entre 0,77 y 0,82. Estos resultados sugieren que un período de colecta de orina con una duración de un día, es suficiente para medir la excreción de creatinina. La ausencia de efecto de los días de colecta sobre la excreción diaria de creatinina en la orina, está de acuerdo con las observaciones descritas por Barbosa *et al.* (2006), quienes evaluaron el periodo de colecta de orina durante seis días consecutivos sobre la

excreción urinaria de creatinina en bovinos Nelore de cuatro categorías; con Leal *et al.* (2007a) quienes utilizaron machos castrados Holstein y con Leal *et al.* (2007b) en novillas de la raza Holstein, quienes evaluaron la excreción diaria de creatinina durante el mismo período de tiempo. La ausencia de efecto del número de días sobre la excreción de creatinina tiene gran aplicación práctica. Periodos más cortos de colecta de orina son deseables, pues reducen el período experimental y consecuentemente los costos de la investigación, el estrés de los animales y la presencia de lesiones e infecciones del tracto urinario (Valadares *et al.*, 1997a; Barbosa *et al.*, 2006).

Se encontró diferencia significativa para la excreción de creatinina durante el intervalo nocturno (20:00 a 8:00 horas) y el intervalo diurno (8:00 a 20:00 horas) ($P < 0,05$), la cual expresada en $\text{mg}/12\text{h}$ y $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PV/12h, fue 8,9% y 10% más alta durante el intervalo nocturno (Tabla 3). Estos resultados están de acuerdo con los de Valadares *et al.* (1999), quienes encontraron que la excreción de creatinina durante el intervalo nocturno (17:00 a 5:00 horas) fue 5% más alta que durante el intervalo diurno (5:00 a 17:00 horas). Igualmente, Kozloski *et al.* (2005), encontraron diferencias entre horarios de colecta dentro de un período de 24 horas en ovejas. Los valores fueron más altos durante la madrugada y por la mañana, y más bajos en la tarde e inicio de la noche. Normalmente, la producción de orina tiende a disminuir considerablemente en el período de la noche en función de una mayor reabsorción de agua y electrolitos Gurtler (1987) citado por Kozloski *et al.* (2005), determinando un aumento en la concentración de creatinina en la orina; estando de acuerdo con Bishop, Duben-Engelkirk y Fody (1992), quienes afirman que la concentración de creatinina varía de acuerdo al volumen de orina en forma inversa. Esto fue confirmado con el coeficiente de correlación encontrado entre estas dos variables de $-0,67$ ($P < 0,0001$). La producción de creatinina parece ser constante y proporcional a las concentraciones celulares de creatina e fosfato de creatina pero, una vez que la producción de orina varía, las concentraciones de creatinina en la orina pueden variar a lo largo del día.

En contraposición a estos resultados están los presentados por Nsahlai, Osuji y Umunna (2000), quienes no observaron efecto del horario en terneros. Sin embargo, variaciones en la concentración urinaria de creatinina a lo largo del día, tanto en bovinos como

en ovinos, también fueron observadas por Chen *et al.*, 1992; Gonda y Lindberg, 1994; Susmel *et al.*, 1995 y Shingfield y Offer, 1999. De este modo, la estimación de excreción diaria total de creatinina, con base en datos de otros experimentos, puede resultar en errores significativos en la estimación de la producción de orina de los animales. Adicionalmente, este error puede ser aún mayor si las muestras puntuales de orina no fueran representativas de la orina total excretada, teniendo en cuenta las variaciones asociadas a los cambios en las tasas de filtración glomerular a lo largo del día (Kozloski *et al.*, 2005). Igualmente, Rennó *et al.* (2008), señalan que la medición de creatinina en colectas de orina en 24 horas es esencial para que se pueda efectuar la estimativa del volumen urinario, cuando se utiliza una única muestra diaria de orina.

Volumen de orina obtenido a través de la colecta total con arnés y estimado a través de las muestras puntuales "spot", utilizando la excreción de creatinina como marcador interno.

La producción de orina obtenida estuvo entre 19,73 y 19,99 L·día⁻¹, según las diferentes técnicas. Los valores obtenidos fueron inferiores a los reportados por Valadares *et al.* (1999) quienes encontraron para vacas multíparas lactantes de raza Holstein volúmenes de 48,3; 48,4; 41,8 y 31,5 kg·día⁻¹, obtenidos por colecta total con arnés y de 47,3; 44,1; 38,8 y 30,0 kg·día⁻¹, estimados a través de la excreción de creatinina para dietas que contenían 20, 35, 50 y 65%

de concentrado, respectivamente. Mientras que Silva *et al.* (2001) relacionan valores medios de volumen de orina de 10,87 L·día⁻¹ (obtenido por colecta total con arneses) y 11,11 L·día⁻¹ (estimado a través de la excreción de creatinina), para vacas cruzadas Holandés x Gyr, en estado de lactancia, con un PV promedio de 511,8 kg.

No se encontró diferencia significativa entre el volumen de orina estimado utilizando la excreción de creatinina y el obtenido con la colecta total con arneses (P>0,05) (Tabla 4). Estos resultados coinciden con los de Valadares *et al.* (1999), para vacas multíparas lactantes de raza Holstein, quienes midieron volúmenes obtenidos por colecta total con arnés entre 31,5 y 48,4 kg·día⁻¹ y estimados a través de la excreción de creatinina, entre 30,0 y 47,3 kg·día⁻¹, para dietas que contenían entre el 20 y 65% de concentrado. Los resultados arrojados por las dos técnicas no presentaron diferencia significativa (P>0,05), excepto para la dieta que contenía 35% de concentrado. Así mismo, Santos *et al.* (2001), encontraron para vacas Holstein en estado de lactancia, valores de 12,52 y 12,47 L·día⁻¹, por colecta total y estimado por muestra "spot", respectivamente, sin diferencia significativa (P>0,05). Igualmente, Silva *et al.* (2001), registraron para vacas cruzadas Holstein x Gyr en estado de lactancia, producciones similares por las dos técnicas (P>0,05), con valores de 10,87 L·día⁻¹ (colecta total) y 11,11 L·día⁻¹ (muestra "spot").

Tabla 3. Variación de la excreción de creatinina en la orina de vacas Holstein durante los intervalos diurno y nocturno.

Intervalo	Excreción promedio mg/12 h	CV	Excreción promedio mg·kg ⁻¹ PV/12 h	CV
Diurno	10303 ± 1779a	0,17	13,96 ± 2,47a	0,18
Nocturno	11229 ± 1859b	0,17	15,36 ± 2,33b	0,15

Medias en la misma columna seguida por letras iguales no difieren (P>0,05)

Es importante anotar como los coeficientes de variación (CV) fueron levemente superiores en los estimados a partir de creatinina (17,50 por PM y 17,48 por PPT), en comparación con el obtenido por colecta total (15,33) (Tabla 4). Sin embargo, estos son inferiores a los informados por Silva *et al.* (2001), quienes obtuvieron un CV de 50,94 para el volumen obtenido real y de 53,63 para el estimado. Igualmente Oliveira *et al.* (2001) reportan un CV de 15,6 para el obtenido y 32,51 para el estimado.

El coeficiente de correlación entre el volumen de orina obtenido por colecta total y el estimado a partir de la excreción de creatinina, tanto por promedio de mezclas, como por promedio por tiempos, fue de 0,82 (P<0,0001). Esta correlación encontrada entre las dos técnicas, se considera alta, lo cual indica que la estimación del volumen de orina a través de la excreción de creatinina es un buen indicador del volumen real, concordando con las afirmaciones hechas por Broderick y MerChen (1992); Chen *et al.*, (1995); Oliveira *et al.*,

(2001); Silva *et al.*, (2001); Kozloski *et al.*, (2005) y Barbosa *et al.*, (2006), quienes indican, que las muestras spot de orina estiman satisfactoriamente el volumen urinario. Por otro lado, la cantidad de creatinina para estimar el volumen de orina, se puede calcular con cualquiera de las dos metodologías: multiplicando la concentración de creatinina de cada mezcla diaria, por el volumen de orina obtenido en el respectivo día (PM), ó multiplicando la concentración de cada tiempo del día, por el volumen de orina obtenido en cada tiempo y posteriormente sumando los cinco valores (PPT), ya que el coeficiente de correlación entre estas fue de 1 ($P < 0,0001$).

La regresión entre el volumen de orina obtenido por colecta total con arneses (y) y el volumen estimado

a partir de creatinina, fue altamente significativa ($P < 0,0001$), indicando un intercepto ($P = 0,0087$) y una pendiente ($P < 0,0001$) de $5,6224 \pm 1,9807$ y $0,7106 \pm 0,0971$ ($R^2 = 0,68$, $n = 28$), respectivamente.

Estos resultados sugieren que la técnica de la muestra "spot" de orina da una estimación satisfactoria del volumen de orina producido, pudiendo ser usado cuando la colecta total de orina no es factible.

Según estos resultados se puede afirmar que las muestras puntuales "spot" de orina, miden satisfactoriamente el volumen urinario, lo cual permite estimar las excreciones de urea y de derivados púricos y subsecuentemente, la producción de N microbiano.

Tabla 4. Volumen diario de orina en vacas Holstein obtenido por colecta total con arneses y estimado por muestras puntuales "spot" utilizando la excreción de creatinina determinada por dos metodologías

Técnica	Metodología	Volumen promedio (L·día ⁻¹)	Diferencia con el obtenido (L·día ⁻¹)	CV
		Obtenido		
Colecta total		19,82 ± 3,04a		15,33
		Estimado		
Excreción de creatinina	PM	19,99 ± 3,50a	0,163	17,50
	PPT	19,73 ± 3,45a	-0,096	17,48

Medias en la misma columna seguida por letras iguales no difieren ($P > 0,05$), por prueba de T

PM= Promedio mezcla (concentración determinada en una muestra compuesta por la mezcla de orina producida en todos los tiempos de colecta)

PPT= Promedio por tiempos (sumatoria de la concentración determinada en la orina producida en cada tiempo)

CONCLUSIONES

La excreción de creatinina urinaria dio estimaciones aceptables del volumen de orina, producido por vacas horas de la raza Holstein, con un peso promedio de 735 kg, siendo una alternativa a la colecta total con arneses. La ausencia del efecto del número de días sobre la excreción de creatinina tiene gran aplicación práctica, ya que permite reducir el trabajo, los costos de la investigación y el estrés de los animales. Se sugiere realizar la colecta durante un día, tomando muestras puntuales de orina en diferentes horarios para constituir una muestra representativa de un ciclo de 24 horas, ya que las concentraciones de creatinina en la orina varían a lo largo del día, siendo más altas durante la noche. La excreción de creatinina presentó valores similares para las dos metodologías utilizadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Barbosa, A.M., R.F.D. Valadares, S.C. Valadares Filho, R.M.L. Véras, M.I. Leão, E. Detmann, M. F. Paulino, M. I. Marcondes, M. A. Souza. 2006. Efeito do período de coleta de urina, dos níveis de concentrado e de fontes protéicas sobre a excreção de creatinina, de uréia e de derivados de purina e a produção microbiana em bovinos Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35(3): 870-877.
- Bishop, M.L., J.L. Duben-Engelkirk and E.P. Fody. 1992. *Clinical Chemistry: principles, procedures, correlations*. 2 ed. J.B. Lippincott Co, Philadelphia. 321 p.
- Broderick, G.A. and N.R. MerChen. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *Journal of Dairy Science* 75(9): 2618-2632.

- Chen X.B. and M.J. Gómez. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives. An overview of the technical details. International Feed Research Unit. Rowett Research Institute, Aberdeen, UK. 21 p.
- Chen, X.B., G. Grubic, E.R. Orskov and P. Osuji. 1992. Effect of feeding frequency in diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. *Animal Production* 55(2): 185-191.
- Chen, X.B., A.T. Mejia, D.J. Kyle and E.R. Orskov. 1995. Evaluation of the use of the purine derivative: creatinine ratio in spot urine and plasma samples as an index of microbial protein supply in ruminants: studies in sheep. *Journal of Agricultural Science* 125(1): 137-143.
- Chizzotti, M.L., F. Valadares, V. Diniz, C. Martins and L.O. Tedeschi. 2008. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. *Livestock Science* 113: 218-225.
- Coto, G., M.M. F.P. Rodrigues and P. Infante. 1988. The effect of increasing consumption of concentrates, creatinine, creatine and allantoin in the urine of rams fed hay. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 22: 279-284
- Dukes, H.H. 1967. *Fisiología de los animales domésticos*. 3 ed. Aguilar, España. 962 p.
- Gonda, H.L and J.J.E Linberg. 1994. Evaluation of dietary nitrogen utilization in dairy cows based on urea concentrations in blood urine and milk, and on urinary concentration of purine derivatives, *Acta Agriculturae Scandinavica Section A Animal Science* 44 (4): 236-345.
- Gurtler, H. 1987. *Fisiologia veterinária*. 4 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 612 p. citado por: Kozloski GV, G. Fiorentini, C.J. Härter e L.M.B. Sanchez. 2005. Uso da creatinina como indicador da excreção urinária em ovinos. *Ciência Rural* 35(1): 98-102.
- Harper, H.A., V.W. Rodwell, P.A. Mayes. 1982. *Manual de química fisiológica*. 5 ed. Atheneu, São Paulo. 736 p.
- Kozloski G.V., G. Fiorentini, C.J. Härter, L.M.B. Sanchez. 2005. Uso da creatinina como indicador da excreção urinária em ovinos. *Ciência Rural* 35(1): 98-102.
- Krishna Mohan, D.V.G. and S.K. Ranjhan. 1982. Growth nitrogen balance and nutrient intake in crossbred heifer calves fed different levels of energy and protein. *Indian Journal of Animal Science* 52(8): 638-642.
- Leal, T.L., R.F.D. Valadares, S.C. Valadares Filho, M.I. Leão, E. Detmann, A.M. Barbosa, M.L. Chizzotti e M.L. Paixão. 2007a. Variações diárias nas excreções de creatinina e derivados de purinas em novilhos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36(4): 896-904.
- Leal, T.L., R.F.D. Valadares, S.C. Valadares Filho, J.M.S. Campos, E. Detmann, A.M. Barbosa, R.M.A. Teixeira e M.A. Marcondes. 2007b. Variações diárias nas excreções de creatinina e derivados de purinas em novilhas. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36(4): 905-911.
- Littell, R.C., P.R. Henry and C.B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science* 76(4): 1216-1231.
- Littell, R.C., J. Pendergast and R. Natajan. 2000. Modelling covariance structure in the analysis of Repeated measures data. *Statistics in Medicine* 19(13): 1793-1819.
- Mendonça, S.S., M.L.A. Pereira, A.J. Assis, L.V. Aguiar e G.G.P. Carvalho. 2006. Estimacão da produçãõ de proteína microbiana em ruminantes baseada nas excreções de derivados de purina. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 101(559-560): 181-186.
- Nsahlai, I.V., P.O. Osuji and N.N. Umunna. 2000. Effect of form and of quality of feed on the concentrations of purine derivatives in urinary spot samples, daily microbial N supply and predictability of intake. *Animal Feed Science and Technology* 85(3): 223-238.
- Oliveira, A.S., R.F. Diniz, S.C. Valadares, P.R. Cecon, L.N. Renno e A.C. Queiroz, M.L. Chizzotti. 2001. Produçãõ de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações isoprotéicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30(5): 1624-1629.
- Oliver, J.C., J. Rosel, y L. Murria. 2000. Análisis de medidas repetidas mediante métodos de máxima verosimilitud. *Psicothema* 12(2): 403-407.

- Orskov, E.R. and N.A. Macleod. 1982. The determination of the minimal nitrogen excretion in steers and dairy cows and its physiological and practical implications. *The British Journal of Nutrition* 47(3): 625-636.
- Perasso, E. y D. Mazziotta. 2004. Evaluación de métodos por la evaluación externa de calidad en química clínica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 38(1): 61-67.
- Pimpa, O., J.B. Liang, J. Balcells, Z.A. Jelan and N. Abdullah. 2003. Urinary purine derivative excretion in swamp buffaloes after duodenal purine base infusion. *Animal Feed Science and Technology* 104(1): 191-199.
- Rennó, L.N., R.F. Diniz, S.C. Valadares Filho, M.I. Leão, R.J.F. Coelho Da Silva, P.R. Cecon, L.C. Gonçalves, H.L. Chaves e R.S. Linhares. 2000. Concentração plasmática de uréia e excreções de uréia e creatinina em novillo. *Revista Brasileira de Zootecnia* 29(4): 1235-1243.
- Rennó, L.N., S.C. Valadares Filho, M.F. Paulino, M.I. Leão, R.F.D. Valadares, F.P. Rennó e M.L. Paixão. 2008. Níveis de uréia na ração de novilhos de quatro grupos genéticos: parâmetros ruminais, uréia plasmática e excreções de uréia e creatinina. *Revista Brasileira de Zootecnia* 37(3): 556-562.
- Santos, A.O., R.F. Diniz, S.C. Valadares, P.R. Cecon, L.N. Renno, A.C. Queiroz e M.L. Chizzotti, 2001. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações isoprotéicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30(5): 1624-1629.
- SAS (Statistical Analysis System). 2001. User's Guide: Statistics. SAS Institute, Inc. Cary, North Carolina, USA. 1028 p.
- Shingfield, K.J. and N.W. Offer. 1999. Simultaneous determination of purine metabolites, creatinine and pseudouridine in ruminant urine by reversed-phase highperformance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 723(1-2): 81-94.
- Siddons, R.C., J.V. Nolan, D.E. Beever and J.C. Macrae. 1985. Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing contrasting forms and levels of N. *British Journal of Nutrition* 54(1): 175-187.
- Silva, R., R. Valadare, S. Filho, P. Cecon, L. Renno e R.J. Silva. 2001. Uréia para em lactacao. estimativas do volume urinario, da producao microbiana da excreção de uréia. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30(6): 1948 -1957.
- Susmel, P.P., M. Spanghero, B. Stefanon and C.R. Mills. 1995. Nitrogen balance and partitioning of some nitrogen catabolites in milk and urine of lactating cows. *Livestock Production Science* 44(3): 207-219.
- Topps, J.H. and R.C. Elliot. 1967. Partition of nitrogen in the urine of African sheep given a variety of low-protein diets. *Animal Production* 9(2): 219-227.
- Vagnoni, D.B., G.A. Broderick, M.K. Clayton, and R.D. Hatfield. 1997. Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. *Journal of Dairy Science* 80(8): 1695-1702.
- Valadares, R., L. Goncalves, N. Rodríguez, C. Filho e I. Sampaio. 1997a. Níveis de proteína em dietas de bovinos. 4 concentrações de amonia ruminal e uréia plasmática e excreções de uréia e creatinina. *Revista Brasileira de Zootecnia* 26(6): 1270-1278.
- Valadares, R., L. Goncalves, N. Rodríguez, C. Filho e I. Sampaio. 1997b. Metodologia de colecta de Urina em vacas Utilizando sondas de folley. *Revista Brasileira de Zootecnia* 26(6): 1279-1282.
- Valadares, R., G.A. Broderick, S.C. Valadares Filho e M.K. Clayton. 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *Journal of Dairy Science* 82(12): 2686-2696.
- Walker, D.M. and G.J. Faichney. 1964. Nitrogen balance studies with the milk-fed lamb. 2. The partition of urinary nitrogen and sulphur. *British Journal of Nutrition* 18: 201-207.