

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE VETERINARIA DE LUGO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL

ESTUDIO SOBRE LA ACUMULACIÓN DE COBRE Y DE LOS
FACTORES DE VARIACIÓN EN GANADO VACUNO PROCEDENTE DE
LA COMARCA DEL DEZA

Memoria presentada por el Licenciado D. José Manuel Cruz López
para optar al grado de Doctor en Veterinaria

Lugo, enero de 2005

D. JOSE LUIS BENEDITO CASTELLOTE, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal, Dña. M. MARTA LÓPEZ ALONSO, Profesora Titular del Departamento de Patología Animal y Dña. MARTA INÉS MIRANDA CASTAÑÓN, Profesora Asociada a Tiempo Completo del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidade de Santiago de Compostela

INFORMAN

Que la Tesis Doctoral titulada “Estudio sobre la acumulación de cobre y de los factores de variación en ganado vacuno procedente de la Comarca del Deza”, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria D. JOSÉ MANUEL CRUZ LÓPEZ, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Patología Animal de la Universidade de Santiago de Compostela y, en opinión de los abajo firmantes, este trabajo reúne las condiciones legales para optar al Título de Doctor en Veterinaria.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente informe en Lugo a veinte de enero de 2005.

Fdo. José Luis Benedito Castellote

Fdo. M. Marta López Alonso

Fdo. Marta I. Miranda Castañón

A TI, MAMÁ

***NUNCA CHE AGRADECEREI O SUFICIENTE O
ORGULLOSO QUE ESTOU DE SER VETERINARIO***

Mi más sincero agradecimiento:

A los Profesores Doctores José Luis Benedito Castellote, Marta López Alonso, y Marta I. Miranda Castañón, directores de la presente Tesis Doctoral, por la oportunidad que me han brindado, así como por su inestimable orientación y ayuda, tanto en el terreno personal como en la realización de este trabajo.

A los Profesores Doctores Joaquín Hernández Bermúdez y Cristina Castillo Rodríguez por su desinteresado asesoramiento en la elaboración de esta tesis doctoral, y con los que compartí entrañables conversaciones que me ayudaron a subirme a ese “tren” que solo pasa alguna vez por nuestra vida.

A mis compañeros, Rodrigo, Elena, Jesús, Oscar, Víctor, Patricia e Isabel, con quienes compartí un excelente ambiente de trabajo.

A los técnicos de laboratorio Manuel y Mayte por su ayuda en la preparación y análisis de las muestras.

A los inspectores veterinarios oficiales y personal de Embutidos y Cárnicas Gallegas S.L. de Vila de Cruces y Matadero Comarcal del Deza/Lalín S.L. por la disposición mostrada y por las facilidades que nos brindaron a la hora de la recogida de muestras.

No puedo evitar hacer una mención especial, a José Luis, “El Profesor”, porque de su mano comencé mis andanzas profesionales hace muchos años cuando era estudiante, y de su mano sigo aprendiendo, no sólo como profesor sino como amigo y apoyo incondicional que con creces siempre me ha demostrado ser.

A todas aquellas personas, que de una forma u otra, han colaborado en la realización de este trabajo.

Y, por último, aunque ellos saben que son los primeros, a MI FAMILIA: a mis padres y a mi hermana Milu, a los que les debo todo lo que soy, y a Belén, mi esposa, por llenar de amor y complicidad los silencios de mi camino.

*A todos ellos, **MUCHAS GRACIAS***

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada dentro del Proyecto de Investigación titulado: "Impacto de los purines procedentes de explotaciones de ganado porcino sobre los niveles de cobre en el medio natural y su riesgo de toxicidad sobre especies susceptibles (vacuno y ovino) de Galicia" (PGIDT00AGR2610PR), financiado por la Xunta de Galicia y desarrollado en el Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.

INDICE

| | |
|--|-----|
| INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS | 1 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 9 |
| 1. Cobre en los suelos | 11 |
| 2. Cobre en las plantas | 15 |
| 3. Fuentes de cobre para rumiantes | 17 |
| 4. Necesidades de cobre en rumiantes | 22 |
| 5. Metabolismo del cobre | 24 |
| 6. Funciones del cobre | 55 |
| 7. Deficiencia de cobre en animales | 59 |
| 8. Intoxicación por cobre en animales | 69 |
| 9. Diagnóstico de los desordenes dependientes de cobre | 81 |
| 10. Prevención y control de los desordenes dependientes de cobre | 91 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 105 |
| 1. Zona de estudio: La Comarca del Deza | 107 |
| 2. Animales de estudio | 110 |
| 2.1. Características de los animales | 110 |
| 2.2. Elección del tipo de muestras | 110 |
| 3. Recogida de muestras | 111 |
| 4. Análisis laboratorial | 113 |
| 4.1. Instrumental | 113 |
| 4.2. Preparación de las muestras | 113 |
| 4.3. Determinación analítica | 114 |
| 4.3.1. Determinación de los niveles de cobre por EAA | 114 |
| 4.3.2. Determinación de los niveles de otros metales tóxicos y esenciales por ICP-AES | 115 |
| 4.4. Cálculo de las concentraciones de metales en las muestras | 116 |
| 4.5. Control de calidad | 116 |
| 5. Análisis estadístico | 117 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 119 |
| 1. Capítulo 1. Niveles de cobre en ganado vacuno procedente de la Comarca del Deza. Descripción general. | 121 |
| 2. Capítulo 2. Acumulación de cobre en terneros en los distintos ayuntamientos de la Comarca del Deza | 131 |
| 3. Capítulo 3. Estudio de la influencia de diversos factores de variación (sexo, edad, raza y estación) sobre la acumulación de cobre en terneros. | 139 |
| 4. Capítulo 4. Interacción entre los niveles de cobre y otros metales tóxicos y esenciales en terneros de la Comarca del Deza | 157 |
| CONCLUSIONES | 175 |
| RESUMEN | 181 |
| SUMMARY | 185 |
| BIBLIOGRAFÍA | 189 |

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCION y OBJETIVOS

El cobre es un mineral esencial para la vida puesto que actúa como cofactor de numerosas enzimas y procesos metabólicos; sin embargo, es un elemento extremadamente tóxico cuando está presente en concentraciones excesivas (Horn and Tümer, 1999; Mercer, 2001). Debido a este doble papel, todos los organismos vivos han desarrollado mecanismos homeostáticos altamente especializados para secuestrar, almacenar y excretar cobre, así como eficientes mecanismos detoxificadores para contrarrestar sus efectos cuando está presente en concentraciones excesivas. Tras muchos años de investigación, en los cuales se han descubierto numerosas proteínas implicadas en el metabolismo del cobre -como las metalotioneínas, o de forma más reciente los chaperones y las Cu-ATPasas-, así como la base molecular de importantes enfermedades hereditarias en el hombre (principalmente la Enfermedad de Menkes y la Enfermedad de Wilson) no se conocen todavía en detalle los mecanismos homeostáticos que regulan el metabolismo del cobre a nivel celular (Dameron y Harrison, 1998; Harrison y Dameron, 1999; Horn y Tümer, 1999; Harris, 2000, 2001; Mercer, 2001).

Dentro de las especies animales, y más concretamente de los animales domésticos, existen marcadas variaciones en cuanto a la susceptibilidad a padecer trastornos en el metabolismo del cobre (Bremner, 1998; Radostits et al., 2002; Underwood y Suttle, 2002). De ellas, los rumiantes y especialmente el ganado ovino son las más susceptibles a padecer tanto procesos de deficiencia como de toxicidad por cobre. Debido a su gran predisposición a sufrir procesos de deficiencia de cobre, puesto que presentan una capacidad de absorción intestinal mucho menor a otras especies (Underwood y Suttle, 2002) han desarrollado mecanismos homeostáticos que limitan la excreción biliar del mismo en respuesta a niveles altos en la dieta y que dan lugar a importantes reservas de cobre a nivel hepático; no obstante, el límite entre los niveles

adecuados de acumulación de cobre en el hígado y las concentraciones que dan lugar a alteraciones tóxicas es muy estrecho, lo que los hace a su vez tremendamente susceptibles a sufrir procesos de intoxicación crónica por cobre (Gooneratne et al., 1989a). En el extremo opuesto se sitúa el ganado porcino, especie altamente tolerante a niveles elevados de cobre en la dieta, y de hecho el cobre junto con el zinc se utiliza como promotor de crecimiento a concentraciones muy elevadas (250 mg/kg materia seca) en los sistemas de producción intensiva (Poulsen, 1998).

De forma tradicional se consideraba al ganado vacuno como una especie bastante resistente a la intoxicación por cobre, y de hecho los episodios de toxicidad eran bastante raros. En los últimos años, sin embargo, el número de casos de intoxicación por cobre en ganado vacuno ha incrementado de forma drástica (Bradley, 1993; Engle y Spears, 2000a) incluso con niveles de acumulación hepática claramente por debajo de los considerados como tóxicos de forma clásica (Perrin et al., 1990; Gummow, 1996). Es tal el alcance de esta nueva problemática que varias cartas al editor en la prestigiosa publicación británica *The Veterinary Record* ponen de manifiesto el alarmante incremento de la intoxicación crónica por cobre en esta especie animal (Bidewell et al., 2000; VLA Surveillance report, 2001). En la mayor parte de los casos, los episodios de toxicidad están asociados a un excesivo aporte de cobre en la ración, así como a cambios en la biodisponibilidad de los suplementos dietéticos empleados (Galey et al., 1991; Steffen et al., 1997). Estudios recientes en animales suplementados con cobre dentro de los límites permitidos ponen de manifiesto que se alcanzan niveles de residuo en hígado alrededor de 125 mg/kg, claramente por encima de los valores de normalidad (25-100 mg/kg; Puls, 1994); además en este estudio los animales mostraban un menor consumo de alimento y ganancia de peso en comparación con los animales control (Engle and Spears, 2000a). Estos niveles de cobre que parecen estar asociados a toxicidad subclínica en terneros han sido descritos a gran escala en numerosos países, estando asociados en la mayor parte de los casos al uso de suplementos minerales por encima de las necesidades (Hadrich, 1996; Jilg et al., 1997) o a la contaminación de pastos o forrajes por emisiones industriales, mineras o lodos, especialmente purines de cerdo ricos en cobre (Tokarnia et al., 2000).

A la hora de estudiar el metabolismo y acumulación de cobre en animales, y especialmente en rumiantes, es importante señalar que el desarrollo de problemas de deficiencia y toxicidad no va a depender solo de la concentración de cobre en la dieta, sino que va a verse afectado por numerosos factores que condicionan tanto la absorción/excreción como la biodisponibilidad del mismo (Gooneratne et al., 1989a).

Entre estos factores, el estatus de otros elementos en la dieta, principalmente el molibdeno y el azufre, aunque también el zinc y hierro, van a ser fundamentales para estimar las necesidades nutricionales de cobre. Así, a modo de ejemplo, señalar que pequeños cambios en la concentración de molibdeno y azufre en el pasto o en la ración pueden ser capaces de producir cambios mayores en la absorción, distribución o excreción de cobre en los rumiantes, resultando en síndromes clínicos tanto de deficiencia como de toxicidad (Suttle, 1991; Smith y White, 1997). En la literatura científica existen además numerosos ejemplos de interacciones del cobre con otros elementos tóxicos. Así, la interacción entre el cadmio, el cobre y el zinc debido a la capacidad compartida de estos metales de inducir la síntesis de metalotioneínas (Webb, 1979) que ha sido ampliamente documentada en animales expuestos a niveles altos de cadmio trae como consecuencia una deficiencia secundaria de cobre en animales (Koh y Judson, 1987; Spierenburg et al., 1988; Miranda, 1999; Miranda et al., 2004).

Además de los factores propios de la dieta, la susceptibilidad a padecer desordenes en el metabolismo del cobre va a depender enormemente de factores propios del animal. En este sentido, uno de los factores que emergen cuando se aborda el tema del metabolismo y la suplementación de cobre en animales de granja es que pueden existir diferencias raciales importantes, tanto en las necesidades nutricionales como en la susceptibilidad a los procesos de deficiencia e intoxicación, hecho que debería conocerse en detalle para evitar problemas tanto de carencias como de excesos. La importancia del componente racial en el metabolismo del cobre está bien estudiada en ganado ovino, donde existen marcadas diferencias genéticas en cuanto a la eficacia de absorción gastrointestinal del cobre dietético y a la excreción biliar. Esto ha permitido clasificar a las razas ovinas en susceptibles o resistentes a la intoxicación por cobre, y por tanto ajustar los suplementos dietéticos a sus necesidades (Underwood y Suttle, 2002). En ganado vacuno, sin embargo, la importancia del componente racial en el metabolismo del cobre apenas se ha estudiado. Aunque se sabe que razas como la Simmental o la Charolesa presentan mayores necesidades que otras como la Angus (Radostits et al., 2002), poco se conoce sobre la posible susceptibilidad a la intoxicación por cobre en éstas y otras razas de ganado vacuno.

En Galicia, en un primer estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación en el que se monitorizaron los niveles de metales tóxicos y esenciales en ganado vacuno procedente de toda la comunidad (López Alonso, 1999) se observó que los niveles de cobre en hígado son muy elevados, duplicando los niveles descritos en la bibliografía en todos los países estudiados (López Alonso et al., 2000a). Se observó además que

los niveles de cobre hepáticos son especialmente elevados en terneros procedentes de la Comarca del Deza, donde existe una importante producción de porcino en intensivo y donde se emplean purines de cerdo con niveles elevados de este metal como fertilizantes en pastos destinados al ganado vacuno. En esta zona existe una gran variabilidad en cuanto a los niveles de cobre en terneros criados en explotaciones tradicionales donde los animales se alimentan de productos locales, y aproximadamente el 20% de los hígados de vacuno muestreados presentaban niveles de cobre asociados con toxicidad ($> 150\text{mg/Kg}$). Cuando se estudió la influencia de la densidad de porcino en intensivo sobre los niveles de cobre en vacuno se observó una asociación estadísticamente significativa entre ambos parámetros (López Alonso et al., 2000b). Estos resultados presentan una gran importancia porque, a pesar de que en la literatura científica aparecen descritos numerosos casos puntuales de intoxicaciones en vacuno y ovino asociados a purines de cerdo (Parkinson y Yells, 1985; Christie y Beattie, 1989; Poole et al., 1990; Kerr y McGavin, 1991), es la primera vez que la influencia del uso de purines de cerdo como fertilizantes sobre la acumulación de cobre en ganado vacuno se describe a escala regional.

En este estudio, que se engloba dentro de un amplio proyecto de investigación en terneros procedentes de la Comarca del Deza, se pretende evaluar en detalle los niveles de cobre en terneros procedentes de sistemas tradicionales de explotación y las fuentes de variación que afectan a su acumulación orgánica. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Evaluar los niveles de cobre en hígado, riñón y sangre, principales indicadores de la acumulación orgánica de cobre en rumiantes, en una muestra representativa de terneros procedentes de todos los Ayuntamientos de la Comarca del Deza.
2. Estudiar la influencia de la densidad de ganado porcino en intensivo (número de cerdas reproductoras, número de cerdos de crecimiento-cebo, número de explotaciones por parroquia) en los distintos Ayuntamientos de la Comarca del Deza sobre la acumulación de cobre en terneros.

3. Evaluar la influencia de factores de variación propios del animal (edad, sexo y raza) y la época de sacrificio (invierno o verano) sobre la acumulación de cobre a nivel orgánico.
4. Estudiar si la acumulación de cobre en terneros por encima de los niveles de normalidad ejerce una influencia significativa sobre los niveles de otros metales tóxicos o esenciales, así como, si por el contrario, la acumulación de cobre puede verse también influenciada por los niveles de otros metales.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. COBRE EN LOS SUELOS

El cobre es el mineral más abundante en las rocas *mafic* e intermedias de la corteza terrestre, mientras que en las rocas eruptivas, como los granitos, se encuentra en concentraciones muy bajas. Se suele presentar bajo formas simples y complejos sulfato; estos minerales se solubilizan fácilmente en procesos intemporales y liberan los iones de cobre sobre todo en ambientes ácidos. El cobre es un catión versátil que en los suelos o en la materia reposicionada cuenta con una gran capacidad para interactuar químicamente con otros minerales y compuestos orgánicos. Aunque es soluble, y por tanto móvil y disponible, la forma química en la que se presenta en el suelo es de gran importancia para las prácticas agrícolas, mientras que el contenido total de cobre ofrece únicamente información básica para los estudios geoquímicos (Kabata-Pendias y Pendias, 1984).

Los niveles de cobre en suelos varían de 6 a 60 mg/kg (Kabata-Pendias y Pendias, 1984) siendo este contenido más alto en suelos ricos en hierro y más bajo en suelos arenosos y orgánicos. La regularidad del cobre a gran escala indica la existencia de dos factores, la roca madre y los procesos de formación del suelo, de los que depende su concentración inicial en los mismos.

La característica más común en la distribución del cobre en cuanto al perfil del suelo es su acumulación en el horizonte (capas superficiales). Esto hace que la determinación de la concentración del cobre en la superficie de los suelos refleje la bioacumulación del metal y las deposiciones recientes provocadas por el manejo del hombre.

La variación del pH afecta a la asimilación del cobre, aunque se mantiene al mismo nivel cuando el pH baja de 5. Si se eleva el pH se reduce el cobre asimilado, lo que hace que las carencias de cobre se observen con más frecuencia en los suelos calizos (Kabata-Pendias y Pendias, 1984).

1. 1. Reacciones con los componentes del suelo

Los procesos que implican la fijación del cobre por el suelo se relacionan con los siguientes fenómenos:

- Adsorción. Todos los suelos son capaces de absorber iones de cobre de la fase en la que están disueltos y sus propiedades dependen de la carga superficial de los adsorbentes. La carga superficial está controlada por el pH, por tanto la adsorción de las especies iónicas se puede presentar como una función del mismo. La adsorción del cobre en general es muy elevada, lo que limita su movilidad y hace que sea uno de los 6 microelementos que es adsorbido con mayor fuerza por la superficie de cambio de suelo, explicando así la tendencia a formar enlaces muy energéticos. Muchos autores constataron que el cobre puede ser absorbido dentro de un rango de 1.90-63.5 mg/g; de esa cantidad absorbida el cobre ha sido siempre encontrado con óxido de hierro y manganeso, hierro amorfo (formas cristalinas), hidróxido de aluminio y arcilla. Harter (1979) demostró que las cifras más significativas en la superficie del suelo se obtuvieron entre adsorción de cobre y el total de bases, mientras que en profundidad la adsorción de cobre está altamente relacionada con el contenido de vermiculita.
- Oclusión, coprecipitación y sustitución. Son fenómenos involucrados en la adsorción inespecífica de cobre. Aquellas fracciones del cobre en el suelo que no se difunden son las que están formando parte de ciertas estructuras minerales que tienen una enorme afinidad por ellas, constituyendo la porción más estable del metal en el suelo (Kabata-Pendias y Pendias, 1984).
- Quelación orgánica y formación de complejos. La capacidad de los constituyentes orgánicos del suelo para unirse al cobre está reconocida, siendo estas reacciones la llave que gobierna el comportamiento del cobre en la mayoría de los suelos (Kabata-Pendias y Pendias, 1984).
- Fijación microbiana. Juega un rol muy importante en la unión al cobre en determinadas superficies del suelo. La cantidad de cobre fijada por la biomasa microbiana varía ampliamente y se ve afectada por varios factores como la concentración del metal, las propiedades del suelo y el crecimiento estacional, siendo sin duda un importante paso en el ciclo ecológico de este metal (Kabata-Pendias y Pendias, 1984).

1.2. Contaminación del suelo

La contaminación del suelo agrícola por cobre se debe fundamentalmente a la utilización purines de cerdo (y en menor medida de gallinaza) como fertilizantes, así como al empleo de fitosanitarios, aerosoles y otros productos con un contenido elevado de este metal (García Fernández et al., 1999). En zonas industriales, las emisiones procedentes de actividades antropogénicas pueden contribuir además de una forma significativa al enriquecimiento de cobre de los suelos (Grobler, 1999; Grobler y Swan, 1999 a, b; Underwood y Suttle, 2002).

Los purines de cerdo contienen elevadas concentraciones de cobre y zinc. Esto es debido a que a los cerdos se les añade cobre en las dietas como promotor de crecimiento así como para el control de la disentería; simultáneamente se añade zinc para prevenir cuadros de intoxicación por cobre y problemas de Paraqueratosis o deficiencia de zinc (Christie y Beattie, 1989). El problema deriva en que no se ajustan las cantidades de estos oligoelementos en la dieta a los requerimientos del animal en función de su estado productivo. Si las concentraciones de estos minerales son superiores a los niveles de absorción, que es lo habitual, la parte no absorbida pasa a los purines o estiércol aumentando su poder contaminante (Coppenet et al., 1993; Vilafranca, 1997; Poulsen, 1998).

El purín de cerdo está considerado como uno de los problemas medioambientales más importantes en los países con elevada densidad de porcino en intensivo, como Francia (Arzul y Maguer, 1990; Copenet et al., 1993; L'Herroux et al., 1997), Dinamarca (Bak et al., 1997), Holanda (Binnerts, 1986; Esselink et al., 1995) e incluso Reino Unido (Parkinson y Yells, 1985; Christie y Beattie, 1989; Poole et al., 1990; Nicholson et al., 1999), donde se ha demostrado que el uso de estos purines como fertilizante en los campos provoca un incremento anual importante de cobre en los suelos, llegando incluso a alcanzar niveles de toxicidad si el uso de estos purines es elevado (Carballas Fernández et al., 1990).

El abonado continuo de los campos con purines de cerdo produce acúmulos considerables de cobre y zinc, que pueden llegar a producir efectos detectables en la biomasa microbiana del suelo e incluso pueden ser tóxicos para los animales, sobre todo la oveja (Christie y Beattie, 1989). Coppenet et al. (1993) observaron como con los años el acúmulo tanto de cobre como de zinc en los suelos aumenta de manera preocupante. Arzul y Maguer (1990) observaron una correlación positiva entre el número de cerdos por hectárea y el nivel de cobre en los estuarios, señalando además

que los niveles de cobre en suelos crecían proporcionalmente con la carga porcina. Posteriormente, L'Herroux et al. (1997) en esta misma zona, estudiaron los metales pesados presentes en los purines de cerdo y observaron que al inicio del experimento el cobre en el suelo estaba de forma inerte (fracción residual) y en formas químicas poco asimilables por las plantas. Tras aplicaciones intensivas de purines este elemento estaba presente en concentraciones mucho mayores y en formas disponibles, debido a que la reincidencia de abonado produjo cambios de las condiciones ambientales con alteraciones del potencial redox, bajada del pH y condiciones de anoxia o anaerobiosis. Existe por tanto la necesidad de evaluar las condiciones locales y el tipo de suelo en particular antes de proceder a la aplicación de los purines en los campos. Además, debe tenerse en cuenta las características y los niveles de cobre en la hierba y los excesos de este mineral disponibles para el ganado (Parkinson y Yells, 1985).

Numerosos autores han descrito en ganado ovino niveles elevados de cobre en hígado, en animales que se alimentan de forraje sobre el que se aplican estos purines, siendo frecuentes los casos de intoxicación (Parkinson y Yells, 1985; Christie y Beattie, 1989; Poole et al., 1990; Kerr y McGavin, 1991). Aunque con menor frecuencia, también se han descrito casos de toxicidad en ganado vacuno (Batey et al., 1972; Braude, 1975), atribuidos al consumo de pastos a los que se había aplicado purines de cerdo.

La gestión y tratamiento del estiércol y de los purines en las explotaciones de porcino es un aspecto que cada vez adquiere mayor importancia debido a la sensibilidad social y al problema de acúmulo de determinados elementos tóxicos en suelo-planta-animales por el abuso de abonado (De la Torre et al., 2000). Además, la legislación será más restrictiva en el futuro debido a que las dimensiones de las explotaciones han aumentado considerablemente, produciéndose una concentración de la cabaña porcina en determinadas áreas, lo que origina un aumento final de la carga animal y lleva por tanto a problemas para la reutilización del estiércol y purines de la propia explotación, con el peligro de originar situaciones de riesgo para la salud humana y animal (Vilafranca, 1997).

Aunque en menor medida, debemos señalar el potencial contaminante del empleo de gallinaza como fertilizante agrícola. A los pollos de crecimiento acelerado se le aportan, al igual que a los cerdos, excesos de minerales como promotores de crecimiento así como para evitar ciertas enfermedades. Por ello, los excrementos de pollo son también una importante fuente de contaminación por acúmulo excesivo de

determinados minerales (cobre, zinc y manganeso principalmente) en el suelo y plantas, por lo que debe controlarse el uso continuo de los mismos en los campos para evitar problemas en los pastos y en los animales que se alimentan de ellos (Van der Watt et al., 1994).

De forma más puntual, o incluso accidental, la contaminación de cobre en el suelo podría presentarse por la corrosión de materiales de construcción con aleación de cobre como son los alambres eléctricos o las cañerías, entre otros (Kabata-Pendias y Pendias, 1984).

2. COBRE EN LAS PLANTAS

2.1. Absorción y transporte

Los mecanismos de absorción del cobre por las plantas no se conocen en detalle, aunque hay evidencias de que se trata de un proceso de absorción activa; no obstante, cuando se alcanzan niveles de toxicidad de cobre en los suelos pueden ocurrir fenómenos de absorción pasiva.

A pesar de la complejidad de los mecanismos de absorción, se observa una correlación entre la concentración del metal en las soluciones nutrientes o en el suelo y la concentración en las plantas, siendo dicha asociación especialmente evidente en el rango de toxicidad (Kabata-Pendias y Pendias, 1984; Cook et al., 1997). Además, debemos señalar que el contenido de cobre de las plantas que crecen en zonas irrigadas se va a ver condicionado no sólo por factores dependientes del suelo sino también por los niveles de cobre en el agua y demás propiedades de la misma.

La distribución del cobre dentro de la planta es altamente variable siendo la tendencia general a acumularse en los órganos reproductivos de la planta, así, la mayor concentración de cobre ha sido encontrada en el embrión de los granos de cereales (con un rango de 8 a 18 mg/kg materia seca) y en la cubierta de la semilla (de 8 a 23 mg/kg), mientras que considerando el total de la misma el valor mayor registrado fue 4 mg/kg (Loneragan, 1981).

El movimiento del cobre en la planta determina su utilización por la misma. Así, los tejidos que se encuentran en las raíces poseen la enorme capacidad de unirse al cobre a contragradiente de su transporte hacia los brotes, tanto bajo condiciones de deficiencia como de exceso de cobre. Aunque este proceso todavía no se conoce de

forma completa, Loneragan (1981) concluyó con sus estudios que la excreción del cobre desde la raíz hacia el xilema y el floema donde se encuentran las formas móviles del cobre constituye la base de la nutrición referida al cobre en las plantas.

La extracción de cobre por los cultivos es despreciable en comparación con el contenido en el suelo (Kabata-Pendias y Pendias, 1984; Cabral et al., 1998). A pesar de la tolerancia general de las plantas (especies y genotipos) este metal se considera altamente tóxico (Oskarsson y Norrgren, 1998). Los síntomas generales más característicos de la intoxicación por cobre son clorosis y malformación en las raíces; además, el crecimiento se reduce, sobre todo el de las raíces que son espesas, poco ramificadas y con raicillas de color oscuro (Loué, 1988). Estudios en trigo en crecimiento en suelos enriquecidos en cobre mostraron que las plantas reducían su crecimiento, sufrían clorosis y cambios ultraestructurales en los cloroplastos y manifestaban una eficiencia reducida de la fotoquímica del fotosistema II (PSII) (Eleftheriou y Karataglis, 1989). De todas formas, la toxicidad del cobre no es frecuente debido a la gran capacidad de fijación de este elemento en el suelo, y únicamente aquellos suelos muy ricos en cobre (por el contenido de la roca madre o bien por aportes de cobre durante mucho tiempo) suelen presentar un riesgo potencial para las plantas (Loué, 1988). Para valorar el riesgo de toxicidad se consideran dos criterios principales que son la cantidad de hierro cambiante y el pH bajo (Loué, 1988).

2.2. Funciones bioquímicas

El cobre presenta un papel muy importante en diversos procesos fisiológicos de la planta como son la fotosíntesis, la respiración, la distribución de carbohidratos, la reducción y fijación del nitrógeno y el metabolismo proteico; también influye en la permeabilidad de los vasos del xilema, la síntesis de DNA y RNA y su deficiencia inhibe la reproducción de la planta, disminuyendo la producción de semillas y polen; además está involucrado en los mecanismos de resistencia a determinadas enfermedades (Kabata-Pendias y Pendias, 1984).

Debido a la implicación del cobre en gran número de procesos fisiológicos, la deficiencia del mismo afecta de forma muy importante a la producción de las plantas. Se han aplicado distintos métodos para la valoración de estos efectos, como son el uso de plantas indicadoras, de test en suelos o ensayos bioquímicos. No obstante, aunque la deficiencia de cobre es frecuente y bien conocida, el diagnóstico y corrección de la misma necesita estudiarse con más profundidad. Sin embargo, se podría generalizar que concentraciones inferiores a 2 mg/kg serían inadecuadas para

el desarrollo apropiado de la mayoría de las plantas (Kabata-Pendias y Pendias, 1984).

2.3. Interacciones con otros elementos

Para un desarrollo óptimo, la planta debe tener no sólo una cantidad apropiada de cobre activo en las células sino también poseer un equilibrio entre los elementos químicos. Debido a la función significativa del cobre en los enzimas y su valencia variable, iones que tienen similar afinidad a las proteínas a las que se une el cobre van a dar lugar a antagonismos.

El arsénico, cobre y níquel son elementos que presentan una gran toxicidad para las plantas. A modo de ejemplo, en un estudio sobre las 2 o 3 vías de interacción que afectan al crecimiento y composición tisular del arroz (*Oryza sativa* L.) se constató que según los rangos de aplicación de los niveles de metales los efectos de níquel, cobre y arsénico no eran independientes unos de otros. En términos de toxicidad, existe una interacción sinérgica entre cobre y níquel, mientras que entre níquel y arsénico, cobre y arsénico se observaron antagonismos.

3. FUENTES DE COBRE PARA RUMIANTES

3.1. Disponibilidad en los alimentos

Los ingredientes naturales de las raciones para animales domésticos son con frecuencia deficientes en varios microminerales, lo que hace necesaria su suplementación externa. Por ello es importante conocer las necesidades del animal así como la disponibilidad de los micronutrientes, tanto de las materias primas del pienso como de las fuentes externas utilizadas.

La *disponibilidad* de un micromineral se define como el porcentaje del mismo que es utilizado por el animal. En términos económicos, debemos tener en cuenta que es difícil determinar la disponibilidad real de los microminerales con fiabilidad. Numerosos factores, tales como la metodología del ensayo, el animal, las características de la dieta y las interacciones entre minerales influyen en los valores obtenidos. Además, la disponibilidad se valora en comparación con un patrón, que no siempre es el mismo en los distintos laboratorios (FEDNA, 1999).

Nederbragt et al. (1984) indican que la disponibilidad de cobre en rumiantes depende de la valencia del cobre en la ingesta y está condicionada por las variaciones en la microflora del rumen. Muchos otros factores como la raza, la edad, la composición del suelo y de la ración, así como las variaciones que determinan el cobre disponible para la absorción intestinal también pueden influir en la disponibilidad final del mismo.

3.1.1. Factores dependientes del suelo

Como ya hemos indicado, existe una amplia variedad geográfica en el contenido de cobre en los suelos, el cual se refleja en la incidencia natural de la deficiencia de cobre en los animales.

Aunque se observaron bajos contenidos de cobre disponible en las plantas en aquellos suelos ricos en materia orgánica (Haynes, 1997), las deficiencias de cobre casi en su totalidad se presentan dependientes de factores dietéticos que interfieren sobre la absorción y utilización del cobre por el animal (Phillippo, 1983). Así por ejemplo, se observó una deficiencia leve de cobre en ganado vacuno en zonas de Inglaterra en época de primavera con una contaminación anterior del suelo por hierro (Underwood y Suttle, 2002).

En diversas zonas se ha visto como la hierba capta suficiente molibdeno como para inducir problemas clínicos de deficiencia de cobre (Benedito et al., 1998), lo que nos lleva a presentar el estatus del molibdeno en el suelo como el factor más influyente del que dependen los niveles de cobre. El fuerte efecto influyente del molibdeno hace necesario el diseño de mapas que señalen su contenido en los suelos y sedimentos de arrastre, pudiendo así delimitarse las áreas de mayor riesgo de hipocuprosis (Boila et al., 1984).

3.1.2. Factores vegetales

Se ha estudiado el efecto de una serie de factores sobre el estatus de cobre en las plantas, entre ellos, las diferencias ambientales entre la estabulación y pasto, hierba fresca y heno o el estado de crecimiento de la hierba fresca.

Entre la hierba fresca y la ración de invierno no existen diferencias en cuanto a la composición mineral, de hecho se observó un estatus de cobre adecuado en el hígado de vacas estabuladas al final del periodo invernal con una alimentación con más heno y menos silo que en granjas con bajo estatus en cobre en la época de primavera (Loué, 1988).

La estabulación no afecta de forma significativa al estatus de cobre de los animales, aunque sí se ve mejorado con una alimentación de heno frente a la hierba fresca (Ríos Granja, 1996); esto es debido no sólo al proceso de henificación sino también a la diferencia de la fase de crecimiento en la que se encuentra la planta en el momento del procesado. Incluso se ha visto que en ganado vacuno los animales estabulados alimentados a base de heno incrementan su estatus de cobre (Branion, 1960).

En estudios bioquímicos en ganado vacuno en los que se consideró el nivel de cobre en hierba fresca y heno, así como en el contenido ruminal y heces, se puso de manifiesto la capacidad de formar complejos sulfito en el rumen, lo cual resulta ser un mecanismo muy importante para disminuir la disponibilidad del cobre en rumiantes (Underwood y Suttle, 2002).

3.1.3. Factores estacionales

Los factores estacionales presentan un interés particular ya que los antagonistas del cobre se ven afectados de forma muy importante por ellos. Así, el hierro se encuentra en sus máximos niveles en primavera y otoño; las concentraciones de molibdeno aumentan gradualmente con el avance del año aunque pueden aumentar de forma marcada en la primavera (Korte et al., 1996) llegando incluso a duplicarse durante la estación de pastoreo (Suttle et al., 1999). La concentración de azufre desciende con la maduración de la planta mientras que la disponibilidad del cobre aumenta. Todos estos factores hacen que existan importantes variaciones en el estatus del cobre en animales entre la primavera y el otoño, especialmente en los casos de deficiencia de cobre descritos en animales en crecimiento. Así, se han registrado fluctuaciones estacionales en los niveles plasmáticos de cobre, con concentraciones más bajas entre febrero y marzo y más altas en agosto y septiembre (Smart, 1984).

3.1.4. Factores nutricionales

En función del cobre disponible se cubrirán las necesidades e incluso se incrementará el riesgo de intoxicación mucho más que por la concentración de cobre total contenida en el alimento.

A pesar de los importantes estudios sobre forrajes llevados a cabo por Mills (1954,1956) hay que destacar que poco se conoce sobre las formas en que se presenta el cobre en los alimentos. Debemos considerar que las variaciones en los valores de disponibilidad del cobre para rumiantes de un mismo ingrediente o entre ellos dependen de lo que ocurra en el rumen, y en particular de la sincronía entre la

liberación de cobre y de sus antagonistas potenciales, principalmente molibdeno, azufre e hierro.

Debe tenerse en cuenta que existen diferencias entre la materia prima y el producto final, pudiendo los procesados aumentar o disminuir su contenido de cobre. No obstante, poco se conoce sobre la naturaleza del cobre en los productos alimenticios y los efectos del procesamiento son difíciles de valorar. El metal podría formar complejos con moléculas orgánicas que liberan cobre sólo después de sufrir condiciones extremas de desnaturalización. En contraste con estas observaciones, Mills (1954, 1956) demostró que la hierba cruda es altamente efectiva para aumentar los almacenes de cobre en ratas con deficiencia. Bremner (1970) realizó varios experimentos para caracterizar las especies que eran metal afines en el tracto gastrointestinal de animales con una dieta de hierba seca.

3.1.5. Otros factores

La disponibilidad del cobre puede además estar condicionada por otros factores como la ingesta, fase de preñez o las concentraciones hepáticas.

La fase de preñez afecta a la cinética tanto del feto como de la madre. Así, durante el primer trimestre la concentración hepática de cobre fetal está entorno a 200 mg/kg de materia seca, independientemente de la edad de la madre, raza y estatus de cobre (Crow et al., 1980). Smart y Christensen (1982) encontraron que el contenido hepático descendía repentinamente después de 180 días de gestación en los fetos de vacas que mostraban deficiencia de cobre en hígado (<30 mg/kg materia seca). Aunque no se ve afectado por el estatus de cobre de la madre, la ingesta de cobre durante la gestación modifica los niveles hepáticos del ternero neonato por lo que debe tenerse mucho cuidado ya que no se han determinado los niveles que provocan toxicidad en los terneros. En los recién nacidos la regulación homeostática de cobre es deficiente ya que van a tener un sistema homeostático muy simple. El sistema de la ceruloplasmina no madura antes de los 4 días postnacimiento, en este momento el cobre es liberado del hígado y se alcanzan en plasma valores de referencia en adultos; estos aumentos que se dan tras el nacimiento son independientes de la madre o de las concentraciones de cobre en el hígado de los terneros.

3.2. Composición de los forrajes

La especie, la variedad y la madurez de la planta así como las condiciones del suelo y los fertilizantes utilizados influyen en los contenidos de cobre y de otros minerales

íntimamente relacionados en su metabolismo como hierro, molibdeno y azufre (McFarlane et al., 1990). Así, las concentraciones excesivamente altas de molibdeno en los forrajes se dan de forma natural en suelos alcalinos y suelos ricos en materia orgánica, que además cuentan con niveles elevados de azufre en los forrajes.

Las gramíneas tienden a ser más pobres en cobre que las leguminosas (4.7 vs.7.8 Cu mg/kg materia seca). En gramíneas de clima templado el cobre no se distribuye de forma homogénea (hojas>tallos) de manera que los valores tienden a disminuir durante la estación de crecimiento (Minson, 1990).

Cuando el contenido de cobre de los forrajes y de los pastos es de 1 a 3 mg/kg materia seca, las enfermedades carenciales en los animales son muy probables (Loué, 1988).

3.3. Composición de los alimentos concentrados

El contenido en cobre de las materias primas varía entre 5 y 20 mg/kg materia seca. La disponibilidad del cobre es muy variable si bien, en general, es inferior en fuentes vegetales que en fuentes animales o inorgánicas, probablemente debido a que en las primeras se encuentra en forma de fitatos. Es superior en henos que en praderas, especialmente cuando se pastan previo a la floración.

La mayoría de las fuentes minerales de cobre (metionato, lisinato, sulfato, acetato, cloruro, óxido cuproso, etc) son bien utilizadas tanto en monogástricos como en rumiantes. Tomando como referencia el cobre pentahidratado (asignándole una disponibilidad del 100%) el carbonato presenta valores medios, inferiores al sulfato y sólo el óxido cúprico presenta valores de utilización limitados (FEDNA, 1999).

La intoxicación por cobre es más frecuente en animales alimentados con concentrados. Esto es debido a que a pesar de que los pastos pueden contener más o menos cobre que los granos, la disponibilidad del mismo en los cereales es mayor, llegando a un coeficiente de absorción 10 veces superior (Suttle, 1986). Las diferencias específicas entre distintas semillas de gramíneas respecto al contenido de cobre y otros elementos antagonistas son relativamente bajas, siendo además las concentraciones normales reducidas si se comparan con las de la mayoría de los alimentos destinados al ganado.

La leche y los productos lácteos son pobres en cobre (1-2 mg/kg materia seca; Licata et al., 2004) aunque se pueden contaminar durante su elaboración y almacenamiento.

Por el contrario, la concentración de molibdeno en leche depende de la ingesta dietética, a diferencia del cobre, y puede elevarse siete veces por encima de lo normal (0.06 mg/l en ovejas y vacas). No obstante, el molibdeno de la leche sobrepasa el rumen por lo que tiene poco efecto sobre el estatus de cobre (Underwood y Suttle, 2002).

4. NECESIDADES DE COBRE EN RUMIANTES

El nivel de cobre en la dieta necesario para el mantenimiento de la salud de los animales depende de la especie animal y sobre todo, como hemos venido indicando, de numerosos factores nutricionales, estando sobre todo correlacionado con los niveles de molibdeno y sulfuro inorgánico (Nacional Research Council, 2000). Cuando las condiciones dietéticas son óptimas para la utilización del cobre, niveles de 8 a 10 mg/kg materia seca son suficientes para cubrir las necesidades en rumiantes (Nacional Research Council, 2000).

En momentos de alta producción láctea, crecimiento rápido o estrés las necesidades de cobre aumentan, por lo que estas recomendaciones son probablemente inadecuadas y deberían ser excedidas. También es bien sabido que ciertos minerales, nitratos, sulfato, proteínas y plantas estrogénicas reducen la utilización de cobre; por ello todos estos factores deberían de ser identificados para determinar de forma precisa los requerimientos dietéticos de cobre en los animales (Underwood y Suttle, 2002).

La composición de la dieta es la responsable de determinar la proporción del cobre dietético que es absorbido y puede variar tanto que la ingesta de cobre *per se* poco va a condicionar la aparición de una deficiencia funcional de cobre. Se puede decir que tres son los factores más importantes: el tipo de alimento, el contenido relativo de molibdeno y azufre y la constitución genética del animal (Suttle, 1986).

4.1. Tipo de alimento

Al estudiar la composición de los alimentos que normalmente consumen los rumiantes se ha encontrado que existen grandes diferencias en la biodisponibilidad del cobre, lo cual condiciona de forma muy importante las necesidades nutricionales de los animales.

El cobre se absorbe con mayor facilidad en alimentos bajos en fibra como cereales y brassica, mientras que la absorción es más pobre en hierba fresca. La conservación de la hierba o heno y el ensilado generalmente mejoran su disponibilidad aunque raramente los niveles de la cosecha no fibrosa y en el caso del silo hacen que las mejoras sean consistentes (Suttle, 1986).

Diversos componentes de la dieta, como el fitato, el ácido ascórbico, los tiomolibdatos, la fructosa o la fibra presentan la capacidad de acomplejarse con el cobre y por tanto limitar su absorción (Underwood y Suttle, 2002).

La intoxicación por cobre es esencialmente un problema en ganado intensivo, pero no por el hecho en sí, si no porque su alimentación implica que la disponibilidad del cobre va a ser mayor. Siguiendo este razonamiento lógico, la deficiencia de cobre es un problema del ganado en pasto por la pobre disponibilidad del cobre en la hierba (Suttle, 1986).

4.2. Efectos del molibdeno y azufre en la disponibilidad del cobre

La capacidad del molibdeno y azufre para inducir deficiencia de cobre en rumiantes es un hecho perfectamente constatado (Whitelaw et al., 1984; Ladefoged y Stürup, 1995; Smart et al., 1992; MacPherson et al., 1997). Se ha acumulado suficiente información sobre las interacciones entre estos metales como para establecer ecuaciones que cuantifican un 78% de variación en la disponibilidad del cobre en ovejas en un determinado lugar (Suttle, 1983 a). Las interacciones con hierro, molibdeno y azufre van a condicionar las necesidades de cobre, y esto debe tenerse en cuenta antes de valorar la capacidad de los alimentos para proporcionar el cobre disponible necesario (Suttle, 1986).

4.3. La importancia de la constitución genética

La constitución genética cobra una gran importancia al conocerse que los desórdenes metabólicos del cobre podrían ser controlados por manipulación genética (Underwood y Suttle, 2002). Como se tratará de forma más específica en otros apartados de esta revisión bibliográfica, la influencia genética en la susceptibilidad a padecer procesos de deficiencia o toxicidad de cobre ha sido ampliamente estudiada en ganado ovino, lo que ha permitido adaptar las razas (susceptibles o tolerantes al cobre) a las características de los pastos (Suttle et al., 2002). En ganado vacuno el efecto de la genética sobre las necesidades de cobre ha sido mucho menos estudiado, limitándose a un número reducido de razas, si bien hay evidencias de que existen diferencias

genéticas en cuanto a sus necesidades de cobre (Littledike et al., 1995; Mullis et al., 2003).

5. METABOLISMO DEL COBRE

5.1. Absorción

Aunque el mecanismo de absorción de cobre en el animal adulto no se conoce con precisión, se sabe que se lleva a cabo en varios tramos del tracto digestivo, desde el estómago al intestino grueso. En el caso de los rumiantes se limita principalmente a duodeno y yeyuno (Underwood y Suttle, 2002).

La capacidad máxima de absorción intestinal está dentro del rango del 30-60%. No obstante, de este cobre absorbido una gran parte se secreta, haciendo que al final las cifras que se barajen sean del 5-10% (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001).

La absorción intestinal cuenta con dos componentes: por un lado el transporte activo que es saturable y mediado por metalotioneínas (se relaciona con bajas concentraciones de cobre) y la difusión simple, que es un mecanismo pasivo e insaturable (relacionado con altas concentraciones). Además, la absorción de los compuestos de cobre podría agruparse en dos categorías: aquellos que son absorbidos fácilmente como es el caso de hidróxidos, yoduros, glutamatos, citratos y pirofosfatos frente a los que tienen dificultada la absorción que son los sulfatos, óxidos, el cobre metálico y los compuestos de cobre no hidrosolubles (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001).

La valencia del ion de cobre influye en la disponibilidad del metal en el intestino (Nederbragt, 1984). En animales monogástricos el cobre se presenta normalmente como Cu^{+2} mientras que en rumiantes se presenta predominantemente como cobre monovalente cuya absorción es más difícil que en su forma divalente.

Es importante señalar que además de las variaciones específicas en la absorción intestinal de cobre ya nombradas hay otras que son propias de las circunstancias del individuo como la edad, raza o propiamente idiosincrásicas. Así por ejemplo, el recién nacido tiene asegurado el aporte necesario de cobre mediante la absorción por pinocitosis de las macromoléculas intactas y el alto contenido de cobre en el calostro, además tiene una mayor capacidad de absorción y sus reservas son mayores (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001). Los animales monogástricos y los terneros absorben del 45-55

% del cobre dietético, lo que puede ser debido a los bajos niveles de hierro en su comida o la formación de sulfuro de cobre por la reducción de sulfato a sulfuro.

La razón de la vulnerabilidad del rumiante al déficit del cobre tiene su explicación en los procesos digestivos que tienen lugar en el rumen, donde se degradan las fuentes orgánicas e inorgánicas de azufre a sulfuro. Los protozoos del rumen juegan un papel muy importante en la generación de sulfuro; así se ha visto que en animales libres de patógenos que son extraídos mediante cesárea (Ivan, 1988) o mediante la administración de ionóforos antiprotozoarios (Van Ryssen y Barrowman, 1987) la absorción de cobre está aumentada. Durante la digestión ruminal la mayor parte del cobre liberado va a precipitar en forma de sulfuro de cobre y permanece sin absorberse, mientras que el liberado durante la digestión postruminal se une parcialmente a componentes no digeridos. En ovejas se han propuesto una serie de teorías para explicar la acumulación de cobre por el desequilibrio de la actividad o composición de la microflora del rumen, pero no hay evidencias que constaten estas teorías (Nederbragt, 1984).

Tanto en humanos como en animales se ha mostrado que la absorción intestinal de cobre se regula por las formas químicas en las que se presenta en el alimento, el estatus nutricional del individuo y numerosas interacciones con otros factores dietéticos que afectan a la biodisponibilidad. El transporte de cobre a través del borde en cepillo del intestino delgado podría estar condicionado por una gran variedad de componentes dietéticos, incluyendo la fibra, fitatos, ácido ascórbico, tiomolibdatos y aminoácidos (Cousins, 1985).

Aunque no se conocen en detalle los mecanismos bioquímicos involucrados, hay evidencias de que la absorción intestinal de cobre se regula en gran medida por las necesidades del organismo, donde las metalotioneínas juegan un papel destacado en el mantenimiento de un estatus nutricional adecuado (Bremner, 1998). La razón por la que estas proteínas varían tanto en animales de genética y estados fisiológicos distintos no se conoce, algunas posibilidades podrían ser cambios en el flujo de cobre o ratio de síntesis:degradación de la proteína (Cousins, 1985). A modo de ejemplo, el cordero que es alimentado con leche puede llegar a absorber un 70-85 % del cobre ingerido, mientras que el destetado absorbe menos del 10%. Durante la gestación, el aumento en la retención de cobre en las ratas es parcialmente una consecuencia de la disminución de la excreción biliar del metal (Terao y Owen, 1977).

Cuando se enriquece la ración con molibdeno y azufre se forman tiomolibdenatos que llevan a la formación de compuestos de cobre que son más complejos y además el cobre tiende a unirse más fuertemente al material particulado (Allen y Gawthorne, 1987 a,b), se reduce entonces la disponibilidad del cobre que lleva a una absorción menor del 1% (Price y Chesters, 1985).

Bajo condiciones normales los animales monogástricos utilizan de un 30 a 50% del cobre dietético, mientras que los porcentajes disminuyen si se incluyen mayores cantidades de cobre en la dieta. En rumiantes el sistema microbiótico en el rumen es un factor importante que determina la disponibilidad del cobre, lo que se denota claramente por la influencia de la producción de sulfuro en el rumen; se piensa que está unido el cobre a S^{2-} formando Cu_2S una forma más insoluble incluso que el CuS (Nederbragt, 1984). En el ambiente ruminal con un pH reducido, el cobre se puede presentar de forma monovalente, y de hecho se puede demostrar que muestras de rumen reducen fácilmente grandes cantidades de cobre iónico (Nederbragt, 1984).

La absorción del cobre se va a ver mermada por la acción de antagonistas, y así cabe citar como los más importantes:

- Elementos de transición. Existen elementos químicos que son similares al cobre y que van a competir con él por los sitios de unión en los sistemas metabólicos específicos, incluyendo la absorción intestinal. Evans et al. (1970a) aislaron y purificaron unas proteínas metalafines en el duodeno de ganado vacuno y demostraron que el cadmio y el zinc desplazan al cobre de los puntos de unión sulfhídricos.
- Ácido ascórbico. El ácido ascórbico es reconocido como un antagonista del cobre en numerosas especies animales (Johnson y Murphy, 1988) probablemente debido a la capacidad de reducción de Cu^{+2} en Cu^{+} . Hunt et al. (1970) observaron una reducción significativa del cobre hepático en pollos con una dieta suplementada con ácido ascórbico, con lo que concluyeron que afectaba a la absorción de cobre, a su uso o a ambos. Evans et al. (1970b) demostraron una disminución en la unión de cobre a las metalotioneínas en intestino e hígado después de la adición de ácido ascórbico; el análisis espectral de las proteínas indica que la vitamina interactúa con las metalotioneínas y por eso inhibe la formación de mercáptidos. Experimentos llevados a cabo en animales de laboratorio alimentados con dietas deficientes de cobre y suplementados con 1-5% de ácido ascórbico tuvieron mayores índices de mortalidad, pérdidas de peso y bajo hematocrito y hemoglobina que los animales

control; así se sugería que el ácido ascórbico daña el estatus de cobre a través de una disminución en la absorción o un aumento en el movimiento del cobre (Johnson y Murphy, 1988).

- Complejos dietéticos cúpricos. La disponibilidad del cobre se ve condicionada por la naturaleza de los componentes de la dieta. Existen investigaciones que demuestran que la proteína ingerida tiene un papel protector frente a la acumulación de cobre (McKee y Frieden, 1971) y que consiste en la formación de complejos macromoleculares que los invalidan para su absorción.
- Aniones. La forma más conocida como inhibidora sobre la absorción del cobre es el sulfito, hecho comprobado en numerosas especies animales como ratas, cerdos o el hombre (Underwood y Suttle, 2002)

5.2. Transporte y captación celular

El cobre a nivel intestinal se enlaza a una metalotioneína de la mucosa lo que limita su traslocación posterior (Cousins, 1985) y permite la adaptación a ingestiones excesivas (Woolliams et al., 1983). Después de la absorción intestinal el cobre es transportado a través de la sangre por la albúmina.

Para ser captado por el hígado se une a glutatión primero y después a metalotioneínas y otras proteínas citoplasmáticas, donde es utilizado para el metabolismo hepático, almacenado en forma de Cu-metalotioneínas o, si el aporte es excesivo, eliminado a través de la bilis. El cobre necesario para el metabolismo extrahepático abandona el hígado en forma de ceruloplasmina, cuya síntesis está condicionada por fenómenos como la inflamación, ciertas hormonas y niveles de cobre (Cousins, 1985).

En el caso de un déficit de cobre, se produce un aumento en la actividad hepática de los enzimas encargados de la síntesis de glutatión (Chen et al., 1995) que estimulan la eficacia en la captación de cobre por el hígado; lo mismo sucede en la exposición a un exceso de selenio (Hartman y van Ryssen, 1997).

La captación de cobre en el resto del organismo ocurre sobre todo debido a receptores de ceruloplasmina en la membrana celular (McArdle, 1992; Saenko et al., 1994), aunque también se observó *in vitro* que la albúmina y algunos aminoácidos como la histidina facilitan su captación.

La ceruloplasmina constituye la fracción de cobre plasmático más elevada en animales, a excepción de las aves donde la actividad de esta proteína en el torrente sanguíneo es muy escasa. En los no rumiantes constituye el 95% del cobre plasmático frente al 80% de animales rumiantes. En vacuno los niveles de ceruloplasmina disminuyen drásticamente durante una deficiencia de cobre y pueden alcanzar niveles no detectables en ganado aparentemente sano (Humphries et al., 1983).

En la sangre, el cobre se encuentra principalmente en los eritrocitos, donde el 60% del total está asociado al enzima superóxido dismutasa (SOD) mientras que el 40% restante se encuentra libre contenido en un compartimento dializable que Bush et al. (1956) designaron como “*pool lábil*” en el que está unido a aminoácidos y que probablemente es necesario para asegurar un adecuado suplemento para mantener la actividad superóxido dismutasa. El cobre total contenido en los eritrocitos permanece constante a pesar del estatus de cobre del animal y esto ocurre en la mayoría de las especies animales tanto en casos deficiencia como en ingestiones excesivas.

Ante situaciones de deficiencia de cobre se produce un estímulo del reciclaje al optimizar la eficacia de absorción, si bien los mecanismos involucrados en este proceso homeostático no se conocen en detalle. Tampoco se sabe hasta qué punto el cobre es vulnerable a los tiomolibdatos capaces de estimular las pérdidas de cobre; Smith et al. (1968) obtuvieron un aumento de 2.5 veces en las pérdidas fecales endógenas de cobre en ovejas que recibían grandes suplementos de molibdeno (25 mg/kg) y azufre (4.5 mg/kg). Woollians et al. (1983), al igual que Freudenberger et al. (1987), observaron incrementos notables en la velocidad de depleción hepática del cobre al tiempo que veían un efecto de la estimulación del molibdeno de la ración sobre las pérdidas endógenas de cobre.

Por último comentar que la captación del cobre no va a condicionar la excreción del mismo por vía urinaria. Como el cobre circula en la sangre unido a la ceruloplasmina o se encuentra confinado dentro de los eritrocitos, es muy poco el cobre permeable en los capilares glomerulares, lo que hace que la excreción urinaria de cobre sea insignificante en todas las especies animales, aunque se sabe que aumenta en el caso de las ovejas ante la exposición a molibdeno (Smith et al., 1968; Marcilese et al., 1969).

5.3. Metabolismo hepático

El éxito en la adaptación a las variaciones en el aporte de cobre en la dieta se consigue gracias al almacenamiento hepático y la excreción biliar, si bien la proporción

de cobre almacenado, así como la capacidad de eliminación biliar varía ampliamente según la especie animal. Los rumiantes, especies más vulnerables a la deficiencia de cobre, almacenan los excesos de este micronutriente, mientras que los no rumiantes, que no cuentan con ningún riesgo, excretan por vía biliar el exceso de cobre y mantienen bajos los niveles hepáticos de este metal. Deben tenerse en cuenta también las diferencias entre especies en cuanto a la restricción de la acumulación hepática mediante excreción biliar; de hecho la incapacidad del ovino para la eliminación biliar de cobre explica su mayor vulnerabilidad a padecer procesos de intoxicación crónica frente a otras especies como el porcino donde esta capacidad no es limitada (Bremner, 1998).

En rumiantes cuando ocurre una depleción de cobre (por ejemplo ante una falta de ingestión en la dieta) el ritmo al que desciende el cobre hepático se correlaciona de manera positiva con las concentraciones previas a la depleción en este órgano (Woollians et al., 1983; Freudenberger et al., 1987).

En los tejidos extrahepáticos el metabolismo del cobre se confina sobre todo a la síntesis y degradación de enzimas cobre-dependientes, mientras que el hígado está implicado además en el mantenimiento de la homeostasis del cobre.

5.3.1. Distribución subcelular de cobre y almacenamiento hepático

Dentro del hígado, el cobre se encuentra asociado a distintas fracciones celulares en las que desempeña un papel específico, tanto formando parte de enzimas cobre dependientes como ligado a proteínas de almacenamiento.

Estudios de fraccionamiento subcelular, llevados a cabo principalmente por técnicas de centrifugación diferencial (Corbett et al., 1978; Gooneratne et al., 1979; Saylor y Leach, 1980; Jenkins, 1989; Kumaratilake y Howell, 1989), consideran que en las células hepáticas el cobre está contenido en cuatro grandes fracciones, desempeñando unas funciones específicas en cada una de ellas:

- Fracción microsomal. Contiene al menos un 10% del cobre total en la célula hepática y representa las fracciones del retículo endoplasmático rugoso, retículo endoplasmático liso, aparato de Golgi y ribosomas. Está involucrada en la nueva síntesis de proteínas que contienen cobre que están siendo transportadas con el fin de su uso o secreción.

- Fracción nuclear. Contiene aproximadamente el 20 % del cobre total hepático en la mayoría de los mamíferos, si bien su contenido exacto es difícil de evaluar puesto que en esta fracción queda además englobado el cobre unido a restos de tejidos y células intactas. Se considera una organela que puede funcionar como un almacén temporal. Está constituido por ácido nucleico y proteínas básicas a las cuales se une el cobre.
- Fracción granular. En la mayor parte de los animales con un estatus adecuado representa el 20% del cobre total. Está compuesta por mitocondrias y lisosomas, éstos últimos con un papel vital para mantener la homeostasis del cobre. El material que no puede ser digerido o preparado para su excreción por el parénquima es almacenado dentro de los lisosomas, organelas que secuestran el exceso de cobre previa excreción biliar.
- Citosol. El sobrenadante final o citosol contiene la mayoría (50 %) del cobre hepático en los mamíferos adultos. Está asociado en su mayor parte a proteínas específicas metal-afines como las metalotioneínas (principales puntos de almacenamiento temporal de cobre en la célula) aunque en menor medida también a enzimas cobre-dependientes como la superóxido dismutasa.

Es necesario señalar que la proporción de cobre en las distintas fracciones subcelulares mencionadas varía de forma muy destacable en función de diversas variables como la especie animal, edad y estatus de cobre.

5.3.1.1. Variaciones en la distribución subcelular de cobre dependientes de la especie

En la mayoría de las especies de mamíferos con un estatus normal de cobre la mayor proporción de este metal (por encima del 50%) está localizada en el citosol, como almacenamiento temporal en forma de metalotioneínas. La capacidad de esta fracción para almacenar cobre va a depender de forma muy importante de la especie animal, siendo muy alta en aquellas, como el perro y el cerdo, que tienen una enorme capacidad de síntesis de metalotioneínas, en comparación con otras, como los rumiantes, donde esta capacidad es muy limitada. A su vez, la escasa capacidad de los rumiantes (especialmente el ovino) para la síntesis de metalotioneínas hace que la excreción biliar de cobre vía lisosomal sea muy limitada, lo que conduce a su almacenamiento en concentraciones elevadas en la fracción granular.

5.3.1.2. La edad como agente modificador de la distribución subcelular hepática

La concentración hepática de cobre en la mayoría de las especies de mamíferos va aumentando de forma constante durante el periodo intrauterino, alcanza un máximo antes o al nacimiento y después disminuye a los niveles encontrados en adultos (Underwood y Suttle, 2002). Evans et al. (1970c) demostraron con sus experimentos que los aumentos en las concentraciones hepáticas de cobre en animales inmaduros resultan de su limitada capacidad de eliminación biliar.

Al igual que la concentración total de cobre hepático, el contenido de cobre en las distintas organelas varía de forma destacable con la edad. Así, los estudios realizados con centrifugación diferencial en hígado humano (Porter, 1964), bovino (Porter et al., 1961) y de rata (Gregoriadis y Sourkes, 1967; Evans et al., 1970c) demostraron que las fracciones granular y nuclear contienen el más alto nivel de cobre durante el desarrollo neonatal (con un total de casi un 80% del cobre total neonatal del hígado inmaduro) mientras que el citosol contiene únicamente un 15%. Durante el desarrollo, una vez que maduran los mecanismos homeostáticos de eliminación biliar, el contenido de cobre disminuye drásticamente en la fracción granular y nuclear y ligeramente en el citosol, mientras que el resto es distribuido en las organelas subcelulares en la proporción previamente descrita.

Las alteraciones de la distribución subcelular hepática que dependen de la edad señalan la existencia de un mecanismo homeostático de protección en las células hepáticas. Como la eliminación de cobre es limitada en el hígado inmaduro y esto causa un aumento de la concentración del mismo, los sitios de unión en el citosol llegan a saturarse y el exceso de cobre pasa a estar unido a los lisosomas o es incorporado a las proteínas de las mitocondrias y del núcleo. Cuando el animal madura y la capacidad de eliminación biliar del cobre mejora, la acumulación de este metal dentro de la célula disminuye y así también disminuye la necesidad de unión del cobre a organelas celulares. Cuando el movimiento del cobre hepático alcanza su máxima capacidad, la mayor proporción de cobre hepático está unido a metalotioneínas dentro del citosol en la mayoría de las especies, a excepción de los rumiantes que presentan una capacidad de síntesis de metalotioneínas muy limitada (Evans, 1973; Cousins, 1985).

5.3.1.3. Efecto del estatus del cobre en su distribución subcelular

Ante el acúmulo de cobre en el hígado la distribución subcelular se asemeja a la de los neonatos (Gregoriadis y Sourkes, 1967; Evans et al., 1970c), en ambos casos el

contenido de cobre en las organelas subcelulares y la concentración hepática siguen una función lineal. La capacidad de unión es alta en la fracción granular y nuclear, mientras que en el citosol es limitada; el retículo endoplasmático liso y las proteínas del núcleo son los encargados de mantener la homeostasis del cobre hepático.

La distribución subcelular de cobre, zinc, hierro y molibdeno fue investigada en el hígado de terneros prerrumiantes alimentados con lactorreemplazantes, comparando los efectos de una dieta control de 10 mg Cu /kg (dosis control) y 1000 mg Cu /kg (dosis alta), o con la dosis de cobre de 1000 mg/kg añadiéndole zinc. En los animales del grupo control el cobre se localizaba primeramente en el núcleo y la fracción lisosomal, el zinc principalmente en el citosol, el hierro en el citosol y la fracción nuclear, mientras que el molibdeno se presentaba en todos los compartimentos con un mínimo en los microsomas. Los terneros que recibían dosis altas de cobre presentaban marcados aumentos de cobre en el núcleo y la fracción del citosol, el zinc aparecía reducido en el citosol, el hierro aumentado en el núcleo y el molibdeno disminuido en todas las fracciones (Jenkins y Hidioglou, 1989).

5.3.2. Influencia materna en el metabolismo fetal del cobre

La mayoría de los animales neonatos tienen mayor concentración de cobre en el hígado que los adultos, a excepción de la especie ovina (Underwood y Suttle, 2002). Gracias al almacén mineral en el hígado fetal, el recién nacido obtiene el cobre necesario para los primeros estadios de vida. Las reservas neonatales se reducen si se produce una restricción del aporte materno, con esto se acelera su depleción posterior (Wiener et al., 1984 a, b).

El feto tiene una máxima prioridad frente a la madre a la hora del reparto del cobre dietético. Se ha observado que vacas con concentraciones de cobre hepáticas bajas (<24.8 mg/kg materia seca) pueden criar terneros que contienen en sus hígados 330 mg/kg materia seca de cobre (Gooneratne y Christensen, 1985); sin embargo con valores maternos por debajo de 16.5 mg/kg materia seca los valores fetales descienden en más de un 50%.

En cuanto a la concentración de cobre en la leche materna se ha observado que la secreción de este oligoelemento se reduce cuando el aporte dietético es inadecuado, si bien no se incrementa al suplementar cobre en la ración (Whitelaw et al., 1983). También es destacable la existencia de diferencias en los niveles de cobre en leche entre especies, mientras que en vaca y cabra son bajos (0.15 mg/l Cu) la cerda secreta niveles altos (0.75 mg/l Cu) durante un periodo breve, posiblemente debido a

que se trata de una lactación de una camada grande y de rápido crecimiento (Underwood y Suttle, 2002).

De lo dicho anteriormente se desprende que el almacenamiento de cobre en el hígado fetal a expensas de la madre, seguido de la excreción de cobre sufrida durante la lactación, hacen mermar de forma considerable las reservas hepáticas de la hembra. En casos de deficiencia de cobre, las escasas reservas de la madre pueden no ser suficientes para cubrir las necesidades, lo que hace que la descendencia nazca con reservas hepáticas de cobre disminuidas y que consuman leche donde el contenido de cobre está muy por debajo de lo normal (Suttle et al., 1970).

5.4. Ceruloplasmina

Como hemos indicado, la ceruloplasmina es la principal proteína transportadora del cobre hepático hacia los tejidos. Contiene 6-8 átomos de cobre por molécula y liga del 90 al 95% del cobre en el torrente sanguíneo (Cousins, 1985). Después de un tiempo la ceruloplasmina vuelve al hígado donde se degrada en los lisosomas.

La ceruloplasmina ejerce un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio entre el cobre hepático y extrahepático. Por una parte, el aumento de la concentración hepática de cobre induce la síntesis de ceruloplasmina, lo que permite una mayor redistribución del metal hacia los tejidos periféricos, así como el mantenimiento de los niveles de cobre hepáticos dentro de los límites fisiológicos, si bien es cierto que por encima de una determinada concentración de cobre en el hígado los niveles de ceruloplasmina alcanzan una fase de meseta (Eckert et al., 1999). Por otra parte, tal y como han demostrado Campbell et al. (1981) la absorción de cobre hacia los tejidos está estrictamente relacionada con la liberación de ceruloplasmina por parte del hígado.

Evans et al. (1970c) comprobaron en ratas que la disminución de la concentración hepática de cobre durante el desarrollo neonatal coincide con un aumento de la ceruloplasmina en plasma.

La ceruloplasmina se considera como una proteína de fase aguda, con marcadas propiedades antiinflamatorias (Denko, 1979) así como de protección frente a fenómenos de peroxidación lipídica (Dormandy, 1980). Como ejemplos del aumento de ceruloplasmina asociada a procesos inflamatorios podemos citar enfermedades crónicas comunes como la artritis (Sorenson, 1978) y la enfermedad periodontal (Freeland et al., 1976). El mecanismo fisiopatológico que explica este aumento de

actividad de ceruloplasmina es complejo e involucra tanto la estimulación de su síntesis como la secreción desde las células hepáticas.

Varios experimentos han demostrado además que la ceruloplasmina en plasma se eleva en respuesta a determinados aumentos patológicos de cobre en el hígado, como por ejemplo en la cirrosis biliar humana, la enfermedad de Wilson (Sternlieb, 1980) y cirrosis biliar primaria (Jain y Gerlowski, 1981). En estos casos, el aumento de la función de la ceruloplasmina como antioxidante se debe posiblemente al aumento de la producción de metabolitos oxidantes por parte del cobre, entre los que se incluye O_2^- y H_2O_2 .

Finalmente, debemos destacar la influencia de determinados metales sobre la actividad de la ceruloplasmina. Así, se ha demostrado que la administración parenteral de cadmio estimula de forma significativa la actividad de la ceruloplasmina sérica, junto con un aumento del cobre hepático. La administración de plomo también aumenta ligeramente el nivel de ceruloplasmina. En contraste, la inyección de plata disminuye de forma intensa la actividad de ceruloplasmina y la concentración de cobre en suero y aumenta ligeramente el cobre hepático (Sugawara y Sugawara, 1987).

5.5. Metalotioneínas

Las metalotioneínas se aislaron por primera vez en 1957 en el riñón de caballos como una proteína unida al cadmio (Margoshes y Vallee, 1957; Kagi y Vallee, 1960). Sin embargo, no fue hasta que se demostró en animales de experimentación que su síntesis podía ser estimulada por metales, cuando atrajeron el interés de los investigadores, en este primer momento se sugirió que las metalotioneínas podrían jugar un papel crucial en la detoxificación del cadmio y otros metales pesados.

En 1970, transcurrida más de una década, se demostró que las metalotioneínas también participaban en el metabolismo de metales esenciales. Así, se descubrió que estas metaloproteínas están mayoritariamente unidas a cobre y zinc en un amplio rango de tejidos (Bremner y Young, 1976) y que su síntesis puede ser inducida por la administración de uno de estos metales esenciales (Webb, 1972; Bremner et al., 1978), además de por una gran variedad de estímulos fisiológicos, incluyendo el hambre y el estrés (Oh et al., 1978; Sobocinski et al., 1978). Todos estos hallazgos ponen de manifiesto su importancia fisiológica, nutricional así como toxicológica y se sugiere que su papel en la detoxificación de metales no esenciales, como el cadmio, en realidad podría ser una coincidencia fortuita debido a las propiedades químicas similares entre el cadmio, cobre y zinc (Webb, 1972).

Desde este momento, las metalotioneínas han sido aisladas de una gran variedad de especies y tejidos animales, siendo más características del hígado, riñón e intestino, mostrándose en hígado de animales adultos como una proteína que contiene zinc (Nordberg y Nordberg, 2000).

En cuanto a las propiedades físico-químicas de las metalotioneínas, Kagi y Walle (1960) aislaron y caracterizaron estas proteínas en una gran variedad de muestras biológicas. Cuentan con una cadena polipeptídica única de 61 aminoácidos de los cuales el 25-30 % contienen residuos de cisteína, capaz de unir a 5-7 átomos de cobre por molécula y presentan una secuencia homóloga indicando la conservación de la estructura primaria a lo largo de la cadena evolutiva (Knudsen et al., 1998).

Centrándonos en el papel de las metalotioneínas en el metabolismo intrahepático del cobre, debemos señalar que tras muchos años de investigación su papel no está totalmente esclarecido. La unión del exceso de cobre a las metalotioneínas en el citosol, para posteriormente ser eliminado a través de los lisosomas vía biliar, parece ser la hipótesis más aceptada dentro de la detoxificación celular de este metal (Bremner, 1987). De hecho, está bien demostrado que en el hígado de animales expuestos a altos niveles de cobre se encuentran cantidades importantes de complejos cobre-metalotioneínas en los lisosomas y otras fracciones particuladas del hígado (Riordan y Richards, 1980; Johnson et al., 1981; Mehra y Bremner, 1984); en estos animales, la rápida desaparición del cobre del citosol reflejaría la absorción de la Cu-metalotioneína por los lisosomas y otras organelas para su eliminación biliar.

Sin embargo, el hecho de que no se detecten anomalías en el metabolismo del cobre a nivel hepático en animales deficientes de zinc (en los cuales las metalotioneínas unidas al cobre están ausentes) parecen indicar que la metaloproteína no juega un papel obligatorio en el transporte intracelular del cobre (Bremner, 1987).

No obstante, las grandes diferencias entre especies animales en cuanto a su capacidad de síntesis de metalotioneínas, podrían explicar la diferencia de susceptibilidad a la acumulación de cobre y subsiguiente toxicidad. De hecho la toxicidad por cobre es baja en aquellas especies como el perro o el cerdo donde una gran parte de cobre está ligado a metalotioneínas, y por el contrario, es muy alta en otras como la oveja en las que solamente una pequeña proporción de cobre está ligado de esta forma (Bremner, 1987; Bremner y Beattie, 1990).

En casos concretos como cerdos en crecimiento (Mehra y Bremner, 1984), perros de raza Bedlington terrier (Johnson et al., 1981) que presentan un defecto inherente en el

metabolismo de cobre que conlleva una acumulación excesiva de este metal, o en el hígado de humanos con un cierto tipo de enfermedad colestática (Janssens et al., 1984), la mayor parte del cobre está unido a metalotioneínas del citosol, de lisosomas y otras porciones particuladas. En contraste, ovejas con acúmulo de cobre (Taylor et al., 1988; Mehra y Bremner, 1984), ratas alimentadas con suplementos de cobre (Bremner y Mehra, 1983) y animales deficientes de zinc de muchas especies animales (Bremner, 1980, 1991 a,b) muestran tan sólo una pequeña porción de cobre asociado a metalotioneínas.

Las metalotioneínas también juegan un papel importante como almacenamiento de cobre en los animales neonatos. Como hemos indicado, las concentraciones hepáticas de cobre/zinc son muy elevadas en fetos y neonatos, estando en un porcentaje muy alto ligados a metalotioneínas (Bremner et al., 1977; Bakka y Webb, 1981; Mason et al., 1981). Así, se ha encontrado que la distribución de cobre en fetos y neonatos de humanos (Riordan y Richards, 1980), vacuno (Hartman y Weser, 1977) y hamsters (Bakka y Webb, 1981) se parece a la de los animales adultos expuestos a niveles excesivos de cobre.

A la hora de estudiar el metabolismo hepático de las metalotioneínas no podemos olvidar su capacidad de fijación a otros elementos, tanto esenciales (zinc) como tóxicos (principalmente cadmio, aunque también mercurio o plata) puesto que van a determinar importantes interacciones entre estos metales, tanto a la hora de su síntesis, competencia por los puntos de fijación, como en su degradación (Bremner, 1987).

En primer lugar debemos señalar la distinta afinidad de los distintos cationes por los grupos tiol de las metalotioneínas. En general se asume la siguiente secuencia de afinidad: $Hg(II) > Cu(II) > Ag(I) > Bi(III) > Cd(II) > Pb(II) > Zn(II) > Co(II) > Fe(II)$ (Vasak, 1991). No obstante, debemos señalar que la unión de estos cationes a los puntos de fijación de las metalotioneínas no solo depende de su respectiva afinidad por los residuos de cisteína, sino que también está relacionada con su cantidad relativa en la célula (Hamilton et al., 1987).

El cobre desplaza al zinc y al cadmio de la proteína (Bremner y Marshal, 1984) esto nos ayuda a explicar el desarrollo de una deficiencia de cobre en animales con dietas altas en zinc y cadmio. La distinta afinidad de varios metales por las metalotioneínas es también importante para comprender como es el ratio de degradación de la proteína en función del contenido del metal (Bremner y Mehra, 1983). La unión tan

sólida de la metalotioneína al cobre se ilustra también por la incapacidad del EDTA para desplazar al cobre de la proteína aunque desplazando al zinc y en menor medida al cadmio (Winge y Miklossy, 1982). El tetratiomolibdato (TTM) es extremadamente efectivo en el desplazamiento del cobre de las metalotioneínas, lo cual permite explicar los efectos adversos del molibdeno en el metabolismo del cobre en rumiantes (Bremner y Mehra, 1983).

Whanger y Weswig (1970) demostraron con sus estudios que el cadmio, la plata y el zinc antagonizan el metabolismo del cobre dentro de la célula hepática. Para ello eliminaron los efectos competitivos a nivel intestinal inyectando cobre en ratas que tenían bajos niveles de cobre en la dieta y analizaron la actividad de la ceruloplasmina en plasma. Los resultados experimentales demostraron que la ceruloplasmina es almacenada más fácilmente en ratas con dietas bajas en cobre que en animales que bajo las mismas condiciones se suplementan de cadmio, plata y zinc. Además estos mismos autores en 1971 estudiaron el efecto del suplemento dietético de zinc sobre la distribución subcelular del cobre hepático, indicando que la acumulación de zinc en hígado se asocia con una disminución del cobre dentro de los microsomas mientras que la fracción de zinc aumenta. La teoría de que el zinc desplaza al cobre de los microsomas fortalece la hipótesis de Whanger y Weswig (1970) desde que la biosíntesis proteica está asociada sobre todo a la fracción microsomal.

5.6. Otras proteínas involucradas en el transporte intracelular

Los chaperones de cobre y las cobre ATP-asas son proteínas citosólicas pequeñas, ubicuas, que se encargan de transportar cobre en el citoplasma hacia el lugar de utilización por proteínas dependiente de cobre (Mercer, 1997; Dameron y Harrison, 1998; Harrison et al, 1999; Horn y Tümer, 1999; Harris, 2000, 2001). La identificación de proteínas homólogas en bacterias, levaduras y humanos revela la conservación de su estructura y su función en el metabolismo de cobre a lo largo de la escala evolutiva (Peña et al., 1999).

Aunque todavía no se conocen en detalle, la función de los cobre-chaperones es la de prevenir la interacción inadecuada con otros componentes celulares. Se programan con una doble función, por un lado la transferencia y por otro la prevención de la exposición citoplasmática a iones de cobre en tránsito (Harrison y Dameron , 1999). Estas funciones no sólo son necesarias para proteger la célula del efecto deletéreo del cobre libre, sino también para asegurar que el cobre pueda identificar la proteína específica (el mecanismo para transferir el cobre fue determinado experimentalmente

por Pufahl en 1997). Las investigaciones disponibles sugieren que cada proteína cobre-dependiente en la célula se sirve de un chaperón específico de cobre, de hecho se está comprobando que muchas alteraciones genéticas ligadas al metabolismo del cobre, como las Enfermedades de Wilson o de Menkes en humana, podrían obedecer a defectos genéticos en estas proteínas transportadoras (Harris y Gitlin, 1996).

5.7. Influencia hormonal en la homeostasis de cobre

Es conocida la influencia hormonal de la secreción de las glándulas endocrinas en una amplia variedad de funciones metabólicas en el organismo de los mamíferos. Una de las primeras evidencias de la influencia hormonal en el metabolismo del cobre fue descrita por Krebs en 1928 quien observó que los niveles de cobre en suero de hembras preñadas eran casi el doble de los individuos control (Evans, 1973). Desde entonces se ha descubierto la participación de numerosas hormonas en el metabolismo del cobre.

5.7.1. Hormona del crecimiento

La hormona del crecimiento o somatotropina provoca el crecimiento de los tejidos del cuerpo, además tiene muchos efectos metabólicos generales que incluyen un aumento de la síntesis de proteínas en todas las células del organismo, mejora el empleo de las grasas y conserva los carbohidratos. La hormona del crecimiento también influye en el metabolismo del cobre a través de sus efectos en el metabolismo proteico y, como ya sabemos, la síntesis de proteínas tiene un marcado efecto en la homeostasis cúprica (Evans, 1973).

5.7.2. Hormonas adrenocorticotrópica

La hormona adrenocorticotrópica (ACTH) controla la secreción de cortisol. Evans y Wiederanders (1968) observaron que múltiples inyecciones de ACTH disminuían los niveles de ceruloplasmina y cobre en plasma de ratas, tanto en animales neonatos como en adultos. Sin embargo, hay otros estudios que muestran resultados opuestos en los que se constata que no hay un aumento de cobre plasmático tras la inyección de trementina que tiene entre otros un efecto estimulante.

5.7.3. Hormonas adrenales

Ante cualquier tipo de estrés se produce un incremento inmediato y notable de la secreción de ACTH en la hipófisis anterior, a lo que sigue en plazo de minutos un aumento de la secreción de cortisol.

Ante el estrés la mayoría de los mamíferos presentan un aumento de los niveles de cobre y ceruloplasmina en plasma. Así, Evans et al. (1969) demostraron que tanto la concentración plasmática de cobre como la de ceruloplasmina se elevaban de forma significativa en ratas adultas después de permanecer siete minutos nadando. De forma similar, Haralambie y Kreul (1970) detectaron un aumento de cobre y ceruloplasmina en suero después de dos horas de ejercicio físico en humanos. Se ha demostrado una relación inversa entre los niveles plasmáticos de cobre y corticosteroides, lo que indica que las hormonas de la corteza adrenal no determinan un aumento de cobre plasmático durante el ejercicio físico; es más, la inyección de esteroides adrenales en ratas adultas no tuvo efectos en los niveles de cobre plasmáticos (Gregoriadis y Sourkes, 1970; Evans, 1973). De esa manera se reforzó como hipótesis provisional que la adrenalina era la responsable del aumento plasmático de cobre y ceruloplasmina asociado al ejercicio físico (Evans, 1973; Gregoriadis y Sourkes, 1970).

5.7.4. Hormonas sexuales

El efecto de las hormonas sexuales femeninas se estudió al administrar estrógenos y se observaron aumentos de cobre sanguíneos en muchas especies de mamíferos (Evans et al., 1970a; Evans, 1973). Rusanov et al. (1981) demostraron que las hormonas sexuales, especialmente los estrógenos, inducían la síntesis de ceruloplasmina en ovejas, además de producir un aumento de la concentración de cobre en hígado.

La gestación también parece tener un efecto significativo sobre la homeostasis de cobre. Butler (1963) demostró en ovejas que la preñez producía un descenso en los niveles de cobre y ceruloplasmina en sangre entera, mientras que en otras especies mamíferas se ha descrito un aumento de los niveles de cobre y ceruloplasmina en sangre al progresar la preñez (O'Leary y Spellacy, 1968).

Esta influencia hormonal presenta importancia puesto que puede condicionar la susceptibilidad de los animales a padecer procesos de intoxicación por cobre. A modo de ejemplo señalar que en una intoxicación accidental en ganado vacuno lechero al que se le añadió una cantidad excesiva de cobre a la ración comercial, se encontró que la mayoría de los animales afectados que sucumbieron a la intoxicación por cobre eran hembras que se encontraban al final de la preñez o habían parido pocos días antes de la crisis hemolítica (Perrin et al., 1990). Se documenta así que altos niveles de estrógenos aumentan la absorción de cobre en el intestino, y pueden acelerar la síntesis de ceruloplasmina y otras proteínas ligantes de cobre.

En cuanto a las hormonas sexuales masculinas, se ha observado que la administración de testosterona produce un aumento de cobre sanguíneo en humanos (Johnson et al., 1959).

5.8. Interacciones del cobre con otros metales

De entre los numerosos factores de variación que influyen sobre la absorción y deposición de metales en el organismo, la interacción con otros metales tóxicos o esenciales es uno de los más importantes (Goyer, 1995). Estas interacciones pueden clasificarse en dos grandes grupos, las competitivas y las no competitivas.

Las interacciones competitivas se producen entre elementos que tienen la misma estructura electrónica y comparten la tendencia a formar complejos y a que se dispongan ligandos alrededor del metal; cuando se produce el reemplazo isomorfo de un elemento por otro en un punto funcional se producen los antagonismos. Todas las interacciones competitivas tienen dos cosas en común y es que son negativas y mutuas. A modo de ejemplo podemos señalar el efecto de la ingesta excesiva de cobre y zinc. Así, en ratas con una dieta que contenía niveles adecuados de cobre se observaron signos indicativos de deficiencia cuando las dietas eran suplementadas con niveles altos de zinc. Por otro lado cerdos alimentados con altas concentraciones de cobre sufrían paraqueratosis que es un signo característico de deficiencia de zinc (Underwood y Suttle, 2002).

En las interacciones no competitivas las fluctuaciones con deficiencia o exceso de uno (o más) elementos influyen en el metabolismo final de un segundo elemento o interfieren en algún proceso biológico esencial que afecta a la expresión final de su actividad biológica. Entre las interacciones no competitivas más importantes en animales debemos señalar el efecto de la deficiencia de cobre sobre el metabolismo del hierro, o el efecto del molibdeno y azufre sobre el estatus de cobre, como se tratarán en detalle en este capítulo. Teniendo en cuenta la influencia de antagonistas como el hierro y molibdeno en la incidencia de desórdenes que afectan al cobre, su prevención debería alcanzarse en la medida de lo posible reduciendo la exposición de dichos antagonistas (Suttle y Underwood, 2002).

5.8.1. Interacciones del cobre con elementos tóxicos

5.8.1.1. Cadmio

Las interacciones entre cadmio, zinc y cobre se han registrado tanto en mamíferos procedentes de áreas contaminadas como en estudios experimentales (Webb, 1979; Nicholson et al., 1984; Spierenburg et al., 1988) y son una consecuencia de la capacidad compartida de estos metales para inducir la síntesis de metalotioneínas y la competencia por los sitios de unión tiol de las mismas (Webb, 1979). Las interacciones entre cadmio, cobre y zinc han sido también descritas con niveles de exposición a cadmio bajos, tanto en humanos (Rahil-Khazen et al., 2002) como en animales (López Alonso et al., 2002), lo que podría sugerir un efecto del cadmio sobre el metabolismo de los elementos traza incluso a niveles de exposición ambiental bajos.

El cadmio dietético afecta a la absorción intestinal y contenido tisular de hierro, cobre y zinc (Groten et al., 1991) ya que estos metales forman parte de determinadas enzimas que desempeñan un importante papel en la prevención de daños relacionados con la peroxidación lipídica.

La gran potencia del cadmio como antagonista del cobre también se demostró en ratas, ovejas preñadas y en sus crías cuando las dietas contenían bajos niveles de cadmio (Mills y Dalgarno, 1972; Campbell y Mills, 1974). Así, con contenidos de cadmio de 1.5 a 12 mg/kg en hígado, los niveles de cobre en hígado y plasma sufrieron una gran disminución y en ocasiones se presentaron signos de rarefacción ósea y reducciones en el crecimiento.

Sin embargo, en experimentos con zinc en los que aparecen alteraciones en el metabolismo con bajas ingestiones de cadmio son un reflejo de la composición y en particular del contenido de cobre de la dieta (Campbell et al., 1978). El antagonismo de ambos elementos tiene un beneficio extra que es el descenso de la concentración de cadmio en un 50% en el riñón de ratas; así que ante una exposición prolongada de cadmio, el inicio del daño renal podría retrasarse con suplementación de cobre.

La afinidad de las metalotioneínas por los metales, proteínas involucradas en su transporte, fue determinada *in vitro* y al observar los resultados se obtuvo la siguiente secuencia: $Zn < Cd < Cu < Hg$ (Funk, 1987). Day et al. (1984) comprobaron que el Cd^{+2} y el Hg^{+2} desplazan al Zn^{+2} de Zn-MT hepática en ratas *in vivo* y *ex vivo*; cuando el hígado era pre-inducido con cobre, cadmio y mercurio estos elementos podían

desplazar al zinc de (Zn, Cu)-MT in vivo y ex vivo, pero al contrario de lo esperado el mercurio era incapaz de desplazar al cobre de las metalotioneínas.

Estudios experimentales han demostrado que el cadmio y el cobre compiten por los sitios tiol de las metalotioneínas (Wentik et al., 1988). Las metalotioneínas inducidas por el cadmio se van a unir con más facilidad al cadmio que al cobre (Foulkes, 1993). La capacidad de unión a las metalotioneínas va a depender de las concentraciones relativas de cada metal, de manera que si se presentan concentraciones de cadmio relativamente altas en relación a los ratios de cobre hepáticos se facilita el desplazamiento del cobre (Cosson, 1994). Estas relaciones negativas entre el cadmio y el cobre hepático se observaron en ganado vacuno y ovino expuesto experimentalmente a cadmio o que procedía de zonas contaminadas (Koh y Judson, 1986; Wentik et al., 1988; Smith et al., 1991 a, 1991b; Miranda, 1999; Miranda et al., 2004).

Por último comentar que hay estudios que señalan la posibilidad de una reducción de la transmisión placentaria de cobre en ovejas y vacas ante pequeños aportes de cadmio. La relación antagónica entre el cobre y el cadmio podría tener lugar desde antes del nacimiento. El papel del cobre en el desarrollo del feto puede ser inhibido en ovejas y ratas preñadas al ser suplementadas con cadmio (Mills y Dalgarno, 1972; Choudhury et al., 1978) por lo que puede ser responsable de la baja disponibilidad y el bajo peso al nacimiento que a veces se observó bajo estas circunstancias.

5.8.1.2. Plomo

A pesar de no ser una interacción tan estudiada como la que ocurre por ejemplo entre plomo-calcio o plomo-hierro (Goyer, 1995), en la literatura científica hay varios ejemplos de interacción entre plomo y cobre. Los primeros estudios que evidenciaron la interacción entre ambos metales se realizaron en ratas, en las que se comprobó que tras administrar grandes cantidades de plomo en la dieta los animales presentaban una absorción de cobre deficiente o marginal (Dhawan et al., 1995). En estos animales se observaron bajos ratios de crecimiento, concentraciones séricas y actividad de ceruloplasmina bajas, cardiomiopatía, paraplejia y anemia al administrar de 0.5 al 3 % de plomo como acetato de plomo trihidratado (Klauder et al., 1972; Michaelson y Sauerhoff, 1973; Petering, 1980). También se ha descrito una asociación negativa entre plomo y cobre en hígado en animales expuestos a bajos niveles de plomo (Spiereburg et al., 1988; Miranda, 1999) aunque según Rahil-Khazen et al. (2002) y López Alonso et al. (2002) ambos metales no estaban asociados estadísticamente. Se

ha observado además que la deficiencia de cobre aumenta la acumulación de plomo en los tejidos, y que la suplementación de cobre en estos animales produce una rápida disminución del plomo en glóbulos rojos, hígado, riñón, y cerebro; estos hechos sugieren que la interacción entre estos elementos se produce durante la fase de absorción intestinal, si bien el mecanismo de interacción se desconoce.

También se ha demostrado en animales de laboratorio que la adición de 1.5 a 20 mg/kg de cobre en la dieta aumentaba la acumulación de plomo en hígado y riñón cuando este último metal era ingerido a dosis de 200 mg/kg (Cerklewski y Forbes, 1977).

5.8.2. Interacción del cobre con otros elementos esenciales

5.8.2.1. Molibdeno

La interacción triple entre cobre-molibdeno-azufre es un ejemplo de interacción no competitiva negativa frecuentemente encontrada en la nutrición de rumiantes (Suttle, 1991; Smith y White, 1997). La formación mediante reacciones químicas de complejos tiomolibdatos (TM) a partir de molibdatos y sulfatos tiene lugar sobre todo a nivel digestivo y van a disminuir la disponibilidad del cobre, comenzando por el cobre procedente del alimento; además interfieren en su absorción y alteran su distribución tisular. Estos complejos son absorbidos en el rumen, pero gran parte tras superar el ambiente ácido que se encuentra en el abomaso son absorbidos como tal al llegar al intestino delgado. En los rumiantes el medio ambiente ruminal es el encargado de generar un control microbiológico sobre los compuestos azufrados, comprometidos en la fase de interacción cobre-molibdeno-azufre. Este control modifica naturalmente las concentraciones finales de cobre y molibdeno en los distintos tejidos del organismo (Igarza y Auza, 1995).

Los signos clínicos inducidos por un exceso de molibdeno en la dieta - como son un pobre crecimiento, reducida ingestión de comida, diarrea, anemia, acromotriquia (pérdida de pigmento en pelo y lana) y anormalidades en articulaciones y huesos - recuerdan la deficiencia de cobre y se pueden revertir con el aumento en la ingesta del mismo.

Los tiomolibdatos son los principales responsables de la patogenia de la intoxicación por molibdeno. Su mayor disponibilidad se concentra a nivel intestinal donde los sulfatos, que son los encargados de deprimir la absorción de molibdatos, se encuentran en menor concentración (Igarza y Auza, 1995). Los tiomolibdatos, tras

absorberse sin modificación, se unen en el torrente sanguíneo al cobre y a la albúmina resultando ser estables y no sujetos a hidrólisis. Los tiomolibdatos no desplazan al cobre de la albúmina pues presentan un sitio de unión distinto, es más, la afinidad del sitio de unión parece aumentarse por la presencia de cobre y viceversa, dando lugar a la formación de una proteína-TM-cobre particular en la sangre. Esta triple interacción conlleva un bloqueo del cobre plasmático por lo que se retarda su transferencia al espacio extravascular y a los tejidos en general; la ceruloplasmina también desciende aunque en este caso no depende del cobre unido a la albúmina. Como consecuencia de estos mecanismos se produce una baja utilización del cobre hepático que es el órgano de mayor importancia como lugar de depósito de este mineral. Al administrar tetratiomolibdatos (TTMs) se observa una fuerte eliminación de cobre y molibdeno vía biliar, ambos están unidos a macromoléculas siendo parte del cobre insoluble en ácido tricloroacético; en relación al cobre plasmático insoluble en ácido tricloroacético éste parece proceder del cobre corporal, posiblemente del hígado (Igarza y Auza, 1995).

La incidencia de efectos sistémicos tales como niveles de cobre elevados en plasma y en el riñón ha sido a menudo observada en ovejas con altos niveles de molibdeno en la dieta (Underwood y Suttle, 2002) estos aumentos fueron observados incluso a concentraciones bajas de cobre. Gooneratne et al. (1989b), tras probar con distintos complejos que contenían molibdeno y azufre comprobaron que aumentaban la acumulación de cobre en el riñón.

En conclusión, las distintas interacciones que tienen lugar en el aparato digestivo pueden reducir la disponibilidad del mineral procedente del alimento y las interacciones sistémicas pueden contribuir al desarrollo de estados metabólicos deficitarios de cobre, por depleción de las reservas tisulares (Igarza y Auza, 1995).

Van Ryssen et al. (1985) realizaron una prueba para determinar los efectos del molibdeno y azufre dietético en el estatus de cobre de ovejas con hipocupremia después de la retirada de cobre de la dieta. En primer lugar, a cada animal se le administraron 75 mg de cobre al día durante un periodo previo para establecer altos niveles de cobre en sus hígados. Después se alimentaron con molibdeno (0-140 mg/día) y azufre (0-4 g/día) sin añadir cobre en la dieta. Las ovejas con 70 mg de molibdeno al día mostraron un 40% de reducción de cobre, en comparación con aquellos animales que no tuvieron suplementos de molibdeno, pero si tenían cobre extra en la ración no se observaba la reducción. Se encontraron además niveles altos de cobre en riñón y plasma en todos los grupos de animales que eran suplementados con molibdeno. En los tratamientos con cobre adicional los efectos sistémicos eran

menos pronunciados que con un tratamiento de 70 mg de molibdeno sin cobre, lo que sugiere que la fuente de cobre medida en estos efectos sistémicos no tiene como origen la dieta. Van Ryssen et al. (1985) constataron con sus observaciones que el molibdeno dietético en presencia de azufre se une al cobre en el tracto digestivo y que enlaces residuales de tiomolibdato podrían ser absorbidos y reaccionar con cobre en el organismo.

En un experimento que se realizó en vacuno en dos regiones con forraje pobre y rico en molibdeno (1.7 mg/kg y 72.1 mg/kg respectivamente) Hamaguchi (1999) indicó con sus resultados que las dietas conocidas como ricas en molibdeno durante más de 125 días no afectaban a la salud ni al rendimiento animal. Si la alimentación con el forraje rico en molibdeno se mantenía durante un periodo continuado, no conllevaba deficiencia de cobre o efectos adversos. Los niveles de molibdeno en leche, sangre e hígado se elevaron y los de cobre no se vieron afectados; después de separarlos de la fuente de molibdeno, sus concentraciones volvieron a ser normales.

En otros estudios, como el realizado por El-Gallad et al. (1977), tras inyecciones intravenosas e intraduodenales de tetratiomolibdatos en ovejas, se observó un aumento del cobre a nivel plasmático, acumulándose en la misma fracción cromatográfica que el molibdeno. Al administrar en ratas el mismo compuesto pero en la dieta, se observó una disminución de la absorción de cobre plasmático, la actividad de la ceruloplasmina así como la concentración hepática de cobre; además el cobre y el molibdeno se unían a las mismas proteínas y formas ácido-insolubles en plasma y riñón (Mills et al., 1978).

5.8.2.2. Zinc

El antagonismo mutuo entre el cobre y el zinc se presentó como el primer ejemplo de interacción competitiva biológica entre metales con propiedades químicas y físicas similares. Si se suplementa con zinc disminuye la intoxicación por cobre, y también se produce la situación contraria, porque al aumentar el cobre puede afectar al metabolismo del zinc (Bremner y Beattie, 1995).

El principal mecanismo de interacción entre el cobre y el zinc se sitúa en la competencia entre ambos metales por los puntos de unión de las metalotioneínas. La síntesis de metalotioneínas podría estar inducida por metales esenciales y cobre pero también por algunos metales tóxicos. Las metalotioneínas funcionan como un almacén intracelular para el zinc y el cobre (Bebe y Panemangalore, 1996). La concentración de

metalotioneínas en el hígado no está relacionada con la acumulación de cobre pero sí es dependiente del estatus de zinc del animal (López Alonso et al., 2004b).

En un estudio realizado por López Alonso et al. (2004b) para determinar el papel de las metalotioneínas en la acumulación de cobre hepático en ganado vacuno de Galicia y la importancia de las metalotioneínas en el metabolismo del zinc, se observó que aunque el cobre es un pobre inductor de la síntesis de metalotioneínas, puede competir con el zinc por los sitios de unión. Esto es debido a que, el cobre tiene una mayor afinidad por las metalotioneínas que el zinc incluso después de haber inducido su síntesis el zinc (Bremner y Beattie, 1995; Bremner, 1998).

La anemia falciforme y la enfermedad de Wilson son dos alteraciones en las que se establece una relación entre el cobre y el zinc.

Los pacientes con anemia falciforme se caracterizan por presentar hiperzincuria. La deficiencia de zinc parece producir una ligera acumulación de cobre y un aumento de los niveles de ceruloplasmina, al intensificarse la absorción de cobre. Debido a la deficiencia de zinc, se produce el cierre del mecanismo intestinal de las metalotioneínas y aumenta la absorción de zinc. También se produce un aumento en la absorción de cobre y de sus niveles en el organismo sobre todo a nivel hepático, respondiendo con un aumento en la síntesis de ceruloplasmina. El proceso se revierte con la administración de zinc. La deficiencia de cobre trae como consecuencia la inducción intestinal de metalotioneínas por el zinc (Brewer et al., 1985).

En cuanto a la enfermedad de Wilson, se trata de un desorden del cromosoma-13 relacionado con la excreción hepatobiliar de cobre manifestándose como una progresiva intoxicación hepática y neurológica (Goyer, 1995). La penicilamina resulta ser efectiva pero es necesario valorar otras posibilidades debido a su toxicidad; así, el zinc se presenta como un tratamiento alternativo atractivo a la penicilamina. Para comprobar que el único camino para controlar la acumulación de cobre en la enfermedad de Wilson era la penicilamina se retiró a los pacientes brevemente de la penicilamina y se hizo un estudio del estatus de cobre con la terapia de zinc. Debe prolongarse durante 2 o 3 meses debido a que durante la terapia con penicilamina los pacientes presentan deficiencia de zinc. Así que hasta que no tengan la cantidad suficiente con las dosis farmacológicas el zinc no induce la síntesis de metalotioneínas, de ese modo proporciona un bloqueo de la absorción de cobre (Brewer et al., 1985).

5.8.2.3. Hierro

El metabolismo del cobre y del hierro están íntimamente relacionados (Garrick et al., 2003b). Aunque se sabe que la deficiencia de cobre genera deficiencia celular de hierro no se conoce todavía cual es la base molecular de esta interacción. Hart et al. (1928) fueron quienes registraron una de las primeras interacciones entre elementos traza, así descubrieron que el requerimiento de cobre en la hematopoyesis que relaciona el cobre y el hierro puede describirse como una interacción no competitiva. Se han realizado estudios sobre esta interacción positiva que cobran importancia porque la proteína ferroxidasa-I que contiene cobre, cuya actividad está marcadamente disminuida por su deficiencia, es esencial para la movilización de hierro de los almacenes previos a su incorporación a la hemoglobina (Roeser et al., 1970). Askwith et al. (1994) comprobaron en levaduras que el cobre es un grupo prostético de la ferroxidasa involucrada en el transporte de alta afinidad de hierro.

Tanto el cobre como el hierro son nutrientes esenciales para la mayoría de los organismos, y muchas de sus utilidades están basadas en su capacidad para asumir al menos dos oxidaciones en las reacciones de reducción. Tanto el hierro férrico como el cobre cúprico son esencialmente insolubles en soluciones acuosas a pH neutro y precipitarán bajo la mayoría de las condiciones fisiológicas, así que por su toxicidad potencial y la dificultad de mantenerlos solubles es por lo que se asocian a transportadores y chaperones en casi todas las fases de su metabolismo. Cuando la capacidad de los transportadores/chaperones/sistemas de almacenamiento esté saturada es cuando llegan a ser tóxicos.

En lo que se refiere al hierro, el control de la absorción, transporte y almacén depende de los cambios y unión a transferrina, ferritina y posiblemente lactoferrina. La metalotioneína juega un papel principal en el secuestro de cobre lo que lleva a cuestionar si esta capacidad de unirse al cobre implica que pueda realizar una función análoga a la de la ferritina (Cherian, 2003).

Cada día se están descubriendo nuevos mecanismos relacionados con el transporte de metales. El transportador divalente de metal (DMT1) aparentemente transporta ambos metales iónicos (Gunshin et al., 1997), por lo que es otro cruce potencial en la homeostasis del cobre y del hierro. Linder et al. (2003) examinaron la interacción entre cobre y hierro en un mismo cultivo celular, encontraron que la disminución celular aumentaba la absorción para ambos iones metálicos y que la disminución celular de hierro o cobre también intensifica el transporte epitelial de hierro desde la cámara

apical a la basal. Algunos de estos resultados reflejan la conducta del transportador DMT1. La capacidad de DMT1 de transportar otros metales divalentes como manganeso, cadmio, níquel, cobalto, o plomo (Garrick et al., 2003a) podrían explicar que estos metales interaccionen con el hierro y el cobre. De la misma forma Roth et al. (2002) demostraron que el estatus de hierro afectaba a la toxicidad de manganeso probablemente en una vía en la que comparten un transportador como DMT1.

La ceruloplasmina y la hepaestina son oxidasas de cobre que juegan un claro papel en el metabolismo del hierro, ambas están involucradas en la exportación de hierro de algunas células. Patel et al. (2000) consideraron el papel de la ceruloplasmina en lo referente a la interacción del hierro y cobre, e identificaron una isoforma de proteína (GPI) que se detectó particularmente en el cerebro, estos hallazgos ayudaron a corroborar la hipótesis del traspaso parcial de funciones entre la ceruloplasmina y la hepaestina porque no todas las formas de proteína se encuentran en el suero.

Otro mecanismo de interacción entre ambos metales puede proceder de IRE/IRP (elementos sensibles al hierro/proteínas reguladoras de hierro). Este sistema sensible asegura que el ARN de los elementos sensibles al hierro se exprese de manera coordinada con la disponibilidad del hierro. Oshiro et al. (2002) concluyeron que algún otro metal podría afectar a este sistema sensible. Arredondo et al. (2003) mostraron que la respuesta de IRP1 (proteína sensible al hierro) con respecto al cobre era similar a la respuesta del hierro.

A pesar del paralelismo también existen importantes diferencias entre hierro y cobre en cuanto a su homeostasis. Linder et al. (2003) revisaron la excreción del cobre que es una de las fases de mayor importancia en cuanto a su homeostasis, nada que ver con el hierro que se pierde a través de procesos que son relativamente independientes de los niveles de hierro en el organismo, excepto ante mayores contenidos de cobre en células que llevan a una ligerísima mayor excreción. Se ha cuestionado por qué los niveles de DMT1 son altos en riñón, una localización que se relacionaría con el proceso de excreción, se cree que asegura la recuperación del hierro filtrado o guía la homeostasis de otro metal (Garrick et al., 2003a).

En la intoxicación crónica por cobre se han descrito modificaciones importantes de los niveles de hierro, especialmente a nivel renal. Durante la fase pre-hemolítica el cobre acumulado en riñón mantiene su función y éste presenta mínimos daños estructurales (Gooneratne y Howell, 1983). Durante la hemólisis la asociación de cobre y hierro contenidos en el riñón es bastante elevada y destaca su incapacidad funcional a nivel

glomerular y tubular. En cuanto a la patogenia no está claro el mecanismo responsable de los cambios degenerativos y necróticos, la ruptura de los lisosomas que liberan cobre, cobre-metalotioneinas, todos pueden ser citotóxicos y dar lugar a una desorganización de la célula. Los mecanismos son quizás similares a los que afectan al parénquima hepático.

La actividad redox del cobre también se asocia a una neurodegeneración (Opazo et al., 2002). Cuando es uno de los síndromes asociados a enfermedades relacionadas como de Wilson y Menkes (Mercer, 1997; Mercer et al., 2003) y aceruloplasminemia (Miyajima et al., 2003), se constata la hipótesis de que ambos metales cobre y hierro son críticos para el desarrollo mental propiamente dicho, así como la toxicidad de uno o los dos conlleva el desarrollo de muchas formas de neurodegeneración.

5.8.2.4. Selenio

El selenio es un elemento que presenta importantes interacciones tanto con otros elementos tóxicos como cadmio, plata y mercurio, como con otros esenciales con el cobre. Posiblemente la interacción mejor estudiada es la que ocurre con el mercurio; así, actúa frente a su intoxicación probablemente protegiendo del daño celular producido por los radicales libres, aumentando la síntesis de la enzima glutation-peroxidasa (que sería inhibida por el mercurio) y formando complejos inactivos de selenio-mercurio (Goyer, 1997).

Uno de los mecanismos en los que se ve involucrado el selenio en la detoxificación de metales consiste en trasladar elementos tóxicos desde la circulación sistémica y concentrarlos en los lisosomas. El selenio intensifica los procesos que tienen lugar dentro de los lisosomas de concentración y precipitación de ciertos elementos, lo que resulta en muchos casos beneficioso. Berry et al. (1995) estudiaron la interacción del selenio con elementos del grupo 1b del sistema periódico y emplearon pruebas de microanálisis para detectar a los elementos en las organelas intracelulares; tras administrar cobre, plata y sales de oro observaron como se concentraban en los lisosomas de hígado o riñón en presencia de sulfuro.

En el caso concreto del cobre, la incorporación del cobre hepático en las metalotioneínas del citosol y sobre todo en los lisosomas constituye un importante mecanismo para la detoxificación celular, ya que como sabemos el patrón de distribución del cobre hepático refleja la distinta susceptibilidad que sufren las especies y la toxicidad hepática del cobre se reduce enormemente si éste está unido a metalotioneínas (Bremner, 1987).

El papel del selenio al formar parte de la enzima glutatión-peroxidasa es la catálisis de la reducción de peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos (Counotte y Hartmans, 1989). Como la GSH-Px sanguínea se encuentra en los glóbulos rojos funcionando como parte del sistema antioxidativo, protege la célula de procesos oxidativos (Chowdhury y Chandra, 1987; Bires et al., 1991b). En la intoxicación por cobre el selenio neutraliza el efecto tóxico del cobre ya que produce un daño oxidativo en los glóbulos rojos y causa hemólisis (Soli, 1980; Hidiroglou et al., 1984) y peroxidación de lípidos especialmente en los hepatocitos (Nederbragt et al., 1984). Otros nutrientes, como la vitamina E, ácidos grasos poliinsaturados, metionina, azufre y cobre, interaccionan con el selenio y por tanto van a afectar a sus requerimientos.

Bires et al. (1991a) realizaron un estudio tras una administración parenteral de selenio en ovejas para evaluar la influencia en el desarrollo de una intoxicación de cobre. Los resultados confirmaron que el selenio administrado 3 veces por semana no afectaba significativamente a la evolución de los animales intoxicados por cobre.

Otro mecanismo de interacción entre el selenio y el cobre podría situarse en el tracto digestivo donde el selenio da lugar a complejos al asociarse al cobre, como la forma selenito de cobre que es altamente insoluble. Estos complejos tan sólo se solubilizan si se forman dentro del rumen, pero no se solubilizan en el abomaso, por lo que pasaría a ser no disponible (Weast, 1978).

En relación a la asociación casual descubierta entre la deficiencia de selenio y el desarrollo de cáncer en humanos, ésta permitió establecer que los compuestos de selenio dietéticos tienen un papel protector frente al cáncer. Los experimentos realizados en animales expuestos de forma crónica a selenito de sodio, cadmio, plomo y arsénico inorgánico demostraron que estos últimos contrarrestan el efecto anticarcinogénico de los compuestos de selenio administrados. De manera que si se consiguen aclarar estos mecanismos moleculares se descubrirían potencialmente los mecanismos involucrados en la intoxicación crónica de los metales pesados y metaloides (Gailer, 2002).

5.9. Excreción biliar

La bilis es la principal vía para la excreción de cobre en mamíferos (Luza y Speisky, 1996; Underwood y Suttle, 2002). En menor medida el cobre también es excretado durante la transpiración y lactación. En casos de obstrucción biliar o en la enfermedad de Wilson se excretan grandes cantidades de cobre por el sistema urinario. La excreción biliar permite por un lado combatir los excesos de cobre en la dieta y

además da una opción al reciclaje enterohepático del cobre, hecho de gran importancia en rumiantes si tenemos en cuenta la baja eficacia de absorción a nivel intestinal del cobre procedente de la ración en estas especies animales.

En cuanto a los mecanismos de eliminación biliar, debemos señalar que todavía no están totalmente esclarecidos. Gooneratne et al. (1989b) han propuesto tres mecanismos o vías de transferencia de cobre del hígado a la bilis para su excreción: (1) la vía transbiliar en la que el cobre pasa a la bilis sin entrar a través del hepatocito, (2) la transhepatocelular, en la que el cobre entra en los hepatocitos, se une a transportadores celulares y posiblemente a metalotioneínas y se elimina a través de la bilis y (3) la hepatolisosomal, la vía más importante en la que el cobre entra en los hepatocitos, se une a las metalotioneínas para facilitar su captación por parte de los lisosomas y a través de estas vesículas se elimina a través de la bilis. A su vez, la pérdida de metalotioneínas desde los lisosomas u otras organelas podría quizás ocurrir por una excreción directa de la proteína intacta (monomérica) o en forma agregada (Sato y Bremner, 1984).

Se ha sugerido que la degradación de la metaloproteína *in vivo* ocurre dentro de los lisosomas y que la facilidad de traslado de los metales unidos es un importante paso en el proceso degradativo (Feldman et al., 1978; Bremner y Mehra, 1983). El hallazgo de metalotioneínas ricas en cobre dentro de los lisosomas es consistente con esta hipótesis. El cobre está unido muy fuertemente a las metalotioneínas, siendo incluso resistente a la hidrólisis por los extractos lisosómicos (Bremner y Mehra, 1983).

La velocidad de excreción biliar es muy variable dependiendo de la especie animal. De forma experimental se ha demostrado que terneros a los que se les administra cobre excretan menos de un 4 % del total infundido en los tres días siguientes a la administración, mientras que en cerdos se alcanzan cifras del 80-90% (Charmley y Symonds, 1985). Estas diferencias en la excreción biliar explican la enorme susceptibilidad de los rumiantes a padecer procesos de intoxicación crónica de cobre en comparación con los cerdos. En este mismo experimento se demostró que el ganado vacuno puede trasladar por vía intravenosa el cobre infundido de la circulación sistémica al hígado más rápidamente que los cerdos pero no es capaz de excretarlo vía biliar; en contraste, los cerdos trasladan el cobre infundido mucho más lentamente del plasma, pero son capaces de excretar casi todo el cobre infundido a bilis en un periodo de 3 días (Charmley y Symonds, 1985).

Similares resultados han sido descritos en otros experimentos. Lynne et al. (1982) mostraron con sus observaciones en vacas que aproximadamente el 95% del cobre infundido es aclarado rápidamente del plasma, sin embargo, detectaron pequeñas cantidades del cobre excretado en orina y bilis durante los 10 días después de la infusión. Según Phillip y Graca (1983), la pérdida total de cobre en bilis parece estar determinada por las concentraciones hepáticas de cobre, aunque no estaba afectada de forma significativa por las distintas concentraciones de cobre en la dieta en un estudio realizado en vacuno.

5.10. Distribución tisular de cobre

Como hemos indicado el hígado es el principal reservorio de cobre a nivel orgánico. Los niveles de cobre en hígado en rumiantes son muy altos si los comparamos con otras especies de monogástricos como los cerdos, caballos e incluso el hombre. Los rumiantes, especialmente el ganado ovino y a diferencia de otras especies, presentan una capacidad de eliminación biliar limitada, y por ello, cuando el consumo es superior a las necesidades fisiológicas, se produce un almacenamiento continuado de cobre en este órgano hasta alcanzar concentraciones superiores a 600 e incluso 1200 mg/kg (Miller et al., 1993; Underwood y Suttle, 2002). Mientras que el cobre se acumula en el hígado no se produce ninguna alteración patológica, sin embargo cuando se supera su capacidad de almacenamiento, después de periodos de exposición superiores a 6 meses, el cobre se libera a la sangre, provocando una crisis hemolítica que conduce en la mayor parte de los casos a la muerte del animal.

En el riñón las concentraciones de cobre son bajas y no suelen exceder los 10 mg/kg peso fresco. En contraste a lo que sucede en el hígado, los niveles renales de cobre en los rumiantes no se ven afectados por esta capacidad de almacenamiento. Únicamente en los casos de intoxicación crónica, cuando se supera la capacidad de almacenamiento hepático y se desencadena la crisis hemolítica se produce un aumento significativo de los niveles renales de cobre (Puls, 1994).

Los órganos que más contribuyen al peso de la canal, que son músculo, grasa y hueso, presentan concentraciones de cobre muy bajas. Por este motivo, cuando no se incluye el hígado en la canal, las concentraciones de cobre máximas son relativamente bajas. En general, se indica una cantidad de 1.2 mg/kg de cobre peso fresco para ovejas y 0.8 mg/kg de cobre peso fresco para el bovino (Grace, 1983), mientras que en especies no rumiantes, como la rata y el pollo, las concentraciones en la canal son mucho más elevadas (4.8 y 1.7 mg/kg peso vivo respectivamente; Suttle, 1987).

Señalar además que en ganado ovino en la lana se depositan grandes cantidades de cobre (Grace, 1983; Underwood y Suttle, 2002)

En sangre los niveles de cobre también son bajos, aunque reflejan la cantidad de oligoelemento que el animal ingiere, especialmente en los casos donde los niveles en la dieta son altos (Gummow, 1996; Radostits et al., 2002).

Finalmente señalar que ante un déficit de cobre ocurren descensos importantes en las concentraciones de cobre en los tejidos, siendo especialmente destacables en el riñón y leves en el cerebro (Suttle y Angus, 1976).

5.11. Susceptibilidad a desórdenes del metabolismo del cobre

Como hemos venido comentando a lo largo de esta revisión bibliográfica, la susceptibilidad al padecimiento de desordenes en el metabolismo mineral, tanto en casos de deficiencia como de toxicidad, puede verse condicionada por numerosos factores, dependientes no solo de la dieta, sino también del propio animal. De entre las causas propias del animal es importante distinguir factores genéticos heredables de factores ambientales. Estos factores que modifican la susceptibilidad podrían actuar en el lugar de exposición (aumentando o disminuyendo la ingesta), podrían afectar a la toxodinámica del metal (con frecuencia formándose complejos o uniones covalentes) o podrían modificar el transporte al órgano diana o la inmunología, bioquímica o citología del órgano diana (Underwood y Suttle, 2002).

El factor mejor estudiado es sin duda la variabilidad genética. Se considera que existen especies de animales con una marcada diferencia en su tolerancia al cobre dietético. Dentro de los caballos, los ponies son extremadamente resistentes a la intoxicación y pueden tolerar concentraciones tan altas como 791 mg/kg en materia seca sin sufrir ningún tipo de alteración (Smith et al., 1975). El cerdo también se caracteriza por su resistencia, y como ya se ha comentado el cobre se emplea en esta especie en elevadas concentraciones (incluso de 250 mg/kg materia seca) como promotor del crecimiento sin causar ningún tipo de alteración al animal. En el extremo opuesto se sitúa el ganado ovino, especie altamente susceptible al padecimiento de intoxicación crónica por cobre, debido a que presenta una escasa capacidad de eliminar el exceso de cobre en la dieta vía biliar, como consecuencia de su baja capacidad para inducir la síntesis de metalotioneínas. Aunque de forma tradicional el ganado vacuno se ha considerado relativamente tolerante a la intoxicación por cobre, en los últimos años han aumentado de forma alarmante los casos de intoxicación, debido sobre todo al uso de suplementos excesivos en la ración; estudios recientes

(López Alonso et al. 2004b) ponen de manifiesto que esta especie, al igual que el ovino, presenta una capacidad muy limitada para almacenar el cobre ligado a metalotioneínas a nivel hepático.

A su vez, existen importantes diferencias interespecíficas en cuanto a su susceptibilidad a padecer desordenes en el metabolismo del cobre. Debido a su susceptibilidad, los estudios realizados sobre la variabilidad genética del metabolismo del cobre se ha realizado especialmente en ovino. Entre las diferentes razas de ovejas existen variaciones muy destacables a nivel hepático cuando reciben excesos de este elemento (Woollians et al., 1982; van der Berg et al., 1983). Es el caso de la raza Texel que es de las más vulnerables a la toxicidad por cobre por su mayor retención (Littledike y Young, 1993; Suttle et al., 2002); por el contrario aquellas caracterizadas por una pobre retención desarrollan hipocuprosis cuando el aporte de cobre es insuficiente, pudiendo citar así a la raza escocesa Blackface (Woollians et al., 1986). Debemos atribuir estas diferencias a variaciones en la eficacia de absorción intestinal de cobre (Wiener et al., 1978; Woollians et al., 1983), aunque también pueden producirse por diferencias debidas a la distribución del cobre absorbido (Woollians et al., 1982, 1983).

En el ganado bovino la influencia genética en la susceptibilidad a padecer procesos de deficiencia o toxicidad de cobre ha sido poco estudiada. Littledike et al. (1995) en un estudio de suplementación con cobre a largo plazo obtuvieron concentraciones hepáticas más elevadas en Limousin que en otras ocho razas bovinas, y sugirieron que podría ser debido a una mayor absorción de cobre en esta raza, aunque esta diferencia también podría ser explicada por el tamaño pequeño del hígado y los altos niveles hepáticos de zinc en esta raza.

Du et al. (1996) observaron como al recibir la misma ración *ad libitum* rica en cobre el ganado Jersey acumuló cobre en hígado un poco más rápido que el Holstein, aunque también es cierto que consumían más alimento por unidad de peso metabólico. Se encontraron además diferencias en la actividad de la ceruloplasmina, lactato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa. Este estudio fue la primera demostración de las diferencias genéticas en la concentración del cobre hepático dentro del vacuno de leche: Incluso aunque las vacas Jersey parecen ser más susceptibles a la intoxicación por cobre y tenían mayor cantidad de cobre plasmático que las Holstein (Gibson et al., 1987), las diferencias genéticas fueron asociadas a la deficiencia en la absorción de cobre dietético, excreción de cobre endógeno y la cantidad de comida ingerida.

En un estudio reciente llevado a cabo por Mullis et al. (2003) en vacuno adulto suplementado con cobre y zinc se observó que los animales de raza Simmental mostraban un menor estatus de cobre que los de raza Aberdeen Angus, lo que sugiere unos mayores requerimientos de este mineral.

Varias investigaciones (Woolliams et al., 1983; Gooneratne et al., 1994) sugieren que las diferencias en la excreción del cobre endógeno también contribuyen a explicar las diferencias genéticas en la retención de cobre hepático. La elevada excreción biliar causa una deficiencia de cobre con más frecuencia en Simmental que en otras razas bovinas, así en un estudio realizado por Gooneratne et al. (1994) empleando distintos tipos de dietas (con niveles altos y bajos de cobre, con o sin suplementación de molibdeno y azufre) la excreción biliar de la raza Simmental fue al menos dos veces la de Aberdeen Angus para cualquier tipo de dieta.

6. FUNCIONES DEL COBRE

Hace casi un siglo que se conoce la necesidad de que el cobre se encuentre en la dieta de los mamíferos, así como la existencia de patologías asociadas tanto a su deficiencia, que afecta fundamentalmente a los rumiantes en pasto, como a su toxicidad por una exposición excesiva.

No obstante, es destacable lo poco que se conocen las causas exactas de porqué la deficiencia de cobre en la dieta provoca enfermedad clínica. Esto se debe, desde el punto de vista práctico, a que la deficiencia de cobre está confinada en su mayor parte a los rumiantes en pasto, y en seguida se trata con la administración de cobre por distintas vías. Sin embargo, se le ha prestado poca atención a las variaciones en la respuesta a la deficiencia de cobre que se han registrado tanto intra como entre especies.

Aunque se sabe que el cobre es un elemento multifuncional, básico para al menos diez metaloenzimas (Tabla 1), donde cada una de ellas cuenta con un papel importante en el organismo, todavía no se conocen en detalle los mecanismos fisiopatológicos de las distintas alteraciones orgánicas que aparecen ante una deficiencia de cobre, lo que hace difícil indicar porqué aparece una sintomatología específica ante una deficiencia de cobre.

En su mayor parte la función del cobre en las metaloenzimas involucra una transferencia de electrones y la unión enzimática a oxígeno molecular. La presencia de un fallo localizado en la actividad de una cuproenzima no evidencia de forma substancial una lesión aunque muchas veces sí se interpreta de esta forma.

Tabla 1. Principales enzimas dependientes de cobre presentes en los tejidos de mamíferos, funciones y consecuencias de la reducción de su actividad. (Tomado de Frieden, 1986).

| Enzima | Localización | Función | Consecuencia del déficit |
|--------------------------------|---|---|--|
| Citocromo-c-oxidasa (CCO) | Membrana mitocondrial interna | Transporte electrónico | Producción energética y conducción nerviosa deficiente, fallo respiratorio |
| Superoxido dismutasa (SOD) | Citoplasma en cerebro, hígado, corazón eritrocitos | Dismutación de radicales superóxido | Degeneración del SNC Convulsiones |
| Tirosinasa | Melanocitos del ojo, piel | Producción de melanina | Despigmentación |
| Dopamina- β -hidroxilasa | Plasma, médula adrenal | Producción de catecolaminas | Desequilibrio en el centro hipotalámico, hipotermia, anorexia, fallo respiratorio, sonnolencia, deshidratación: ataxia |
| Amino-oxidasa | Plasma, cerebro, pulmón, riñón, intestino, placenta | Oxidación de mono-, di- y poliaminas | Aumento de los niveles de histamina, urticaria |
| Lisil-oxidasa | Extracelular, cartílago, hueso, sangre | Entrecruzado de colágeno y elastina | Manifestaciones del tejido conectivo: uniones hiperextensibles, ruptura vascular, anormalidades óseas |
| Ceruloplasmina | Plasma | Transporte de cobre, movilización de hierro, antioxidantes, otros | Anemia, enzimas de cobre bajas |

Experimentos nutricionales han demostrado que el cobre es necesario para una gran variedad de funciones entre las que cabe citar la formación ósea, función cardíaca, desarrollo de tejido conectivo y para la mielinización del cordón espinal, queratinización, pigmentación de tejidos (Radostits et al., 2002; Underwood y Suttle, 2002).

6.1. Eritropoyesis

En 1928 Hart et al. establecieron la necesidad del cobre y del hierro para prevenir la anemia en ratas que eran alimentadas con leche, demostrando así la esencialidad del cobre como constituyente de la dieta (Adham y Song, 1980). Las controversias en el papel desempeñado por la interacción cobre-hierro no finalizaron al estudiarlo en la eritropoyesis. En primer lugar la cupro-enzima que más predomina en plasma, la ceruloplasmina, funciona como una ferroxidasa, aumentando el transporte de hierro por la transferencia de Fe^{+3} a la proteína transportadora transferrina. Al descender las concentraciones de ceruloplasmina, el hierro se acumula en los tejidos mientras que sus niveles en plasma se reducen.

6.2. Protección contra oxidantes

El cobre puede tener un papel protector frente a la oxidación con dos vías de actuación, la primera relacionada con el equilibrio del metabolismo del hierro y la segunda a través de la enzima cobre-zinc superóxido dismutasa (CuZnSOD). Así, el descenso de CuZnSOD se correlaciona con una disminución del cobre hepático y, a su vez, en esta situación se encuentran reducida la capacidad defensiva del hígado de otros radicales libres como son los superóxidos (Taylor et al., 1988).

La ceruloplasmina ayuda a defender al organismo como agente antioxidante al capturar el hierro libre y los radicales libres (Saenko et al. 1994), y proporciona además interacciones con otros nutrientes que tienen propiedades antioxidantes como manganeso, selenio y vitamina E.

6.3. Desarrollo cardíaco

Se han registrado casos de cardiomegalia en ganado vacuno tras sufrir episodios de deficiencia de cobre. Gross y Prohaska en 1990 demostraron en ratones que la actividad del enzima dopamina- β -monooxigenasa (DBM) se encuentra disminuida en situaciones de deficiencia de cobre, mientras que el metabolismo de las catecolaminas puede verse seriamente afectado tanto en el corazón como en el cerebro. Se han

observado también defectos en la síntesis de proteínas miofibrilares en animales deficientes de cobre asociadas a una baja actividad del enzima citocromo-c-oxidasa (Chao y Allen, 1992).

6.4. Desarrollo del sistema nervioso central

El papel del cobre en el desarrollo del sistema nervioso central se descubrió en corderos en condiciones de explotación (Brady y Helvig, 1984). Estudios experimentales enfocados hacia el estudio de la deficiencia de cobre en corderos se contraponen en la patogenia del estado atáxico conocido como “ataxia neonatal” o “ataxia enzoótica”, que es uno de los primeros trastornos reconocidos de la deficiencia de cobre. Por un lado se piensa que la lesión primaria se localiza en las neuronas con una degeneración secundaria de mielina y por el otro la aplasia de la mielina cobra una mayor importancia (Bremner y Davies; 1976; Bremner et al., 1978). En cuanto a la deficiencia de citocromo-c-oxidasa descrita en este tipo de procesos, hay autores que afirman que esta enzima es necesaria para sostener la integridad neuronal y axonal, mientras que otros defienden su papel en el mantenimiento de la síntesis de fosfolípidos; la dificultad desde el punto de vista temporal y anatómico para realizar estudios en los tractos nerviosos prolongan esta falta de acuerdo, es más, se ha visto que pueden ocurrir lesiones en la materia blanca y gris en animales normales bajo el punto de vista clínico (Bremner y Mehra, 1983).

También se obtuvieron descensos de otros enzimas dependientes de cobre, como el peptidil- α -amidamonoxygenasa (PAM) en el cerebro de ratas recién nacidas de madres deficientes en cobre (Prohaska y Bailey, 1995), ya que del cobre dependen numerosas moléculas biogénicas como las hormonas reguladoras del apetito como la gastrina y la colecistoquinina.

6.5. Inmunocompetencia

El cobre juega un papel esencial en el funcionamiento normal del sistema inmune de los rumiantes. Hay evidencias de un aumento del número de leucocitos en vacas jóvenes deficientes en cobre (Arthington et al., 1996; Gengelbach et al., 1997). El cobre juega un papel muy importante en la función efectiva de los linfocitos B y T, los neutrófilos, macrófagos y función del complemento (Jones y Suttle, 1981; Arthur y Boyne, 1985; Gengelback y Spears, 1998).

En animales de laboratorio la deficiencia de cobre puede afectar al número de células que intervienen en la inmunidad, aumentando los mastocitos (células inespecíficas del

sistema inmune) y disminuyendo las subpoblaciones de células T (células específicas del sistema inmune) (Mulhen y Koller, 1988).

En cuanto a la susceptibilidad a las infecciones, en estudios realizados en ganado ovino en las colinas escocesas para valorar las causas de la mortalidad en un rebaño, entre ellas las genéticas, se observó que las infecciones microbianas eran la causa más importante y que había una correlación significativa entre la susceptibilidad a la infección y la deficiencia de cobre. Así se constató que se producían más pérdidas en razas con menor eficacia para la utilización de cobre, mientras que éstas eran reducidas en animales que recibían suplementos de cobre o en aquellas razas que genéticamente tenían un estatus de este mineral más elevado (Woolliams et al., 1986). Se registró que los animales deficientes en cobre eran más susceptibles a padecer infecciones específicas (*Salmonella typhimurium* y *Pasteurella haemolyticum*) al igual que sucede en animales de laboratorio (Brewer et al., 1983). La debilidad se sitúa en los leucocitos en el complejo inmune, la alteración de sus funciones está asociada a la deficiencia de superóxido-dismutasa, que es una enzima que contiene cobre y que posee actividad bactericida (Brinckerhoff et al., 1983). Esta susceptibilidad es tan temprana en la vida de la oveja que la inhabilita para conferir inmunidad pasiva a sus crías vía calostro.

7. DEFICIENCIA DE COBRE EN ANIMALES

La deficiencia de cobre puede ser *primaria*, como resultado de los bajos niveles de este mineral en la dieta, o *secundaria*, como consecuencia de la interacción con otros factores en la absorción y utilización del mismo, siendo la interacción cobre-molibdeno-sulfato la más importante en rumiantes (Corah e Ives, 1991; Underwood y Suttle, 2002).

La deficiencia de cobre, tanto simple como inducida, se asocia a una amplia variedad de trastornos en rumiantes, como son anemia, depresión del crecimiento, diarrea severa, cambios en la coloración del pelo o de la lana, ataxia neonatal, alteraciones en el crecimiento con huesos largos, débiles y frágiles, infertilidad temporal e insuficiencia cardíaca (Miller et al., 1993; Underwood y Suttle, 2002; Radostits et al., 2002). De forma general podemos decir que la patogenia de casi todas las lesiones provocadas por la deficiencia de este mineral es común y derivada de la falta de actividad de las enzimas que lo contienen y que desempeñan un papel importante en la oxidación celular (Radostits et al., 2002).

7.1. Anemia

La sangre es uno de los tejidos diana del cobre ya que este metal está fuertemente involucrado en los procesos de síntesis de la médula ósea (Barceloux, 1999a). La anemia se desarrolla cuando la deficiencia de cobre es intensa o crónica; cuando los niveles de cobre se reducen a 0.095-0.190 mg/dl no es posible mantener la hematopoyesis normal.

Aunque no está totalmente esclarecido todo indica a que en vacuno y ovino se trata de una anemia hipocrómica y macrocítica, en perros es normocrómica y normocítica, mientras que en otras especies como cerdos, conejos y ratas la anemia es hipocrómica y microcítica, al igual que la anemia por deficiencia de hierro. Aunque en un principio se sostuvo la idea de que el metabolismo del hierro agrava la deficiencia de cobre en los animales, hay evidencias de que en algunas especies el efecto eritropoyético no se relaciona con su papel en la síntesis de hemoglobina, prueba de ello fueron los experimentos realizados en conejos y ratas con suplementos de cobre, en los que el efecto eritropoyético no iba acompañado de un aumento en la cantidad de hemoglobina.

Lahey et al. (1952) comprobaron que ante deficiencias de cobre en cerdos a los que se le suplementaba este mineral, la microcitosis desaparecía antes de que la concentración corpuscular de hemoglobina volviera a la normalidad, lo que puede ser debido a que el ratio de células en maduración esté retrasado; así bajo este punto de vista, estudios morfológicos en perros con anemia por deficiencia de cobre demostraron que la médula ósea era más hiperplásica que en perros con anemia por deficiencia de hierro y que contaba con un mayor número de células inmaduras.

Se han propuesto numerosos mecanismos en la patogenia de dicha anemia:

- En animales con un estatus normal de cobre, la alta actividad de la enzima citocromo-c-oxidasa en la médula ósea está totalmente asociada a la hematopoyesis, mientras que en animales cobre-deficientes esta enzima está en concentraciones muy bajas, afectando por ello a la hematopoyesis; en los eritroblastos de los animales cobre deficientes las mitocondrias están ampliadas, presentando a veces una estructura espiral o apilada.
- La ceruloplasmina es esencial para la promoción de saturación de hierro de la transferrina y en su utilización en la médula ósea. En animales cobre deficientes la actividad plasmática de ceruloplasmina está disminuída de forma marcada, mientras que en animales normales es mucho más que la mínima requerida para la

máxima movilización de hierro. Parece ser que los defectos de movilización de hierro tan sólo se detectan en procesos de deficiencia de cobre largos y severos, cuando la ceruloplasmina disminuye intensamente, de ahí que la anemia pueda ser un signo tardío de deficiencia de cobre.

- Junto con los efectos en la síntesis de hemoglobina, la disminución severa de la actividad de la citocromo-c-oxidasa en animales deficientes afecta a la síntesis de fosfolípidos y retrasa la maduración de los glóbulos rojos.
- En cerdos con deficiencia de cobre el tiempo de supervivencia en la circulación de los glóbulos rojos es bastante más corto de lo normal y se atribuye al daño provocado por la peroxidación en las membranas de los glóbulos rojos por el anión superóxido, además de por la disminución del enzima superóxido-dismutasa. Finalmente, señalar que se han observado cuerpos de Heinz dentro de los eritrocitos en corderos deficientes de cobre.

7.2. Alteraciones cardiovasculares

7.2.1. Corazón

En ratas (Abraham y Evans, 1972) se ha demostrado que la disminución de la actividad de la citocromo-c-oxidasa en el miocardio que se produce en la depleción de cobre se acompaña de cambios morfológicos con un agrandamiento del corazón. Resultados similares han sido también descritos en ganado vacuno (Mills et al., 1976). En muchas especies animales se ha descrito que ante deficiencias severas o prolongadas de cobre, si el corazón está involucrado, puede aparecer una muerte repentina atribuida a una ruptura del miocardio con hemopericardio y hemotórax mientras que en la depleción crónica se presenta paro cardíaco local con un reemplazo fibroso en el miocardio.

Estudios morfológicos, tanto en ganado vacuno como en animales de laboratorio deficientes de cobre, ponen de manifiesto un agrandamiento en la fracción mitocondrial de las fibras del miocardio que contribuyen a la aparición de cardiomegalia; el área ocupada por las mitocondrias agrandadas excedía la de las miofibrillas que aparecían desplazadas y deformadas. No obstante, estas mitocondrias cardíacas, aisladas *in vitro*, tenían una función normal con respecto a la respiración y fosforilación (Goodman y Dallman, 1970).

Los estudios histoquímicos llevados a cabo para evaluar la posibilidad de una adaptación de las mitocondrias ante situaciones de déficit de cobre, mostraron que

mientras se producía la disminución de la actividad citocromo-c-oxidasa aumentaban otras enzimas oxidativas mitocondriales. Por ello, se sugirió que el agrandamiento del miocardio junto con el incremento en la actividad enzimática se podría explicar por el aumento de las mitocondrias; de forma alternativa, los mecanismos oxidativos para la producción energética podrían también estar aumentados por el uso de vías glucolíticas que son menos eficientes.

A nivel histológico, se ha observado que en ganado vacuno con deficiencia crónica de cobre el corazón aparece más firme (hecho asociado al cambio fibrótico) a pesar de que el miocardio es suave, grueso y pálido. La mayor anomalía observada es un espesamiento de la red de fibras miocárdicas, si bien de forma local las fibras miocárdicas atróficas aparecían reemplazadas por tejido fibrótico.

La cronicidad con la que aparecen las lesiones en ganado vacuno contrasta con el carácter severo y agudo de las deficiencias de cobre experimentales en cerdos, donde el corazón presenta un aspecto pálido y friable. Así, en cerdos que morían por rotura cardíaca, no se hallaron lesiones específicas en las fibras de miocardio; en estos animales el principal mecanismo de los daños patológicos eran posiblemente las alteraciones encontradas en las arterias coronarias.

7.2.2. Vasos sanguíneos

Una de las lesiones registradas con más frecuencia y de mayor importancia en la deficiencia de cobre es la formación defectuosa de los tejidos elásticos que se debe a la falta de la metaloenzima lisil-oxidasa. Como consecuencia de esta falta de actividad enzimática, los enlaces de los residuos de lisina resultan dañados y el tejido elástico sufre fallos estructurales por la supresión de la síntesis de elastina (Rucker y Tinker, 1977), de hecho los test mecánicos realizados en segmentos aislados de aorta muestran que las fuerzas tensionales están disminuidas. La apariencia anormal de la elastina defectuosa en ratas con déficit severo de cobre se reconoce fácilmente en microscopio óptico y electrónico (Kitano, 1980; Prohaska y Heller, 1982).

La debilidad progresiva de las paredes arteriales conlleva la aparición de aneurismas y muerte repentina por la rotura de las arterias principales en numerosas especies animales como pollos, pavos, cerdos, conejos y cobayas (Underwood y Suttle, 2002). Sin embargo, ni la fragmentación del tejido elástico ni la ruptura de la aorta han sido observados en ganado vacuno con deficiencia de cobre (Mills et al., 1976) ni en ovino (Cleary y Fanning, 1975), si bien en vacuno se han constatado cambios en el tejido elástico del ligamento nugal (Mills et al., 1976).

A nivel de la circulación periférica también se ha observado una fragmentación del tejido elástico de los vasos, lo cual se traduce como hemorragias internas que podrían ser fatales, y en algunos animales hemorragias subcutáneas generales. Así, se ha visto que las deficiencias severas de cobre provocaron lesiones hemorrágicas en embriones de pollo, hemorragias subcutáneas generales en pollos y petequiales en orejas de conejos (Underwood y Suttle, 2002).

También se han observado casos de hidropericardio, hidrotórax, derrame pleural y ascitis, si bien estos efectos son difíciles de aislar de la anemia y los desordenes cardiacos con los que se relaciona. Gallagher (1979) sugirió que probablemente los factores que contribuyen al desarrollo del edema sean los fallos miocárdicos, hepáticos y endoteliales que siguen a la severa depresión de la respiración celular. También se podrían desarrollar pequeñas hemorragias si las células del músculo liso, que son supersensibles a los efectos de la noradrenalina, presentaran espasmos intermitentes.

Lo que parece claro, sin embargo, es que los defectos hemorrágicos son mucho más probables en fetos y recién nacidos, concretamente en las fases de crecimiento y organogénesis, y en relación a esto, cabe destacar el papel activo del cobre como componente de ciertas sustancias angiogénicas que promueven la migración de células endoteliales y el crecimiento de capilares (Mc Auslan et al., 1980).

7.3. Alteraciones en el Sistema Nervioso

7.3.1. Ataxia neonatal

En la patogenia de la ataxia neonatal debemos situar la reducción de la actividad de la citocromo-c-oxidasa, enzima esencial para la síntesis de fosfolípidos, que como se sabe son esenciales para la formación apropiada de la mielina a nivel del sistema nervioso central. En este sentido se debe señalar que en animales sanos la actividad de la citocromo-c-oxidasa es muy elevada en el sistema nervioso, y que en las fases iniciales de la deficiencia de cobre en el cerebro ocurre una depleción menor de su actividad, en comparación con otros tejidos como el hígado, posiblemente para poder asegurar la integridad del sistema nervioso; no obstante, en deficiencias de cobre avanzadas hay una pérdida de hasta un 70% de su actividad enzimática (Abraham y Evans, 1972), lo que se traduce en el desarrollo de anomalías del sistema nervioso central. Una reducción importante de la actividad citocromo-c-oxidasa en la región de núcleo rojo del cerebro, así como del contenido en cobre, también se constató en la ataxia neonatal tardía.

Uno de los factores más crítico en la etiología de la ataxia neonatal parece ser la concentración de cobre en el cerebro. El valor umbral entre clínica normal y enfermedad se estableció en 3 mg/kg peso húmedo en todo el cerebro; por debajo de este valor hay una asociación clara entre la concentración de cobre y la actividad de la enzima citocromo-c-oxidasa en el núcleo rojo. Smith et al. en 1980 encontraron en fetos bovinos deficientes en cobre una disminución del 60% en la actividad de la citocromo-c-oxidasa en cerebro, si bien los efectos de esta falta de actividad enzimática no son importantes antes del periodo perinatal. El foco lesional en la materia gris del cerebro de corderos afectaba al nacimiento (ataxia neonatal congénita), a la médula espinal en casos tardíos y este hecho refleja los picos de síntesis de desarrollo de mielina en esos lugares del día 90 de gestación al día 20 después del nacimiento (Lee et al., 1968).

El desarrollo postnatal de la ataxia neonatal tardía ha sido confirmado a través de controles de suplementación de cobre después del nacimiento, pero el tiempo del tratamiento (31 ± 10 días) sugirió que la mielina es vulnerable a la deficiencia de cobre por la razón que sea durante un periodo prolongado de tiempo.

7.3.2. Encefalopatías espongiiformes transmisibles

Estudios recientes sitúan al cobre, junto con otros oligoelementos como el manganeso en la etiología de importantes patologías nerviosas, entre ellas la Encefalopatía espongiiforme transmisible bovina (Mercer, 2001; Bounias y Purdey, 2002).

Purdey (2000) planteó tras la estimulación con manganeso que la liberación de ceruloplasmina por el hígado conducía a su posterior incorporación como manganeso (II) y su oxidación a manganeso (III) que es letal. La ceruloplasmina, una oxidasa que contiene cobre es capaz de oxidar neuromediadores moleculares como la 6-hidroxi dopamina, sin liberar potentes derivados tóxicos de oxígeno (Floris et al., 2000). Esto sugiere una conexión adicional con el sistema de priones, a través del balance del cobre, transporte del metal y comunicación celular. El cobre está involucrado en la agregación de prion humano (106-126), principalmente a uniones a determinados aminoácidos (His-111, Met-109 y Met-112) según Jobling et al. (2001) con la consecuente neurotoxicidad. Por otro lado, los iones de cobre pueden inducir a priones naturales que pueden convertirse en proteasa-resistente e insoluble-detergente.

En la patogenia de esta enfermedad podrían también ocupar un papel destacado las metalotioneínas. Así, en un estudio llevado a cabo por Hanlon et al. (2002) en el que se compararon animales con encefalopatía espongiiforme bovina, animales con otra

enfermedad neurológica distinta y animales clínicamente sanos, se encontró que al igual que en estudios anteriores ocurría un aumento en la inmuno-reactividad de las metalotioneínas I/II en los tejidos medulares del sistema cerebral de los animales afectados por encefalopatía espongiiforme bovina, indicando que estas proteínas podrían jugar un papel todavía sin identificar en la respuesta a la infección por priones.

También se han descrito casos de lesiones similares a la encefalopatía espongiiforme bovina en terneros con niveles de cobre en hígado y cerebro elevados y con actividades de ceruloplasmina plasmática muy disminuída, lo que sugiere una conexión en la patogenia con la Enfermedad de Wilson en humana, donde al no poder distribuirse de forma adecuada a nivel orgánico el cobre hacia los tejidos se acumula principalmente en hígado y sistema nervioso central causando importantes lesiones (Wada et al., 1995).

7.4. Alteraciones óseas

Las anomalías en el desarrollo óseo varían ampliamente entre especies y razas. Las alteraciones de la osificación endocondrial que provoca un crecimiento óseo anormal (osteocondrosis) solo pueden afectar a los animales en crecimiento, de forma que la morfología ósea depende del ritmo de crecimiento, la distribución del peso corporal, el movimiento, e incluso el ritmo de crecimiento de las pezuñas.

El ensanchamiento de las epífisis en los huesos de las extremidades posteriores es una manifestación frecuente del ganado vacuno en crecimiento con deficiencia de cobre durante el crecimiento. En ganado ovino y vacuno se ha podido apreciar las costillas en apariencia de “rosario” debido al sobrecrecimiento de las articulaciones costocondrales; los animales adultos pueden presentar osteoporosis sin alteraciones en el crecimiento de la epífisis, pero con evidencias de un daño en la actividad osteoblástica y también es frecuente observar una mayor incidencia de fracturas óseas espontáneas. En corderos jóvenes estabulados nacidos de ovejas deficientes en cobre pueden aparecer osteoporosis y una reducción de la actividad osteoblástica pero sin cambios morfológicos de los huesos.

En cerdos jóvenes sometidos a deficiencia de cobre muy intensa se observó una reducción de la actividad osteoblástica, el ensanchamiento de la zona epifisaria y el desarrollo de alteraciones óseas notables con fracturas y malformaciones graves, incluyendo marcadas curvaturas de las extremidades anteriores.

7.5. Cambios en el tejido elástico

Cuando el enzima lisil-oxidasa se encuentra afectado se puede observar una rotura aórtica, desórdenes articulares y osteoporosis.

La osteocondrosis observada en ciervos rojos con deficiencia de cobre se acompaña habitualmente de graves defectos de los cartílagos articulares (Thompson et al., 1994), lo que probablemente se deba a un desarrollo alterado del colágeno y de la elastina, que provoca hemorragias subperiostiales e inserciones tendinosas defectuosas. La marcha anormal observada en rumiantes deficientes en cobre que algunos describen como “en pie de paloma” no son simples alteraciones óseas sino una combinación de desordenes que afectan al tejido óseo y conectivo.

Rucker et al. (1996) observaron como en ratas deficientes en cobre una disminución del 50-60% de la actividad de lisil-oxidasa en la piel no se acompañaba de modificaciones en la estructura del colágeno.

Se cree que la formación defectuosa de la cáscara del huevo de la gallina se produce por anomalías bioquímicas similares (Baumgartner et al., 1978), al igual que la delgadez de la red de capilares alveolares del pulmón de las aves (Buckingham et al., 1981).

Fahrenbach et al. (1966) describieron el proceso de elastogénesis del ligamento nugal en vacas y en sus observaciones enfatizaron el alto nivel de la actividad celular en animales cobre-deficientes. La alteración del ligamento nugal provoca una dislocación de la escápula que causa una “joroba” mientras baja la cabeza.

7.6. Alteraciones en la lana y pelo

Entre las fenoloxidasas que contienen cobre se encuentra el enzima tirosinasa, que está involucrada en la producción de melanina a partir de tirosina. Este proceso es extremadamente sensible a los cambios en el estatus de cobre, de hecho las pérdidas de pigmento en lana, pelo y plumas son un marcado índice de la deficiencia de este mineral (Underwood y Suttle, 2002).

La despigmentación suele ser el síntoma clínico más precoz de la deficiencia de cobre en todas las especies animales de capa pigmentada. La falta de pigmentación en la lana de ovejas negras y la formación de pelo gris en ganado vacuno, especialmente alrededor de los ojos, puede aparecer con niveles de cobre en la dieta que no desencadenan la aparición de otros síntomas de deficiencia. En las ovejas, el proceso

de pigmentación es tan sensible a cambios en la ingestión de cobre que se pueden encontrar bandas de fibras de lana despigmentadas alternadas con pigmentadas, según se retire o añada cobre a la ración (Underwood y Suttle, 2002).

La pigmentación del pelo es reducida, el rojo se transforma en amarillo, el negro en gris, sobre todo alrededor de los ojos, punta de las orejas y en los flancos (Lavín, 1986; Herd, 1990). Para controlar rápidamente el problema, podrían incluirse en el rebaño varias ovejas de lana negra en las que la alteración de la pigmentación es fácilmente detectable. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la despigmentación es un síntoma común que aparece en otros procesos carenciales como deficiencias de vitaminas o cobalto. Por este motivo, desde el punto de vista bioquímico así como diagnóstico, la existencia de bajas concentraciones de cobre y acromotriquia en el mismo animal no se pueden interpretar simplemente como causa y efecto.

Además de la despigmentación del pelo y de la lana, se registra alopecia y alteración en la estructura de las fibras de la lana que ocurren como resultado de una queratinización alterada. En ovejas con un estatus muy bajo de cobre una de las primeras alteraciones que aparece es el fallo de los folículos para producir estructura característica a las fibras de lana, lo que le da un aspecto de "lana de acero"; esto ocurre cuando los grupos sulfhidrilo de prequeratina se oxidan formando grupos disulfuro que producen enlaces de unión en la queratina, ya que para realizar esta transformación son necesarios enzimas Cu-dependientes.

7.7. Diarrea

La diarrea es una de las alteraciones descritas con mayor frecuencia en rumiantes con deficiencias severas de cobre, aunque también se ha visto en estudios experimentales en animales de laboratorio. Los mecanismos patogénicos implicados no están totalmente elucidados siendo numerosos los mecanismos propuestos.

En ganado vacuno deficiente en cobre se ha observado que la actividad de la citocromo-c-oxidasa aparece muy disminuida en los enterocitos del intestino delgado. Así, Fell et al. (1975) encontraron pérdidas de la actividad de este enzima relacionada con lesiones mitocondriales en los enterocitos y con atrofia parcial de las vellosidades en el duodeno y yeyuno; sin embargo, dichas lesiones no fueron confirmadas en esta especie por Suttle y Angus (1976) aunque en ratas sí concluyeron que desde el punto de vista morfológico no hubo afectación.

También se constató que una de las consecuencias de la deficiencia de cobre que podría contribuir a la patogenia de la diarrea era la hemorragia, a través de una mucosa aparentemente intacta, hacia el lumen del ciego con sangre sin digerir en las heces. Estas hemorragias hacia el lumen intestinal indican un serio desorden hemostático y de la integridad y competencia funcional del epitelio.

Otra posibilidad sitúa en la patogenia de las diarreas por deficiencia de cobre el desarrollo de úlceras abomasales; aunque no se conocen con precisión los mecanismos lo que sí se ha sugerido es que al disminuir la inmunidad puede ocurrir la proliferación de microflora oportunista, incluido *Clostridium perfringens*, potenciado por un estasis ruminal e intestinal generados por los defectos en la producción de elastina y colágeno.

También cabe citar la posible malabsorción (Suttle y Angus, 1976) o disturbios en la motilidad gastrointestinal, originadas por una concentración decreciente de noradrenalina en la musculatura intestinal. Finalmente señalar la posible contribución de la atrofia acinar pancreática observada en animales deficientes de cobre debido a la excesiva peroxidación de los lípidos de membrana y la infiltración de proteasas séricas, si bien hay que indicar que sólo un 1% o menos del páncreas es necesario en ratas para una función digestiva normal (Gollan, 1975).

7.8. Infertilidad

La infertilidad ha sido uno de los primeros síntomas descritos en animales con deficiencia de cobre (Underwood y Suttle, 2002), describiéndose con frecuencia que en rebaños de vacuno con “enfermedad de las caídas” había una mayor incidencia de infertilidad, una producción disminuída y retraso en el crecimiento de ganado joven.

Sin embargo, no está claro cual es la relación entre el estatus de cobre y la fertilidad en vacas con deficiencia de cobre de forma marginal (Phillipo et al., 1982; Lavín et al., 1987). En los casos de deficiencia secundaria de cobre la infertilidad podría estar asociada al exceso de molibdeno (Phillipo et al., 1982), así se ha visto que concentraciones elevadas de este mineral pueden retrasar la primera ovulación en novillas, con la posibilidad de que tengan un efecto específico en el eje hipófisis-hipotálamo, el cual podría intensificarse con un estatus bajo de cobre. Otros autores citan alteraciones en la duración del ciclo estral, que puede llegar incluso a veces a anestro, ovarios quísticos, ovulación alterada, retrasos en la pubertad y reducción de los índices de concepción (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001).

7.9. Susceptibilidad al padecimiento de infecciones

Estudios epidemiológicos llevados a cabo en granjas deficientes de cobre indican una mayor incidencia de mortalidad asociada a procesos infecciosos de origen bacteriano en comparación con granjas con un estatus de cobre adecuado (Underwood y Suttle, 2002). La mortalidad perinatal también está aumentada, si bien disminuye cuando se añaden suplementos de cobre al final de la gestación.

En vacas jóvenes con una deficiencia de cobre inducida por molibdeno las respuestas febriles a infecciones experimentales de tipo viral se mantuvieron inalteradas (Arthington et al., 1996) o no estuvieron relacionadas con el contenido de cobre (Gengelbach et al., 1997).

7.10. Consecuencias subclínicas de la deficiencia de cobre

En rumiantes, el retraso en el crecimiento es una característica común de la deficiencia subclínica de cobre, mientras que en los no rumiantes este retraso es tardío y en la mayor parte de los casos muy leve. También se han observado casos de infertilidad y bajo rendimiento en vacas productoras de leche (Underwood y Suttle, 2002).

En general en rumiantes estas deficiencias subclínicas se asocian al consumo de pasto o raciones que contienen cocientes Cu:Mo bajos (< 3.0 , con frecuencia < 1.0) (Underwood y Suttle, 2002), por lo que no está demasiado claro si estas manifestaciones, en ausencia de otras lesiones características de la deficiencia de cobre, de deben a los niveles bajos de este metal o a un exceso en los niveles de molibdeno.

8. INTOXICACIÓN POR COBRE EN ANIMALES

Como ya se ha revisado en las secciones anteriores, el cobre es un elemento esencial para la vida, realizando multitud de funciones en numerosos órganos y tejidos. Sin embargo, en la gran mayoría de las especies animales puede resultar altamente tóxico cuando se encuentra en concentraciones excesivas.

Existen grandes diferencias entre especies con respecto a la cantidad máxima de cobre que pueden tolerar sin que este metal resulte perjudicial. De entre los animales domésticos, sin lugar a duda, la oveja es la especie más susceptible (no es capaz de

incrementar la excreción biliar de cobre ante un aumento de exposición), mientras que los cerdos son altamente tolerantes, y de hecho se utilizan altos niveles de cobre como promotores de crecimiento en sus dietas. Las diferencias de tolerancia a niveles altos de cobre en la dieta entre rumiantes y no rumiantes puede relacionarse también en gran parte con el metabolismo del azufre, así como con diferencias en los niveles en la dieta de azufre, molibdeno, zinc, hierro y selenio.

De forma tradicional se pensaba que el ganado vacuno era bastante tolerante a la acumulación por cobre (Howell y Gooneratnte, 1987; Bradley, 1993) y los casos de intoxicación eran bastante infrecuentes. De hecho, con poca frecuencia se incluía la intoxicación crónica por cobre dentro de los paneles de diagnóstico diferencial de otras enfermedades. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado de forma importante el número de episodios de toxicidad por cobre en ganado vacuno descritos en la literatura científica (Bidewell et al., 2000; VLA, 2001), describiéndose incluso casos con concentraciones de cobre muy por debajo de los umbrales de toxicidad considerados de forma clásica para esta especie animal (Perrin et al., 1990; Tremblay y Baird, 1991; Gummow, 1996).

Las investigaciones que se han llevado a cabo a raíz del aumento de la incidencia de los casos de intoxicación por cobre en ganado vacuno no han conseguido demostrar que una concentración excesiva de cobre en la dieta sea la causa, tampoco se ha identificado un alimento o grupo de ellos como causa fundamental en este tipo de intoxicaciones. Se piensa, no obstante, que muchos casos podrían estar asociados a un cambio en el tipo y disponibilidad de los suplementos de cobre empleados (Galey et al., 1991; Steffen et al., 1997). Así, se está viendo que determinados suplementos en los que los aminoácidos quelan minerales pueden ser de un 300-500% más disponibles que las tradicionales sales de sulfato de cobre.

El uso de estos suplementos de cobre de forma rutinaria en los alimentos concentrados y de forma prolongada en el tiempo (en muchos casos durante todo el ciclo productivo), sin tener en cuenta los niveles de cobre en la ración base, así como las necesidades específicas de los animales, puede llevar a una acumulación de niveles muy altos de cobre en el hígado, y por tanto a un problema de toxicidad crónica, en muchos casos de carácter subclínico.

Otra posible causa a la que apuntan las investigaciones es a una susceptibilidad racial. Como veremos en detalle, cuando las metalotioneínas y otros ligandos que normalmente secuestran el cobre en el hígado se saturan, los iones que permanecen

libres pueden causar importantes daños oxidativos en diversos compartimentos celulares, como el núcleo y los microsomas. Aunque está demostrado a nivel de especie que existen importantes variaciones en la capacidad de síntesis de metalotioneínas que están directamente relacionadas con la susceptibilidad o resistencia de esas especies a padecer intoxicaciones por cobre (Bremner, 1998), poco es lo que se conoce de las variaciones raciales en el ganado vacuno.

Dentro de la intoxicación por cobre en animales debemos distinguir dos tipos, la *forma aguda*, debido a la ingestión de concentraciones anormalmente altas de cobre en un espacio breve de tiempo, y la *forma crónica*, la más frecuente en animales y que se debe a la acumulación de niveles de cobre dietético no necesariamente altos (a veces ligeramente por encima de las necesidades nutricionales) durante periodos de tiempo largos.

8.1. Intoxicación aguda por cobre

La intoxicación aguda por cobre es bastante infrecuente en animales. Está asociada a la ingestión de niveles muy altos de cobre en un breve espacio de tiempo.

La causa principal de la intoxicación aguda por cobre, sin lugar a duda, es la suplementación excesiva de este mineral en la dieta, bien por ingestión oral o por vía parenteral. Esta puede ser errónea, de ahí el cuidado con el que deben ser calculadas las dosis en función del peso vivo del grupo de tratamiento, o de forma accidental, debido a una suplementación innecesaria en animales con un alto grado de acumulación hepática.

Cuando la vía de exposición es la oral el cuadro clínico que muestra el animal es de una gastroenteritis aguda con dolor abdominal, diarrea y en ocasiones muerte. La intoxicación aguda por una dosis oral única de cobre se produce a una concentración de 20-50 mg/kg materia seca en corderos, 130 mg/kg en ovejas y 200 mg/kg en vacas. Los caballos y los cerdos son más resistentes que los rumiantes y los niveles de tolerancia se sitúan en 300 mg/kg (Seawright, 1982; Nacional Research Council 1980).

La inyección parenteral de dosis elevadas de cobre también puede causar una intoxicación en todas las especies de rumiantes. Las dosis necesarias para inducir una intoxicación pueden ser variables dependiendo de la especie animal, tipo de compuesto y vía de administración. A modo orientativo podríamos hablar de 10-50 mg/kg de CuCa EDTA en ovejas y 50-300 mg de sulfato de cobre pentahidratado en vacuno administrado subcutáneamente (Howell y Gooneratne, 1987).

En casos de intoxicación aguda por cobre en ganado ovino la muerte suele ocurrir antes de 3 días después de la inyección, aunque en vacuno pueden tardar 12 días. Los animales comienzan a sentirse débiles y letárgicos y muestran una coloración amarilla de las mucosas. Es frecuente encontrar hemólisis y hemoglobinuria, así como una elevación importante de las enzimas hepáticas como la sorbitol deshidrogenasa. El examen postmortem de los animales revela la existencia de lesiones hemorrágicas (petequias y equimosis) en las serosas y un exceso de fluido en las cavidades corporales, congestión y edema pulmonar; el hígado se muestra aumentado de tamaño, congestionado y hemorrágico. Si ha ocurrido hemólisis la orina muestra un color rojo oscuro (Howell y Gooneratne, 1987).

El examen histológico del hígado muestra necrosis de las células hepáticas parenquimatosas. En los animales que mueren rápidamente muy pocas células sobreviven alrededor de la vena central, estando esta zona llena de sangre. En animales que sobreviven más tiempo es frecuente encontrar infiltrados de leucocitos polimorfonucleares, aunque la reacción de las células de Kuffer es mínima. En el riñón se observa degeneración y necrosis de los túbulos contorneados proximales. Al cuantificar los niveles de cobre en estos tejidos se observa una elevación de los mismos, aunque poco marcada. La extensión y severidad de las lesiones en hígado parecen correlacionarse con las concentraciones de cobre. El mecanismo de intoxicación por cobre ha sido asociado con un daño oxidativo, que causa peroxidación lipídica de las membranas de los hepatocitos y desnaturalización de la hemoglobina en los glóbulos rojos (Goyer, 1986).

Aunque con menor frecuencia, también se han descrito episodios de intoxicación aguda ligados a la polución que se origina por el uso de aerosoles, purín de cerdo, e incluso basura industrial, así como por tratamientos veterinarios con el consumo de antihelmínticos que contienen cobre, baños de pezuñas y fungicidas (Humphreys, 1990).

Los efectos de la intoxicación de cobre en las especies no rumiantes son menos intensos y se caracterizan por una inhibición del crecimiento, anemia, distrofia muscular, reproducción perjudicada y longevidad disminuida (Underwood y Suttle, 2002).

8.2. Intoxicación crónica

Es la forma más común de intoxicación por cobre y se debe a la ingestión repetida del metal por encima de la capacidad del animal para excretarlo vía biliar, si bien las dosis

con las que se relaciona no están muy por encima de los requerimientos corporales (Underwood y Suttle, 2002).

Como se ha indicado, la oveja es la especie animal más susceptible a la intoxicación crónica, lo que hace que la mayor parte de la información de la que se dispone sobre la patogenia y los mecanismos patológicos de enfermedad sean referidos a esta especie animal.

Aunque dentro de las especies domésticas también se han descritos episodios de toxicidad crónica en ciertas razas de perros, como los Bedlington Terrier (Haywood et al., 1996; Hyun y Filippich, 2004), que presentan un defecto congénito en la metabolización/excreción de niveles normales de cobre en la dieta, la información que se presenta en esta sección está referida a los mecanismos fisiopatológicos de acumulación crónica de cobre en rumiantes, y de forma especial en el ganado ovino.

8.2.1. Etiología

El ganado criado en régimen intensivo es el más susceptible a padecer intoxicación crónica por cobre, si bien también se detectan episodios de toxicidad en animales en pasto. Se puede decir que existen 3 circunstancias principales que inducen toxicidad: (1) la ingesta alta de cobre junto con unos niveles adecuados o bajos de molibdeno, (2) cuando la dieta contiene bajos niveles de molibdeno pero los niveles de cobre son de normales a elevados y (3) la ingestión de plantas hepatotóxicas.

En la mayor parte de las ocasiones el exceso de cobre tiene su origen en la propia dieta, bien por un contenido alto de cobre en los forrajes, bien (lo más frecuente) asociado al empleo durante periodos de tiempo largos de suplementos minerales por encima de las necesidades del animal. A modo de ejemplo, señalar la intoxicación descrita en un rebaño de vacuno alimentado con gallinaza en la que murieron 146 de las 1000 cabezas de ganado con síntomas de intoxicación crónica por cobre (Tokarnia et al., 2000) o la intoxicación en terneros a los que se les administró una dosis excesiva de óxido de cobre en forma de bolos (Steffen et al., 1997).

En otras ocasiones, sin embargo, la suplementación de cobre puede ser adecuada (o al menos estar dentro de los límites que marca la legislación para suplementos animales) y la susceptibilidad a la intoxicación podría estar ligada a ciertos factores estresantes o a la deficiencia de otros oligoelementos en la dieta, como por ejemplo el molibdeno y selenio (Galey et al., 1991). Así, señalar la intoxicación por cobre descrita por Bradley (1993) en vacuno lechero de raza Holstein con el resultado de 9 muertes

de 63 animales (14%) tras la suplementación con 37 mg/kg de cobre en el alimento durante un período de 2 años.

La intoxicación por cobre suele ser más frecuentes en animales jóvenes debido a su menor capacidad de metabolización del metal. Entre los numerosos ejemplos descritos en la literatura podemos citar la intoxicación crónica en terneros alimentados con lactorreemplazantes, que por un error en la formulación contenía niveles de cobre entre 120 y 159 mg/kg materia seca (Croubels et al., 2001); la intoxicación iatrogénica en terneros neonatos debido a la administración de bolos de óxido de cobre (Hamar et al., 1997) o la intoxicación en terneros de entre 2 y 4 meses de edad debido al empleo de antihelmínticos que contenían cobre (Sullivan et al., 1991).

La intoxicación crónica en vacuno se puede producir además por la contaminación de los pastos por residuos de minería o emisiones industriales y basura, o por el empleo de purines de cerdo ricos en cobre en los pastos destinados al ganado (Grobler y Swan, 1999 a, b; Tokarnia et al., 2000).

8.2.1. Patogenia

La patogenia de la acumulación de cobre ha sido profundamente estudiada en ganado ovino (Corbett et al., 1978; Gooneratne et al., 1979; Kumaratilake y Howell, 1987, 1989; Haywood et al., 2001). Se considera que la susceptibilidad de esta especie se asocia con la incapacidad de acumular el exceso de cobre en las metalotioneínas en el hígado, lo que limita su capacidad de excreción biliar. Cuando se supera la capacidad de almacenamiento en el hígado sobreviene una crisis hemolítica que termina en muchos casos con la muerte del animal.

Los estudios de distribución subcelular del cobre en el hígado (Corbett et al., 1978; Gooneratne et al., 1979; Kumaratilake y Howell, 1989) han contribuido de forma muy importante al estudio de los mecanismos implicados en la acumulación crónica de cobre. Durante las fases tempranas de acumulación de cobre en el hígado en ovino, al igual que en la mayoría de mamíferos, el cobre se acumula principalmente en el citosol unido a las metalotioneínas; sin embargo, a diferencia de otras especies, la oveja tiene una capacidad limitada para acumular grandes cantidades de Cu-metalotioneína en el hígado y la saturación ocurre muy pronto. Una vez que los sitios de unión para el cobre están saturados se inicia la absorción del cobre por los lisosomas (en la fracción granular). La acumulación en los lisosomas está probablemente relacionada con la autofagia del cobre y está bien asumido que tiene un papel importante en el proceso

de detoxificación del cobre para su posterior excreción biliar, si bien hay otras vías para la excreción del cobre aparte de la lisosomal (Bremner, 1998).

El secuestro del exceso de cobre por los lisosomas en proliferación podría ser responsable del mantenimiento de una concentración constante de cobre en el citosol de las células hepáticas (Kumaratilake y Howell, 1989). Al inicio del almacenamiento de cobre en los lisosomas éstos van a aumentar predominantemente en número (de hecho, durante la fase de almacenamiento de cobre en el hígado previa a la hemólisis el número de lisosomas en los hepatocitos está correlacionado positivamente con la concentración de cobre en el hígado). Sin embargo, a medida que la acumulación progresa, el incremento en el número de lisosomas se reduce significativamente (llegando incluso cesar con niveles críticos de cobre) y el exceso de metal es acumulado en los lisosomas ya presentes, dando lugar al aumento de su volumen (Howell y Gooneratne, 1987). Los lisosomas ya existentes podrían llegar a saturarse con lo que el citosol, e incluso el núcleo, no pueden mantener las concentraciones de cobre y comienzan a acumularlo a una velocidad mayor de la normal, alcanzando valores de toxicidad.

Los lisosomas son por tanto organelas de almacenamiento esenciales que se encargan de proteger la célula hepática de los efectos tóxicos del metal. Mientras los lisosomas son capaces de secuestrar cobre, éste se almacena en el hígado durante un periodo de semanas o meses sin manifestación clínica de daño hepático (Howell y Gooneratne, 1987). Sin embargo, una vez que se saturan los lisosomas, el cobre comienza a acumularse en concentraciones elevadas en el núcleo y otras organelas, o incluso puede permanecer libre en el citosol, causando en ambos casos importantes lesiones celulares.

Aunque no se conoce en detalle el mecanismo de necrosis hepática en animales que presentan una acumulación de cobre en el hígado, se ha sugerido que el exceso de acumulación de cobre conlleva la ruptura de las membranas lisosomales, dando lugar a una filtración de hidrolasas ácidas en el citoplasma y la destrucción de las células hepáticas (Gooneratne et al., 1980). Lindquist (1968) sugiere que la ruptura lisosómica ocurriría por oxidación catalítica de la membrana lipídica, que se podría iniciar por la acción directa del cobre con oxígeno formándose radicales libres. Pero es también posible que la acumulación de cobre en la fracción nuclear desestabilice el ADN e inhiba la actividad de la RNA polimerasa, dando lugar a una desorganización y la consecuente muerte de la célula (Bremner, 1998). El aumento de iones de cobre libres en el citosol podría afectar a la actividad enzimática de los microsomas, causando la

peroxidación lipídica de las membranas y la degeneración y necrosis de las células (Kumaratilake y Howell, 1989).

8.2.3. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas en la intoxicación crónica por cobre están bien documentadas y se agrupan en tres fases distintas: prehemolítica, hemolítica y posthemolítica (Howell y Gooneratne, 1987).

Durante la fase prehemolítica el cobre se acumula en el organismo, particularmente en el hígado; esta fase puede durar de semanas a meses, tiempo en el que el animal se encuentra clínicamente normal.

La fase hemolítica es la fase clínica. Una vez que se ha superado la capacidad de almacenamiento de cobre en el hígado se produce un intenso daño hepático con la consiguiente salida del metal almacenado en los hepatocitos a la circulación sanguínea, lo que origina el repentino desarrollo de una hemólisis. Lo característico de esta fase es la hemólisis, por lo que normalmente en esta fase se habla de “crisis hemolítica”. La gravedad de la hemólisis va a condicionar el pronóstico del animal, así, aquellos casos con hemólisis ligeras suelen superar la enfermedad, mientras que los que presenten una hemólisis severa mueren a las pocas horas. Los síntomas clínicos en los animales van a ser los característicos de una anemia hemolítica incluyendo letargia, polidipsia y pérdida de apetito; las mucosas aparecen ictéricas, los ojos hundidos y los vasos de la esclerótica color marrón chocolate por la metahemoglobina. La orina es de color oscuro.

Los animales que sobreviven pasan a la fase posthemolítica. Durante este periodo pueden aparecer nuevas crisis hemolíticas, incluso después de que la fuente de cobre haya sido eliminada. El animal recobra la normalidad, si bien la recuperación es tanto más lenta cuanto más intensa haya sido la fase hemolítica.

8.2.3.1. Cambios en hígado

Dentro de los lóbulos hepáticos los hepatocitos muestran un gran número de lisosomas cargados de cobre, se presume que la carga excesiva precede a la muerte individual de los mismos (Howell y Kumaratilake, 1985). Durante el periodo prehemolítico se ha demostrado mediante estudios morfométricos un gran aumento en el número de lisosomas que acumulan más cobre, aumentan en tamaño y presumiblemente en peso. A nivel ultraestructural, muchos hepatocitos muestran un

aumento marcado en número, tamaño y densidad de los lisosomas que eran normales en otras situaciones. Algunos de estos lisosomas mostraron interrupciones focales de sus membranas, lo que se asocia a liberación de material granular (Gooneratne et al., 1980).

8.2.3.2. Cambios en sangre

El aumento de la concentración de cobre en sangre se debe a la ruptura de los lisosomas hepáticos y liberación enzimática desde el hígado. El cobre procedente de la lisis de los hepatocitos cargados de cobre pasa a la sangre dando lugar a una crisis hemolítica. El mecanismo que desencadena la absorción del cobre por los eritrocitos 24 horas antes de la hemólisis no está claro, pero puede ser debido a una deformación de sus membranas por efectos indirectos o directos del cobre, dando lugar a cuerpos de Heinz y/o sobre componentes como la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa, glutatión y adenosina-trifosfato. Durante la acumulación de cobre hay un aumento de la actividad simultánea de fosfatasa ácida y sorbitol deshidrogenasa a parte del cobre en sangre.

Kumaratilake et al. (1981) encontraron mínimas fluctuaciones de cobre en sangre, plasma y glóbulos rojos hasta un poco antes de la hemólisis, momento en el que los valores eran de 4 a 10 veces superiores a lo normal. Tras muestreos diarios de sangre en ovejas en fase de acumulación de cobre (prehemolítica) se observó que los niveles de cobre, tanto en sangre entera como en plasma, eran elevados en periodos cortos de tiempo durante las 14 semanas previas a la hemólisis, aunque los aumentos eran de mayor intensidad 1 o 2 días o incluso el primer día de la hemólisis. En base a esto, concluyeron que las estimaciones de los niveles de cobre en sangre tienen una validez limitada para el diagnóstico de la acumulación o intoxicación con cobre.

Otros cambios bioquímicos en sangre están asociados al daño hepático, uno de los más tempranos en la fase prehemolítica es el aumento de la actividad de enzimas hepáticas que son específicas como sorbitol-deshidrogenasa, arginasa o glutamato-deshidrogenasa, ésta última es considerada por algunos autores como el mejor indicador para el diagnóstico de la intoxicación crónica de cobre por sus aumentos significativos (Humann-Ziehank et al., 2001), la mayor parte de estos aumentos se correlacionan con la actividad de la fosfatasa ácida y con los máximos niveles de cobre plasmático, indicando así la liberación del contenido de los lisosomas hepáticos (organelas que acumulan cobre) en el transcurso de la enfermedad. En otros estudios

la actividad de fosfatasa ácida en suero permaneció aumentada durante la fase prehemolítica en todas las ovejas (Spengler, 1989).

8.2.3.3. Cambios en el riñón

En la intoxicación crónica por cobre durante la fase pre-hemolítica el metal se acumula sin que el riñón pierda su función y presenta únicamente mínimos daños estructurales (Howell y Gooneratne, 1987; Ledoux et al., 1996).

Durante la hemólisis la asociación de cobre y hierro contenidos en el riñón es bastante marcada y destaca su incapacidad glomerular y tubular. En cuanto a la patogenia no está claro el mecanismo responsable de los cambios degenerativos y necróticos: la ruptura de los lisosomas que liberan cobre, el cobre unido a metalotioneínas, o simplemente las metalotioneínas, todos ellos tienen un carácter citotóxico pudiendo dar lugar a una desorganización de la célula. Los mecanismos fisiopatológicos son posiblemente similares a los que afectan al parénquima hepático.

En el transcurso de la fase posthemolítica tanto la actividad enzimática como las células sanguíneas antes mencionadas regresan a la normalidad, eso sí, existen evidencias del fallo renal ya que se encuentran niveles de urea elevados.

8.3. Problemas subclínicos de la acumulación de cobre en rumiantes

Como hemos indicado, en la intoxicación crónica por cobre previa a la crisis hemolítica hay una fase, más o menos prolongada de tiempo, en la que se produce la acumulación de cobre en el hígado (Weaver et al., 1999); solamente cuando se sobrepasa esta capacidad de almacenamiento es cuando ocurre la rotura de los hepatocitos cargados de cobre que da lugar a la hemólisis masiva.

Teniendo en cuenta la patogenia de la toxicidad crónica es fácil entender que durante la fase silente de almacenamiento (fase prehemolítica) ocurren pequeños daños hepáticos, medibles a nivel laboratorial (utilizando marcadores enzimáticos de daño hepático), pero que pasan desapercibidos desde un punto de vista clínico. Estas lesiones pueden ser responsables de un menor rendimiento de los animales, es decir, estamos ante casos de toxicidad subclínica.

A modo de ejemplo podemos señalar varios estudios experimentales, donde a pesar de no inducir toxicidad clínica, el almacenamiento hepático de cobre era responsable de una merma de las producciones.

Gummow (1996) indujo una intoxicación por cobre en ganado vacuno adulto administrando suplementos de cobre durante periodos de tiempo largos. Los resultados de su estudio le permitieron establecer que en las condiciones de sus experimentos aparecen daños subclínicos tras la administración oral de dosis iguales o superiores a 12 mg/kg de peso de cobre al día, una concentración comúnmente empleada en programas de suplementación de cobre en ganado vacuno. Durante el curso de la prueba se monitorizaron las concentraciones de gamma-glutamyltransferasa (GGT) y aspartato aminotransferasa (ASAT), nitrógeno ureico en sangre (BUN), cobre plasmático, concentraciones de zinc y hierro. Los resultados de ASAT muestran que los animales que reciben 10 mg de cobre al día presentaban un daño hepático que llegó a ser detectado sobre el día 40 y persistió durante la prueba, el patrón del daño hepático cobra interés para los picos que aparecen cada 80 días, a los que se interponen periodos de actividad enzimática normal. Se postuló que este patrón puede reflejar episodios de daño celular severo, en el que los hepatocitos de forma individual son destruidos y sustituidos por tejido fibroso no activo. El resultado es una decadencia de la masa funcional y la aparente normalización de la actividad enzimática. Los resultados de ASAT podrían reflejar también que no todos los hepatocitos acumulan cobre al mismo tiempo y la misma cantidad, causando el daño antes en unas células que en otras. Cuando se examinó la concentración del cobre plasmático se observó que en los grupos que recibían 10 y 20 mg/kg de cobre al día los valores encontrados eran significativamente altos en comparación con los controles; estos resultados indican que cuando ocurre la lisis celular el cobre se libera desde las células dañadas, dando lugar a un aumento significativo de los niveles de cobre en sangre en los animales clínicamente normales.

Jenkins y Hidiroglou (1989) realizaron un experimento en terneros lactantes a los que se les suplementó cobre en distintas concentraciones entre 10 y 500 mg/kg con el fin de estimar la concentración de metal que podría afectar al rendimiento de los animales. Tras el tratamiento observaron que tanto el peso ganado como la eficiencia de la dieta fueron similares en los grupos que recibían 10 y 50 mg/kg, pero la ganancia de peso mermaba significativamente en los grupos que recibieron entre 200 y 500 mg/kg. El suplemento adicional de 1000 mg/kg de zinc previenen las muertes para 1000 mg/kg de cobre, pero el rendimiento de los terneros es pobre. Encontraron que con 50 mg/kg de cobre se conseguía una ingesta segura con lactoreemplazantes que contenían 48 mg/kg de zinc y 1.1 mg/kg de molibdeno, sin embargo en ingestas inferiores de estos elementos o durante periodos superiores a 6 semanas, los terneros podrían ser más susceptibles a la intoxicación por cobre. Los niveles plasmáticos de

aspartato aminotransferasa, indicativos de necrosis hepática, fueron similares y se mantuvieron dentro de los valores de referencia para los animales de los lotes que recibían 10, 50 y 200 mg/kg de cobre, aunque fueron elevados para 500 mg/kg de cobre y para los lotes de 1000 mg/kg de cobre más 1000 mg/kg de zinc. Durante el examen postmortem, ninguno de los terneros con 10, 50, o 200 mg/kg de cobre mostraron grandes anormalidades. En definitiva, terneros prerrumiantes alimentados con lactoreemplazantes toleraron hasta 50 mg/kg de cobre, mientras que niveles de 200 y 500 mg/kg fueron tóxicos y causaron menor rendimiento y eficacia del alimento; a dosis de 1000 mg/kg de cobre 3 de 7 terneros murieron y cuando a estas dosis de cobre se suplementaba zinc se prevenían las muertes aunque el rendimiento era menor.

Engle y Spears (2000b) realizaron un estudio sobre el efecto del cobre dietético en el metabolismo lipídico, rendimiento y fermentación ruminal, para ello se contó con un grupo control, y con 2 grupos a los que se le suplementó con 10 y 20 mg de cobre (como CuSO_4)/kg peso seco. Se observó una correlación positiva entre el nivel de suplementación y los niveles de cobre en el hígado, mientras la concentración de colesterol total en suero se redujo. Durante la fase de acabado, la suplementación de cobre reduce la ganancia, la ingesta de comida, y la relación ganancia:comida sin tener en cuenta la concentración ni fuente de cobre. La disminución del rendimiento puede ser debida a que el alto nivel de cobre en la dieta es capaz de alterar la fermentación ruminal (Engle y Spears., 2000a).

La toxicidad subclínica de cobre es un tema de gran relevancia, puesto que estudios de monitorización del estatus de cobre llevados a cabo en diversos países (Hadrich, 1996; Jilg et al., 1997), ponen de manifiesto que un porcentaje relativamente alto de animales presenta niveles de cobre por encima de los límites fisiológicos, lo que indica un riesgo potencial de toxicidad. Al igual que en los casos de toxicidad clínica, la causa de esta acumulación subclínica se sitúa en el empleo de suplementos de cobre, especialmente en alimentos compuestos, por encima de las necesidades fisiológicas (Engle y Spears, 2000a). También se ha descrito un aumento significativo de los niveles de cobre en animales procedentes de regiones agrícolas donde la densidad de ganado porcino es elevada, y si bien los autores señalan que no suceden episodios de toxicidad clínica, podrían ser responsables de una merma en las producciones.

9. DIAGNÓSTICO DE LOS DESÓRDENES DEPENDIENTES DE COBRE

El estatus mineral en los animales depende del mantenimiento de una relación suelo-planta-animal (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001) y si alguno de estos tres niveles se encuentra afectado, la salud, y en consecuencia el rendimiento de los animales, se verán alterados de manera equivalente.

Los resultados de los test de diagnóstico ofertan suficiente información para guiar la clínica de forma correcta, aunque en muchos casos los protocolos requieren múltiples pruebas incluyendo la dosis del elemento en varios compartimentos y la valoración de otros parámetros bioquímicos. El examen debe orientarse a una prevención, debe incluir una anamnesis con datos de presumible importancia como son la producción y la reproducción, un examen físico abarcando los distintos estados fisiológicos en los que se pueden encontrar los animales, una analítica de muestras de fluidos y tejidos, así como un examen patológico de muestras en caso de que se lleven a cabo necropsias (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001). Debemos tener en cuenta en primer lugar si existen síntomas clínicos o bien subclínicos de pérdida de producción, si desde el punto de vista bioquímico observamos concentraciones anormales de cobre en tejidos y en sangre y si existen diferencias entre los animales en relación a un tratamiento con o sin cobre.

Dentro del programa de diagnóstico de deficiencia de cobre deberá conocerse el nivel del mineral de los suelos, hacer una revisión de la dieta (sin olvidarse de las premezclas minerales) para así conocer el aporte de cada elemento, y por supuesto, si queremos conocer el estatus de cada elemento en el organismo, habrá que realizar los análisis oportunos (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001). En lo que se refiere a la dieta, deberemos ir más allá, profundizando en el estudio de posibles interferencias con otros de sus componentes, requerimientos mayores que puede tener el animal por encontrarse en alguna fase de variación fisiológica o por excesos de eliminación. Otras pautas que se deben seguir son por un lado el estudio de forma anual del estatus mineral pero a nivel del conjunto de la explotación con un enfoque profiláctico. Si se encuentran con problemas clínicos, es necesario repetir el estudio del ciclo suelo-planta-animal (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001); debe tenerse en cuenta además otros factores de variación como pueden ser los cambios estacionales ya que van a influir en la disponibilidad de los elementos.

Para la interpretación de la base de datos es fundamental conocer el contenido de los elementos traza en la dieta o tejidos de animales, en la propuesta de que las

anomalías de la composición se reflejan al final en cambios en el rendimiento animal (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001). Por ejemplo, en vacuno la relación entre la magnitud del almacenamiento hepático y las pérdidas endógenas de cobre es tan estrecha (Bremner y Mills, 1981) que se pueden realizar las estimaciones mínimas de requerimiento a partir del equilibrio o retención de cobre tisular.

La necesidad de identificar las consecuencias de la ingestión de concentraciones sub- o supraóptimas de elementos traza se ha acentuado ante la evidencia de que previo a la manifestación clínica de deficiencia o toxicidades severas aparecen signos clínicos relacionados con una disminución de las producciones. Este hecho es esencial en el desarrollo de nuevos indicadores de desequilibrios minerales, ya que las alteraciones metabólicas conllevan manifestaciones pre-clínicas de deficiencia e intoxicación que deberían examinarse en detalle (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001).

9.1. Diagnóstico de la deficiencia de cobre

Como hemos indicado, a la hora de hacer el diagnóstico de una deficiencia de cobre, además de los niveles tisulares del metal, es importante considerar la presencia de otros factores nutricionales que puedan ser responsables de una deficiencia inducida, puesto que pueden ser clave para el éxito del tratamiento. También es importante determinar los niveles de ciertas enzimas cuprodependientes, como la ceruloplasmina, puesto que van a indicar el grado de afectación orgánica.

9.1.1. Cobre dietético y sus antagonistas

La determinación de las concentraciones de cobre en la ración o en los pastos no tiene valor diagnóstico, a no ser que se determinen también otros elementos que interaccionan con él.

La analítica añadida de molibdeno es uno de los criterios más usados para diagnosticar la deficiencia de cobre y predecir su riesgo según un cociente Cu:Mo determinado. A pesar de conocerse el efecto de la relación Cu:Mo sobre las deficiencias o toxicidades del cobre, no se conoce donde está el límite crítico de este cociente. Miltimore y Manson (1971) constatan que un cociente Cu:Mo dietético inferior a 2:1 puede condicionar una deficiencia de cobre en el ganado vacuno, mientras que Alloway (1973) considera que es necesario un cociente de casi 4:1 para evitar ataxia neonatal en ovejas.

Se han dado distintas razones por las que el cociente Cu:Mo no es un buen indicador de los desórdenes del cobre. En primer lugar no refleja la ingestión previa de cobre absorbible y tampoco tiene en cuenta las reservas de cobre en el hígado. Además, este parámetro no muestra la influencia del azufre, ya que los cocientes Cu:Mo son menos importantes a medida que el azufre vegetal aumenta. Por otro lado, la fuerza del molibdeno en la interacción con el cobre es diferente en el caso de la hierba, heno o ensilado y se podría decir que varía estacionalmente en una línea vegetal determinada; su efecto inhibitor sobre la disponibilidad de cobre puede revertir a elevadas concentraciones del mismo (Suttle, 1983a) y también pueden influir otros antagonistas como el hierro.

Por tanto, esta medida diagnóstica debe, al igual que otras, tomarse de manera flexible a la hora de su interpretación. Así, ante cocientes Cu:Mo <1.0 hablaríamos de un riesgo elevado de alteración y entre 1.0-3.0 de un riesgo marginal de problemas pasados o que pueden aparecer en meses posteriores.

9.1.2. Cobre hepático

Muchos autores creen que la concentración de cobre hepático es el indicador más sensible del nivel de exposición de cobre en la dieta en rumiantes (Gooneratne et al., 1989a; Suttle y Underwood, 2002). Aproximadamente el 50-60% del cobre total del organismo está almacenado en el hígado, así que las variaciones en esta cantidad son un buen indicador del estatus de cobre del animal. La principal limitación en su empleo es la obtención de la muestra, así, los tejidos obtenidos a la hora del sacrificio podrían no ser oportunos con el propósito de monitorizar el estatus de un rebaño, y las biopsias son a menudo invasivas y difíciles de conseguir.

Cabe citar como factores influyentes en la concentración de cobre en el hígado la especie, edad, composición química en la dieta, así como diversas situaciones de enfermedad.

- Especie. Las diferencias interespecíficas no tienen nada que ver con la ingesta de cobre sino que están relacionadas con los patrones de excreción. En animales no rumiantes se citan niveles de 10-50 mg/kg de cobre en materia seca (de ellos la inmensa mayoría se encuentran comprendidos entre 15-30 mg/kg) mientras en rumiantes se alcanzan valores de 100-400 mg/kg materia seca. Ovejas y vacas tienen una capacidad superior para unir cobre en hígado así como una menor capacidad de excreción (Charmley y Symonds, 1985). Los niveles sanguíneos de

cobre no aumentan en estas especies ante aumentos en la ingesta (a diferencia de otras como las ratas), a no ser que sean excesivos, momento en el cual en rumiantes sí se puede sobrepasar la capacidad de fijación en el hígado con un aumento consecuente de los niveles de cobre en sangre (Charmley y Simonds, 1985; Arnhold et al., 1998 a,b).

- Edad. En relación a la edad, los neonatos de la mayoría de las especies (incluidos los humanos) presentan valores de cobre hepáticos más altos que los encontrados en animales adultos. La excepción la constituyen los rumiantes, así, en ovejas los valores en neonatos son más bajos que en adultos y la concentración de cobre va aumentando de forma progresiva con la edad, mientras que en terneros son comparables con los encontrados en adultos.
- Dieta. El almacén de cobre en el hígado de ovejas y vacas puede reducirse significativamente por un aumento en la dieta de molibdeno y azufre (Woolliams et al., 1983; Suttle, 1983b). La retención de cobre en el hígado está también influenciada por los niveles de zinc, cadmio, carbonato cálcico e hierro en la dieta (Bremner y Beattie, 1995).
- Otras enfermedades. Se ha observado una depleción de cobre en ratas como resultado de una infección de carácter agudo o crónico. Esto es debido a la elevación de la síntesis y secreción de ceruloplasmina por el hígado (Beisel et al., 1974).

En los primeros estudios que se hicieron en corderos y terneros recién destetados se consideraron como indicativos de una deficiencia, ya sea simple o condicionada, valores de cobre hepático de 20-25 mg/kg materia seca. Más tarde se sugirió que el umbral que debía utilizarse para diferenciar animales alterados/normales era un 75% menor (Suttle, 1987).

A la hora de considerar este parámetro no debemos olvidar que existen diferencias raciales en cuanto a los depósitos corporales de cobre. Du et al. (1996) sugieren que el vacuno Holstein tiene un umbral hepático inferior que el Jersey en el mantenimiento normal de las concentraciones plasmáticas de cobre y en Aberdeen Angus los casos que respondían a cobre sólo se diferenciaban por valores hepáticos inferiores a 3 mg Cu /kg materia seca.

Underwood y Suttle (2002) recomiendan una clasificación a tres niveles: valores de cobre inferiores a 6 mg/kg materia seca indican un riesgo elevado de deficiencia, entre

6-20 mg/kg un riesgo de alteración en el pasado o futuro en el campo, y por encima de 20 mg/kg los niveles de cobre se consideran adecuados. Puls (1994) establece un rango de deficiencia entre 0.5-10.0 mg/kg peso fresco, de marginal entre 5.0-25.0 mg/kg y adecuado por encima de 25.0 mg/kg.

9.1.3. Cobre plasmático y sérico

La concentración de cobre en plasma o suero es uno de los parámetros más utilizados en el diagnóstico de deficiencias de cobre; a ello contribuye el que se trate de una muestra fácil de recoger y que pueda ser procesada de forma rutinaria por muchos laboratorios (Tessman et al., 2001; Minatel y Carfagnini, 2002).

Los niveles normales de cobre en plasma son amplios y varían entre especies; además dependen de la edad, tipo de muestra, de la gestación y del padecimiento de otras enfermedades. En mamíferos recién nacidos, los valores normales son más o menos un 50% de los valores en el adulto pero aumentan al hacerlo su componente mayoritario que es la ceruloplasmina (McMurray, 1980).

En muestras de animales adultos debemos tener en cuenta que los valores en suero son un 10-20% inferiores a los correspondientes en plasma y esto es debido a que parte del contenido en ceruloplasmina se pierde con la coagulación (McMurray, 1980; Paynter, 1980; Suttle, 1994). Para convertir valores de cobre en suero a plasma se multiplica por 1.200 y se resta 0.032 (Wikse et al., 1992).

Las enfermedades infecciosas y otros factores que estimulan el sistema inmune, especialmente la vacunación, aumentan sustancialmente los niveles de cobre en sangre puesto que inducen la síntesis de ceruloplasmina, incluso en animales inicialmente hipocuprémicos (Suttle, 1994), esta falta de especificidad probablemente haya contribuido al escaso interés del cobre sérico como ayuda diagnóstica en comparación con el cobre hepático (Xin et al., 1993; Vermunt y West, 1994). Sin embargo, determinar la hipocupremia es una ayuda importante para el diagnóstico ya que es un indicativo de que las reservas hepáticas están tan agotadas que comprometen la síntesis de ceruloplasmina.

La mayor limitación del uso del cobre plasmático y ceruloplasmina como indicadores del estatus de cobre es que existe un intervalo de tiempo muy variable entre el descenso de sus niveles y el desarrollo de los cambios patológicos, aunque las indicaciones son que los intervalos son más cortos en animales jóvenes.

Las concentraciones de cobre en suero o plasma podrían resultar “falsos positivos” cuando las dietas son altas en molibdeno. Esto es debido a que el cobre en sangre está ligado a tiomolibdatos, lo que lo hace no disponible para el metabolismo normal (Wikse et al., 1992). De esta forma se han visto respuestas positivas a la suplementación por cobre en corderos normocuprémicos que pastaban en zonas ricas en molibdeno, al igual que signos de deficiencia en terneros que recibían dietas altas de molibdeno de forma experimental y que presentaban niveles de cobre en suero dentro del rango de normalidad.

Al igual que sucede con los niveles de cobre en hígado, no es fácil establecer un umbral indicativo de deficiencia para los niveles de cobre en plasma, puesto que como hemos indicado, va a verse condicionado por distintos factores, entre ellos los que estimulan la síntesis de ceruloplasmina. En general se admite que niveles de cobre en plasma permanentemente por debajo de 0.5 mg/l pueden ser indicativos de deficiencia (Radostits et al., 2002). No obstante, tanto en ganado vacuno como en ovino con manifestaciones clínicas de deficiencia de cobre suelen encontrarse concentraciones plasmáticas entre 0.2-0.3 mg/l (McFarlane et al., 1991; Underwood y Suttle, 2002).

9.1.4. Cobre sanguíneo

La concentración de cobre en sangre total no se ha empleado de forma rutinaria para el diagnóstico de deficiencias de cobre, aunque sí se ha revelado como un parámetro útil en los casos de intoxicaciones.

En este sentido, Inglaterra ha sido posiblemente el único país donde se ha utilizado con frecuencia este parámetro en el diagnóstico de las deficiencias de cobre, fijándose un umbral máximo de normalidad en 0.80 mg/l; no obstante, se ha demostrado que al igual que sucedió en un principio con los niveles de cobre en hígado, este valor es demasiado alto, lo que llevó a sobreestimar la incidencia de hipocuprosis (Suttle, 1994) puesto que muchos animales no se beneficiaban de la suplementación (Givens et al., 1981).

Estudios posteriores, como los llevados a cabo por Koh y Judson (1987), en los que determinaron las concentraciones de cobre en plasma, sangre total e hígado en los mismos individuos durante espacios de tiempo prolongados, permitieron establecer un intervalo marginal de 0.38-0.63 mg/l de cobre en sangre entera.

9.1.5. Ceruloplasmina

La actividad de la ceruloplasmina, el principal exportador de cobre hepático hacia los tejidos, se considera un buen indicador del estatus de cobre en vacuno (Blackley y Hamilton, 1985; Barboza y Blake, 2001). Así, si las concentraciones de cobre caen por debajo de 0.3 mg/l en sangre y 40 mg/kg en el hígado, la actividad de ceruloplasmina estará significativamente disminuída (Hynes et al., 1975; Larson et al., 1995; Arthington et al., 1996).

Wikse et al. (1992) señalan como importante ventaja de la ceruloplasmina el que es mucho más precisa que la concentración de cobre en sangre para identificar problemas de deficiencia de cobre ligados a un exceso de molibdeno en la dieta, debido a que cuantifica únicamente el cobre fisiológicamente disponible.

Sin embargo, en el resto de los casos, las ventajas que aporta la determinación de la actividad de la ceruloplasmina en comparación con el cobre sanguíneo en rumiantes son pocas, ya que las correlaciones de estos dos parámetros suelen ser muy altas puesto que el 80-90% del cobre se encuentra en forma de ceruloplasmina.

Los rangos de referencia para la ceruloplasmina en plasma se sitúan entre 10 y 20 mg/dl para animales con un estatus de cobre adecuado, entre 5 y 10 mg/dl como indicativos de deficiencia y < 5 mg/dl en casos de deficiencia severa (Gay et al., 1988).

9.1.6. Cu-Zn-Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la Cu-Zn superóxido dismutasa en los eritrocitos, una de las principales cuproenzimas, constituye un método indirecto para valorar el estatus de cobre en animales. Comparando la actividad SOD con la concentración hepática de cobre se llegó a la conclusión de que sirve para predecir los niveles de cobre en hígado en ovejas cuando la ingesta es de baja a moderada (Underwood y Suttle, 2002).

La actividad de SOD en los eritrocitos va a ayudar al diagnóstico de forma distinta que los niveles de cobre plasmático o sérico, ya que ante una deficiencia de cobre la actividad enzimática va a descender a un ritmo lineal y lento (Suttle y McMurray, 1983). Así, frente al descenso de manera exponencial del cobre plasmático o sérico los valores bajos de SOD nos señalan una deficiencia prolongada de cobre y los valores altos una sobrecarga del mismo que se relacionan más con la tasa de crecimiento que con el contenido de ceruloplasmina.

Debe tenerse en cuenta que las unidades convencionales de medida no son cuantitativas, utilizando como unidad la actividad necesaria para alterar en un 50% la tasa de "superoxidación". Como las tasas de superperoxidación varían según el método, la equivalencia molecular de SOD de una unidad también varía. Además, los glóbulos rojos deben lavarse para eliminar los inhibidores plasmáticos y diluirse para minimizar la interferencia de los constituyentes de los hematíes, incluyendo probablemente la hemoglobina. Se han propuesto intervalos específicos para ensayos particulares (Herbert et al., 1991). Debido a que la actividad de SOD está correlacionada de forma importante con el cobre eritrocitario, la medición del cobre en los glóbulos rojos sería más útil y menos problemática (Arthington et al., 1996).

9.1.7. Cobre en pelo y lana

Las concentraciones de cobre en pelo y lana, tanto en ovejas y como en ganado vacuno, tienen un valor relativo como ayuda diagnóstica. Pueden reflejar una ingestión de cobre subóptima, lo que se vería con el deterioro de la capa del animal (Suttle y Angus, 1978; Suttle y McMurray, 1983). No se debe olvidar que otras deficiencias nutritivas van a influir también en el crecimiento del pelo y de la lana, así que se tendrá en cuenta a la hora de la interpretación diagnóstica.

9.1.8. Otros criterios

Las actividades de las enzimas monoamino oxidasa (MAO) en plasma y citocromo-c-oxidasa en hígado representan índices útiles en el diagnóstico de agotamiento crónico del cobre. Sin embargo, Mills et al. (1976) al estudiar casos de terneros deficientes de cobre concluyeron que estas técnicas bioquímicas tienen un valor limitado para predecir la rapidez o intensidad con que un individuo presentará síntomas manifiestos de deficiencia, por lo que no van a mejorar los escasos resultados que ofrece la determinación de la actividad CuZnSOD hepática.

9.2. Diagnóstico de la intoxicación por cobre

A la hora de realizar el diagnóstico de la intoxicación por cobre debemos de tener en cuenta además de las características clínicas del animal, la historia de exposición al metal, la predisposición genética, los cambios morfológicos y bioquímicos y el análisis del contenido de cobre en la dieta, tejidos y sangre. El no considerar en conjunto todos estos datos puede hacer que el diagnóstico resulte dificultoso.

Como hemos comentado, previo a la manifestación clínica de la intoxicación por cobre existe una fase de almacenamiento en el hígado en el que pueden ocurrir daños subclínicos en el animal, responsables de un menor crecimiento o merma en las producciones que es importante identificar.

9.2.1. Cobre en hígado

La concentración elevada de cobre en el hígado es uno de los parámetros más importantes a la hora del diagnóstico de intoxicación puesto que hasta que se desencadena la crisis hemolítica el cobre se acumula casi exclusivamente en este órgano (Howell y Gooneratne, 1987).

Al igual que sucedía con los niveles de cobre en hígado indicativos de deficiencia, los niveles de residuo asociados con toxicidad no están claramente establecidos. Aunque de forma tradicional se establecía un umbral de toxicidad para el ganado vacuno en 250 mg/kg peso fresco (Wikse et al., 1992; Radostits et al., 2002), de forma reciente se han descrito casos de intoxicación crónica en animales donde los niveles de cobre exceden los 150 mg/kg. Así por ejemplo, en un estudio de inducción experimental de intoxicación por cobre en vacuno adulto se observaron signos clínicos de intoxicación en los animales con una concentración media de cobre en el hígado de 152 ± 56.6 (rango: 69-194) mg/kg (Gummow, 1996).

También hay que tener en cuenta que cuando se supera la capacidad de almacenamiento de cobre en hígado y se produce la necrosis de los hepatocitos cargados de cobre, este metal pasa a la circulación sanguínea (desarrollando la crisis hemolítica), por lo que en ese momento los niveles hepáticos de cobre pueden ser más bajos.

9.2.2. Cobre en sangre

La determinación de los niveles de cobre en sangre presenta una utilidad diagnóstica limitada puesto que permanecen dentro del rango de normalidad mientras dura la fase de almacenamiento hepático, y únicamente sufren una elevación considerable cuando ocurre la crisis hemolítica (Howell y Gooneratne, 1987).

9.2.3. Cobre en riñón

La determinación de los niveles de cobre en riñón presenta importancia para confirmar el diagnóstico de intoxicación en los animales que muestren niveles de cobre próximos al umbral de toxicidad. Si bien las concentraciones renales de cobre permanecen

próximas a la normalidad (4-6 mg/kg peso fresco; Puls, 1994) durante la fase de almacenamiento, una vez que ésta se satura y se produce la crisis hemolítica, una gran parte del cobre liberado pasa al riñón donde se acumula (Riet-Correa et al., 1989). Así, en un estudio sobre el diagnóstico de la intoxicación de cobre en terneros, se registraron valores en hígado y riñón de 36-166 mg/kg y 22-35 mg/kg respectivamente (Sargison y Scott, 1996), lo que llevó a los autores a concluir que concentraciones de cobre renales elevadas confirman el diagnóstico provisional de intoxicación, mientras que las concentraciones normales hepáticas eran la consecuencia de la previa liberación del cobre almacenado en los lisosomas hacia la circulación periférica.

Además, junto con los niveles de cobre es importante considerar las concentraciones renales de hierro, que permanecerán normales o ligeramente elevadas antes de la crisis hemolítica mientras que estarán muy aumentadas durante y después de la fase hemolítica (Howell y Gooneratne, 1987).

9.2.4. Enzimas marcadoras de daño hepático

La determinación de ciertas enzimas marcadoras de daño hepático permiten evaluar el grado de necrosis celular una vez que los hepatocitos saturados de cobre sufren la lisis celular.

Se han realizado numerosas investigaciones con el fin de identificar cuáles son los indicadores bioquímicos más adecuados para el diagnóstico de intoxicación por cobre en rumiantes. Entre ellas las más empleadas han sido la aspartato-aminotransferasa (ASAT) que se libera normalmente en respuesta de cambios en la permeabilidad hepatocelular, daño subletal y necrosis (Backley et al., 1982) y la gamma-glutamyl-transferasa (GGT) que está asociada con membranas microsomales y se suele liberar durante la necrosis letal celular (van der Schee et al., 1983; Humphries, 1989; Lewis et al., 1997). También se han empleado otras enzimas específicas hepáticas como la arginasa, sorbitol deshidrogenasa (SDH) y la glutamato deshidrogenasa (GLDH) además de enzimas lisosomales como la fostatasa ácida (FA) (Zervas et al., 1990; Sutherland et al., 1992).

Los resultados de estos estudios son poco consistentes, tanto en lo relacionado con la elección de los parámetros más sensibles como con la correlación existente entre el daño hepático y la magnitud de la elevación de sus niveles plasmáticos. Algunos estudios muestran que las actividades de las enzimas tan sólo se elevan al comienzo de la crisis hemolítica, por lo tanto no son realmente técnicas diagnósticas válidas

(Humann-Ziehank et al., 2001). Duncan y Prasse (1986) documentaron además que la correlación entre la actividad sérica de la enzima aspartato-aminotransferasa y la manifestación clínica de la insuficiencia hepática es pobre.

9.2.5. Hallazgos en la necropsia

En los animales que mueren durante la fase hemolítica se constata la presencia de una ictericia generalizada y líquido seroso en las cavidades; el hígado presenta un aspecto friable y un color anaranjado o amarillento; los riñones muestran un color marrón-oscuro, están edematizados y de consistencia disminuida; la orina es de color café o rojo oscuro (Howell y Gooneratne, 1987; Underwood y Suttle, 2002).

Los exámenes histológicos del hígado muestran la presencia de necrosis en gran número de hepatocitos, especialmente alrededor de la vena central. Los hepatocitos además muestran vacuolización, a veces con pigmento de aspecto granular de color amarillo-claro; las células de Kupffer están repletas de pigmentos de color marrón-acaramelado; se observa además una gran retención de bilis en los canalículos biliares. A nivel renal destaca la presencia de un gran número de cilindros granulares rojos o hialinos, vacuolización de las células epiteliales, a veces con pigmentos amarillo-claro en las mismas, dilatación de los túbulos y necrosis de las células de los tubulos contorneados proximales (Maiorka et al., 1998).

9.2.5. Otros parámetros

Durante la fase clínica de la enfermedad el estudio hematológico pone de manifiesto un marcado descenso del número de glóbulos rojos, del valor hematocrito y de la hemoglobina asociado a la hemólisis masiva que puede afectar hasta al 75% de los eritrocitos. El examen del frotis sanguíneo en la fase hemolítica revela la existencia de numerosos fragmentos celulares, anisocitosis, poiquilocitosis, policromasia y presencia de cuerpos de Heinz en más del 15% de los eritrocitos. Los glóbulos blancos estarán muy aumentados (2-3 órdenes de magnitud) con un incremento muy marcado del número de neutrófilos (Underwood y Suttle, 2002).

10. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LOS DESÓRDENES DEPENDIENTES DE COBRE

La prevención y el control de los desordenes del cobre, tanto de deficiencia como de toxicidad, presentan gran importancia puesto que al igual que otras alteraciones

nutricionales en la mayor parte de los casos afectan a la totalidad del rebaño, y como tal deben de ser abordados.

10.1. Tratamiento y prevención de la deficiencia de cobre

A la hora de establecer el tratamiento de una deficiencia de cobre es esencial diferenciar si estamos ante una *deficiencia primaria*, que se presenta cuando existe un aporte insuficiente del elemento en el alimento o en el agua de bebida, o ante una *deficiencia secundaria*, que ocurre cuando el cobre está en cantidades adecuadas pero no tiene una absorción y un metabolismo óptimo en el organismo (Benedito et al., 1998).

A la hora de proporcionar suficiente cobre al ganado nos encontramos con una gran variedad de métodos, incluyendo desde la aplicación de distintos compuestos de cobre a los suelos, alimentos o agua de bebida, a una gran variedad de formas en el propio animal, tanto por vía oral como parenteral. Para la elección del método de suplementación se procura valorar su eficiencia y el mínimo coste. Así mismo, los suplementos deben administrarse diariamente o en largos intervalos; en este último caso la dosis de cobre puede exceder los requerimientos nutricionales y llegar a ser tóxica.

10.1.1. Suplementación de cobre en los suelos

Se sabe que el uso de fertilizantes puede aumentar el rendimiento de las plantas y elevar el nivel de cobre en hierbas y forrajes, si bien los niveles adecuados para los animales suelen ser más altos (77.5 mg/kg cobre materia seca).

Debe tenerse en cuenta que en función del tipo de suelo y del clima las cantidades precisas van a variar. Las primeras experiencias llevadas a cabo en Australia indican que un suelo abonado con 5-7 kg/ha de sulfato de cobre suele ser suficiente para un periodo de 3 o 4 años, excepto en suelos calcáreos (Underwood y Suttle, 2002), mientras que en suelos arenosos se han obtenido efectos residuales prolongados de 23 o más años. No es conveniente tratar con fertilizantes los suelos ricos en materia orgánica porque el cobre se fija a complejos ácidos no utilizables. Tampoco es aconsejable en casos de hipocuprosis inducida por molibdeno en pastos ricos en cobre.

Los resultados del abonado no son uniformes entre los distintos experimentos. Mientras que en unos trabajos se vio que la aplicación de una cantidad de 2.75 kg de

cobre (como sulfato de cobre pentahidratado) por hectárea determinaba un aumento de la carga ganadera durante más de 4 años (Gartrell, 1981), en otros, la respuesta no es consistente e incluso a niveles más altos de 5 a 7 kg/ha el efecto beneficioso no ocurría por encima de los cuatro años. Por tanto, es difícil predecir el beneficio año tras año, de manera que puede ser necesario repetir la operación anualmente con el fin de mantener los niveles de cobre adecuados, si bien el coste de la repetición lo hace poco rentable.

Una alternativa a los fertilizantes inorgánicos es la aplicación de purines ricos en cobre, especialmente de cerdo. Como hemos indicado, en las dietas intensivas de porcino se añaden elevadas concentraciones de cobre (>200 mg/kg materia seca) como promotor del crecimiento, del cual un 80% se elimina en las heces, haciendo que los purines contengan concentraciones extremadamente altas de este metal. McAllister en 1976 constató que la aplicación repetida de purín en granjas de manejo intensivo podría dañar la tierra. Se realizó un estudio para valorar el efecto de la frecuencia y duración en el tiempo de la aplicación de abono porcino y vacuno en el campo, así como la composición mineral de la hierba y las propiedades físicas y químicas del suelo. Los resultados mostraron cambios significativos del contenido mineral; así, se observaron aumentos de cobre (10 mg/kg) y de zinc (44 mg/kg) por la aplicación de purín de cerdo en la hierba seca al primer corte (Christie y Beattie, 1989). Se producía la acumulación de cobre y zinc extraídos por EDTA en el suelo que aumentaba con las aplicaciones progresivas de purin de cerdo, especialmente en los horizontes más superficiales del suelo. Aunque la acumulación de cobre y zinc presumiblemente no era suficiente para producir síntomas de toxicidad en la hierba, las concentraciones podrían afectar a la biomasa microbiana del suelo. Las dietas que contienen CuSO_4 y purín producen consecuencias análogas indicando que el cobre del purín es relativamente aprovechable y potencialmente tóxico cuando es ingerido un pasto contaminado. No obstante, cabe destacar que el principal riesgo en la aplicación de purines con elevado cobre subyace en la ingestión de pasto contaminado por cobre. Batey et al. (1972) sugirieron que existía un riesgo si se permitía pastar la hierba que estaba físicamente contaminada por purín rico en cobre.

10.1.2. Suplementación de cobre en la dieta

10.1.2.1. Concentrados

La aplicación de cobre en los concentrados es uno de los métodos más comunes de suplementación. Normalmente se añade en forma de carbonato o sulfato de cobre al

5% formando parte de una premezcla junto con otros minerales (como por ejemplo sodio, hierro, zinc y manganeso) que se incorpora en la parte concentrada de la ración. Alternativamente, el sulfato de cobre podría añadirse directamente o rociar el concentrado.

La concentración final de cobre se ajusta normalmente a una media de ingesta de al menos 10 mg/kg de cobre de la ingesta total de alimento (concentrado y forraje). El concentrado debe contener mayor cantidad de cobre para compensar el contenido en los forrajes que es mucho menor que 10 mg/kg. De este modo, para el vacuno lechero, el sulfato de cobre podría ser mezclado directamente con el concentrado para darle una concentración final con un rango entre 20-25 mg/kg de cobre. Sin embargo, si se consideran los efectos antagonistas, donde el exceso de molibdeno provoca una deficiencia secundaria de cobre, deberían ser administrados más de 150 mg de sulfato de cobre diariamente o lo que es lo mismo, suplementados con 45 mg/kg de cobre.

La ventaja de incorporar el cobre en la porción de concentrado de la ración es que con este método se garantiza que cada uno de los animales se suplemente diariamente con la cantidad recomendada, pero por otro lado tiene como inconveniente su coste que debería ser considerado. Si la ración contiene muchos componentes, y ya de por sí requiere un proceso de mezclado (como suele ocurrir en la preparación de la ración de vacas lecheras) el coste es insignificante, pero sin embargo, cuando la ración prácticamente es un solo componente (como ocurre en los sistemas de producción de carne con cebada o maíz) los costes de la mezcla no están justificados. Además, este método cuenta con la limitación de que se aplica a sistemas en los que el vacuno está recibiendo una ración con concentrado.

10.1.2.2. Bloques y mezclas minerales

Cuando los animales no reciben concentrados, una alternativa es considerar el libre acceso a una mezcla de minerales. Así por ejemplo, se previene la deficiencia proporcionándole piedras para lamer que contengan entre 0.5-1.9% de cobre, subsanándose la necesidad de aplicación de fertilizantes que en explotaciones extensivas resulta sin duda antieconómica. Un animal que come 110 g de la mezcla que contiene 0.2% de sulfato de cobre hidratado ingeriría aproximadamente 50 mg de cobre.

Si bien es un método económico presenta múltiples inconvenientes: la cantidad de cobre ingerida no es controlada y es imposible asegurar su eficacia en todos los animales del grupo, la ingesta en animales en pasto es irregular y es también difícil

mantener la disponibilidad de los minerales y protegerlos de forma adecuada de fenómenos atmosféricos como la lluvia y otras adversidades.

Dunlop et al. (1939) usaron sales para lamer en ovejas con 0.3% de cobre y observaron como la incidencia de ataxia neonatal estaba enormemente reducida pero no eliminada, presumiblemente porque las ovejas consumen poco cobre por este método. Paradójicamente también hay peligro de intoxicación por cobre cuando se llevan mucha cantidad a la boca cuando lamen.

10.1.2.3. Suplementación discontinua con sales de cobre

La administración de sales de cobre de forma discontinua se ha mostrado como un método eficaz, ya que los animales tienen capacidad de almacenar cobre en el hígado durante periodos en los que se ingiere en exceso y movilizarlo de los depósitos cuando los consumos son insuficientes. Las soluciones con CuSO_4 cada mes o incluso a intervalos más largos suele tener efectos satisfactorios. Sin embargo, cuando los contenidos en molibdeno en el forraje son suficientemente elevados como para inducir diarreas (5 mg Mo/Kg materia seca) puede ser necesaria la suplementación diaria de cobre.

La deficiencia secundaria de cobre inducida por el molibdeno causa una importante reducción en la producción lechera, que se puede corregir con dosis de entre 300 y 1200 mg de cobre al día, ante este tratamiento los animales responden con un aumento en la producción de al menos un 10%, lo que justifica su uso durante los 250 días de la lactación (Dewes, 1984).

Cuando la deficiencia es menos severa o primaria, la suplementación oral discontinua resulta ser útil, tanto en vacas como en ovejas. Así, Jamieson y Allcroft (1950) en el Reino Unido, probaron una sola dosis de 500 mg de sulfato de cobre en vacuno y observaron como aumentó su desarrollo de forma significativa, sin embargo era necesario aumentar la dosis a 5 g mensuales para mantener unas concentraciones de cobre en sangre dentro del rango de normalidad. McPherson et al. (1983a) observaron que con una suplementación de 1.5 g de cobre en 3 intervalos mensuales aumentaba el desarrollo del vacuno sin alterar sus concentraciones en sangre. Estos mismos autores con un programa de administración de dosis similar durante los 3 últimos meses de preñez en primerizas constataron que, aunque no aumentaban los niveles de cobre en sangre en las hembras sí lo hacían los valores de cobre en sangre en los terneros, mostrando así como el cobre había sido transferido a través de la placenta.

Los terneros lactantes, sin embargo no recibieron beneficio del cobre que se le daba a la novilla, lo que sugería que no se producía un aumento de cobre en la leche.

La incidencia de ataxia neonatal se redujo del 23 al 3% en ovejas con dosis orales de 125 mg de cobre en intervalos de 15 días durante la preñez (Askari et al. 1979). De forma alternativa estos mismos autores emplearon un programa de dos dosis orales de 220 mg de cobre (1 g de sulfato de cobre) aplicadas 8 y 4 semanas antes de la fecha esperada para el parto. La primera dosis, alrededor de 80 días después de la concepción, aseguró niveles de cobre para la síntesis de mielina que comienza de forma muy intensa el día 100 postconcepción (Askari et al. 1982). En cuanto a la incidencia de la ataxia postnatal en ovejas observaron una reducción importante con esa misma dosis oral de sulfato de cobre durante las primeras semanas de vida.

Además del sulfato de cobre, se ha probado la suplementación oral con otros compuestos como el glicinato y calcio cúprico, también administrados por vía oral, y se ha observado que la retención de cobre en el hígado de ambos compuestos no es mejor que la administración oral de sulfato de cobre que contaría con una retención aproximada del 1.8%, con lo que se concluye que no suponen una ventaja sobre el sulfato de cobre que además es más barato. En cuanto a la suplementación con cobre-lisina en terneros en crecimiento (Kegley y Spears, 1994), se ha observado que el estatus de cobre en estos animales no difiere de los suplementados con sulfato de cobre; ambos presentan la misma disponibilidad, al contrario que el óxido de cobre donde la disponibilidad es muy baja.

A pesar de que las sales de cobre administradas oralmente permiten controlar un gran número de deficiencias de cobre, como hemos comentado, presentan el inconveniente de que solo son efectivas durante periodos cortos de tiempo. Debido a ello, ha habido muchos intentos para desarrollar formulaciones de cobre para dosis orales que permanezcan efectivas durante periodos más prolongados de tiempo. Estas formulaciones incluyen agujas de óxido de cobre y liberación controlada en cristales como veremos más adelante.

10.1.3. Suplementación de cobre en el agua de bebida

Farmer y colaboradores (1982, 1983) desarrollaron en ganado vacuno en crecimiento dos formas de añadir una cantidad de sales de cobre al agua de bebida de forma controlada. La primera es un mecanismo contador que fija la proporción de algún elemento traza en el agua de bebida, mientras que la segunda es un sistema de

liberación lenta en forma de pellets, a través del cual pasa el agua, haciendo que se disuelva y se mantenga una cantidad fija de ese elemento en el agua.

Utilizando el mecanismo contador observaron que aprovisionaba con 2 o 3 mg/kg de cobre en el agua de bebida a animales que pastaban en una zona rica en molibdeno. Con este método se consiguió una ingesta de cobre de 30 mg diarios, la cual era suficiente para prevenir los signos de una deficiencia secundaria y mantener en la normalidad la concentración de cobre en sangre. Concluyeron estos autores que se trata de un sistema barato, seguro y conveniente para la prevención y el tratamiento de la deficiencia primaria de cobre y la inducida con molibdeno.

El sistema de liberación lenta de cobre era menos efectivo. Al chequear el agua se encontraron valores de 0.08 a 0.16 mg/kg de cobre, lo que indica que en la disolución de los pellets no se libera toda la forma soluble del metal, quedando mucha cantidad de cobre acumulado en el fango donde estaba contenido el agua.

10.1.4. Suplementación parenteral

El desarrollo de métodos de suplementación parenteral surge ante la necesidad de minimizar las limitaciones que presenta la suplementación oral, entre ellas, la baja tasa de absorción intestinal y almacenamiento hepático. Así, con la suplementación parenteral se consigue que más de un 75% de una dosis única pueda alcanzar el hígado para su almacenamiento, en comparación con menos de un 10% en las dosis orales. Además, la reducción de las dosis de cobre administradas tiene una gran importancia desde el punto de vista de la calidad medioambiental, puesto que la cantidad de metal que no se absorbe vía oral permanece como residuo en el medio natural.

Jamieson y Allcroft (1950) observaron en terneros como con una dosis de 50 mg de sulfato de cobre por vía intravenosa se conseguían los mismos efectos que con una dosis de 500 mg por vía oral.

Bohman et al. (1984, 1987) valoraron la composición de los tejidos tras la inyección de dos compuestos de cobre, edetato y glicinato. El edetato de cobre causó menos irritación tisular en el punto de inyección que el equivalente de cobre en forma de glicinato. Observaron que el cobre (sobre todo edetato) se moviliza rápidamente del punto de inyección subcutáneo, y aunque las concentraciones plasmáticas aumentan de forma transitoria, el cobre se almacena rápidamente en el hígado tras la inyección,

lo que probablemente sirva para minimizar los riesgos de toxicidad del producto debido a las concentraciones que el cobre podría alcanzar en sangre.

Es importante destacar que con este tipo de suplementación no deben realizarse administraciones de cobre adicionales, especialmente en ovejas, ya que una cantidad en exceso, por encima de los requerimientos nutricionales (cuando se emplee la vía parenteral) puede ser almacenado en el hígado y llegar a desencadenar una intoxicación.

Hay distintos factores que determinan la duración del efecto, como la ingesta en la dieta de cobre, la cantidad almacenada en el organismo y los continuos requerimientos diarios. Por ejemplo, las terneras preñadas deben recibir suplementos de cobre adecuados antes del día 50, cuando comienza la primera fase de mielinización en el desarrollo fetal. En ganado ovino, si la deficiencia de cobre es severa durante la preñez, los corderos recién nacidos deberán ser suplementados con cobre vía parenteral. En vacuno de carne con rápido crecimiento y que se encuentra pastando en áreas con severa deficiencia de cobre, Gleed et al. (1983) demostraron que era necesario repetir la dosis parenteral.

10.1.5. Agujas de óxido de cobre

Las agujas de óxido de cobre son partículas de elevado peso específico en forma de varilla, con una longitud de entre 1-10 mm, compuestas por óxido de cobre y alambres de cobre oxidado que pueden ser administradas fácilmente en gelatina o una cápsula similar. Una vez administradas, las cápsulas se disuelven lo que permite que las partículas en ella englobadas se liberen durante un periodo de varias semanas, algunas de ellas en los preestómagos pero sobre todo en el abomaso, donde el óxido de cobre se disuelve de forma lenta a pH ácido (Cameron et al., 1989).

El ritmo óptimo de dosificación es de 0.1 g/kg de peso vivo (Suttle, 1987). Deberían vigilarse las dosis elevadas por la peligrosidad de causar una toxicidad, particularmente en ovejas cuando éstas ya cuentan con buenos niveles de cobre (Allen et al., 1984). La principal ventaja que presentan frente a otros métodos de suplementación es que las reservas hepáticas de cobre pueden mantenerse durante meses después de una dosis única (McFarlane et al., 1991).

En ovejas este tipo de suplementación es uno de los mejores métodos para prevenir la deficiencia de cobre y sus implicaciones. Suttle (1981) demostró que 0.5 g de cobre (0.64 g de agujas) protegía de forma efectiva contra la hipocupremia, mientras que

Cavanagh y Judson (1994) concluyeron que con dosis de 2.5 g de óxido de cobre se podría prevenir la deficiencia de cobre en un periodo breve de tiempo en ovejas en pasto sin ningún riesgo de intoxicación por cobre.

Judson et al. (1982) realizaron diversos experimentos en ovejas de la raza merina en Australia a las que se les prescribió dosis de 2 a 16 g de cobre. Concluyeron que con dosis de 2.0 g se incrementó la concentración de cobre en el hígado por lo menos durante 30 semanas.

Whitelaw et al. (1983) administraron 3.2 g de cobre en terneros con deficiencia inducida y 1.6 g a corderos con edades comprendidas entre 3-5 semanas, pero no consiguieron constatar cual era su efecto valorando las concentraciones de cobre en el hígado.

Deland et al. (1979) administrando dosis de 50 g de cobre en terneros de 3 meses observaron que los animales estaban protegidos durante seis meses contra la deficiencia de cobre (hipocupremia, bajas concentraciones de cobre en hígado, reducciones en la producción). Al comparar sus efectos con la aplicación de una dosis única parenteral de 120 mg de cobre en forma de glicinato de cobre constataron que la protección alcanzada era mejor en el primer caso.

McPherson (1983a) encontró que con una dosis de 3.2 g de cobre en terneros y de 8 a 16 g en novillas y vacas de carne adultas en pasto los animales quedaban protegidos frente a las deficiencias estacionales producidas por el pasto. Whitelaw et al. (1983) administraron 16 g de cobre a terneros de 190 kg y observaron como su índice de crecimiento se vio aumentado de forma significativa al igual que los niveles de cobre en sangre durante varios meses. McPherson (1983b) administró 48 g de cobre en vacas de carne con el objetivo de conseguir una protección para largos periodos de tiempo y concluyó que estaba suficientemente justificada la dosis ya que se alargaba el periodo de protección a casi 8 semanas. El vacuno adulto se encuentra suficientemente protegido durante 6 meses con dosis de 16 g de cobre.

En ovejas el tratamiento temprano durante la preñez protege a sus crías gracias a la transferencia de cobre a través de la placenta (Gooneratne y Christensen, 1985). Tanto en ovino como en vacuno los niveles de cobre que son transferidos a través de la leche son pobres, es posible que los terneros se vean afectados y que se les deba administrar para la deficiencia de cobre dosis de hasta 20 g.

Judson et al. (1984) estudiaron algunos factores que condicionan la disponibilidad del cobre en las agujas. Demostraron que en ovino, tanto en extensivo como en intensivo, el efecto del grado de llenado del rumen en el momento de la administración de la dosis era insignificante. Observaron además que las partículas de cobre eran más efectivas para alcanzar niveles de cobre hepáticos si presentaban un tamaño uniforme (de 3.0 a 4.0 mm de longitud, de 1 a 1.2 mm de diámetro, con un promedio de 140 partículas en 2.5 g) que si había tamaños distintos.

Si se quiere conseguir la máxima eficacia de estas partículas se deben controlar las enfermedades parasitarias y otras causas de diarrea, ya que en estudios realizados en Nueva Zelanda por Bang et al. (1990) se sugirió que cuando los parásitos incrementaban el pH del abomaso, la cantidad de cobre liberado de las partículas de óxido de cobre era menor.

10.1.6. Liberación controlada en cristales

La utilización de cristales ha sido evaluada como posible método de suplementación de cobre de larga duración por Allen et al. (1984), quienes han descrito como su solubilidad depende sobre todo de las concentraciones de los constituyentes principales (calcio, sodio e iones fosfato) variando así el cristal de insoluble a soluble, si bien en todos los casos las variaciones en la proporción de cobre tienen un mínimo efecto en su solubilidad. De forma adicional estos cristales también pueden contener selenio y cobalto.

Estos mismos autores describieron el uso de cristales con un 18% del peso de cobre que tras el procesado bajo la forma de cápsulas cilíndricas contaban con un peso aproximado de 17 y 75 g para ovejas y vacuno de carne en crecimiento respectivamente; estos cristales se incrustan en la parte anterior del estómago de manera que el cobre se va liberando desde un mínimo de 2.1 mg en ovino a 11 mg en vacuno al día; incluso aunque este ratio de liberación se mantuviera tan sólo en un 50% en las ovejas y un 30% en los terneros de la recomendación diaria dietética, la concentración hepática de cobre se elevaría de forma muy importante.

En un experimento realizado con ovejas se observó un aumento de la actividad de ceruloplasmina al menos durante un año desde su aplicación (Carlos et al., 1985).

La mayor ventaja es que proporciona suplementos adicionales de cobre en una proporción uniforme durante muchos meses. Mientras que las agujas son efectivas 6

meses después de la dosis, esta forma cristalizada lo es más allá, es decir, sólo es necesaria una administración anual.

Como un posible inconveniente, señalar que en su primera comercialización en ovejas se sugirió que la cantidad de cobre que se liberaba no era suficiente para prevenir el desarrollo de ataxia neonatal en corderos de madres tratadas, si bien esta limitación se podría contrarrestar con un aumento en la solubilidad del producto.

10.1.7. Suplementos de cobre inorgánicos vs. orgánicos

La baja disponibilidad del cobre en los alimentos para rumiantes ha hecho necesario potenciar el uso de agentes que protejan al cobre contra antagonistas que actúan en el rumen, pero desafortunadamente este objetivo no se ha logrado. Se han propuesto mezclas de hidroxilatos Cu-proteína (“metalosatos”) y de complejos aminoácidos específicos como Cu₂:lisina. En varios estudios en ganado vacuno en los que se han probado metalosatos (Wittenberg et al., 1990) y Cu-aminoácido (Ward et al., 1993; Kegley y Spears, 1994; Du et al., 1996; Yost et al., 2002) y en un estudio en ovino con Cu₂:lisina (Suttle y Brebner, 1996) no se ha demostrado que ninguna de estas fuentes tenga ventajas sobre el tradicional sulfato de cobre. En estudios con cerdos o aves tampoco mostraron una disponibilidad superior sobre el sulfato de cobre la metionina-Cu ni la lisina-Cu (Baker y Ammerman, 1995).

10.1.8. Selección genética

Se pueden aprovechar las variaciones genéticas referidas al metabolismo del cobre para prevenir las deficiencias y disminuir la dependencia de una suplementación en el caso de problemas endémicos. Woollians et al. (1985, 1986) seleccionaron carneros jóvenes por sus concentraciones plasmáticas de cobre a lo largo de cuatro generaciones consiguiendo eliminar la hipocuprosis en un rebaño calificado como “vulnerable” sin la necesidad de recibir una alimentación específica. Otra opción es cruzar corderos de un rebaño calificado como “tolerante” como Texel por corderos escoceses Blackface para así reducir los problemas de hipocuprosis.

10.1.9. Minimización de los antagonismos

Teniendo en cuenta la influencia de antagonistas como el hierro y especialmente el molibdeno sobre la incidencia de desordenes que responden al cobre, su prevención puede alcanzarse en parte reduciendo al máximo la exposición a dichos antagonistas. En cuanto a los problemas de deficiencia, debe evitarse el uso excesivo de cal y

mejorar el drenaje del suelo cuando hablamos del molibdeno y en cuanto al hierro se consigue disminuir a base de evitar el pastoreo excesivo. Además, tanto en rumiantes en pastoreo, como adultos en estabulación nunca debe utilizarse hierro para formular suplementos minerales.

10.2. Tratamiento y prevención de la intoxicación por cobre

Una vez que se ha diagnosticado la intoxicación por cobre el tratamiento irá encaminado, además de tratar de estabilizar al animal en la fase de crisis hemolítica, a retirar la fuente de cobre y a reducir los depósitos corporales (especialmente hepáticos) de este mineral (Howell y Gooneratne, 1987; Auza et al., 1999; Underwood y Suttle, 2002)

La primera medida a tomar es eliminar inmediatamente la fuente de cobre. Como en la mayor parte de los casos la intoxicación ocurre a través de la dieta, ésta debe remplazarse por una que contenga un nivel de cobre y de oligoelementos antagonistas adecuado. No obstante, hay que tener en cuenta que los signos de intoxicación pueden seguir apareciendo en el rebaño o incluso algún animal puede morir después de que se haya eliminado el exceso de cobre; esto puede ser debido a que el cobre continua disponible en el rumen o a que el nivel de almacenamiento hepático es muy elevado.

Además, como la crisis hemolítica se desencadena generalmente en situaciones de estrés, un punto fundamental en el tratamiento es evitar todas aquellas situaciones como traslados, cambios bruscos de temperaturas (especialmente el frío), periodos de ayuno temporales o determinadas prácticas de manejo como la castración o el esquilado en ovejas que puedan suponer un estrés para los animales del rebaño, incluso para aquellos aparentemente sanos.

Los primeros tratamientos que se registraron de la intoxicación de cobre fueron el azul de metileno y el ácido ascórbico con el objetivo de corregir la metahemoglobinemia así como los daños peroxidativos. El azul de metileno, a una dosis de 5-10 mg/kg de peso inyectados en una solución intravenosa al 4%, reducía la metahemoglobinemia (fenómenos oxidativos en la hemoglobina) pero no prevenía las muertes. El ácido ascórbico también fallaba en lo que se refería a revertir los efectos de la intoxicación por cobre como son los daños por fenómenos de oxidación (Braude y Ryder, 1973).

También se evaluó para el tratamiento de la intoxicación por cobre el uso de agentes quelantes que se unen al metal y previenen el daño tisular. En ovejas 100 mg de 2,3-

dimercapto-1-propanol en aceite administrado por vía intramuscular, y di-sodio-calcio-edetato administrado intravenoso fallaron en el intento de aumentar la excreción urinaria de cobre y por tanto fueron inefectivos. La penicilamina sin embargo consiguió aumentar la excreción urinaria en más de 20 veces pero su elevado precio hace que no sea factible su uso para el tratamiento de rutina en animales de granja. Otros compuestos como el dimetil-tiocarbamato tampoco se han mostrado efectivos en la excreción de los depósitos corporales de cobre (Gooneratne y Christensen, 1997).

Los aumentos en las concentraciones de zinc en la dieta muestran un efecto beneficioso contra la intoxicación de cobre, tanto en ovejas como en cerdos, al disminuir la absorción intestinal de cobre. Sin embargo, el hecho de que las concentraciones dietéticas de zinc necesiten elevarse a valores de entre 220-420 mg/kg para que sean efectivas limita su aplicación práctica (Bremner y Davies, 1976). Pero por otro lado se constató que la suplementación con zinc (Van Ryssen y Barrowman, 1987) y D-penicilamina (Botha et al., 1993; Humann-Ziehank et al., 2001) son ineficaces en la eliminación de cobre en sus formas unidas en el hígado. Un aumento en la proteína del concentrado de la dieta, de 10 a 20% también parece proteger contra la intoxicación de cobre en ovino (McPherson y Hemingway, 1965).

En la actualidad el método más efectivo para movilizar en cobre de los depósitos corporales es el empleo de soluciones orales de tetratiomolibdato de amonio (Gooneratne et al., 1989b). Se trata de un tratamiento muy práctico y específico que se basa en la interacción del cobre con molibdeno y azufre para producir compuestos de cobre unido a molibdatos que pueden ser excretados con facilidad.

Tras la administración intravenosa de tetratiomolibdato de amonio a ovejas intoxicadas por cobre se observó una reducción importante en la concentración de cobre en las fracciones hepáticas, en el número y tamaño de los lisosomas electrodensos presentes en los hepatocitos y en el número de células necróticas en el hígado. El tetratiomolibdato es capaz de movilizar el cobre presente en los lisosomas y el citosol de las células cargadas de cobre. Tras la administración de tetratiomolibdato aumenta la concentración de molibdeno total en los hepatocitos así como en las distintas fracciones, lo que indica que el molibdeno procedente de los tetratiomolibdatos está entrando en las células hepáticas. La movilización hepática de cobre trae como consecuencia un descenso de los niveles del metal en el hígado, un aumento de la concentración de cobre en sangre así como de su excreción urinaria. De forma experimental también se ha demostrado la eficacia de los tetratiomolibdatos en la

prevención parcial o total de la hemólisis y otros daños titulares (Howell y Gooneratne, 1987; Auza et al., 1999)

En los estudios experimentales llevados a cabo por Gooneratne y colaboradores (1989b, 1997) en ovino intoxicado por cobre se demostró que los tetratiomolibdatos producen una rápida movilización del cobre hepático para ser eliminado vía urinaria, aunque también se produce un aumento de su excreción vía biliar y se potencia su secreción endógena en el tracto gastro-intestinal. Los mayores efectos de los tetratiomolibdatos en la excreción biliar ocurrían a las 24 horas siguientes a su administración cuando los efectos sistémicos eran máximos. También demostraron que los tetratiomolibdatos actúan primero en el almacén de tiempo más corto y de forma limitada en el de tiempo prolongado.

Existen distintos protocolos de tratamiento con tetratiomolibdatos de amonio utilizando dosis únicas o repetidas, tanto por vía oral, intravenosa o subcutánea. Durante la fase aguda de una intoxicación por cobre en ovino la administración de 6 dosis de 15mg/kg por vía endovenosa resultó ser efectiva, observándose una disminución de los depósitos de cobre en hígado a niveles dentro de la normalidad (Sansinanea et al., 1995). También se consiguió un control efectivo de la intoxicación de cobre en ovejas tras la inyección subcutánea de tetratiomolibdato de amonio en 3 dosis de 3-4 mg/kg peso vivo en días alternos; este tratamiento causó una disminución substancial del contenido de cobre y del daño ocasionado además de disminuir el ratio de mortalidad en animales que desarrollaron crisis hemolítica, lo que lleva a concluir que la vía subcutánea es tan efectiva como la intravenosa y más conveniente (Humphries et al., 1988). Durante un episodio de toxicidad por cobre en ganado vacuno de leche asociado al uso excesivo de suplementos minerales, se evaluó el uso de tetratiomolibdato de amonio administrado por vía oral como método preventivo, y potencialmente, reductor de los depósitos corporales de cobre. Todos los animales del rebaño (lactantes y no lactantes) recibieron dosis entre 500 y 1000 mg de tetratiomolibdato de amonio con la dieta durante 18 días. Se observó que tras el tratamiento los niveles de cobre en suero habían disminuido considerablemente y tampoco se habían detectado nuevos episodios de mortalidad o intoxicación clínica.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ZONA DE ESTUDIO: LA COMARCA DEL DEZA

La Comarca del Deza está situada en el extremo septentrional de la provincia de Pontevedra (Mapa 1) englobando a los Ayuntamientos de Agolada, Dozón, Lalín, Rodeiro, Silleda y Vila de Cruces. Presenta una superficie de 1036 Km² y una población cercana a los 50.000 habitantes (Tabla 1).

Se trata de una comarca con un importante sector agropecuario, si bien en los últimos años ha comenzado a desarrollarse un tejido industrial, con especial peso de la industria textil, y un sector terciario como apoyo a los sectores primario e industrial.

La Comarca del Deza cuenta con una de las cabañas ganaderas más importantes de Galicia, tanto en número de cabezas como en producción, entorno a la cual se sitúa el 35% de la población ocupada. Si bien en el pasado el sistema agrario tradicional, agricultura y ganadería, estaban bastante equilibradas, en la actualidad la orientación ganadera de las explotaciones va cobrando una creciente importancia, tendiendo a una elevada especialización en el ganado bovino (de producción tanto cárnica como láctea) y porcino, así como la superficie total dedicada a pastos, convirtiéndose en una de las comarcas de Galicia con mayor densidad ganadera (Tablas 2 y 3). Dentro de la propia comarca existen diferencias importantes en cuanto al tipo de explotaciones. Así por ejemplo, mientras que en Silleda y Lalín predominan las explotaciones intensivas de ganado vacuno de leche (Tabla 2), en Agolada y Rodeiro lo hacen las de vacuno de carne en un sistema fundamentalmente semiextensivo. En cuanto al porcino, se trata de una de las comarcas con mayor actividad en intensivo, con una densidad media 10 veces superior al resto de Galicia (Tabla 3), especialmente concentrada en los Ayuntamientos de Dozón y Silleda, aunque en menor medida también en Rodeiro y Lalín.

Destacar asimismo la importancia de la cunicultura, que junto con los nuevos cultivos de flores y productos hortícolas en invernaderos o las plantaciones de frutales cobran un nuevo impulso y dotan a la comarca del Deza de nuevas alternativas agrarias en las que prima la calidad sobre la cantidad. Por otra parte, en la actualidad se está trabajando en la incorporación de métodos ecológicos en los sistemas de producción relacionados con la ganadería y agricultura, lo que supone una nueva orientación para el sector.

Tabla 1. Características de los Ayuntamientos que integran la Comarca del Deza (Anuario Estadística Agraria, 2000)

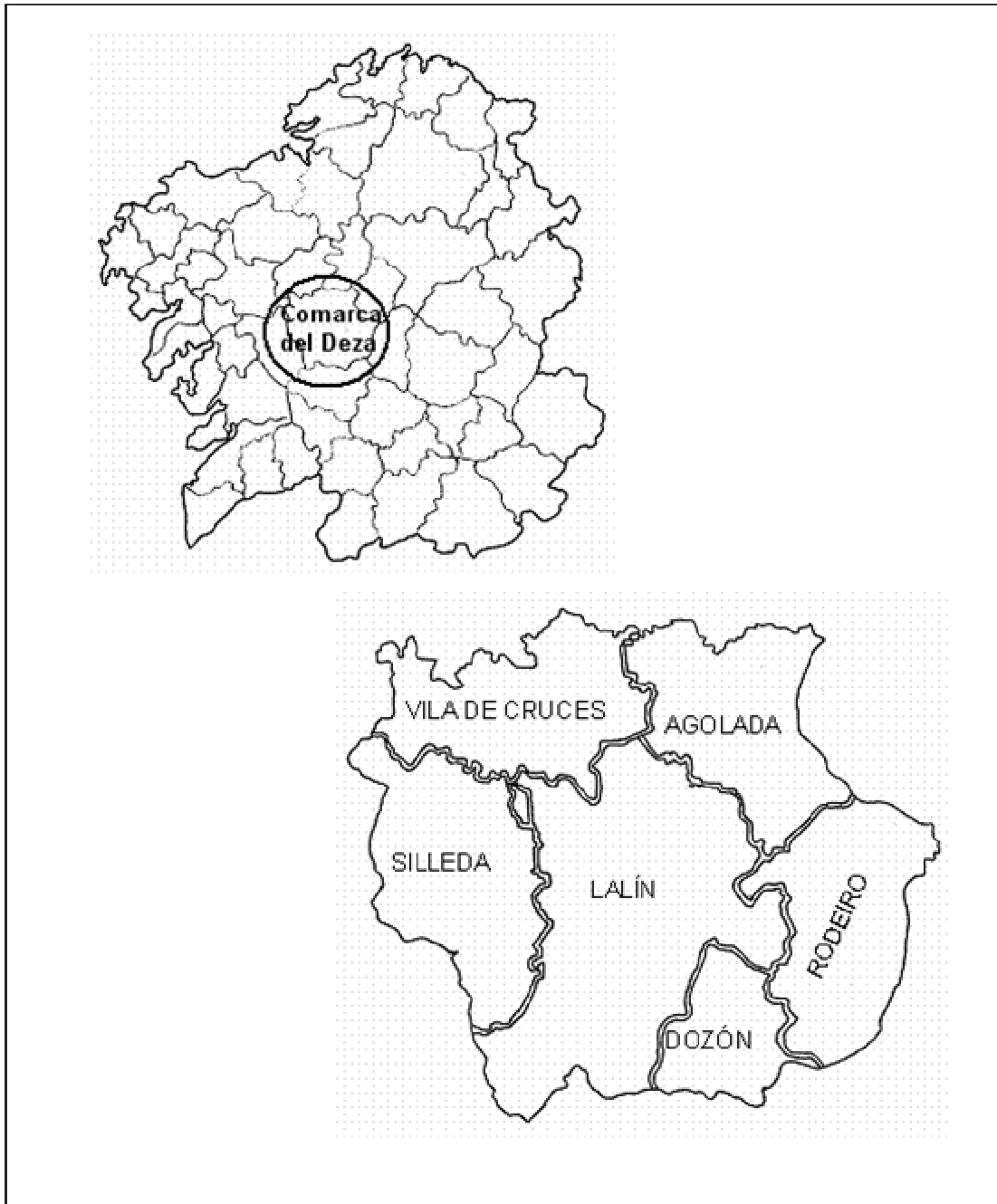
| Ayuntamiento | Superficie (Km ²) | Población |
|----------------|-------------------------------|-----------|
| Agolada | 148 | 4117 |
| Dozón | 74.6 | 2164 |
| Lalín | 326 | 20453 |
| Rodeiro | 167 | 4578 |
| Vila de Cruces | 154.5 | 7108 |
| Silleda | 169 | 9100 |
| TOTAL | 1036.1 | 47520 |

Tabla 2. Censos ganaderos de vacuno en la Comarca del Deza (entre paréntesis densidades ganaderas por km²) (Anuario Estadística Agraria, 2000)

| Ayuntamiento | Nº Explot | Nº Total reses | Nº vacas leche | Nº vacas carne |
|----------------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| Agolada | 523 | 5119 (34,6) | 2200 (14,9) | 2402 (16,2) |
| Dozón | 271 | 4053 (54,3) | 2516 (33,7) | 920 (12,3) |
| Lalín | 1573 | 20992 (64,4) | 15029 (46,1) | 2297 (7,0) |
| Rodeiro | 664 | 10351 (62,0) | 6325 (37,9) | 2416 (14,5) |
| Silleda | 1110 | 14976 (88,6) | 11284 (66,8) | 675 (4,0) |
| Vila de Cruces | 881 | 6690 (43,3) | 4305 (27,9) | 1501 (9,7) |
| TOTAL | 5022 | 62181 (59,8) | 41659 (40,1) | 10211 (9,8) |
| GALICIA | 88913 | 1005367 (34,0) | 478197 (16,2) | 269762 (9,1) |

Tabla 3. Censos ganaderos de porcino en la Comarca del Deza (entre paréntesis densidades ganaderas por km²) (Anuario Estadística Agraria, 2000)

| Ayuntamiento | Nº reproductoras | Nº plazas cebo |
|----------------|------------------|----------------|
| Agolada | 570 (3,85) | 7865 (53,1) |
| Dozón | 282 (3,78) | 20676 (277) |
| Lalín | 1890 (5,80) | 27124 (62,4) |
| Rodeiro | 609 (3,65) | 15035 (90,0) |
| Silleda | 4428 (26,2) | 31027 (184) |
| Vila de Cruces | 669 (4,33) | 2587 (16,7) |
| TOTAL | 8448 (8,13) | 97537 (93,9) |
| GALICIA | 119332 (4,04) | 303732 (10,3) |



Mapa 1: Distribución geográfica de la zona de estudio.

2. ANIMALES DE ESTUDIO

2.1. Características de los animales

Debido a que para estudiar en detalle la acumulación de cobre a nivel orgánico es necesario el empleo de muestras de tejidos, el protocolo experimental se diseñó de forma que la recogida de muestras se llevase a cabo a nivel de matadero en el momento de sacrificio de los animales.

La selección de los animales a muestrear se realizó en el matadero antes del sacrificio de los mismos, de forma que se consiguiese un número homogéneo y representativo de animales de todas las zonas de estudio. La procedencia exacta de cada animal se certificaba mediante el Documento de Identificación Bovino (DIB). Para garantizar que las muestras fuesen representativas de la zona estudiada, solo se recogieron muestras de aquellos animales mantenidos durante todo el ciclo productivo en la misma explotación y cuya fuente principal de alimentación fuesen los productos de origen local, descartando los animales procedentes de cebaderos industriales. Los animales se mantuvieron en un sistema semiextensivo en pastos abonados con purines de cerdo ricos en cobre, permaneciendo con sus madres durante la mayor parte del ciclo productivo y recibiendo además un complemento con heno y otros productos locales especialmente en invierno.

Con el propósito de minimizar las fuentes de variación, todos los animales muestreados eran de similares características, con una edad que oscilaba entre los 6 y 12 meses de edad. A fin de poder estudiar el efecto del sexo y de la raza sobre el acúmulo de cobre se recogió un número similar de machos y hembras en cada una de las zonas de estudio. Para evaluar la influencia estacional sobre la acumulación orgánica de cobre se realizaron dos muestreos uno en invierno y otro en verano. Se descartaron aquellos animales que por cuestiones sanitarias eran objeto de decomiso.

2.2. Elección del tipo de muestras

A la hora de seleccionar el tipo de muestras para evaluar la acumulación de cobre en terneros en la zona de estudio se tuvieron en cuenta los siguientes criterios (López Alonso, 1999):

- (1) Hígado: Se trata de la muestra más adecuada para evaluar la acumulación de cobre en la mayoría de las especies animales, especialmente en rumiantes, puesto que se trata de un tejido con una gran capacidad bioacumulativa. Al

tratarse del principal reservorio o almacén de cobre a nivel orgánico es la muestra de elección para evaluar el estatus de cobre, tanto en estados carenciales como en estudios de biomonitorización ambiental por exposición a niveles elevados de cobre en el medio natural.

- (2) Riñón: Junto con el hígado son las dos muestras de elección en los estudios de bioacumulación por cobre. Aunque los niveles de cobre en riñón permanecen dentro de la normalidad hasta que se satura la capacidad de acumulación de cobre en hígado, una vez que ésta ocurre y se produce la crisis hemolítica los niveles de cobre en riñón se elevan claramente, sirviendo como indicativo de intoxicación crónica por cobre.
- (3) Sangre: Se trata de la muestra no letal más importante para evaluar el estatus de cobre de un animal. Su limitación radica en que únicamente aporta información sobre consumo reciente y que los niveles de cobre en sangre en casos de deficiencia no disminuyen por debajo de la normalidad hasta que ocurre una depleción total de las reservas hepáticas. Durante la crisis hemolítica ocurre además un aumento significativo de los niveles de cobre en sangre.

3. RECOGIDA DE MUESTRAS

La recogida de muestras se llevó a cabo en los principales mataderos de ganado vacuno situados en la Comarca del Deza en los que se sacrifica el ganado procedente de la zona con las características descritas con anterioridad, y que están situados en los ayuntamientos de Vila de Cruces (Embutidos y Cárnicas Gallegas, S.L.) y Lalín (Matadero Comarcal del Deza/Lalín, S.L.) (Mapa 1).

La toma de muestras se llevó a cabo en los meses de diciembre de 2000 (muestreo de invierno) y julio de 2001 (muestreo de verano).

La selección de los animales se realizaba de forma previa al sacrificio, una vez realizada la verificación de la documentación así como la inspección antemortem de los mismos. Se recogieron muestras de un total de 533 animales, 261 durante el muestreo de invierno y 272 durante el muestreo de verano. En la Tabla 4 se presenta de forma esquemática el número de animales que integran cada uno de los grupos de estudio.

Tabla 4. Número de animales muestreados en cada grupo

| Zona | Machos | Hembras | Total |
|----------------|------------|------------|------------|
| Agolada | 49 | 29 | 78 |
| Dozón | 45 | 14 | 59 |
| Lalín | 147 | 72 | 219 |
| Rodeiro | 16 | 12 | 28 |
| Silleda | 40 | 15 | 55 |
| Vila de Cruces | 62 | 32 | 94 |
| Total | 359 | 174 | 533 |

Previo al sacrificio se seleccionaban los animales a muestrear de acuerdo con las características descritas anteriormente, basándonos en Documento de Identificación Bovino (DIB). Ya en este momento se asignaba a cada animal el código de identificación empleado en este estudio. El siguiente esquema se corresponde con un ejemplo de la ficha de campo empleada en la recogida de muestras.

| | | | | | |
|----------|------------------------|-------------|-------------------|----------|-----------------------|
| | | fecha | 22/12/00 | matadero | Vila de Cruces |
| Código | PP 142 | procedencia | Galegos, 2 | | |
| nºcrotal | ES-001103780284 | | Lalín | | |
| edad | 8 meses | nº CEA* | 3602401238 | | |
| raza | R. Gallega | incidencias | | | |
| sexo | hembra | | | | |

nº CEA: Código de Explotación Agraria

La sangre (10 ml aproximadamente) se recogió en el momento del sacrificio en tubos heparinizados. Para evitar fuentes de variación el resto de muestras se recogieron siempre de la misma localización anatómica mediante el empleo de cuchillos de plástico para evitar contaminación. La muestra de hígado (200 g aproximadamente) se tomó del lóbulo cuadrado y la del riñón se recogió la mitad anterior del riñón derecho. Las muestras se colocaron en bolsas de polipropileno y se mantuvieron refrigeradas hasta su transporte en el mismo día al laboratorio.

Una vez en el laboratorio, las muestras se limpiaron de grasa, tejido conectivo y principales vasos sanguíneos y se homogeneizaron. De cada muestra se tomaron 3 submuestras de 10 g aproximadamente en bolsas de polipropileno, las cuales se identificaban con el código del animal. Se tomaron asimismo 3 alícuotas de sangre (3 ml) en tubos de plástico estériles. Todas las muestras se congelaron a -18°C hasta su posterior análisis laboratorial.

4. ANÁLISIS LABORATORIAL

4.1. Instrumental

Para la determinación de los niveles de cobre hemos empleado un espectrofotómetro de absorción atómica con Efecto Zeeman (HITACHI modelo Z-8100) equipado con un automuestreador (HITACHI SSC-200) e impresora (HITACHI).

La determinación de los niveles de metales tóxicos (cadmio, plomo, arsénico y mercurio) y elementos esenciales (cobalto, hierro, manganeso, molibdeno, selenio y zinc) se llevó a cabo por Espectroscopia de Emisión con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-AES), empleando un Perkin Elmer Optima 4300 DV.

La digestión ácida de las muestras se realizó en un sistema de microondas marca Milestone Ethos Plus, equipado con vasos de alta presión.

Todas las soluciones se prepararon con agua ultrapura con una resistividad específica de $18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, obtenida a través de un sistema de purificación de agua Millipore (modelo Milli-Q Plus) inmediatamente antes de su uso.

Para evitar problemas de contaminación debido a los detergentes o a las propias muestras todo el material de vidrio (tubos de digestión y almacenamiento, probetas, matraces aforados, frascos de almacenamiento, etc.) se lavó con agua después de cada uso y se mantuvo en una solución de ácido nítrico al 10% durante al menos 24 horas, finalmente se aclaró 3 veces con agua desionizada y se mantuvo en un lugar libre de polvo hasta su uso.

4.2. Preparación de las muestras

Todas las muestras de hígado y riñón (2 gramos aproximadamente) y sangre (2 ml) se pesaron de forma precisa en los vasos de digestión utilizando una balanza electrónica

SALTER-AND, modelo ER-60A. A cada muestra se le añadieron 5 ml de ácido nítrico concentrado, (Suprapur grade, Merck), 2 ml de peróxido de hidrógeno 30 % p/v y 1 ml de agua ultrapura. A continuación se cerraron los vasos y se sometieron a un proceso de digestión cuyas características aparecen reflejadas en la Tabla 5. La solución resultante se diluyó con agua ultrapura hasta un volumen final de 25 ml y se almacenó en tubos de polipropileno hasta su posterior análisis químico, momento en el que se prepararon las diluciones adecuadas para trabajar en el rango de linealidad, dependiendo de la concentración de metal en las distintas muestras titulares (López Alonso, 1999).

Tabla 5. Programa de digestión empleado para la digestión ácida de las muestras empleando un microondas marca Milestone (modelo Ethos Plus).

| | Paso | Tiempo | Temperatura | Potencia |
|----------|------|-------------|-------------|----------|
| Vísceras | 1 | 5 minutos | 180° | 1000 W |
| | 2 | 10 minutos | 180° | 1000 W |
| Sangre | 1 | 2 minutos | 85° | 1000 W |
| | 2 | 2.5 minutos | 135° | 1000 W |
| | 3 | 4.5 minutos | 230° | 1000 W |
| | 4 | 15 minutos | 230° | 1000 W |

4.3. Determinación analítica

4.3.1. Determinación de los niveles de cobre por Espectrofotometría de Absorción Atómica con llama

4.3.1.1. Condiciones de análisis

Las condiciones de trabajo aparecen reflejadas en la Tabla 6. Tanto la altura del quemador como el flujo de acetileno se optimizaron para conseguir las máximas lecturas de absorbancia mientras que se aspiraba una solución de 2 mg/l. Para calcular los valores de absorbancia se trabajó en modo área de pico.

Tabla 6. Condiciones instrumentales para el análisis de cobre por Espectrofotometría de Absorción Atómica en llama

| | | |
|------------------------|-------------------|----------------------|
| Intensidad lámpara | 7.5 mA | |
| Longitud de onda | 324.8 nm | |
| Rendija | 1.3 nm | |
| Tipo de quemador | Standard | |
| Altura de quemador | 7.5 mm | |
| Llama (aire/acetileno) | | |
| | presión aire | 160 Kpa (15.0 l/min) |
| | presión acetileno | 7 Kpa (2.2 l/min) |

4.3.1.2. Preparación de las disoluciones patrón y calibración

Las soluciones standard se prepararon diariamente a partir de una solución stock de 1.000 ± 0.002 g/l (Titrisol, Merck) sobre un 10% de ácido nítrico. Se trabajó en el rango de linealidad, siendo éste de 0.25 a 4 mg/l.

Con el propósito de detectar posibles oscilaciones en las condiciones del equipo a un intervalo constante (cada 10 muestras) se inyectaba la solución standard de mayor concentración.

Se usó el método de adiciones standard a fin de detectar posibles interferencias y efectos de matriz, sobre 3 muestras de cada tipo (hígado, riñón y sangre) tomadas arbitrariamente. El paralelismo observado, tanto entre la recta de calibrado como entre las rectas de adiciones standard entre si, indica la ausencia de interferencias en la determinación de estos metales con la técnica por nosotros empleada, consecuentemente la determinación de cobre se llevó a cabo empleando una recta de calibrado normal.

4.3.2. Determinación de los niveles de metales tóxicos (cadmio, plomo, arsénico y mercurio) y esenciales (cobalto, hierro, manganeso, molibdeno, selenio y zinc) por Espectroscopia de Emisión con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-AES)

La determinación de los niveles de los principales metales tóxicos y esenciales en hígado y riñón se llevó a cabo por Espectroscopia de Emisión con Fuente de Plasma

Acoplado (ICP-AES). Los análisis se realizaron en el Laboratorio FISQITECNAL perteneciente a los Servicios Centrales de la Universidad de Santiago de Compostela. Las condiciones analíticas aparecen reflejadas en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones instrumentales para el análisis por Espectroscopia de Emisión con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-AES).

| | |
|---------------------|------------------|
| Potencia | 1 Kw |
| Flujo de plasma | 15 l/min |
| Flujo gas auxiliar | 1.5 l/min |
| Presión nebulizador | 150 Kilopascales |
| Velocidad muestra | 25 rpm |

4.4. Cálculo de las concentraciones de metales en las muestras

Para calcular la concentración de los metales analizados en las muestras se empleó la

$$K = \frac{(a - b) \times V}{m}$$

siguiente formula:

Donde K = concentración en la muestra (mg/kg o mg/l en sangre), a = concentración en la solución ($\mu\text{g/l}$ o mg/l), b = concentración media del blanco ($\mu\text{g/l}$ o mg/l), V = volumen final de la muestra (ml), m = peso de la muestra (g) o volumen para la sangre (ml).

4.5. Control de calidad

Durante todo el estudio se llevó a cabo un estricto programa de control de calidad analítica. En cada lote de 10 muestras se incluía un blanco y una muestra de material de referencia certificado.

El límite de detección en la digestión ácida se calculó como tres veces la desviación standard de los blancos (Tabla 8). Los límites de cuantificación, expresados como la concentración de cada analito en el tejido (peso fresco) se calcularon teniendo en cuenta el peso de la muestra y la disolución empleada.

Tabla 8. Límites de detección ($\mu\text{g/l}$) y resultados del análisis del material certificado de referencia (Pig Kidney CRM 186) expresados en mg/kg .

| Elemento | Límite de detección | CRM (Pig Kidney CRM 186) * | |
|----------|---------------------|---|---|
| | | Niveles certificados (media \pm 95%IC) | Niveles analizados (media \pm 95%IC) |
| As | 17 | 0.063 \pm 0.009 | < ld |
| Cd | 1.4 | 2.71 \pm 0.15 | 2.47 \pm 0.10 |
| Co | 2.1 | --- | 0.287 \pm 0.032 |
| Cu | 5.3 | 31.9 \pm 0.4 | 29.6 \pm 0.3 |
| Fe | 4.6 | 299 \pm 10 | 284 \pm 10 |
| Hg | 9.1 | 1.97 \pm 0.04 | 1.76 \pm 0.05 |
| Mn | 1.4 | 8.5 \pm 0.3 | 7.94 \pm 0.29 |
| Mo | 3.1 | --- | 3.54 \pm 0.10 |
| Pb | 1.78 | 0.306 \pm 0.011 | 0.329 \pm 0.053 |
| Se | 16 | 10.3 \pm 0.5 | 11.0 \pm 0.5 |
| Zn | 1.8 | 128 \pm 3 | 124 \pm 3 |

* entre paréntesis valores indicativos; ld: límite de detección

Los estudios de recuperación analítica se llevaron a cabo empleando un material de referencia certificado (Pig Kidney CRM 186, BCR Reference Materials). Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 8 y, en general, se observa que para el Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, Se y Zn los valores determinados en este estudio son muy próximos a los valores certificados, lo que demuestra la exactitud del método y asegura que no se producen ni pérdidas ni contaminación de las muestras durante todo el proceso. En el caso del Mo y Co, al no tener información sobre los niveles presentes en el CRM, la recuperación analítica se realizó mediante el empleo de muestras añadidas de forma que se consiguiesen valores de absorbancia entre 2-10 veces por encima de los niveles de concentración esperados en los tejidos; en todos los casos los valores de recuperación se situaron entre el 91 y 97%.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa SPSS para Windows (v.12.1). Para comprobar si los datos seguían una distribución normal se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Al no presentar una distribución normal, los datos se transformaron logarítmicamente antes de su análisis.

Las posibles diferencias entre la acumulación de cobre en los distintos Ayuntamientos de la Comarca del Deza se analizó mediante un Análisis de varianza de una Vía; la influencia de la densidad de porcino sobre la acumulación de cobre se evaluó mediante un análisis de regresión. La influencia de diversos factores de variación (edad, sexo, raza y época del año de sacrificio) sobre la acumulación de cobre a nivel orgánico se realizó mediante un Análisis de Varianza, usando el Modelo Lineal General. Las correlaciones entre los niveles de metales en las distintas muestras biológicas, así como los distintos metales entre si dentro de un mismo órgano, se realizaron empleando el coeficiente de correlación de Spearman (R_s) (Willians, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1.

NIVELES DE COBRE EN GANADO VACUNO PROCEDENTE DE LA COMARCA DEL DEZA. DESCRIPCIÓN GENERAL

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en el análisis por Espectrofotometría de Absorción Atómica de las muestras de hígado, riñón y sangre en la totalidad de las muestras recogidas.

Los objetivos que se plantean en este capítulo son:

1. Realizar un análisis estadístico descriptivo de las variables analizadas.
2. Comparar los niveles de cobre encontrados en ganado vacuno en este estudio con otros estudios recientes en Galicia (López Alonso, 1999) así como en otros países.

En la Tabla 1 se presentan los resultados de los niveles cobre obtenidos en terneros en la Comarca del Deza en nuestro estudio. En el hígado encontramos una concentración aritmética media de 74.5 mg/kg peso fresco. Estos niveles son claramente superiores a los de las restantes muestras analizadas, lo que indica la gran capacidad de los rumiantes para almacenar cobre en esta víscera y que los hace susceptibles de sufrir procesos crónicos de intoxicación por cobre. Al estudiar la distribución de la población (Figura 1) observamos que no sigue un patrón normal (Z de Kolmogorov-Smirnov = 2.265, $p=0.000$), presentando un sesgo a la derecha como evidencian las colas de elevadas concentraciones de cobre (valor máximo: 299 mg/kg), y un valor de mediana (63.7mg/kg) y media geométrica (60.3 mg/kg) claramente por debajo del valor de la media aritmética.

En el riñón el nivel medio de cobre en la población estudiada se sitúa en 4.25 mg/kg peso fresco, mostrando ésta una distribución normal (Z de Kolmogorov-Smirnov = 1.139, $p=0.149$). A pesar de que se aprecia un ligero sesgo hacia la derecha (Figura

2), tanto el valor de la mediana como el de la media geométrica se aproximan al de la media aritmética.

En la sangre encontramos un nivel medio de cobre de 0.835 mg/l. La distribución observada se ajusta a un patrón de normalidad (Z de Kolmogorov-Smirnov = 1.124, $p=0.160$), aunque a diferencia de los parámetros anteriores los niveles de cobre en sangre muestran un sesgo hacia la izquierda (Figura 3), con colas de animales con niveles de cobre en sangre bajos.

A la hora de hacer una valoración del estatus de cobre en una población hay que tener en cuenta que no existe un claro consenso acerca de cuáles son los niveles asociados con deficiencia o toxicidad en animales, especialmente en rumiantes. Esto es debido a que el estatus de cobre en rumiantes depende en gran medida de complejas interacciones nutricionales con otros elementos como zinc, molibdeno, azufre y hierro (Smith y White, 1997; Underwood y Suttle, 2002) como se tratará con más detalle el capítulo cuatro.

De acuerdo con Puls (1994) concentraciones de cobre en hígado por debajo de 10 y 5 mg/kg peso fresco son indicativas de estados marginales y deficientes en cobre respectivamente. Sin embargo, Radostits et al. (2002) y Underwood y Suttle (2002) clasifican al ganado vacuno como deficiente en cobre sólo cuando los niveles de dicho metal en hígado se sitúan por debajo de 1.5 mg/kg peso fresco y los niveles en sangre se sitúan de forma permanente por debajo de 0.5 mg/l. En nuestro estudio únicamente 4 terneros (0.75 % de la población) mostraron una concentración de cobre en hígado por debajo de 5 mg/kg y ningún animal mostró niveles inferiores a 1.5 mg/kg. En cuanto a los niveles de cobre en sangre, 16 terneros (3%) presentaban concentraciones por debajo de 0.5 mg/l, aunque únicamente dos de estos animales presentaban niveles de cobre en hígado por debajo de 10 mg/kg. Estos resultados indican que la deficiencia de cobre no es un problema en ganado vacuno en la zona estudiada.

Al igual que en el caso de la deficiencia, establecer cuáles son los límites superiores de normalidad en cuanto al estatus de cobre en ganado vacuno tampoco es tarea fácil. En general, se emplea como indicativo de acumulación de cobre en hígado una concentración superior a 100 mg/kg peso fresco (Puls, 1994). En nuestro estudio un 25% de los animales presentan niveles de cobre en hígado por encima de dicho nivel, lo que indica una acumulación crónica por cobre. En cuanto a los niveles de cobre en riñón debemos señalar que en ningún caso se superó el límite de normalidad

establecido en 10 mg/kg (Puls, 1994), lo que indica que los animales que presentan niveles de cobre en hígado elevados se encuentran en la fase “silente” de acumulación crónica por cobre en la que no se produce ninguna modificación en el metabolismo de este mineral a nivel periférico.

Los niveles de cobre encontrados en la Comarca del Deza son muy similares a los descritos por López Alonso (1999) en un estudio llevado a cabo en toda Galicia, donde se vio que los terneros procedentes del Deza presentan unas concentraciones medias de cobre en hígado (72.4 mg/kg peso fresco) un 45% superiores a las descritas para el conjunto de Galicia (49.9 mg/kg peso fresco). Estos niveles también son claramente superiores a los descritos en otros estudios llevados a cabo en zonas limítrofes; así, Miranda (1999) describe unos niveles medios de cobre en hígado en terneros procedentes de Asturias de 34.3 mg/kg peso fresco y López Alonso (2004a) en la provincia de León de 40.2 mg/kg en ganado vacuno adulto.

En la Tabla 3 se muestran los niveles de cobre en hígado y riñón descritos en otros estudios donde se valora el estatus de cobre en ganado vacuno a una escala regional. Los resultados aparecen expresados como media aritmética, aun sabiendo que no es la medida descriptiva más adecuada en este tipo de poblaciones (Vos et al., 1987, Langlands et al., 1987), debido a que es el descriptor estadístico empleado en la totalidad de los estudios consultados.

En general, las concentraciones de cobre en hígado en terneros de la Comarca del Deza en este estudio son superiores a las descritas en la totalidad de los estudios consultados. Estos valores son claramente superiores a los descritos en la mayoría de las regiones agrícolas, y comparables a los que presenta el ganado vacuno que pasta cerca de minas de cobre (Falandysz, 1993). Al comparar los valores encontrados en riñón, observamos que las concentraciones medias de este elemento varían dentro de un estrecho margen, desde un valor mínimo descrito en Burundi de 3.4 mg/kg (Benemariya et al., 1993) hasta un máximo de 5.6 mg/kg en Polonia (Falandysz, 1993), estando los niveles en nuestro estudio en consonancia con los descritos en el resto de los países. Estos resultados son totalmente esperables si se tiene en cuenta que en rumiantes el cobre se acumula a nivel hepático y no es hasta que se satura esta capacidad de almacenamiento cuando el cobre comienza a elevarse de forma significativa en riñón. De hecho, Falandysz (1993) señala que las concentraciones de cobre se mantienen muy estables en riñón, y apenas varían entre zonas industriales y agrícolas.

Tabla 1. Niveles de cobre en hígado, riñón y sangre en ganado vacuno procedente de la Comarca del Deza.

| | HÍGADO | RIÑÓN | SANGRE |
|--------------------------|--------|-------|--------|
| Número de muestras | 532 | 533 | 492 |
| Media | 74,5 | 4,25 | 0,835 |
| Error típico de la media | 1,97 | 0,025 | 0,0083 |
| Media geométrica | 60,3 | 4,21 | 0,813 |
| Mediana | 63,7 | 4,23 | 0,850 |
| Rango | 296 | 7,19 | 0,987 |
| Mínimo | 3,06 | 2,83 | 0,338 |
| Máximo | 299 | 10,0 | 1,32 |
| 25 percentil | 40,2 | 3,90 | 0,700 |
| 75 percentil | 101 | 4,57 | 0,960 |
| Asimetría | 1,06 | 2,11 | -0,026 |
| Error típ. de asimetría | 0,106 | 0,106 | 0,110 |
| Curtosis | 1,57 | 17,6 | -0,310 |
| Error típ. de curtosis | 0,211 | 0,211 | 0,220 |

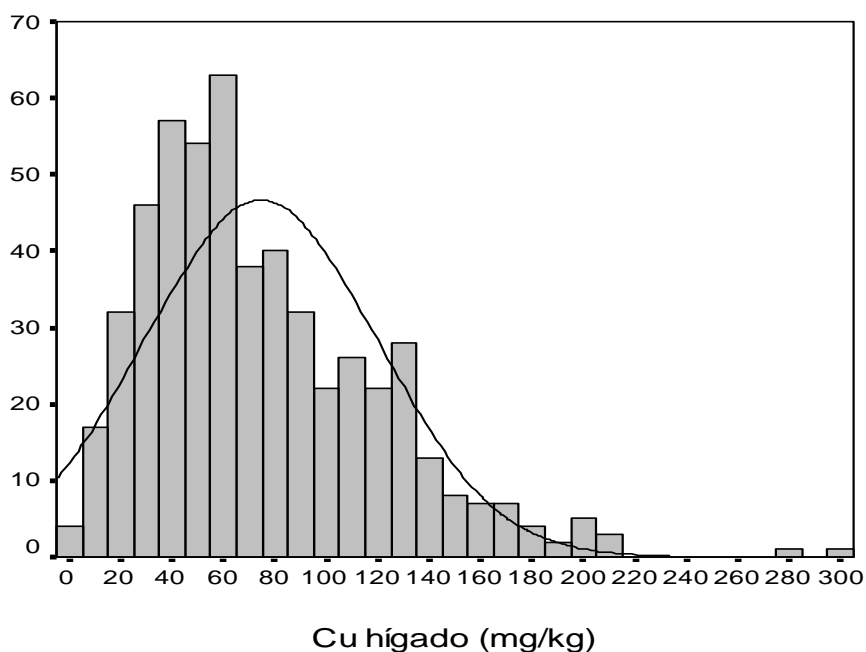


Figura 1. Distribución de los niveles de cobre en hígado en la población estudiada

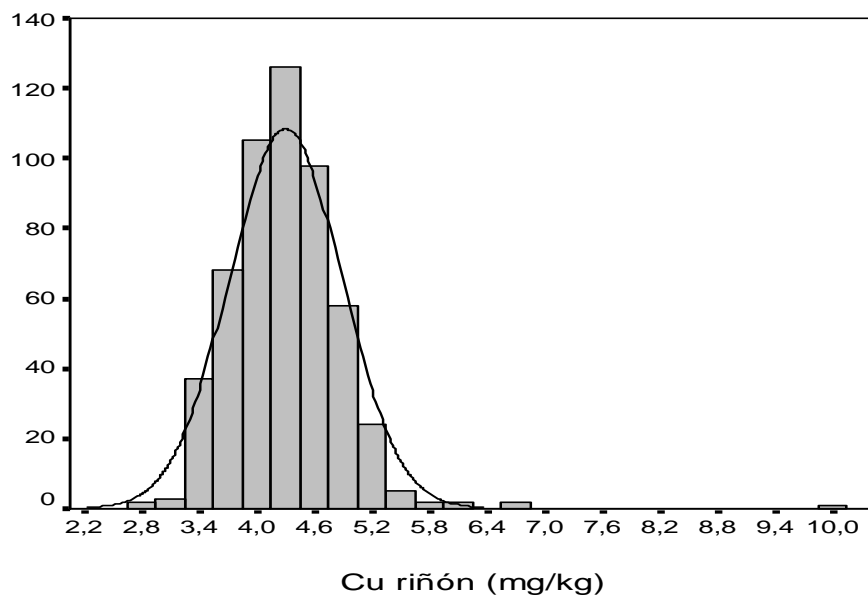


Figura 2. Distribución de los niveles de cobre en riñón en la población estudiada

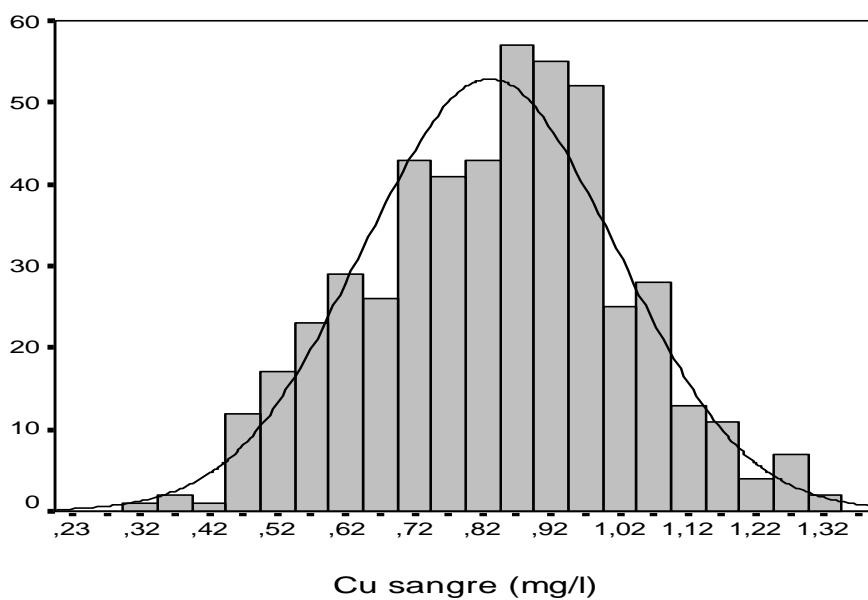


Figura 3. Distribución de los niveles de cobre en sangre en la población estudiada

Tabla 3. Niveles de cobre en productos de ganado vacuno (mg/kg peso fresco) en estudios realizados en otros países

| País | Referencia | | Hígado | n | Riñón | n |
|--------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| Australia | Kramer et al. (1983) | media±DE rango mediana | 33.8±25.2 1.4-134.5 | 180 (0) | 4.9±1.5 <1.0-14.0 | 178 (1) |
| Australia | Langlands et al. (1987) | media±DE rango mediana | 23.5±23.5 17.7 | 1101 | 4.36±4.40 3.90 | 1226 |
| Canadá | Salisbury et al. (1991) | media±DE rango mediana | 56.80±44.60 0.60-315.0 | 2138 (0) | 5.00±2.23 1.00-52.70 | 2138 (0) |
| Holanda | Ellen et al. (1989) | media±DE rango mediana | | | 3.7 2.1-6.2 3.6 | 70 |
| USA | Coleman et al. (1992) | media±DE rango mediana | 46.1±30.8 1.3-193 | 289 (0) | 4.65±2.70 1.4-49.0 | 288 (0) |
| Suecia | Jorhem et al. (1989) | media±DE rango mediana | 39±27 8.8-87.0 41 | 7 | 3.7±0.59 2.8-4.2 4 | 6 |
| Polonia | Falandysz (1993) | media±DE rango mediana | 29 1.0-190.0 | 147 | 5.6 1.6-23.0 | 147 |
| República Eslovaca | Kottferová y Koréne (1995) | media±DE rango mediana | 28.497±22.9 | 6 | 4.180±0.42 | 6 |
| Burundi | Benemariya et al. (1993) | media±DE rango mediana | 30.3±19.1 4.9-65.4 | 11 | 3.4±0.6 2.5-4.2 | 11 |

n: número de muestras (< del límite de detección)

DISTRIBUCIÓN ORGÁNICA DE LOS NIVELES DE COBRE EN LOS TEJIDOS ESTUDIADOS

En la Figura 4 aparecen representados los niveles medios de cobre en hígado, riñón (mg/kg peso fresco) y sangre (mg/l) en el conjunto de los animales de este estudio.

Como hemos comentado, el hígado es el principal reservorio de cobre a nivel orgánico, especialmente en rumiantes, mientras que en el resto de los tejidos analizados los niveles de cobre son bajos. En los rumiantes, a diferencia de otras especies, el metabolismo del cobre no presenta un buen mecanismo homeostático que permita incrementar de forma importante la excreción biliar cuando se ingiere cobre por encima de las necesidades fisiológicas, lo que hace que se almacene en el hígado en concentraciones muy elevadas, llegando incluso a alcanzar valores superiores a 600 e incluso 1200 mg/kg (Miller et al., 1993; Underwood y Suttle, 2002). Mientras que el cobre se acumula en el hígado no se produce ninguna alteración patológica; sin embargo, cuando se supera esta capacidad de almacenamiento (en general tras periodos de exposición superiores a 6 meses) el cobre produce importantes daños oxidativos a nivel hepático, se libera a la sangre causando una crisis hemolítica y en la mayor parte de los casos la muerte del animal.

En contraste a lo que sucede en el hígado, los niveles renales de cobre en rumiantes (al igual que en otras especies animales) no se ven afectados por esta capacidad de almacenamiento. Así, incluso en fases avanzadas de acumulación crónica donde las concentraciones de cobre en hígado alcanzan valores muy elevados no ocurren diferencias significativas entre los animales experimentales y los control (Gummow, 1996). Radostits et al. (2002) señalan que sólo tras la ingestión de una sola dosis masiva de cobre se observan elevaciones de este elemento en el riñón, mientras que en estas circunstancias los niveles de cobre hepático no superan los niveles de normalidad.

A nivel sanguíneo los niveles de cobre son muy bajos en comparación con los restantes órganos estudiados. A niveles altos de exposición, la concentración de cobre en sangre se considera un buen indicador de exposición aguda puesto que refleja la cantidad de cobre ingerido (Gummow, 1996; Radostits et al., 2002). No obstante, debemos señalar que cuando los niveles de ingestión son bajos, el cobre sanguíneo no es un buen indicador de exposición reciente, puesto que si el animal presenta suficientes reservas hepáticas el metal se moviliza en forma de ceruloplasmina hacia los tejidos para satisfacer las necesidades fisiológicas. Así, únicamente cuando se

agotan las reservas de cobre en el hígado es cuando los niveles sanguíneos de cobre descienden por debajo de los valores de normalidad (Radostits et al., 2002).

Al estudiar las correlaciones entre los niveles de cobre en hígado y el resto de las muestras analizadas en nuestro estudio (Tabla 4 y Figura 5) observamos que las concentraciones de cobre están correlacionadas de forma positiva en todos los tejidos, si bien la asociación estadística entre ellos es débil ($R_s < 0.2$ en todos los casos). Resultados similares han sido descritos en ganado vacuno adulto con un estatus de cobre adecuado (Badiey y Darboui, 1999).

La asociación más importante aparece entre los niveles de cobre a nivel hepático y renal ($R_s = 0.173$, $p = 0.000$). Estos resultados indican, que si bien existe una tendencia a que al aumentar la acumulación de cobre en el hígado se produzca una elevación de los niveles renales de cobre, ésta no es muy marcada y se mantiene en todos los casos dentro de los límites fisiológicos (Figura 5).

A nivel práctico, merece especial relevancia la asociación entre los niveles de cobre a nivel hepático y sanguíneo. Esto es debido a que la sangre es una muestra fácil de obtener en el animal vivo, en comparación con el hígado, y por tanto, una fuerte asociación estadística entre ambos parámetros podría indicar que la determinación de los niveles de cobre en sangre es un buen indicador del grado de acumulación de cobre a nivel orgánico. De hecho, Gummow (1996) en un estudio experimental sobre intoxicación crónica por cobre en ganado vacuno describe como en animales alimentados experimentalmente con concentraciones elevadas de cobre ocurre un incremento significativo de los niveles sanguíneos y plasmáticos de cobre a lo largo de la fase de almacenamiento hepático, siendo éste proporcional a la cantidad de metal ingerida. Estos hallazgos llevan a afirmar que el nivel de cobre en sangre puede ser utilizado como un indicador de acumulación crónica; no obstante, estos autores señalan que la magnitud de acumulación es mucho mayor a nivel hepático, y por tanto la determinación de los niveles de cobre en hígado, es un indicador mucho más sensible de exposición crónica a altas cantidades de este elemento. En nuestro estudio hemos de señalar que, si bien existe una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles de cobre a nivel hepático y sanguíneo, ésta asociación no es fuerte y por tanto los niveles de cobre en sangre no pueden considerarse un buen predictor de la acumulación de cobre en terneros, al menos en las condiciones de este estudio.

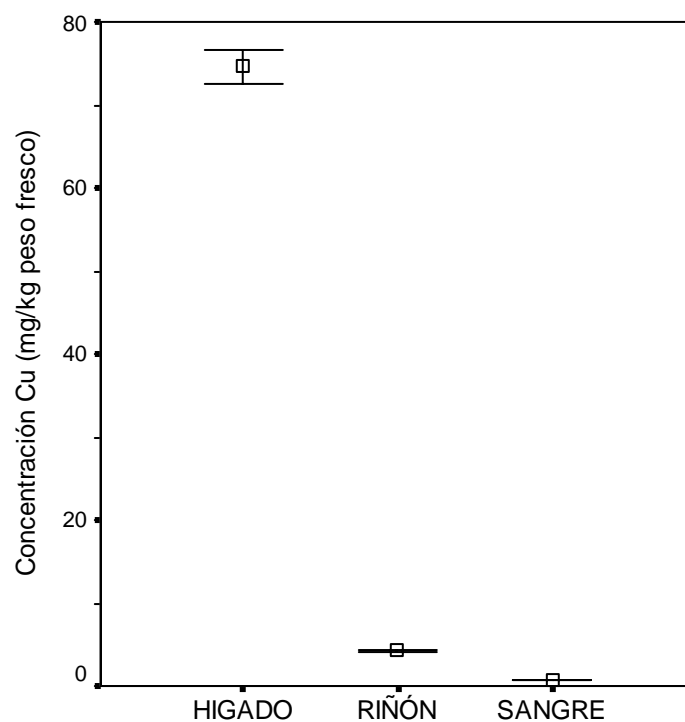


Figura 4. Distribución de los niveles de cobre en hígado, riñón y sangre en los animales de este estudio, expresados como media aritmética \pm ES

Tabla 4. Correlación entre los niveles de cobre entre los distintos tejidos analizados empleando el Coeficiente de correlación de Spearman (R_s)

| | R_s | P | N |
|---------------|-------|-------|-----|
| hígado-riñón | 0.173 | 0.000 | 532 |
| hígado-sangre | 0.130 | 0.004 | 491 |
| riñón-sangre | 0.147 | 0.001 | 492 |

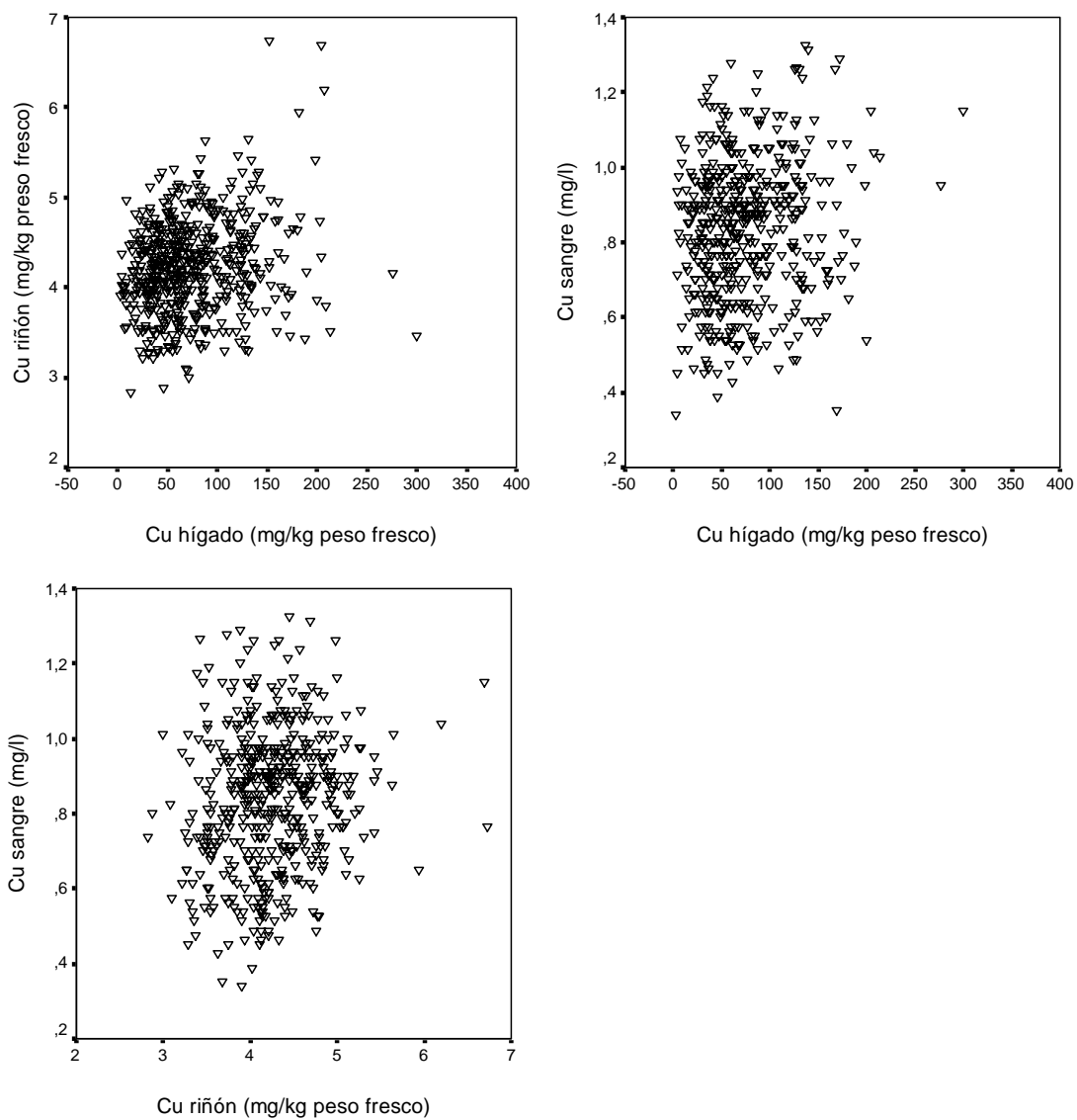


Figura 5. Gráficos de dispersión mostrando la relación entre los niveles de cobre en las distintas muestras analizadas.

CAPÍTULO 2.

ACUMULACIÓN DE COBRE EN TERNEROS EN LOS DISTINTOS AYUNTAMIENTOS DE LA COMARCA DEL DEZA

Como hemos indicado, los niveles de cobre en terneros en la Comarca del Deza son superiores a los descritos en el resto de Galicia, así como en estudios en terneros procedentes de regiones agrarias en otros países. En un estudio previo hemos constatado que existe una asociación estadística entre los niveles de acumulación de cobre y la densidad de porcino en intensivo a nivel de toda la región (López Alonso et al., 2000b).

No obstante, hemos de señalar que dentro de los Ayuntamientos que componen la Comarca del Deza existen importantes diferencias en cuanto a tipo de explotaciones de ganado y densidad de porcino, tanto de cerdas reproductoras como de cerdos en crecimiento-cebo (para más información ver Tabla 3 de Material y Métodos) que pueden tener una influencia significativa en la acumulación de cobre en terneros.

El objetivo general que nos planteamos en este capítulo es estudiar en detalle la variabilidad en la acumulación de cobre en terneros en los distintos ayuntamientos de la Comarca del Deza. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Evaluar la acumulación de cobre en terneros teniendo en cuenta la procedencia (Ayuntamiento) dentro de la Comarca del Deza.
2. Estudiar la influencia de la densidad de ganado porcino en intensivo en la acumulación de cobre.

NIVELES DE COBRE EN TERNEROS EN LOS DISTINTOS AYUNTAMIENTOS DE LA COMARCA DEL DEZA

En la Tabla 1 se presentan los niveles de cobre en hígado, riñón (mg/kg peso fresco) y sangre (mg/l) en terneros de la Comarca del Deza muestreados en este estudio en función de la procedencia de los mismos.

A nivel hepático existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles medios de cobre en terneros procedentes de los distintos ayuntamientos de la Comarca del Deza ($F_{5, 531} = 4.423$, $p=0.001$). Las mayores concentraciones de cobre en hígado fueron encontradas en los terneros procedentes de los ayuntamientos de Dozón, Lalín y Silleda (Post hoc análisis), que mostraron todos ellos niveles muy similares por encima de 80 mg/kg peso fresco, una concentración de cobre muy alta similar a la encontrada en zonas industriales (Falandysz, 1993). En los restantes ayuntamientos los niveles de cobre fueron entre un 22 y 38% inferiores, y fluctuaron entre valores de 58.9 ± 6.65 mg/kg y 66.6 ± 4.67 mg/kg para Rodeiro y Vila de Cruces respectivamente.

Los resultados de este estudio son similares a los encontrados por López Alonso (1999) en una muestra reducida de animales procedentes de esta Comarca, quien también observó que los mayores niveles de acumulación de cobre en hígado se presentaban en los ayuntamiento de Silleda y Dozón, donde la densidad de porcino en intensivo es muy alta (ver Tabla 3 en Material y Métodos) y en Lalín, un ayuntamiento con una densidad de porcino media. Este mismo patrón de comportamiento, en cuanto a los niveles de residuo en hígado en relación con la densidad de porcino, fue observado en la mayoría de los ayuntamientos de Galicia.

A nivel renal los niveles medios de cobre son muy similares en todos los ayuntamientos y no existen diferencias significativas entre ellos ($F_{5, 532} = 1.605$, $p=0.157$). Los niveles medios fluctúan entre 4.13 ± 0.050 y 4.35 ± 0.092 mg/kg peso fresco en Vila de Cruces y Agolada respectivamente. Estos resultados son esperables si tenemos en cuenta que, como ya hemos comentado, los niveles de cobre a nivel renal apenas muestran variabilidad durante la fase de acumulación de cobre a nivel hepático, permaneciendo relativamente constantes a pesar de la diferencia de exposición a cobre de los animales.

Tabla 1. Niveles de cobre en hígado, riñón (mg/kg peso fresco) y sangre (mg/l) en los distintos Ayuntamientos de la Comarca del Deza.

| | | HÍGADO | RIÑÓN | SANGRE |
|----------------|------------------|-----------|------------|-------------|
| AGOLADA | N | 78 | 78 | 70 |
| | Media±ES | 60.2±3.56 | 4.35±0.092 | 0.802±0.020 |
| | Media geométrica | 52.7 | 4.29 | 0.784 |
| | Rango | 8.15-208 | 2.87-10.0 | 0.425-1.14 |
| DOZÓN | N | 59 | 59 | 56 |
| | Media±ES | 81.8±5.83 | 4.31±0.083 | 0.823±0.026 |
| | Media geométrica | 68.4 | 4.27 | 0.797 |
| | Rango | 4.34-207 | 3.29-6.73 | 0.350-1.32 |
| LALÍN | N | 219 | 219 | 199 |
| | Media±ES | 81.5±3.27 | 4.25±0.035 | 0.841±0.012 |
| | Media geométrica | 65.1 | 4.22 | 0.823 |
| | Rango | 3.98-277 | 3.00-5.94 | 0.463-1.31 |
| RODEIRO | N | 28 | 28 | 26 |
| | Media±ES | 58.9±6.65 | 4.13±0.107 | 0.887±0.403 |
| | Media geométrica | 50.6 | 4.09 | 0.861 |
| | Rango | 20.4-146 | 3.08-5.00 | 0.450-1.16 |
| SILLEDA | N | 55 | 55 | 53 |
| | Media±ES | 80.2±6.53 | 4.26±0.074 | 0.909±0.030 |
| | Media geométrica | 62.2 | 4.23 | 0.879 |
| | Rango | 3.06-204 | 3.22-6.69 | 0.338-1.29 |
| VILA DE CRUCES | N | 94 | 94 | 88 |
| | Media±ES | 66.6±4.67 | 4.13±0.050 | 0.796±0.203 |
| | Media geométrica | 53.6 | 4.01 | 0.773 |
| | Rango | 3.59-299 | 2.83-5.42 | 0.388-1.26 |

A nivel sanguíneo, si bien los niveles de cobre son muy bajos, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre terneros procedentes de los distintos ayuntamientos del Deza ($F_{5, 491} = 3.473$, $p=0.004$). Estas diferencias reflejan un distinto nivel de exposición reciente a cobre en los animales estudiados en los distintos ayuntamientos. Al igual que sucede en el hígado, las mayores concentraciones medias de cobre se corresponden con los terneros procedentes de ayuntamientos con densidades de porcino elevadas como Silleda (0.909 ± 0.298 mg/l) y son más bajas en aquellos donde la densidad de porcino es baja como Vila de Cruces (0.796 ± 0.020 mg/l).

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA DENSIDAD DE PORCINO EN INTENSIVO EN LA COMARCA DEL DEZA SOBRE LOS NIVELES DE COBRE EN TERNEROS

Con el objetivo de determinar la posible asociación entre las explotaciones de ganado porcino en intensivo y los altos niveles de acumulación de cobre observados en la Comarca del Deza, se ha estudiado la influencia de la densidad de porcino y el número de explotaciones sobre los niveles de cobre en ganado vacuno procedentes de esta zona.

La información referente a la densidad de porcino (cerdas reproductoras y cerdos de crecimiento-cebo) en cada ayuntamiento se obtuvo del Anuario de Estadística Agraria correspondiente al año 2000 de la Xunta de Galicia (ver Tabla 3 en Material y Métodos). De forma general, debemos señalar que nos encontramos con una densidad muy alta de cerdos de crecimiento-cebo (la más elevada dentro de Galicia) en Dozón y Silleda, una densidad media en Lalín, Rodeiro y Agolada y finalmente una densidad baja de porcino en Vila de Cruces. En cuanto a la densidad de cerdas reproductoras, ésta es únicamente elevada en Silleda, mientras que en el resto de ayuntamientos, si bien existen explotaciones, son poco numerosas. Para estudiar la variabilidad de la actividad de porcino dentro de cada ayuntamiento se consideró además el número de explotaciones industriales de porcino dentro de cada parroquia.

Para determinar si la variabilidad en los niveles de cobre en terneros en la Comarca del Deza está significativamente asociada con la densidad de porcino se realizaron modelos de regresión (SPSS para Windows, versión 12.1) considerando como variable dependiente los niveles de cobre en hígado, riñón (mg/kg peso fresco) y sangre (mg/l) y como variables independientes el número de cerdas reproductoras, el número de

cerdos de crecimiento-cebo y el número de explotaciones industriales de porcino por parroquia.

Como era esperable, solamente encontramos una asociación estadística entre la densidad de porcino y los niveles de cobre en hígado, puesto que es el único tejido donde se acumula este elemento de forma apreciable. Como ya hemos indicado, en el riñón los niveles de cobre se mantienen prácticamente constantes independientemente del grado de exposición a cobre. En sangre, a pesar de que existen diferencias estadísticamente significativas dentro de la zona estudiada los niveles de cobre son muy bajos y reflejan únicamente una exposición reciente, lo que hace que la variabilidad sea mucho menor y no alcance una significación estadística dentro del modelo matemático.

Tabla 2. Modelo de regresión para la influencia de la densidad de porcino en intensivo sobre los niveles de cobre en hígado en terneros procedentes de la Comarca del Deza.

Análisis de regresión

| Predictor | Coficiente | Error típ. | T | P |
|----------------------------|------------|------------|--------|------|
| Constante | 53.0 | 4,363 | 12,143 | ,000 |
| Nº cerdos crecimiento | ,649 | ,329 | 1,975 | ,049 |
| Nº cerdas reproductoras | ,025 | ,028 | ,901 | ,368 |
| Nº explotaciones/parroquia | 1,136 | ,184 | 6,163 | ,000 |

R = 0.276 R2 = 7.6% R2 correg = 7.1%

Análisis de varianza

| Fuente | gl | Suma de cuadrados | Media cuadrática | F | P |
|-----------|-----|-------------------|------------------|--------|-------|
| Regresión | 3 | 80767,101 | 26922,367 | 13,742 | 0.000 |
| Residual | 499 | 977588,215 | 1959,095 | | |
| Total | 502 | 1058355,31 | | | |

Ecuación de Regresión

Cu hígado = 53.0 + 0.649 x Nº cerdos crecimiento + 0.025 x Nº cerdas reproductoras + 1.14 x Nº explotaciones por parroquia

Los resultados del modelo de regresión para los niveles de cobre en hígado aparecen reflejados en la Tabla 2. La densidad de cerdos de crecimiento-cebo presente en cada ayuntamiento de la Comarca del Deza explica en parte la variabilidad observada en la acumulación de cobre en terneros, si bien la densidad de cerdas reproductoras no ejerce una influencia significativa en el análisis. En cuanto a la variabilidad observada en los niveles de cobre en terneros dentro de cada ayuntamiento, el número de explotaciones industriales de porcino por parroquia aparece como un factor altamente significativo en el análisis.

Similares resultados, en cuanto a la variabilidad de acumulación de cobre en terneros dependiendo de la densidad de porcino en intensivo, han sido descritos en un trabajo previo llevado a cabo en toda Galicia a escala de ayuntamiento (López Alonso, 1999). En ese estudio se ha constatado que la densidad de cerdos en crecimiento-cebo, al igual que el contenido de cobre en los suelos explican en gran medida la variabilidad de los niveles de cobre encontrada en terneros en Galicia y ponen de manifiesto la importancia del uso de los purines de cerdo procedentes de explotaciones de crecimiento-cebo como abono en pastos destinados al ganado vacuno.

En el presente estudio encontramos además que la variabilidad en la acumulación de cobre en hígado en terneros de la Comarca del Deza puede ser explicada en gran medida a una escala espacial menor, considerando el número de explotaciones intensivas de porcino dentro de cada parroquia. Estos resultados indican posiblemente que el purín se utiliza más como fertilizante en las zonas donde se produce, y por tanto la probabilidad de que los terneros consuman pastos contaminados en los que se ha utilizado purín de cerdo como fertilizante es mayor en las parroquias donde la actividad de porcino en intensivo es más importante.

El hecho de que únicamente la influencia del porcino de crecimiento-cebo sea significativa en el análisis en este estudio, al igual que en el trabajo previo llevado a cabo en toda Galicia (López Alonso et al., 2000b), puede explicarse teniendo en cuenta que la densidad de cerdas reproductoras es mucho menor en la zona estudiada (1-2 órdenes de magnitud) y por tanto producen unas cantidades de residuos muy inferiores a las de los cerdos en crecimiento-cebo. No obstante, hemos de considerar además que la cantidad de cobre que se añade a las dietas de porcino en intensivo cambia a lo largo del ciclo productivo. Los niveles máximos permitidos de cobre son mucho más elevados (175 mg/kg) en las primeras etapas de crecimiento (desde el destete hasta las 17 semanas de vida) y menores (35 mg/kg) para cerdos de

cebo y cerdas reproductoras (Directiva 70/524 CEE), sin embargo, hemos de señalar que de forma práctica se utilizan niveles de 90 mg/kg o más durante todo el ciclo productivo en cerdos de crecimiento-cebo (Poulsen, 1998).

CAPÍTULO 3.

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES DE VARIACIÓN (SEXO, EDAD, RAZA Y ÉPOCA DE SACRIFICIO) SOBRE LA ACUMULACIÓN DE COBRE EN TERNEROS DE LA COMARCA DEL DEZA

En el capítulo 2 hemos descrito importantes variaciones en los niveles orgánicos de cobre en los terneros estudiados procedentes de la Comarca del Deza.

A la hora de tratar de explicar estas variaciones, al igual que sucede con otros metales, tanto tóxicos como esenciales, hay que tener en cuenta que es difícil poder establecer una relación directa entre los niveles de exposición y las concentraciones tisulares encontradas. Esto es debido a que existen numerosos factores de variación que influyen sobre la absorción y deposición de estos elementos en el organismo (Ma, 1996; Gochfeld, 1997).

En este capítulo se estudia la influencia de diversos factores de variación sobre los niveles orgánicos de cobre. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar el efecto de la raza sobre el metabolismo y acumulación de cobre a nivel orgánico.
2. Valorar si en el ganado vacuno de este estudio el sexo de los animales ejerce una influencia significativa sobre la acumulación de cobre.
3. Estudiar el efecto de la edad sobre la acumulación de cobre a nivel orgánico, con especial relevancia a nivel hepático.
4. Valorar la posible influencia de la época del año en la que son sacrificados los animales sobre los niveles orgánicos de cobre.

Para evaluar la influencia de estos factores de variación sobre los niveles de cobre en la población objeto de estudio se ha llevado a cabo un análisis estadístico multifactorial usando un Modelo General Lineal donde se han introducido como variables:

- (1) Raza: En la Comarca del Deza, al igual que en toda Galicia, la mayoría de os terneros sacrificados pertenecen a la raza Rubia Gallega, Frisona, así como los cruces industriales de ambas razas. Otras razas, como la Pardo Alpina o la Charolesa no han sido incluidas en este estudio debido al escaso número de muestras recogidas (< 1%).
- (2) Sexo: machos o hembras.
- (3) Edad: La población de estudio está comprendida dentro de un rango de 4 a 11 meses de vida, si bien, debido a que las muestras se recogieron en el momento de sacrificio ordinario de los animales, la mayor parte de los mismos (87%) tenían una edad comprendida entre los 6 y 10 meses de edad.
- (4) Estación: se consideró el momento de sacrificio de los terneros, clasificándolos como muestreo de invierno (sacrificio en diciembre de 2000) y muestreo de verano (julio de 2001).

En las Tablas 1, 2 y 3 se presenta un resumen descriptivo de los niveles de cobre orgánico en función de cada una de las variables de estudio. Los resúmenes de los modelos estadísticos para cada uno de estos factores de variación, así como para las posibles interferencias entre ellos aparecen reflejados en las Tablas 4, 5 y 6.

INFLUENCIA DE LA RAZA SOBRE LA ACUMULACIÓN ORGÁNICA DE COBRE

En la Tabla 1 se presentan las concentraciones de cobre en hígado, riñón (mg/kg peso fresco) y sangre (mg/l) en terneros de raza Rubia Gallega, Frisona y cruce industrial de ambas razas, considerando asimismo el sexo de los animales.

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto que existen diferencias en la acumulación de cobre en las distintas razas de terneros procedentes de la Comarca

del Deza (Tablas 4-6). Las diferencias observadas son estadísticamente significativas en hígado ($F_{2, 438} = 4.798$, $p=0.009$) y sangre ($F_{2, 401} = 4.621$, $p=0.010$), mientras que en riñón los niveles de cobre son similares en todos los grupos.

A nivel hepático, los terneros de raza Frisona (92.7 ± 3.92 mg/kg) presentan unos niveles de cobre casi un 50% superiores a la raza Rubia Gallega (62.3 ± 2.99 mg/kg) y un 20% a la de los cruces industriales de ambas razas (76.3 ± 2.88 mg/kg). De los animales muestreados en nuestro estudio, la raza Frisona es además la que presenta un mayor porcentaje de casos (42%) con niveles hepáticos de cobre por encima de los rangos de normalidad (>100 mg/kg peso fresco; Puls, 1994), frente al 27% en los cruces industriales y al 13% en los terneros de raza Rubia Gallega.

A nivel sanguíneo, los niveles de cobre muestran el mismo patrón de distribución por razas, siendo en este caso las concentraciones sanguíneas de cobre en terneros de raza Frisona (0.906 ± 0.17 mg/l) un 18 y un 6% superiores a los de las razas Rubia Gallega (0.766 ± 0.13 mg/l) y los cruces industriales de ambas (0.853 ± 0.12 mg/l) respectivamente. A pesar de que los niveles de cobre en el torrente sanguíneo son bajos existen claras diferencias entre los grupos estudiados que se comportan como tres grupos estadísticamente diferentes entre sí.

La influencia de la raza sobre la susceptibilidad a padecer procesos de deficiencia o toxicidad de cobre ha sido ampliamente estudiada en ganado ovino (Radostits et al., 2002; Underwood y Suttle, 2002), tal y como hemos comentado anteriormente en la revisión bibliográfica, llevando a clasificar a los animales como tolerantes y resistentes y a hacer una selección racial específica para adaptarse a las necesidades de cada región geográfica en concreto, permitiendo en muchos casos disminuir la incidencia de patologías asociadas tanto a la deficiencia de cobre (como la ataxia enzoótica o los problemas reproductivos), como al exceso de acumulación hepática de cobre. Estas diferencias genéticas en el metabolismo de cobre en ganado ovino parecen estar asociadas en gran parte a diferencias en la absorción intestinal del cobre dietético (Wiener et al., 1978; Woollians et al., 1983), aunque también pueden producirse por diferencias debidas al metabolismo y distribución del cobre absorbido (Woollians et al., 1982, 1983). La existencia de determinados genes que controlan las concentraciones plasmáticas de cobre ha quedado demostrada con el éxito de la selección de líneas genéticas con niveles de cobre altos y bajos dentro incluso de una misma raza, donde la herencia genética puede explicar un 0.3% de la variación normal de este parámetro (Radostits et al., 2002).

En ganado vacuno la información de la que se dispone es escasa y se refiere a un número muy limitado de razas. Así por ejemplo, se ha indicado que ciertas razas como la Simmental y la Charolesa podrían tener mayores requerimientos de cobre que otras como la Aberdeen Angus (Radostits et al., 2000; Underwood y Suttle, 2002). A la hora de explicar las diferencias raciales en el metabolismo de cobre en ganado vacuno, y por tanto en las necesidades de cobre en dichos animales, se ha propuesto que pueden deberse, al igual que el ganado ovino, tanto a diferencias en la absorción de cobre a nivel intestinal, como en la excreción biliar del mismo. Así, en un estudio realizado por Gooneratne et al. (1994) empleando distintos tipos de dietas (con niveles altos y bajos de cobre, con o sin suplementos de molibdeno y azufre) se puso de manifiesto que la excreción biliar de cobre en la raza Simmental fue al menos dos veces la de la Aberdeen Angus para cualquier tipo de dieta, lo que hace que esta raza esté especialmente predispuesta a sufrir procesos de deficiencia de este oligoelemento. Las diferencias observadas en los depósitos corporales de cobre entre razas también podrían estar asociadas a diferencias en la cantidad de alimento ingerido (Du et al., 1996), siendo ésta muy variable atendiendo a la necesidades fisiológicas de los animales. Otras posibles explicaciones a la variación racial de los depósitos de cobre podrían situarse en las diferencias en el tamaño relativo del hígado y los estatus normales de otros oligoelementos, así por ejemplo, Littledike et al. (1995) han constatado que la raza Limousin acumula más cobre a nivel hepático tras largos periodos de suplementación, lo que podría explicarse teniendo en cuenta el tamaño pequeño del hígado así como unos mayores niveles de zinc hepático en comparación con otras razas de vacuno.

En nuestro estudio, a diferencia de los experimentos mencionados, los animales no han estado sujetos a condiciones experimentales que nos permitan evaluar si las diferencias observadas se deben a un distinto nivel de absorción intestinal o excreción biliar o a diferencias en la cantidad de exposición a cobre en la dieta. De hecho, el objetivo que nos planteamos en este estudio es únicamente conocer si existe una raza especialmente predispuesta en Galicia a acumular mayores niveles de cobre, aunque sin pretender establecer cuáles son las causas de ese mayor acúmulo.

En nuestro estudio también encontramos diferencias significativas entre razas en los niveles de cobre a nivel sanguíneo. Los niveles de cobre en sangre pueden considerarse una medida indicativa de la absorción intestinal de cobre en animales con un estatus de cobre no deficiente (Evans, 1973). En el torrente sanguíneo el cobre está representado fundamentalmente por transportadores desde el intestino hasta el

hígado (fundamentalmente la albúmina) y la ceruloplasmina, proteína encargada de distribuir el cobre procesado a nivel hepático a los tejidos. En animales donde se cubren las necesidades fisiológicas, como es el caso de los terneros de nuestro estudio, los niveles de ceruloplasmina en sangre se mantienen dentro de un rango muy estrecho (datos no mostrados) y no existen diferencias significativas entre razas ($F_{3,114}=1.018$, $p=0.389$), lo que indica posiblemente que las diferencias observadas en los niveles de cobre sanguíneo en este estudio obedecen fundamentalmente a diferencias en el cobre unido a transportadores para ser conducido al hígado, y por tanto depende directamente del nivel de metal absorbido a nivel intestinal. Estas a su vez podrían estar relacionadas con un distinto nivel de exposición a través de la dieta o a diferencias raciales en cuanto al grado de absorción intestinal.

Como se ha comentado en el apartado de material y métodos los animales de este estudio proceden de granjas tradicionales en las que la alimentación está basada predominantemente en productos de origen local en los que se han utilizado purines de cerdo como fertilizantes, aunque sin cuantificar el grado de los mismos, y no disponemos de información de nos permita señalar que el ganado frisón está más expuesto a niveles de cobre en el alimento. De hecho cuando se evalúa la interacción de la raza y la procedencia de los animales (por Ayuntamiento) donde existen diferencias tanto en la densidad de porcino en intensivo y de razas de animales (ver Tablas 2 y 3 en Material y Métodos) no existe una interferencia entre ambos parámetros ($F_{10, 510}=1.088$, $p=0.369$) que nos permita señalar que las diferencias entre razas en los distintos Ayuntamientos se deban o obedezcan a distintos patrones de exposición a cobre. Es más, tampoco encontramos diferencias raciales en los niveles séricos de zinc ($F_{3,113} = 0.070$, $p=0.994$; datos no mostrados) un oligoelemento presente en elevadas concentraciones en los purines de cerdo, que nos permita sugerir un distinto grado de exposición, estadísticamente significativo, entre las razas estudiadas. Es por tanto probable que las diferencias observadas en los niveles sanguíneos de cobre entre razas en los terneros en la Comarca del Deza en nuestro estudio se deban, al menos en parte, a diferencias en el grado de absorción intestinal.

A nivel hepático las diferencias entre razas en la acumulación de cobre en los terneros de nuestro estudio son tres veces superiores a las descritas en sangre. Debido a que la concentración hepática de cobre es un indicativo de exposición a lo largo de la vida del animal (a diferencia de los niveles sanguíneos que son indicativos de exposición reciente) estos resultados podrían reflejar que las diferencias en la acumulación hepática de cobre se deben simplemente a las diferencias raciales de absorción

intestinal de cobre, aunque si bien es cierto que también podrían deberse (al menos en parte) a diferencias en la excreción biliar tal y como apunta Gooneratne et al. (1994) en sus estudios en ganado vacuno.

Estos resultados ponen de manifiesto que son necesarios nuevos estudios metabólicos en ganado vacuno en condiciones experimentales que nos permitan establecer si las diferencias observadas entre el nivel de acumulación hepática de cobre en las distintas razas obedece a diferencias metabólicas (a nivel de la absorción intestinal, acumulación hepática o excreción biliar) o se debe a diferencias de grado de ingestión de alimento. Los resultados de estos estudios podrían tener una gran importancia de cara a la selección de animales más resistentes a procesos tanto de deficiencia como de intoxicación por cobre, tal y como se ha hecho en ganado ovino, en zonas donde existe un problema de deficiencia de cobre o por el contrario una exposición alta al mismo, como la Comarca del Deza en Galicia. Conocer las necesidades de cobre en las distintas razas permitiría además adaptar las necesidades de este oligoelemento en las dietas y minimizar los riesgos de intoxicación crónica por cobre en ganado vacuno suplementado de forma rutinaria con niveles relativamente altos de cobre (Livesey, 2002).

INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE LA ACUMULACIÓN ORGÁNICA DE COBRE

En la Tabla 1 se presentan las concentraciones de cobre en hígado, riñón (mg/kg peso fresco) y sangre (mg/l) en machos y hembras, tanto en las distintas razas estudiadas como en el conjunto de los animales.

Los resultados del Modelo General Lineal empleado (Tablas 4-6) indican que existen diferencias ligadas al sexo en la acumulación hepática de cobre en los terneros en nuestro estudio ($F_{1, 438} = 5.082$, $p=0.025$), mostrando los machos unos niveles de cobre superiores (14%) a los de las hembras (machos: 77.6 ± 2.45 , hembras: 68.0 ± 3.22 mg/kg peso fresco). En riñón, aunque sin alcanzar una significación estadística las hembras (4.44 ± 0.050 mg/kg) tienden a mostrar unos niveles de cobre superiores a las de los machos (4.15 ± 0.028 mg/kg) ($F_{1, 439} = 3.754$, $p=0.053$). Finalmente, a nivel sanguíneo, si bien las hembras muestran niveles de cobre superiores a los machos en todas las razas estudiadas, las diferencias no son estadísticamente significativas ($F_{1, 401} = 2.007$, $p= 0.157$)

Diversos autores han estudiado la influencia del sexo sobre los niveles orgánicos de cobre en rumiantes, aunque los resultados obtenidos no son concluyentes. En ganado vacuno adulto Kottferová y Koreneková (1997) encontraron diferencias significativas entre los niveles de cobre en hígado y riñón, siendo éstos significativamente superiores en las hembras, aunque no se encontraron diferencias en tejido muscular. De forma similar Khan et al. (1995) describen mayores niveles de cobre en hembras de ganado caprino a nivel hepático, sin encontrar diferencias a nivel renal y muscular. Por el contrario, Miranda et al. (2000) en un estudio llevado a cabo en Asturias encontró que los niveles de cobre en hígado eran superiores en los machos, mientras que en el riñón lo era en las hembras; en el músculo y la sangre las diferencias no eran estadísticamente significativas. Hyvarinen y Nygren (1993) describen niveles mayores de cobre en ciervos macho, hecho que asocian al paso de cobre en las hembras a los fetos. Finalmente, en el estudio previo llevado a cabo en Galicia observamos únicamente diferencias estadísticamente significativas entre sexos en la sangre, donde las hembras presentan niveles superiores a los machos. Estas diferencias entre estudios indican posiblemente que junto con el sexo puede haber otros factores que hacen variar los niveles de cobre, como puede ser el nivel de exposición (muy alto en nuestro estudio) o la edad de los animales (jóvenes o adultos).

Estudios llevados a cabo tanto en animales de laboratorio como en la especie humana ponen de manifiesto una influencia hormonal ligada a los niveles de estrógenos en el metabolismo de cobre (Piscator, 1979; Terrés-Martos et al., 1997). Así, está bien establecido que las hembras presentan concentraciones superiores de cobre en suero o sangre que los machos debido a una mejor eficacia en la absorción de cobre a nivel intestinal, eficacia que aumenta con la gestación, aunque también a que las hembras presentan unos niveles de ceruloplasmina (principal transportador de cobre hepático hacia los tejidos) superiores a los machos (Ruslanov et al., 1981).

Los animales de nuestro estudio son muy jóvenes, por lo que la influencia de las hormonas sexuales podría ser limitada. No obstante, cuando se analizaron los niveles de ceruloplasmina (datos no mostrados) se vió que los niveles eran significativamente superiores en las hembras que en los machos ($F_{1, 113} = 6.671$, $p=0.011$), lo que podría explicar que en las hembras, que al presentar mayores niveles de ceruloplasmina, se produjese una mayor movilización del cobre hepático hacia los tejidos, y como consecuencia unas menores reservas hepáticas, dando lugar a unos mayores niveles de cobre en los tejidos, como por ejemplo el riñón. En la sangre, si bien las hembras

tienden a tener unos niveles de cobre superiores a los machos en todas las razas estudiadas, las diferencias no son estadísticamente significativas.

INFLUENCIA DE LA EDAD SOBRE LA ACUMULACIÓN ORGÁNICA DE COBRE

En la Tabla 2 se presentan los niveles de cobre en hígado, riñón (mg/kg peso fresco) y sangre (mg/l) en función de la edad de los animales.

En el hígado, el principal reservorio de cobre a nivel orgánico e indicador de acumulación crónica, los niveles medios de cobre en los terneros de este estudio muestran una tendencia a aumentar con la edad, desde valores entorno a 60 mg/kg peso fresco en los primeros meses a niveles medios superiores a 90 mg/kg en los terneros sacrificados a los 11 meses de edad. Los niveles máximos observados en los distintos grupos también muestran esta tendencia a incrementarse con la edad desde valores de 113 mg/kg en los terneros sacrificados a los 4 meses a 299 mg/kg para el grupo de 10 meses de edad al sacrificio. No obstante, esta evolución no presenta significación estadística (Tabla 4), posiblemente debido a la influencia de otros factores como la raza en el análisis.

En el riñón, a pesar de ser un órgano donde los niveles de cobre son bajos y que no presenta gran importancia en el metabolismo de cobre en la fase de acumulación crónica, observamos diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($F_{7,439}=2.517$, $p=0.015$, Tabla 5), con una tendencia a aumentar con la edad, desde valores medios de 3.82 ± 0.13 mg/kg peso fresco en los terneros sacrificados a los 4 meses de edad a 4.38 ± 0.08 mg/kg al final del periodo productivo (grupo de 10 meses de edad).

Finalmente, no se ha observado una influencia significativa de la edad sobre los niveles de cobre en sangre en los terneros estudiados (Tabla 6), fluctuando entre valores medios comprendidos entre 0.786 ± 0.022 mg/l (grupo de 6 meses de edad) y 0.903 ± 0.028 mg/l (grupo 5 meses de edad).

El cobre es un oligoelemento esencial en el desarrollo fetal, lo que hace que la evolución del metabolismo del cobre en rumiantes deficientes de este mineral haya sido muy bien estudiada durante la preñez, tanto en la madre como en el feto. Así, se ha demostrado que ocurren cambios importantes en el metabolismo de cobre en la

hembra durante la preñez, encaminados fundamentalmente a aumentar la eficacia de absorción intestinal y disminuir la tasa de excreción biliar, con el objetivo de asegurar el aporte fetal (Gooneratne et al., 1989a). En el feto, que es extraordinariamente eficaz en captar cobre de la madre, el cobre se acumula de forma exponencial, lo que hace que el incremento diario en las reservas hepáticas así como la concentración final de cobre al nacimiento sean muy superiores a las de la madre.

Una vez después del nacimiento, los niveles de cobre en el recién nacido disminuyen, en parte debido a que el contenido en la leche es bajo (Evans, 1973) y a partir de que el animal empieza a ingerir alimento los niveles de cobre, especialmente las reservas hepáticas, van a estar condicionadas por las concentraciones de cobre en la dieta.

No obstante, se dispone de muy poca información del efecto de la edad sobre los niveles de cobre en sangre y la acumulación orgánica en terneros dentro de la orquilla de edad considerada en este estudio. Spierenburg et al. (1988) encuentran un incremento en los niveles de cobre en hígado de ganado vacuno procedente de una zona contaminada, mientras que Khan et al. (1995) no observaron diferencias significativas entre animales jóvenes y adultos en hígado, riñón y músculo en una zona poco contaminada. Como hemos indicado, los rumiantes son capaces de almacenar elevadas concentraciones de cobre a nivel hepático cuando la exposición al metal es elevada debido a que se sobrepasa la capacidad de excreción biliar, lo que explica que en estudios con animales expuestos a niveles altos de cobre, como en nuestro estudio, los niveles de cobre aumenten con la edad.

En cuanto a las variaciones de los niveles de cobre en riñón con la edad observado en los terneros de nuestro estudio, no disponemos de información que nos permita discutir el porqué se produce un aumento significativo de los mismos a lo largo de la vida del individuo. En un estudio previo llevado a cabo en Galicia (López Alonso et al., 2000a) en el que se estudiaba la influencia de la edad sobre la acumulación de diversos metales en ganado vacuno adulto encontramos que los niveles de cobre disminuían con la edad, lo que podía ser atribuido a un antagonismo con la acumulación de cadmio en dicho órgano. Está bien establecido que existen complejas interacciones entre el cadmio, cobre y zinc a nivel orgánico debido a que estos metales tienen propiedades químicas similares y compiten por los lugares de unión a las metalotioneínas, fundamentalmente en el riñón donde el cadmio se acumula de forma importante con la edad. Este efecto antagónico del cadmio sobre el cobre también ha sido descrito en otros estudios en animales expuestos a niveles altos de

cadmio, originando en ocasiones episodios de deficiencia secundaria de cobre (Koh y Judson, 1986; Spierenburg et al., 1988; Wentink et al., 1988). En el presente estudio, sin embargo, los terneros son jóvenes (< 1 año de edad) y los niveles de cobre al que están expuestos los animales son elevados, por lo que el posible efecto antagónico del cadmio sobre los niveles de cobre es poco esperable. Por el contrario, el incremento de los niveles de cobre con la edad podría deberse a una capacidad del propio metal de sintetizar metalotioneínas a nivel renal, dando lugar a un acúmulo progresivo con la edad.

INFLUENCIA DE LA EPOCA DE SACRIFICIO SOBRE LA ACUMULACIÓN ORGÁNICA DE COBRE

En la Tabla 3 se presentan las concentraciones de cobre en hígado, riñón (mg/kg peso fresco) y sangre (mg/l) en terneros de la Comarca del Deza en función de la época de sacrificio: muestreo de invierno, correspondiente a diciembre de 2000 y muestreo de verano, en julio de 2001.

En general, los terneros sacrificados en invierno muestran unos niveles medios de cobre inferiores (70.8 ± 2.63 mg/kg en hígado, 4.19 ± 0.035 mg/kg en riñón y 0.722 ± 0.010 mg/l en sangre) a los animales correspondientes al muestreo de verano (78.0 ± 2.91 mg/kg en hígado, 4.31 ± 0.036 mg/kg en riñón y 0.948 ± 0.008 mg/l en sangre), si bien estas diferencias únicamente presentan significación estadística a nivel sanguíneo ($F_{1,401}=38.452$, $p=0.000$, Tablas 4-6).

La influencia estacional sobre los niveles de cobre en rumiantes ha sido estudiada especialmente en regiones con deficiencia de cobre. Así, está bien establecido que los episodios de deficiencia primaria de cobre ocurren sobre todo en primavera y verano, coincidiendo con los niveles más bajos de cobre en los pastos (Radostits et al., 2002); en los casos de deficiencias secundarias, sin embargo, la incidencia puede ser mayor en otras épocas del año, dependiendo de la concentración de otros elementos como el molibdeno en el pasto, el cual suele alcanzar concentraciones máximas en otoño cuando la lluvia estimula un fuerte crecimiento de las leguminosas.

Cuando se evalúa la influencia estacional sobre los niveles orgánicos de cobre, como en nuestro estudio, es importante tener en cuenta la información que aporta el parámetro elegido. Así por ejemplo, mientras que los niveles de cobre en sangre o suero nos dan una información reciente de exposición a través de la dieta, las

concentraciones en hígado reflejarán los niveles de metal consumidos en los meses precedentes. El parámetro que más se ha utilizado en este sentido es el nivel de cobre en suero, donde se constata que existen importante variaciones mensuales, tanto en ganado de carne como de leche, que están correlacionadas de forma importante con la intensidad de las precipitaciones, coincidiendo los niveles más bajos en sangre con la época de lluvias más intensa (Radostits et al., 2002). De forma similar, Smart (1984) ha descrito importantes variaciones estacionales en los niveles de cobre sérico en animales en pastoreo, con concentraciones más bajas entre febrero y marzo y más altas entre agosto y septiembre. Los resultados de nuestro estudio son coincidentes con estos resultados. Los niveles en suero son significativamente más bajos en los terneros sacrificados en invierno, coincidiendo con la época de más lluvias en Galicia y la alimentación a base de heno seco.

Tabla 1. Niveles de cobre en hígado, riñón (mg/kg peso fresco) y sangre (mg/l) en ganado vacuno en función de la raza y del sexo de los animales.

| RAZA | | N | Media | MG | Rango |
|---------------|---------|-----|-------------|-------|------------|
| HIGADO | | | | | |
| R. Gallega | machos | 112 | 64.2±3.92 | 52.1 | 4.34-208 |
| | hembras | 58 | 58.8±4.44 | 47.4 | 3.59-152 |
| | total | 170 | 62.3±2.99 | 50.4 | 3.59-208 |
| Frisona | machos | 73 | 95.2±5.44 | 83.7 | 12.9-277 |
| | hembras | 20 | 83.5±9.75 | 70.0 | 13.7-161 |
| | total | 93 | 92.7±3.92 | 80.6 | 12.9-277 |
| Cruce | machos | 172 | 79.1±3.61 | 64.9 | 5.63-299 |
| | hembras | 93 | 71.2±4.77 | 55.3 | 3.06-203 |
| | total | 265 | 76.3±2.88 | 61.3 | 3.06-299 |
| Total | machos | 359 | 77.6±2.45 | 63.8 | 4.34-299 |
| | hembras | 173 | 68.0±3.22 | 53.5 | 3.06-203 |
| RIÑÓN | | | | | |
| R. Gallega | machos | 112 | 4.15±.054 | 4.11 | 2.87-6.20 |
| | hembras | 58 | 4.59±.119 | 4.53 | 3.36-10.0 |
| | total | 170 | 4.30±.056 | 4.25 | 2.87-10.0 |
| Frisona | machos | 73 | 4.02±.058 | 3.99 | 2.83-5.18 |
| | hembras | 20 | 4.35±.139 | 4.30 | 3.29-5.42 |
| | total | 93 | 4.09±.056 | 4.06 | 2.83-5.42 |
| Cruce | machos | 172 | 4.21±.038 | 4.18 | 3.00-6.69 |
| | hembras | 94 | 4.37±.046 | 4.35 | 3.275-9.4 |
| | total | 266 | 4.27±.030 | 4.24 | 3.00-6.69 |
| Total | machos | 359 | 4.15±0.028 | 4.12 | 2.83-6.69 |
| | hembras | 174 | 4.44±0.050 | 4.40 | 3.27-10.0 |
| SANGRE | | | | | |
| R. Gallega | machos | 106 | 0.757±.017 | 0.738 | 0.450-1.26 |
| | hembras | 55 | 0.785±.021 | 0.769 | 0.463-1.14 |
| | total | 161 | 0.766±.013 | 0.748 | 0.450-1.26 |
| Frisona | machos | 69 | 0.892±.020 | 0.876 | 0.488-1.29 |
| | hembras | 18 | 0.961±.029 | 0.954 | 0.788-1.21 |
| | total | 87 | 0.906±.017 | 0.891 | 0.488-1.29 |
| Cruce | machos | 156 | 0.848±.016 | 0.825 | 0.388-1.31 |
| | hembras | 85 | 0.861±.020 | 0.838 | 0.338-1.33 |
| | total | 241 | 0.853±.012 | 0.829 | 0.338-1.33 |
| Total | machos | 332 | 0.829±0.010 | 0.807 | 0.388-1.31 |
| | hembras | 160 | 0.847±0.139 | 0.827 | 0.338-1.32 |

Tabla 3. Niveles de cobre en hígado, riñón (mg/kg peso fresco) y sangre (mg/l) en ganado vacuno en función de la estación del año

| | | INVIERNO | VERANO |
|--------|-------------------|-------------|-------------|
| HIGADO | N | 261 | 271 |
| | Media±ES | 70.8±2.63 | 78.0±2.91 |
| | Media geométrica | 58.1 | 62.4 |
| | Rango | 3.06-213 | 3.59-299 |
| RIÑÓN | N | 261 | 272 |
| | Media±ES | 4.19±0.035 | 4.31±0.036 |
| | Media geométrica | 4.15 | 4.27 |
| | Rango | 2.83-6.73 | 3.22-10.0 |
| SANGRE | N | 246 | 246 |
| | Media±ES | 0.722±0.010 | 0.948±0.008 |
| | Media geométrica. | 0.703 | 0.940 |
| | Rango | 0.338-1.27 | 0.663-1.32 |

Tabla 4. Análisis de Varianza (Modelo General Lineal) de los niveles de cobre en hígado en función del sexo, edad y raza de los animales, así como de la estación del año.

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | P |
|-------------------------------|----------------------------|-----|------------------|---------|------|
| Modelo corregido | 12,543 | 79 | ,159 | 1,835 | ,000 |
| Intersección | 400,530 | 1 | 400,530 | 4627,73 | ,000 |
| SEXO | ,440 | 1 | ,440 | 5,082 | ,025 |
| EDAD | ,766 | 7 | ,109 | 1,264 | ,266 |
| RAZA | ,830 | 2 | ,415 | 4,798 | ,009 |
| ESTACIÓN | ,011 | 1 | ,011 | ,130 | ,718 |
| SEXO * EDAD | ,758 | 7 | ,108 | 1,252 | ,273 |
| SEXO * RAZA | ,052 | 2 | ,026 | ,302 | ,739 |
| EDAD * RAZA | 1,518 | 13 | ,117 | 1,349 | ,181 |
| SEXO * EDAD * RAZA | 1,515 | 11 | ,138 | 1,591 | ,098 |
| SEXO * ESTACIÓN | 9,887E-05 | 1 | 9,887E-05 | ,001 | ,973 |
| EDAD * ESTACIÓN | ,516 | 7 | ,074 | ,852 | ,545 |
| SEXO * EDAD * ESTACIÓN | 1,506 | 6 | ,251 | 2,900 | ,009 |
| RAZA * ESTACIÓN | ,146 | 2 | ,073 | ,844 | ,431 |
| SEXO * RAZA * ESTACIÓN | ,530 | 2 | ,265 | 3,060 | ,048 |
| EDAD * RAZA * ESTACIÓN | 1,070 | 12 | ,089 | 1,030 | ,419 |
| SEXO * EDAD * RAZA * ESTACIÓN | ,090 | 5 | ,018 | ,207 | ,960 |
| Error | 37,909 | 438 | ,087 | | |
| Total | 1696,848 | 518 | | | |
| Total corregida | 50,452 | 517 | | | |

* R cuadrado = .249 (R cuadrado corregida = .113)

Tabla 5. Análisis de Varianza (Modelo General Lineal) de los niveles de cobre en riñón en función del sexo, edad y raza de los animales, así como de la estación del año.

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | P |
|-------------------------------|----------------------------|-----|------------------|---------|------|
| Modelo corregido | ,420 | 79 | ,005 | 1,852 | ,000 |
| Intersección | 49,381 | 1 | 49,381 | 17208,5 | ,000 |
| SEXO | ,011 | 1 | ,011 | 3,754 | ,053 |
| EDAD | ,051 | 7 | ,007 | 2,517 | ,015 |
| RAZA | ,006 | 2 | ,003 | 1,132 | ,323 |
| ESTACIÓN | 7,472E-05 | 1 | 7,472E-05 | ,026 | ,872 |
| SEXO * EDAD | ,010 | 7 | ,001 | ,476 | ,852 |
| SEXO * RAZA | ,001 | 2 | ,001 | ,192 | ,825 |
| EDAD * RAZA | ,030 | 13 | ,002 | ,817 | ,642 |
| SEXO * EDAD * RAZA | ,037 | 11 | ,003 | 1,159 | ,314 |
| SEXO * ESTACIÓN | ,005 | 1 | ,005 | 1,786 | ,182 |
| EDAD * ESTACIÓN | ,017 | 7 | ,002 | ,843 | ,552 |
| SEXO * EDAD * ESTACIÓN | ,026 | 6 | ,004 | 1,528 | ,167 |
| RAZA * ESTACIÓN | ,009 | 2 | ,004 | 1,533 | ,217 |
| SEXO * RAZA * ESTACIÓN | ,000 | 2 | ,000 | ,062 | ,940 |
| EDAD * RAZA * ESTACIÓN | ,031 | 12 | ,003 | ,897 | ,550 |
| SEXO * EDAD * RAZA * ESTACIÓN | ,020 | 5 | ,004 | 1,377 | ,232 |
| Error | 1,260 | 439 | ,003 | | |
| Total | 204,111 | 519 | | | |
| Total corregida | 1,679 | 518 | | | |

* R cuadrado = .250 (R cuadrado corregida = .115)

Tabla 6. Análisis de Varianza (Modelo General Lineal) de los niveles de cobre en sangre en función del sexo, edad y raza de los animales, así como de la estación del año.

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | P |
|-------------------------------|----------------------------|-----|------------------|---------|------|
| Modelo corregido | 2,403 | 78 | ,031 | 4,647 | ,000 |
| Intersección | ,710 | 1 | ,710 | 107,067 | ,000 |
| SEXO | ,013 | 1 | ,013 | 2,007 | ,157 |
| EDAD | ,073 | 7 | ,010 | 1,574 | ,141 |
| RAZA | ,061 | 2 | ,031 | 4,621 | ,010 |
| ESTACIÓN | ,255 | 1 | ,255 | 38,452 | ,000 |
| SEXO * EDAD | ,034 | 7 | ,005 | ,732 | ,645 |
| SEXO * RAZA | ,006 | 2 | ,003 | ,481 | ,618 |
| EDAD * RAZA | ,073 | 13 | ,006 | ,843 | ,614 |
| SEXO * EDAD * RAZA | ,017 | 10 | ,002 | ,250 | ,991 |
| SEXO * ESTACIÓN | ,016 | 1 | ,016 | 2,426 | ,120 |
| EDAD * ESTACIÓN | ,021 | 7 | ,003 | ,462 | ,862 |
| SEXO * EDAD * ESTACIÓN | ,028 | 6 | ,005 | ,709 | ,643 |
| RAZA * ESTACIÓN | ,014 | 2 | ,007 | 1,091 | ,337 |
| SEXO * RAZA * ESTACIÓN | ,004 | 2 | ,002 | ,268 | ,765 |
| EDAD * RAZA * ESTACIÓN | ,048 | 12 | ,004 | ,601 | ,841 |
| SEXO * EDAD * RAZA * ESTACIÓN | ,018 | 5 | ,004 | ,530 | ,753 |
| Error | 2,659 | 401 | ,007 | | |
| Total | 9,072 | 480 | | | |
| Total corregida | 5,063 | 479 | | | |

* R cuadrado = .475 (R cuadrado corregida = .373)

CAPÍTULO 4.

INTERACCIÓN ENTRE LOS NIVELES DE COBRE Y OTROS METALES TÓXICOS Y ESENCIALES EN TERNEROS DE LA COMARCA DEL DEZA

Como ya se ha tratado en el capítulo anterior, existen numerosos factores de variación propios del animal, como la edad, el sexo o la raza, que condicionan de forma importante la acumulación a nivel orgánico de numerosos metales, tanto tóxicos como esenciales. Pero además, los niveles de un metal (y por tanto el riesgo a padecer procesos tanto de deficiencia como de toxicidad) pueden verse influenciados de forma significativa por la interacción con otros elementos (Goyer, 1995).

En la literatura científica existen numerosos ejemplos de interacciones del cobre con otros elementos. La primera interacción registrada relaciona al cobre y al hierro y está asociada a la síntesis de hemoglobina (Hart et al., 1928). La interacción entre el cadmio, el cobre y el zinc también ha sido ampliamente descrita en la bibliografía y se explica por la capacidad compartida de estos metales de inducir la síntesis de metalotioneínas y de fijarse a los grupos tiol de las mismas (Webb, 1979), siendo la consecuencia más importante de dicha interacción la deficiencia secundaria de cobre en animales (especialmente rumiantes) expuestos a niveles altos de cadmio (Spiereburg et al., 1988). También está perfectamente registrada la interacción triple entre cobre-molibdeno y azufre en rumiantes (Suttle, 1991; Smith y White, 1997), así, los niveles de molibdeno y azufre en la dieta determinan en gran medida los requerimientos diarios de cobre, siendo capaz de desencadenar una deficiencia secundaria de cobre en el animal cuando los niveles de molibdeno se elevan.

El objetivo que nos planteamos en este capítulo es estudiar si la acumulación de cobre en terneros por encima de los niveles de normalidad ejerce una influencia significativa sobre los niveles de otros metales tóxicos o esenciales, así como, si por el contrario, la acumulación de cobre puede verse influenciada por los niveles de otros metales tóxicos o esenciales. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar los niveles de los principales metales tóxicos (cadmio, plomo, mercurio y arsénico) y esenciales (cobalto, hierro, manganeso, molibdeno, selenio, zinc) en una muestra representativa de terneros procedentes de la Comarca del Deza.
2. Estudiar si existen interacciones significativas entre los niveles orgánicos de cobre y los restantes elementos tóxicos y esenciales que puedan condicionar la acumulación de dichos elementos en los animales.

Para ello se seleccionaron de forma aleatoria muestras de hígado y riñón, principales órganos de acumulación mineral en el organismo, de 195 terneros procedentes de toda la Comarca del Deza, correspondientes al muestreo de verano. Los niveles de metales se determinaron por ICP-AES.

NIVELES DE ELEMENTOS TÓXICOS Y ESENCIALES EN GANADO VACUNO EN ESTE ESTUDIO

En la Tabla 1 se presentan los niveles de elementos tóxicos (cadmio y plomo) y esenciales (molibdeno, hierro, selenio, zinc, manganeso y cobalto) en hígado y riñón en ganado vacuno en nuestro estudio. Los niveles de arsénico y mercurio estaban por debajo del límite de detección en todas las muestras.

De forma general, debemos señalar que los niveles de elementos tóxicos son bajos en comparación con otros estudios llevados a cabo previamente en Galicia y en zonas agrícolas (ver López Alonso et al., 2000a).

En cuanto a los elementos esenciales las mayores concentraciones se encuentran en el hígado, a excepción del hierro y del selenio donde el principal tejido de acumulación es el riñón. En general los niveles medios de todos los oligoelementos estudiados se sitúan dentro de los rangos de normalidad descritos por Puls (1994).

INTERACCIONES ENTRE COBRE Y ELEMENTOS TÓXICOS Y ESENCIALES

En la Tabla 2 se presentan las correlaciones existentes entre los niveles de cobre y metales tóxicos y esenciales en este estudio.

Al analizar las correlaciones entre el cobre y los elementos tóxicos se observó una fuerte asociación entre los niveles de cobre y plomo a nivel hepático. En cuanto a los elementos esenciales, las mayores correlaciones aparecen en el riñón, donde existe una asociación positiva y significativa del cobre con todos los elementos analizados ($p < 0.001$). En cuanto a la asociación entre distintos tejidos (hígado vs riñón), debemos señalar que existe una correlación negativa entre los niveles de cobre hepático y la mayoría de los elementos esenciales estudiados. Resultados similares han sido descritos tanto en humana (Rahil-Khazen, 2002) como en ganado vacuno (López Alonso et al., 2004a) en tejidos procedentes de individuos con niveles de oligoelementos dentro de los rangos adecuados. Si bien la significación real de estas correlaciones se desconoce, se sugiere que puedan deberse a mecanismos de regulación homeostática a nivel renal. Debido a que en nuestro estudio los niveles de cobre a nivel renal se mantienen dentro de la normalidad (los animales con niveles altos de cobre a nivel hepático están en la fase prehemolítica donde los niveles de cobre en riñón no están afectados) estas correlaciones deben ser consideradas en conjunto, dentro de los mecanismos de regulación homeostática que presenta el animal.

Tabla 2. Correlaciones entre los niveles de cobre y otros metales tóxicos y esenciales en los terneros en nuestro estudio. Los valores representan el coeficiente de correlación de Spearman y la probabilidad (entre paréntesis)

| Cu | hígado-hígado | riñón-riñón | hígado-riñón |
|----|----------------|----------------|----------------|
| Cd | -0.052 (0.474) | -0.067 (0.349) | -0.118 (0.099) |
| Pb | 0.865 (0.000) | 0.086 (0.232) | -0.105 (0.144) |
| Mo | 0.416 (0.000) | 0.638 (0.000) | -0.070 (0.328) |
| Fe | -0.032 (0.662) | 0.223 (0.002) | -0.274 (0.000) |
| Se | 0.532 (0.000) | 0.464 (0.000) | 0.186 (0.000) |
| Zn | 0.055 (0.446) | 0.483 (0.000) | -0.130 (0.070) |
| Mn | 0.263 (0.000) | 0.439 (0.000) | -0.149 (0.038) |
| Co | 0.405 (0.000) | 0.261 (0.000) | 0.357 (0.000) |

1. INTERACCIÓN DEL COBRE CON ELEMENTOS TÓXICOS

La importancia del estudio de las interacciones entre elementos tóxicos y esenciales radica en que, como ya hemos comentado, niveles altos de exposición a determinados elementos tóxicos puede originar deficiencias de determinados oligoelementos; de igual forma, la exposición a niveles no adecuados de determinados elementos traza (tanto por exceso como por defecto) pueden condicionar la acumulación orgánica de los elementos tóxicos (Bires et al., 1995) y por lo tanto el nivel de residuo en los mismos.

1.1. Cadmio

Las concentraciones de cadmio encontradas en ganado vacuno en este estudio aparecen reflejadas en la Tabla 1. Los niveles de residuo varían entre no detectables y 328 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso fresco. Los niveles medios (media geométrica) de cadmio son significativamente superiores en riñón (61.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) que en hígado (10.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$) donde la mayor parte de las muestras (61 %) presentan niveles de residuo no detectables. En general, los niveles de cadmio son bajos y similares a los descritos en otras zonas agrícolas (Kreuzer et al., 1978; Vos et al., 1987; Tahvonen y Kumpulainen, 1994).

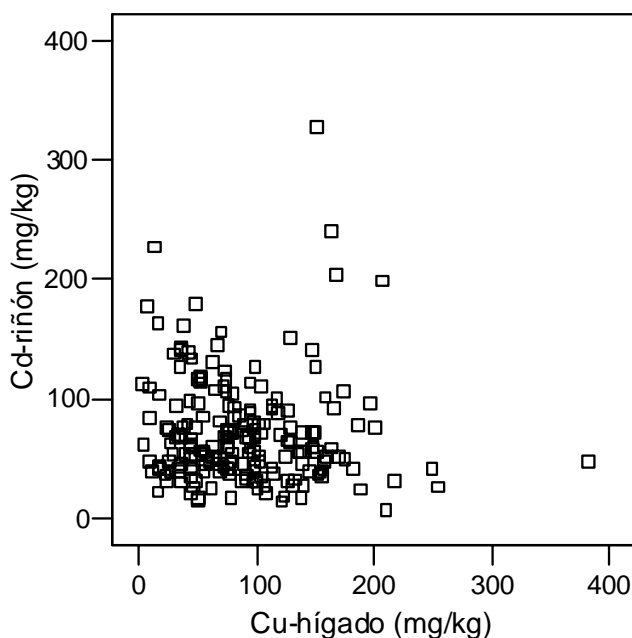


Figura 1. Gráfico de dispersión mostrando la asociación entre los niveles de cobre en hígado y cadmio en riñón.

Al estudiar la posible asociación del nivel de ambos metales en los tejidos estudiados (Tabla 2 y Figura 1) se observa que no están asociados estadísticamente en ninguno de ellos. En cuanto a las asociaciones entre tejidos, señalar que los niveles de cobre en el hígado muestran una tendencia de asociación negativa ($R_s=-0.118$, $p=0.099$) con los niveles de cadmio a nivel renal.

Existen numerosos ejemplos en la literatura que muestran fuertes interacciones entre estos dos elementos. Así, en estudios experimentales en ganado vacuno y ovino al que se le administró cadmio (Wentink et al., 1988; Smith et al., 1991a,b) o en animales que procedían de áreas contaminadas (Koh y Judson, 1986; Miranda et al. 2004) se observó una correlación negativa entre los niveles de cadmio y cobre a nivel hepático. La administración de 5 a 15 mg/kg de cadmio disminuyó las reservas de cobre de un 30 a un 70% en ovejas adultas y hembras preñadas con dietas que contenían un equilibrio mineral con niveles de cobre suficientes como para satisfacer sus requerimientos de forma adecuada (4.9 mg/kg) (Mills y Dalgarno, 1972; Doyle y Pfander, 1975). Las altas concentraciones de cadmio dietético reducen la absorción de cobre al inducir la síntesis de metalotioneínas a nivel intestinal que atrapan al cobre impidiendo su absorción (Webb, 1979). Así, las ingestas elevadas de cadmio inducen signos de deficiencia de cobre como un descenso en el ratio de crecimiento, disminución de cobre en los tejidos, defectos en la elastina de la aorta y también disminuye el rendimiento reproductivo y aumenta la mortalidad en ratas, ratones, cabras y cerdos (Hill et al., 1963; Anke et al., 1970; Hill y Matrone, 1970).

Cuando los niveles de cobre en la dieta son elevados y los niveles de exposición a cadmio son bajos no se ha observado una asociación negativa entre los niveles de ambos metales a nivel hepático en ganado vacuno (López Alonso et al., 2002) aunque sí se ha observado una asociación negativa a nivel renal, lo que podría deberse a la competencia de ambos metales por los puntos de unión de las metalotioneínas (Wentink et al., 1988).

En nuestro estudio la exposición a cadmio es muy baja (como indican los niveles de residuo encontrados) mientras que los niveles de cobre son muy altos, por lo que no es de esperar un efecto significativo del cadmio sobre los niveles orgánicos de cobre. Por el contrario, el alto nivel de exposición a cobre en la dieta podría tener un efecto en la reducción de los niveles de cadmio en los tejidos, sin embargo este efecto es poco marcado y únicamente observamos una tendencia a que los animales con un mayor nivel de cobre en el hígado presenten menores residuos de cadmio a nivel renal. Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta una competencia entre

ambos metales a nivel de absorción intestinal, que hace que los animales expuestos a niveles relativamente altos de cobre presenten una menor absorción de cadmio y por tanto una menor deposición tisular. Este efecto sería más marcado en el riñón, el órgano que acumula la mayor concentración de cadmio-metalotioneínas tras niveles bajos de exposición crónica (Dudley et al., 1985). Al tratarse el cadmio de un elemento bioacumulativo, este efecto es menos marcado en animales jóvenes (como en nuestro caso) y aumentaría progresivamente con la edad.

1.2. Plomo

Los niveles de plomo en ganado vacuno en este estudio aparecen representados en la Tabla 1. En el hígado la concentración media de plomo (143 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso fresco) fue más del doble de la encontrada en el riñón (60.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). A pesar de que los niveles de residuo se sitúan dentro de los descritos en otras zonas agrícolas en ganado vacuno, a nivel hepático son claramente superiores a los encontrados en un estudio previo realizado por López Alonso et al. (2000a) en Galicia, con valores medios en hígado de 57 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que a nivel renal son muy similares (60.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

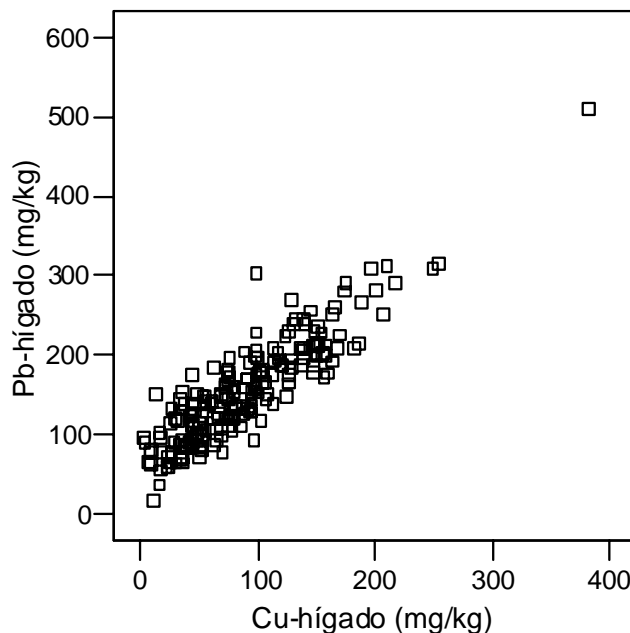


Figura 2. Gráfico de dispersión mostrando la asociación entre los niveles de cobre y plomo en hígado.

En la Tabla 2 y la Figura 2 se presentan las correlaciones entre los niveles de cobre y plomo en este estudio. Las concentraciones de ambos metales están fuertemente correlacionadas a nivel hepático ($R_s = 0.865$, $p = 0.000$), mientras que a nivel renal o entre tejidos la asociación no presenta significación estadística.

A la hora de explicar la asociación positiva entre los niveles de cobre y plomo a nivel hepático encontrada en este estudio, debemos de tener en cuenta que puede ser debida a una exposición conjunta a ambos metales en el medio donde vive el animal, o bien a una interacción entre ambos metales, tanto de tipo competitivo (en algún punto de la absorción, metabolismo o excreción; Bebe y Panemangalore, 1996) o de tipo no competitivo, de hecho se ha sugerido que el plomo estimula la liberación de la ceruloplasmina en sangre como resultado de la intensificación de su actividad (Sugawara y Sugawara, 1987). El hecho de que la asociación entre ambos metales ocurra sólo en hígado y no entre los niveles de cobre en hígado y plomo en riñón (el principal tejido indicador de exposición reciente a plomo), junto con unos niveles de plomo en hígado en este estudio muy superiores a los descritos en investigaciones anteriores en ganado vacuno en Galicia (López Alonso et al., 2000a), podrían sugerir que se trata de una interacción entre ambos metales a nivel orgánico.

A pesar de no ser una interacción tan estudiada como la que ocurre por ejemplo entre plomo-calcio o plomo-hierro, en la literatura científica hay varios ejemplos de interacción entre plomo y cobre. Los primeros estudios que evidenciaron la interacción entre ambos metales se realizaron en ratas, en las que se comprobó que tras administrar grandes cantidades de plomo en la dieta los animales presentaban una absorción de cobre deficiente o marginal (Dhawan et al., 1995). En estos animales se observaron bajos ratios de crecimiento, concentraciones séricas y actividad de ceruloplasmina bajas, cardiomiopatía, paraplejía y anemia al administrar de 0.5 al 3 % de plomo como acetato de plomo trihidratado (Klauder et al., 1972; Michaelson y Sauerhoff, 1973; Petering, 1980). También se ha descrito una asociación negativa entre plomo y cobre en hígado en animales expuestos a plomo (Spierenburg et al., 1988; Miranda, 1999) aunque según Rahil-Khazen et al. (2002) y López Alonso et al. (2002) ambos metales no estaban asociados estadísticamente.

Se ha observado además que la deficiencia de cobre aumenta la acumulación de plomo de los tejidos, y que la suplementación de cobre en estos animales produce una rápida disminución del plomo en glóbulos rojos, hígado, riñón, y cerebro; estos hechos sugieren que la interacción entre ambos elementos se produce durante la fase de absorción intestinal, si bien el mecanismo de interacción se desconoce.

En nuestro estudio las concentraciones de cobre están fuertemente correlacionadas con los niveles de plomo a nivel hepático. Resultados similares han sido descritos por López Alonso et al. (2004a) en ganado vacuno adulto procedente de León en el que los niveles de plomo eran bajos y los de cobre se mantenían dentro de la normalidad. También se ha demostrado en animales de laboratorio que la adición a la dieta de 1.5 a 20 mg/kg de cobre aumentaba la acumulación de plomo en el hígado y tejido renal cuando el plomo era ingerido a dosis de 200 mg/kg (Cerkleroski y Forbes, 1977). No obstante, los mecanismos que explican esta interacción no son conocidos.

2. INTERACCIÓN DEL COBRE CON ELEMENTOS ESENCIALES

El cobre es uno de los oligoelementos que presentan más interacciones a nivel orgánico con otros elementos esenciales. De hecho, para valorar el estatus de cobre de los animales es esencial considerar los niveles de otros metales, principalmente molibdeno o zinc (Underwood y Suttle, 2002).

2.1. Molibdeno

En la Tabla 1 se presentan las concentraciones de molibdeno en ganado vacuno en nuestro estudio. Estos valores se encuentran dentro del rango considerado como adecuado por Puls (1994) de 0.14-1.4 mg/kg en hígado y de 0.22-0.57mg/kg en riñón. Las mayores concentraciones del molibdeno se encuentran en el hígado.

Las correlaciones entre los niveles de cobre y el molibdeno se presentan en la Tabla 2 y Figura 3. En el hígado encontramos una correlación significativa de carácter positivo ($R_s=0.416$, $p=0.000$) que se hace mucho más intensa en el riñón ($R_s=0.638$, $p=0.000$).

La interacción entre cobre y molibdeno es posiblemente el mejor ejemplo de interacción no competitiva en rumiantes. La formación de tiomolibdatos en el tubo digestivo va a deprimir la disponibilidad de cobre en el alimento, además de interferir en su absorción y distribución tisular, de manera que el cobre no se acumula a nivel hepático y se favorece su eliminación renal (Smith y White, 1997). La importancia de esta interacción radica en que los niveles de molibdeno en la dieta van a condicionar enormemente las necesidades de cobre en los rumiantes, siendo frecuentes las deficiencias secundarias de cobre cuando la ingesta de molibdeno es elevada (Gooneratne et al., 1989b; Suttle, 1991; Igarza y Auza, 1995; Smith y White, 1997; Benedito et al., 1998).

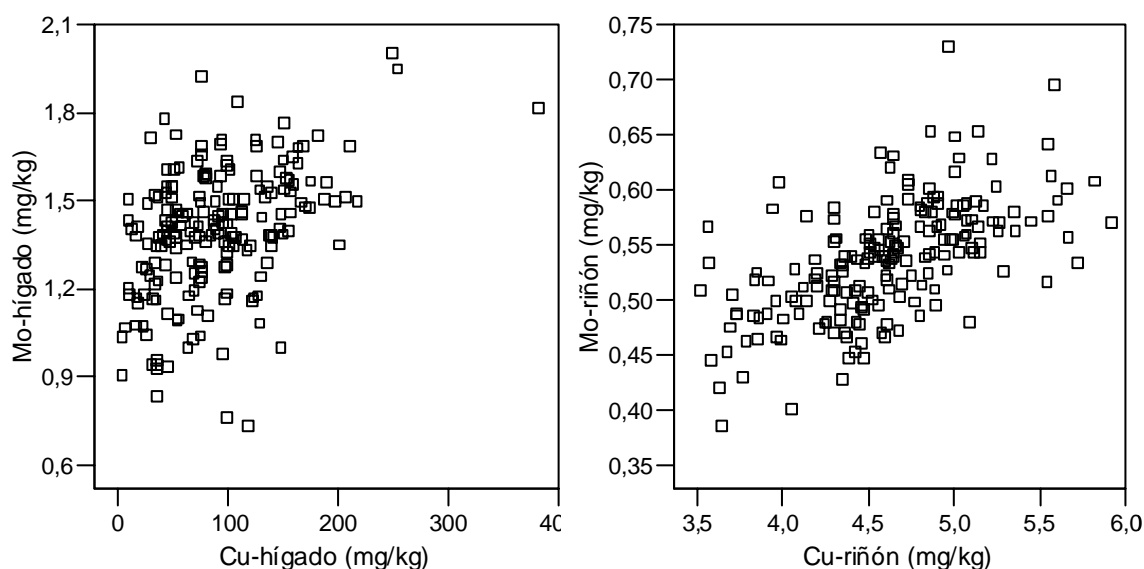


Figura 3. Gráfico de dispersión mostrando la asociación entre los niveles de cobre y molibdeno.

Basándose en el conocimiento de esta interacción, se han empleado los complejos tetratiomolibdatos (TTM) para el tratamiento de la intoxicación crónica de cobre en ovejas (Gooneratne et al., 1989b). Las inyecciones de tiomolibdatos previenen o alivian la acumulación de cobre en el hígado de animales con dosificación de cobre.

En nuestro estudio los niveles de molibdeno se encuentran dentro de los rangos de normalidad, como ya hemos comentado, y no parecen ejercer un papel importante en la acumulación de cobre en el hígado, porque de ser así la asociación entre ambos metales tendría que tener un carácter negativo, es decir, a mayores niveles de molibdeno menor acumulación de cobre en el hígado. Sin embargo, la fuerte asociación estadística entre los niveles de cobre y molibdeno a nivel renal encontrada en nuestro estudio, al igual que en previos experimentos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en ganado vacuno adulto (López Alonso et al., 2004a) indican que los niveles de molibdeno, aún dentro de la normalidad, ejercen una influencia significativa sobre la excreción urinaria de cobre. Similares resultados fueron descritos por Igarza y Auza (1995), quienes comprobaron que al utilizar dietas con exceso de molibdeno aumentaba la acumulación de cobre en riñón. El cobre y el molibdeno tienden a acumularse de forma parecida en la misma fracción cromatográfica y subcelular en riñón en concreto con un ratio 2:1 (Cousins, 1985).

2.2. Hierro

La Tabla 1 muestra los valores medios de hierro en hígado (42.4 mg/kg) y riñón (55.8 mg/kg) en ganado vacuno en nuestro estudio. Estos valores se encuentran dentro del rango adecuado descrito por Puls (1994) de 35-300 mg/kg en hígado y 30-150 mg/kg en riñón.

En la Tabla 2 y la Figura 4 se muestran las correlaciones existentes entre los niveles de cobre y de hierro. Se observa una correlación positiva entre estos dos elementos a nivel renal ($R_s = 0.223$, $p=0.002$) así como una asociación negativa entre los niveles hepáticos de cobre y de hierro a nivel renal ($R_s=-0.274$, $p=0.000$). Correlaciones similares fueron observadas por López Alonso et al. (2004a) al realizar un estudio en ganado vacuno adulto.

En la literatura científica aparecen descritos diversos casos de interacción entre hierro y cobre. Así por ejemplo, se ha descrito una asociación entre la disponibilidad del cobre y la concentración de sulfitos en rumen en animales suplementados con hierro (Suttle et al., 1984); el sulfito de hierro podría actuar como un transportador del sulfito hacia el abomaso donde la acidez del ambiente liberaría al sulfito de hidrógeno, promoviendo la formación de sulfito de cobre ser disponible para el animal.

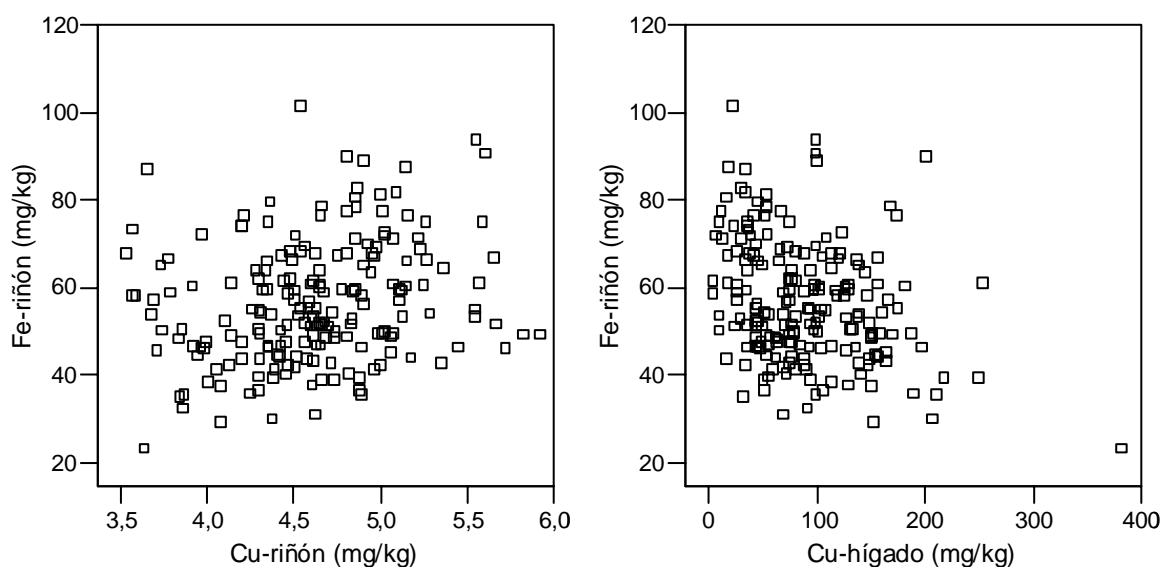


Figura 4. Gráfico de dispersión mostrando la asociación entre los niveles de cobre e hierro.

Bremner et al. (1987) observaron que tras el suplemento de hierro y molibdeno se presenta en el organismo una acción aditiva de ambos metales que lleva a una disminución de los niveles de cobre en plasma e hígado. En nuestro caso, los niveles de hierro son adecuados y no parecen ejercer un efecto significativo sobre el estatus de cobre del animal, puesto que no existe una correlación negativa entre los niveles hepáticos de ambos.

La asociación positiva a nivel renal entre los niveles de hierro y cobre, así como la interacción negativa entre cobre en el hígado y hierro en el riñón que encontramos en este estudio podría explicarse teniendo en cuenta que ambos metales comparten transportadores a nivel renal. De estas proteínas transportadoras la mejor estudiada es el DMT1, que se ha visto que juega un claro papel en el metabolismo del cobre y hierro y posiblemente también en la homeostasis de otros metales esenciales como manganeso, níquel o cobalto o tóxicos como el cadmio y plomo (Gunshin et al., 1997; Garrick et al., 2003a,b). La presencia de DMT1 (transportador divalente de metal) y de otros transportadores podría explicar no sólo la interacción entre cobre-hierro sino también la fuerte correlación del cobre con otros metales como el zinc, hierro, manganeso, molibdeno en el riñón observados en los terneros de este estudio.

2.3. Selenio

En la Tabla 1 se presentan los niveles de selenio observados en ganado vacuno en nuestro estudio. Tanto en el hígado (0.164 mg/kg) como en el riñón (1.37 mg/kg) los valores medios se sitúan dentro de los niveles adecuados (0.12-0.25 mg/kg en hígado, 1.0-1.5 mg/kg en riñón; Puls, 1994) para esta especie animal.

La Tabla 2 y Figura 5 muestran las correlaciones entre cobre y selenio en los tejidos estudiados. En el hígado se presenta la correlación más importante ($R_s = 0.532$, $p=0.000$) que es positiva y significativa al igual que en el riñón ($R_s=0.464$, $p=0.000$) y en menor medida entre tejidos ($R_s=0.186$, $p=0.000$). Estos resultados son coincidentes con los descritos tanto en hígado como en riñón por López Alonso et al. (2004a) en un estudio realizado en ganado vacuno adulto.

En la literatura hay distintos ejemplos de interacción entre estos dos metales. Cuando se presentan altas concentraciones de cobre en la dieta se inducen cambios patológicos que son sensibles al selenio en algunos animales como ratas, pollos y ovejas (Gawthorne, 1985). Jenkinson et al. (1982) al estudiar en ratas la excreción de ^{75}Se descubrieron que la deficiencia de cobre estaba asociada a una disminución

significativa de la actividad de GSH-Px dependiente de selenio en hígado y pulmón, a una disminución de ^{75}Se en hígado y a su aumento en las heces. La disminución de la actividad del enzima se restableció al menos parcialmente tras suplementos dietéticos de selenito sódico. En la situación contraria, los suplementos de selenio administrados a corderos con niveles subóptimos de cobre dieron lugar a un aumento significativo del cobre hepático, pero este hecho no se observó cuando los niveles de cobre eran adecuados. En el caso de ovejas adultas ante suplementos de selenio no se observaron los mismos efectos (Lee y Jones, 1976; Awad et al., 1982) ni tampoco en vacas de leche (Buckley et al., 1986), aunque si en cabras (Hussein et al., 1985).

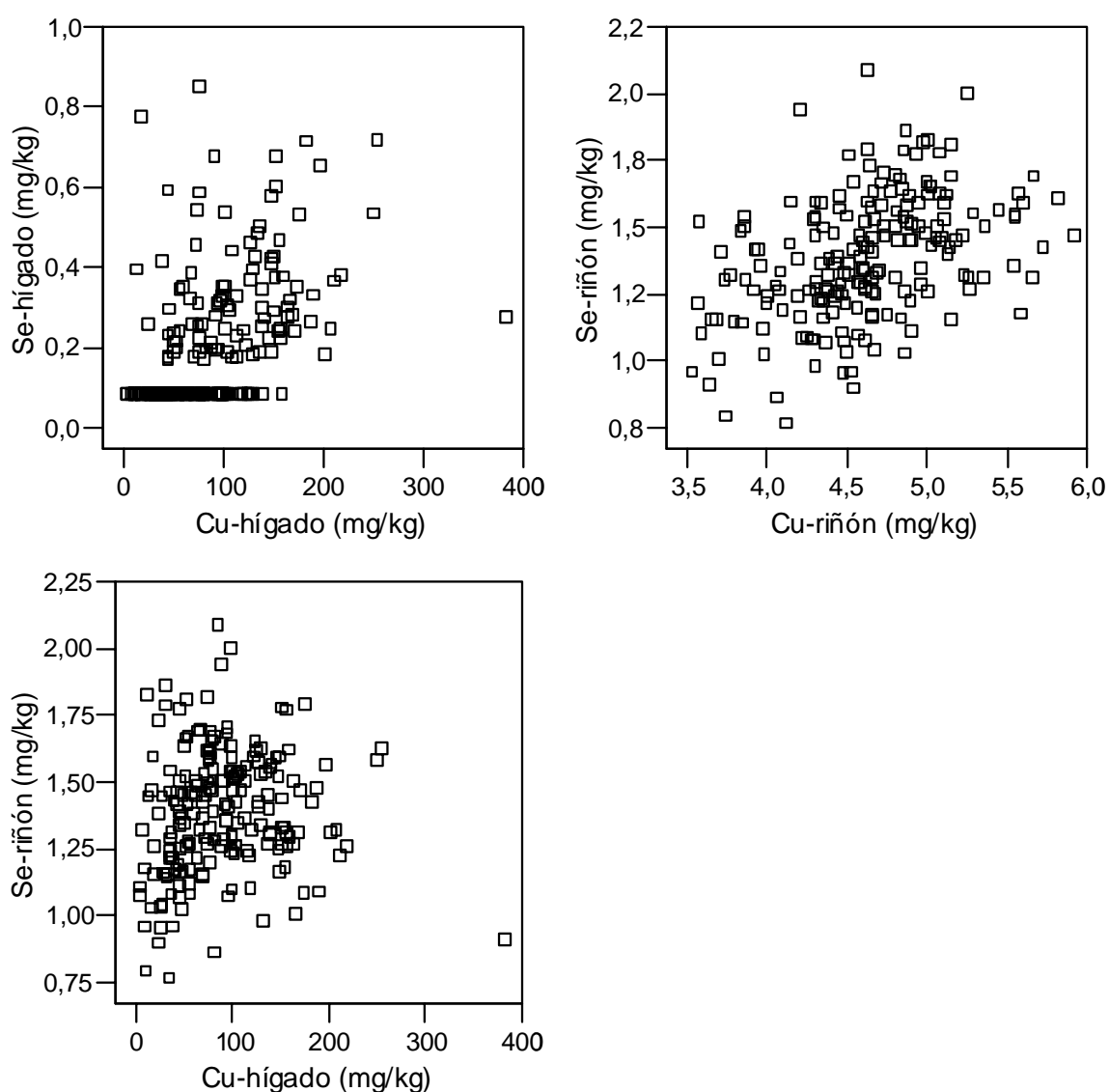


Figura 5. Gráfico de dispersión mostrando la asociación entre los niveles de cobre y selenio.

A la hora de explicar las correlaciones entre el selenio y el cobre observadas en nuestro estudio podríamos tener en cuenta el papel que desempeña el selenio como componente del enzima GSH-Px. Se ha demostrado la capacidad de este enzima para facilitar la excreción de compuestos tóxicos (como el cobre) hacia la bilis así como un aumento de su absorción hacia el riñón. Las variaciones en la intensidad de su función parecen estar relacionadas al menos parcialmente con la síntesis y patrones de giro de GSH-Px en cada tejido o tipo celular (Christie y Costa, 1984).

Por otro lado, la interacción cobre-selenio observada en nuestro estudio también se podría explicar teniendo en cuenta el papel del selenio en la inhibición de la síntesis de metalotioneínas. Así, Chmielnicka et al. (1983) mostraron que tras el tratamiento con selenio se producía la inhibición de la síntesis de metalotioneínas; en consecuencia hay menos cobre unido al citosol de los hepatocitos, se produce la saturación de la fracción nuclear y una menor excreción en bilis, todo ello conlleva a una mayor acumulación de cobre en el hepatocito y a una mayor susceptibilidad a la intoxicación crónica por cobre.

2.4. Zinc

Los niveles de zinc en hígado y riñón en ganado vacuno en nuestro estudio (Tabla 1) son adecuados (52.6 mg/kg en hígado, 25.6 mg/kg en riñón) y se encuentran en general dentro de los valores de referencia descritos por Puls (1994) de 25-100 mg/kg para el hígado y de 18-25 mg/kg para el riñón. Las concentraciones más elevadas de zinc se presentan en el hígado con un máximo de 114 mg/kg.

La Tabla 2 y Figura 6 muestran las correlaciones entre el cobre y el zinc en ganado vacuno en nuestro estudio. El riñón es el único órgano en el que encontramos una asociación significativa entre los niveles de ambos metales ($R_s = 0.483$, $p = 0.000$), también descrita con anterioridad por López Alonso et al. (2004a) en ganado vacuno adulto.

La asociación entre los niveles de cobre y zinc es posiblemente uno de los ejemplos de interacción competitiva entre elementos esenciales mejor descritos en animales. La retención de cobre en el hígado está condicionada por el nivel de zinc en la dieta en la mayor parte de las especies animales (Bremner, 1998). Cuando los niveles dietéticos de zinc son muy altos los niveles de cobre a nivel tisular son bajos y pueden aparecer signos clínicos de deficiencia de cobre; así mismo, bajos niveles de zinc en la dieta conducen a una acumulación de cobre en los tejidos y a signos de toxicidad (Hall et al., 1979; Blalock et al., 1988). Sin embargo, los niveles de cobre parecen tener un

efecto muy pequeño sobre los niveles de zinc y no se han registrado casos en los que altas concentraciones de cobre en la dieta fueran la causa de deficiencia de zinc. La cantidad excesiva de cobre puede afectar al metabolismo hepático de zinc en algunas especies, pero no hay evidencias de que la absorción intestinal del zinc esté seriamente afectada (Bremner, 1987, 1998), aunque algunos autores han señalado que los niveles altos de cobre dietético pueden disminuir la absorción de zinc y desplazar al zinc de los ligandos metabólicos involucrados en la transducción celular (Pena et al., 1999) referidos a la síntesis de metalotioneínas.

En nuestro estudio los niveles de zinc son adecuados y fluctúan dentro de un rango limitado, al contrario de lo que sucede para el cobre, por lo que no era esperable que ejerciesen una influencia significativa sobre el nivel de almacenamiento hepático de cobre. Como se ha indicado, las variaciones en los niveles de cobre tienen un efecto mucho más limitado sobre el metabolismo del zinc; así, aunque se ha demostrado que niveles altos de cobre en el hígado pueden desplazar al zinc en las metalotioneínas a nivel hepático (López Alonso et al., 2004b) este metal pasa a otras organelas celulares sin abandonar en hígado.

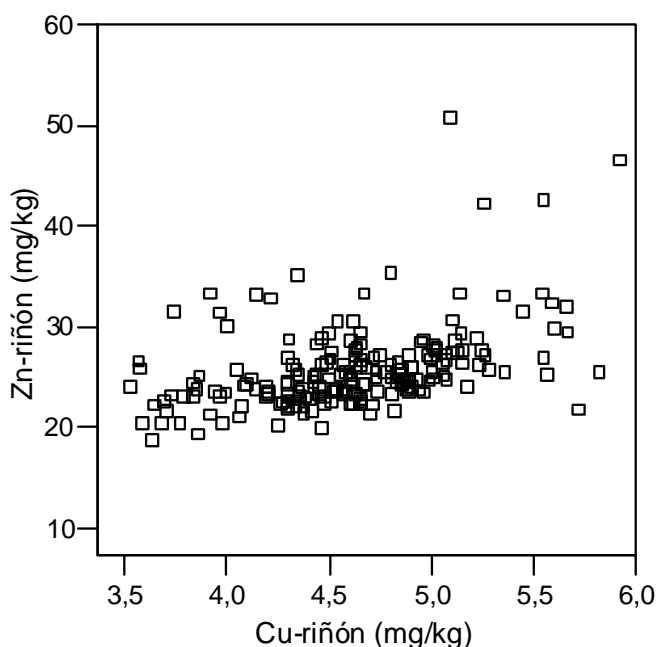


Figura 6. Gráfico de dispersión mostrando la asociación entre los niveles de cobre y zinc en riñón.

En cuanto a la asociación positiva de ambos metales a nivel renal, es posible que esté relacionada, al igual que los demás oligoelementos estudiados, con mecanismos homeostáticos de regulación mineral en los que pueden jugar un papel importante los transportadores antes mencionados.

2.5. Manganeso

La Tabla 1 muestra los valores de manganeso en ganado vacuno en nuestro estudio. Los valores medios de 3.39 mg/kg en hígado y 1.18 mg/kg en riñón se encuentran dentro del rango de normalidad descrito por Puls (1994) de 2.5-6.0 mg/kg en hígado y 1.2-2.0 mg/kg en riñón.

En lo que se refiere a las asociaciones entre los niveles de ambos metales en los tejidos estudiados (Tabla 2 y Figura 7), se encontró una correlación positiva en el riñón ($R_s = 0.439$, $p = 0.000$) y en menor medida en el hígado ($R_s = 0.263$, $p = 0.000$), mientras que entre tejidos la asociación de ambos elementos tiende a ser negativa ($R_s = -0.149$, $p = 0.038$). Resultados similares han sido descritos en un estudio previo en ganado vacuno (López Alonso et al., 2004a). Si bien es posible que la asociación entre ambos metales se deba a mecanismos de regulación homeostática se desconocen los mecanismos involucrados.

2.6. Cobalto

La Tabla 1 muestra los niveles de cobalto en ganado vacuno en nuestro estudio. Los valores medios se encuentran dentro del rango adecuado según los valores de referencia descritos por Puls (1994) tanto para el hígado (65.3 mg/kg) como para el riñón (22.8 mg/kg). Los valores más altos fueron encontrados en el hígado con un máximo de 187 mg/kg. Un 17.9% de las muestras analizadas mostraron niveles por debajo del límite de detección en el riñón.

Los niveles de cobre y cobalto (Tabla 2 y Figura 8) mostraron una correlación positiva tanto en el hígado ($R_s = 0.405$, $p = 0.000$) como en el riñón ($R_s = 0.261$, $p = 0.000$) como entre tejidos ($R_s = 0.357$, $p = 0.000$). Si bien se ha descrito una asociación entre los niveles de ambos metales en un estudio previo en ganado vacuno (López Alonso et al., 2004a) no disponemos de información que nos permita explicar los mecanismos de interacción.

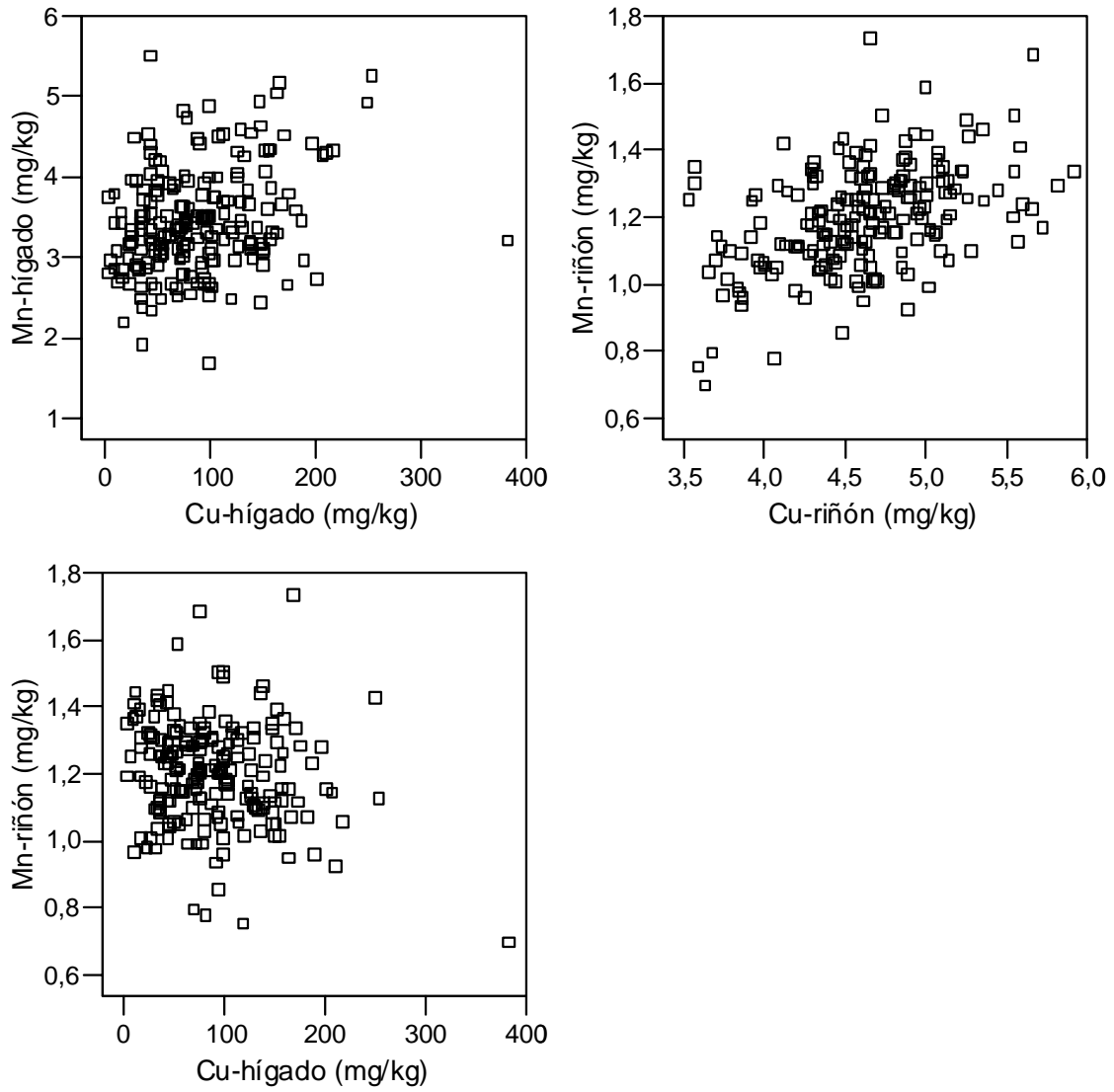


Figura 7. Gráfico de dispersión mostrando la asociación entre los niveles de cobre y manganeso.

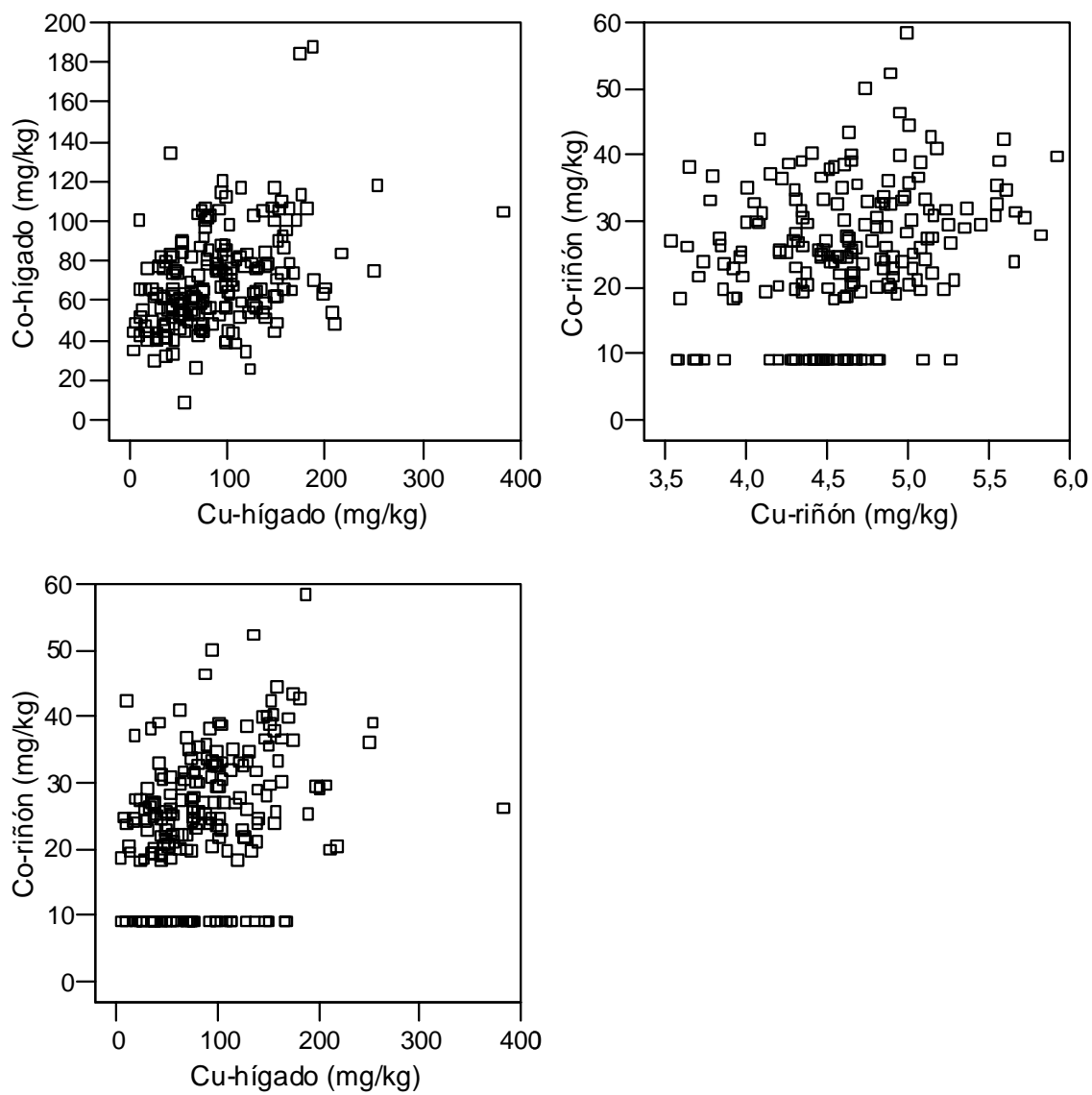


Figura 8. Gráfico de dispersión mostrando la asociación entre los niveles de cobre y cobalto.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.1. Los terneros de nuestro estudio presentan unos niveles de cobre en hígado elevados, superiores a los descritos en otras zonas de Galicia y en la mayoría de las regiones agrícolas. A nivel renal los niveles de cobre son bajos, lo que indica la escasa capacidad de este órgano para acumular cobre mientras que no se supere la capacidad de almacenamiento hepático, al igual que en la sangre, donde las concentraciones de cobre se mantienen dentro de los niveles fisiológicos para esta especie animal.
 - 1.2. Las concentraciones de cobre en hígado están débilmente correlacionadas con los niveles de cobre en riñón y sangre, lo que indica que estos tejidos no son buenos indicadores de la capacidad de acumulación de cobre en el hígado en ganado vacuno.
-
- 2.1. Al estudiar la acumulación de cobre en terneros en los distintos Ayuntamientos que integran la Comarca del Deza se observa que las concentraciones medias de cobre en hígado son significativamente superiores en los terneros procedentes de Dozón y Silleda, donde la densidad de porcino es alta, en comparación con otros como Agolada y Vila de Cruces donde la densidad de porcino es baja.
 - 2.2. La densidad de cerdos de crecimiento-cebo presente en cada ayuntamiento de la Comarca del Deza así como el número de explotaciones industriales de porcino por parroquia explica de forma significativa la variabilidad observada en la acumulación hepática de cobre en terneros.

- 3.1. Al estudiar los factores de variación propios del animal sobre la acumulación de cobre a nivel orgánico se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre razas, tanto a nivel hepático como sanguíneo, mostrando la raza Frisona las mayores concentraciones y la Rubia Gallega las más bajas.
- 3.2. En cuanto al sexo, los machos mostraron niveles superiores de cobre en hígado e inferiores en el riñón en comparación con las hembras, lo que indica una menor movilización de cobre desde el hígado hacia los tejidos periféricos en forma de ceruloplasmina en los machos.
- 3.3. Los niveles de cobre en hígado aumentaron progresivamente con la edad; a nivel renal, a pesar de que los niveles de cobre son bajos, también aumentaron, mientras que en la sangre no se observó un cambio apreciable.
- 3.4. La época de sacrificio no ejerce una influencia significativa sobre el nivel de acúmulo de cobre a nivel hepático o renal. No obstante, los terneros sacrificados en invierno muestran unos niveles de cobre en sangre significativamente inferiores a los sacrificados en verano.

- 4.1. La acumulación de cobre ejerce un efecto significativo sobre los niveles de metales tóxicos. La tendencia de correlación negativa entre los niveles de cobre hepático y cadmio renal indica posiblemente una competencia de ambos metales a nivel de su absorción intestinal que hace que los animales expuestos a niveles altos de cobre muestren menores residuos de cadmio.

En cuanto al plomo, la fuerte correlación de ambos metales a nivel hepático indica que la exposición a niveles elevados de cobre favorece la deposición de plomo en este órgano.

- 4.2. En cuanto a los metales esenciales, los resultados indican que a los niveles de exposición de este estudio no existe una interacción significativa entre los niveles de hierro y zinc con la acumulación hepática de cobre; en el caso del molibdeno tampoco se encontró una asociación de carácter negativo con el cobre, como podría ser esperable.

Los niveles de selenio están fuertemente correlacionados con los niveles de cobre, posiblemente debido a la inhibición de la síntesis de metalotioneínas por

parte del selenio o a la estimulación del enzima glutatión peroxidasa ante la acumulación de cobre.

En cuanto a los niveles de cobalto y manganeso, si bien existe una asociación significativa con los niveles de cobre se desconocen los mecanismos implicados en la misma así como su significación.

RESUMEN

RESUMEN

De forma tradicional se consideraba al ganado vacuno como una especie bastante resistente a la intoxicación por cobre, y de hecho los episodios de toxicidad eran bastante raros. En los últimos años, sin embargo, el número de casos de intoxicación por cobre en ganado vacuno ha incrementado de forma drástica, incluso con niveles de acumulación hepática claramente por debajo de los considerados como tóxicos. Estudios recientes en animales suplementados con cobre dentro de los límites permitidos ponen de manifiesto que se pueden alcanzar niveles de residuo en hígado claramente por encima de los valores de normalidad así como peores índices productivos. Estos niveles de cobre que parecen estar asociados a toxicidad subclínica en terneros han sido descritos a gran escala en numerosos países, estando asociados en la mayor parte de los casos al uso de suplementos minerales por encima de las necesidades o a la contaminación de pastos o forrajes por emisiones industriales, mineras o lodos, especialmente purines de cerdo ricos en cobre.

En Galicia, en un estudio previo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación se observó que los niveles de cobre en hígado son muy elevados en terneros procedentes de la Comarca del Deza, donde existe una importante producción de porcino en intensivo y donde se emplean purines de cerdo con niveles elevados de este metal como fertilizantes en pastos destinados al ganado vacuno. En este estudio se pretende evaluar en detalle los niveles de cobre en terneros procedentes de sistemas tradicionales de explotación de la Comarca del Deza y las fuentes de variación que afectan a su acumulación orgánica. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos concretos: (i) evaluar los niveles de cobre en hígado, riñón y sangre, principales indicadores de la acumulación orgánica de cobre en rumiantes, (ii) estudiar la influencia de la densidad de ganado porcino en intensivo en los distintos Ayuntamientos de la Comarca del Deza sobre la acumulación de cobre en terneros, (iii) evaluar la influencia de factores de variación propios del animal (edad, sexo y raza) y la época de sacrificio (invierno o verano) sobre la acumulación de cobre a nivel orgánico y (iv) estudiar la posible interacción entre la acumulación orgánica de cobre y otros metales tóxicos y esenciales.

Se recogieron muestras de hígado, riñón y sangre de 533 terneros (machos y hembras, con una edad de 6-10 meses de las razas Frisón, Rubia Gallega y cruces industriales de ambas) en el momento del sacrificio y procedentes de todos los Ayuntamientos de la Comarca del Deza. Las muestras se sometieron a una digestión ácida. Los niveles de cobre se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica, mientras de los niveles de los restantes metales tóxicos y esenciales se determinaron por ICP-OES.

Los terneros en la Comarca del Deza de nuestro estudio presentan niveles de cobre en hígado elevados, superiores a los descritos en otras zonas de Galicia y en la mayoría de las regiones agrícolas; esto pone de manifiesto la gran capacidad de los rumiantes para almacenar cobre en esta víscera y que los hace susceptibles de sufrir procesos crónicos de intoxicación por cobre. A nivel renal y sanguíneo los niveles de cobre se mantuvieron dentro de los niveles fisiológicos para esta especie animal.

Las concentraciones medias de cobre en hígado son significativamente superiores en los terneros procedentes de Ayuntamientos como Dozón, Lalín y Silleda, donde la densidad de porcino es alta, en comparación con otros como Agolada y Vila de Cruces donde la densidad de porcino es baja. La densidad de cerdos de crecimiento-cebo presente en cada ayuntamiento de la Comarca del Deza, así como el número de explotaciones industriales de porcino por parroquia, explica de forma significativa la variabilidad observada en la acumulación hepática de cobre en terneros.

Al estudiar los factores de variación propios del animal sobre la acumulación de cobre se observa que la raza Frisón muestra las mayores concentraciones y la Rubia Gallega las más bajas, que en los machos la acumulación hepática de cobre es mayor que en las hembras y que ésta aumenta progresivamente con la edad del animal. Los terneros sacrificados en invierno presentan niveles de cobre en sangre significativamente inferiores a los sacrificados en verano.

La acumulación de cobre ejerce un efecto significativo sobre los niveles de metales tóxicos, así los animales expuestos a niveles altos de cobre muestren menores residuos de cadmio en riñón y una mayor deposición de plomo en el hígado. En cuanto a los metales esenciales molibdeno, zinc e hierro, los resultados indican que a los niveles de exposición de este estudio no existe una interacción significativa con los niveles de acumulación de cobre a nivel hepático. Los niveles de selenio están fuertemente correlacionados con los niveles de cobre.

SUMMARY

SUMMARY

Traditionally cattle have been thought to be relatively tolerant of copper exposure, and indeed reports of copper poisoning were until recently somewhat rare. In the last years, however, an increasing number of episodes of copper toxicity have been reported in cattle, even at concentrations well below those regarded as toxic in the literature. Recent studies have also pointed out that cattle given dietary supplements that lead to copper accumulation in the liver at concentrations slightly higher than normal showed negative effects on animal performance. These liver copper concentrations that seemingly could be associated with subclinical copper toxicity in cattle have been described in many countries where copper supplements are given well above requirements, or where there is contamination of pastures by mining and/or industrial emissions and waste, especially copper-enriched pig slurry.

Investigations on hepatic copper concentrations in calves in Galicia (NW Spain) have revealed great variations in the copper content. Copper concentrations are high in calves from la Comarca del Deza, where there is much intensive pig farming and copper-enriched slurry is spread as fertilizer in pastures for cattle. The aim of this study is to evaluate copper accumulation in cattle from traditional farms in la Comarca del Deza and the factors of variation affecting copper accumulation in calves in this region. We have four specific objectives: (i) to evaluate copper concentrations in liver, kidney and muscle, the main indicators of copper accumulation in ruminant species, (ii) to evaluate the influence of the intensive pig farming density on copper accumulation in calves, (iii) to determine the influence of variation factors (age, sex and breed) and slaughter season (winter, summer) on copper accumulation in calves and (iv) to evaluate the influence of copper accumulation on the status of other toxic and essential elements.

Liver, kidney and blood samples from 533 Holstein Friesian, Galician Blonde and crossbred calves (males and females, aged between 6-10 months) from all the studied areas were collected at ordinary slaughter. Samples were acid digested and metal concentrations were determined by atomic absorption spectrophotometry (copper) or ICP-OES.

Hepatic copper concentrations in calves from la Comarca del Deza in our study were higher compared with other regions in Galicia and most agricultural regions in other countries; this indicates the great capacity of ruminant species to hepatic copper accumulation that makes them susceptible to suffer from chronic copper toxicity. In the kidney and blood copper concentrations were within the physiological range for this animal species.

Hepatic copper concentrations were significantly higher in calves from Dozón, Lalín and Silleda, where intensive pig farming is high, compared with animals from Agolada and Vila de Cruces, where this pig density is low. The number of growing-fattening pigs in each area and the number of pig farms in each share significantly explains the variation in copper accumulation in calves.

When evaluating the influence of the variation factors on copper accumulation in calves it was observed that (i) Holstein Friesian calves showed significantly higher hepatic copper concentrations than Galician Blonde calves, (ii) males accumulate more copper in the liver than females and (iii) copper accumulation significantly increases with age. Animals slaughtered in winter had significantly lower blood copper levels than those collected in summer.

Copper accumulation in calves showed a significant influence on toxic metal accumulation, copper concentrations in the liver were negatively correlated with cadmium in the kidney and lead in the liver. In relation to the essential metals molybdenum, zinc and iron, our results indicate that at the exposure level of this study there is not a significant interaction with copper accumulation in the liver. Selenium and copper showed a strong correlation.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, P.A., Evans, J.L., 1972. Cytochrome oxidase activity and cardiac hypertrophy during copper depletion and repletion. En: Trace Substances in Environmental Health-V, University of Missouri, Columbia, 335.
- Adham, N.D., Song K., 1980. Effect of calcium and copper on zinc absorption in the rat. *Nutr. Metab.* 24, 281.
- Allen, J.D., Gawthorne, J.M., 1987a. Interactions between proteins, thiomolybdates and copper. *Proc. 6th Symposium. Trace Elements in Man and Animals.* New York: Plenum. 315-316.
- Allen, J.D., Gawthorne, J.M., 1987b. Effect of molybdenum treatments on the distribution of Cu and metallothionein in tissue extracts from rats and sheep. *J Inorg. Biochem.* 31, 161-170.
- Allen, W.M., Sansom, B.F., Gleed, P.T., Mallinson, C.B., Drake, C.F., 1984. Boluses of controlled release glass for supplementing ruminants with copper. *Vet. Rec.* 115, 55.
- Alloway, B.J. 1973. Copper in metabolism in sway-back pastures. *J. Agr. Sci.* 80, 521-524.
- Anke, M., Henning, A., Schneider, H.J., Ludke, H., Von Gagern, W.y Schlegel, H., 1970. The interrelations between cadmium, zinc, copper and iron in metabolism of hens, ruminants and man. En: Trace elements Metabolism in Animals, Mills, C.F., Ed., Livingstone, Edinburgh, 317.
- Anuario Estadística Agraria, 2000. Servicio de Publicaciones, Xunta de Galicia. Santiago de Compostela.
- Arnhold, W., Anke, M., Gleit, M., Rideout, B., Stalis, I., Lowenstine, L., 1998a. Determination of copper status in ruminants. *Trace Elem. Electroly.* 15(2), 65-69.
- Arnhold, W., Anke, M., Rideout, B., 1998b. Copper status in endangered deer species. *Proceedings of the 4th International Deer Biology Congress.*, Hungary.
- Arredondo, M., Muñoz, P., Mazariegos, D., Núñez, M.T., 2003. Iron and copper transport by DMT1 in Caco-2cells. *Biomaterials.* 16(1), 231-231.
- Arthington, J.D., Corah, L.R., Blecha, F., 1996. The effect of molybdenum-induced copper deficiency on acute phase protein concentrations, superoxide dismutase activity, leukocyte numbers and lymphocyte proliferation in beef heifers inoculated with bovine herpes-virus-1. *J. Anim. Sci.* 74, 211-217.
- Arthur, J.R., Boyne, R., 1985. Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxide Activities in Neutrophils from Selenium Deficient and Copper Deficient Cattle. *Life. Sci.* 36, 1569-1575.
- Arzul, G., Maguer, J.F., 1990. Influence of pig farming on the copper content of estuarine sediments in Brittany, France. *Mar. Pollut. Bull.* 21(9), 431-434.
- Askari, A.C., Long, C.L., Blakemore, W.S., 1979. Urinary zinc, copper, nitrogen, and potassium losses in response to trauma. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 3, 151-156.
- Askari, A.C., Long, C.L., Blakemore, W.S., 1982. Net metabolic changes of zinc, copper, nitrogen, and potassium balances in skeletal trauma patients. *Metabolism* 31, 1185-1193.

- Askwith, C., Eide, D., Van, H.A., Bernard, P.S., Li, L., Davis, K.S., 1994. The FeT3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell*. 76, 403-411.
- Auza, N.J., Olson, W.G., Murphy, M.J., Linn, J.G., 1999. Diagnosis and treatment of copper toxicosis in ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214, 1624-1628.
- Awad, Y.L., Ahmed, A.A., Lotfi, A.Y., Fahmy, F., 1973. The influence of selenium administration on copper levels and growth of lambs. *Zbl. Vet. Med. A.*, 20, 742-747.
- Badiei, K., Darboui, M., 1999. Measurement and correlation of liver, kidney and plasma copper concentrations and haemoglobin in Holstein cattle. *J. Appl. Anim. Res.* 15(2), 131-136.
- Bak, J., Jensen, J., Larsen, M.M., Pritzl, G., Scott-Fordsmand, J., 1997. A heavy metal monitoring –programme in Denmark. *Sci. Total Environ.* 207, 179-186.
- Bakka, A.; Webb, M., 1981. Metabolism of zinc and copper in the neonate: changes in the concentrations and contents of thionein-bound Zn and Cu with age in the livers of the newborn of various mammalian species. *Biochem. Pharmacol.* 30, 721-25.
- Bakley, B.R., Berzowski, J.A., Shiefer, H.B., 1982. Chronic copper toxicity in a dairy cow. *Can. Vet. J.* 23, 190-192.
- Baker, D.H., Ammerman, C.B., 1995. Copper bioavailability. En: Ammerman, C.B., Baker, D.H., Lewis, A.J. (eds). *Bioavailability of Nutrients for Animals*. Academic Press, New York. pp 127-156.
- Bang, K.S., Familton, A.S., Sykes, A.R., 1990. Effect of Ostertagiasis on copper status in sheep: a study involving use of copper oxide wires particles. *Res. Vet. Sci.* 49, 306-314.
- Barboza, P.S., Blake, J.E., 2001. Ceruloplasmin as an indicator of copper reserves in wild ruminants at high latitudes. *J. Wildl. Dis.* 37(2), 324-331.
- Barceloux, D.G., 1999 a. Copper. *Clinical Toxicology.* 37(2):217-230.
- Barceloux, D.G., 1999 b. Molybdenum. *Clinical Toxicology.* 37(2), 231-237.
- Barlow, R.M., 1963. Further observations on swayback. 1. Transitional pathology and Therapeutics 73, 51-60.
- Batey, T., Berryman, C., Line, C., 1972. The disposal of copper-enriched pig manure slurry on grassland. *J. Br. Grassland Soc.* 27, 139-143.
- Baumgartner, S., Brown, D.J., Salevsky, E., Jr y Leach, R.M., Jr., 1978. Copper deficiency in the laying hen. *J. Nutr.* 108, 804-811.
- Bebe, F.N., Panemangalore, M., 1997. Modulation of tissue trace metal concentrations in weanling rats different levels of zinc and exposed to oral lead and cadmium. *Nutr. Res.* 16(8), 1369-1380.
- Beisel, W.R., Pekarek, R.S., Wannemacher, R.W.Jr., 1974. The impact of infectious disease on trace element metabolism of the host. En: *Trace Element Metabolism in Animals-2*. W, G, Hoekstra, J.W., Suttie, H.E., Ganther, W. Mertz (eds). Baltimore, M.D: Univ. Park, pp. 217-240.
- Benedito, J.L., Díaz de Pablo, C., Ayala, I., Castillo, C., Ríos, M.A., Miranda, M., López Alonso, M., Hernández, J., García Partida, P. (1998). Deficiencia de cobre en un rebaño de la provincia de Lugo (España). En: Zadnik, T; Jazbec, I.; Fatur, B. (editors). *Proceedings of the 6th Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants*. Ed. Tiskarna Univerze, Slovenia. pp. 236-238.
- Benemariya, H., Robberecht, H., Deelstra, H., 1993. Zinc, copper, and selenium in milk and organs of cow and goat from Burundi, Africa. *Sci. Total Environ.* 128, 83-98.
- Berry, J.P., Zhang, L., Galle, P., 1995. Interaction of selenium with copper, silver, and gold salts-electron-microprobe study. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology.* 27 (1), 21-28.

- Bidewell, C.A., David, G.P., Livesey, C.T., 2000. Copper toxicity in cattle. *Vet. Rec.* 147, 399-400.
- Bienengraber, M., Forderkuz, S., Klein, D., Summer, K.H., 1995. Determination of Cu-containing metallothionein. Comparison of Ag saturation assay, thiomolybdate assay and enzyme-linked-immunosorbent assay. *Anal. Biochem.* 228(1), 69-73.
- Binnerts, W.T., 1986. De koperstatus van het rundvee in Nederland. The copper status of cattle in the Netherlands. *Tijdschr.Diergeneeskd.deel 111,afl.7.* 321-324.
- Bires, J., Vrzgula, L., Juhasova, Z., 1991a. Distribution of harmful metals in sheep organisms after experimental industrial contaminant intake. *Vet. Med.* 36(6), 361-371.
- Bires, J., Kovac, G., Vrzgula, L., 1991b. Interactions between copper and selenium in sheep in the course of experimentally-produced copper intoxication. *Vet. Hum. Toxicol.* 33, 489-491.
- Bires, J., Vrzgula, L., Weissova, T., Vrzgulova, M., Baldovic, R., 1995. Distribution of Cu, Fe, As, Cd and Pb in sheep organisms after experimental intoxication with copper-oxide from industrial flue dust. *Tierarztl. Umsch.* 50(5):364-367.
- Blakley., Hamilton., 1985. Ceruloplasmin as an Indicator of Copper Status in Cattle and sheep. *Can. J. Comp. Med.* 49, 405-408.
- Blalock, T.L., Dunn, M.A., Cousins, R.J., 1988. Metallothionein gene expression in rats tissue-specific regulation by dietary copper and zinc. *J. Nutr.* 118, 222-228.
- Bohman, V.R., Drake, E.L, Behrens, W.C., 1984. Injectable copper and tissue composition of cattle. *J. Dairy Sci.* 67, 1468-1473.
- Bohman, V.R., Poole, Kvasnicka, Tronstad, Collison.,1987. The toxicology and composition of bovine tissues after parenteral administration of high levels of copper salts. *Vet. Human Toxicol.* 29, 307-312.
- Boila, R.J., Devlin, T.J., Drysdale, R.A., Lillie, L.E., 1984. Supplementary copper for grazing beef cattle-injectable copper glycinate and copper sulfate in free-choice mineral supplements. *Can. J. Anim. Sci.* 64, 675-696.
- Botha, C.J., Nande, T.W., Swan, G.E., 1993. The cupruritic effect of two chelators following copper loading in sheep. *Vet. Human Toxicol.* 35, 409-413.
- Bounias, M., Purdey, M., 2002. Transmissible spongiform encephalopathies: a family of etiologically complex diseases-a review. *Sci. Total Environ.* 297, 1-19.
- Bradley, CH., 1993. Copper poisoning in a dairy herd fed a mineral supplement. *Can. Vet. J.* 34, 287-292.
- Brady, FO; Helvig, B., 1984. Effect of epinephrine and norepinephrine on zinc thionein levels and induction in rat liver. *Am. J. Physiol.* 247, 319-322.
- Branion, H.D., 1960. Conditioned copper deficiency in cattle. *Proc. Eight International Grassland Congress.* 564. University of Reading, U.K.
- Braude, R., Ryder, K., 1973. Copper levels in diets in growing pig. *J. Agric. Soc.* 80, 489.
- Bremner, I., 1970. Zinc, copper and manganese in the alimentary tract of sheep. *Br. J.Nutr.* 24, 769-783.
- Bremner, I., 1980. Absorption, transport and distribution of copper. *Excerpta Medica on Ciba Foundation Symposium* 79, 23-48.
- Bremner, I., 1987. Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper. *J.Nutr.* 117, 19-29.
- Bremner, I., 1991a. Metallothionein and copper-metabolism in liver. *Methods in enzymology.* 205, 584-591.

- Bremner, I., 1991b. Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Methods in enzymology*. 205, 25-35.
- Bremner, I., 1998. Manifestations of copper excess. *Am. J. Clin. Nutr.* 67(5), 1069S-1073S.
- Bremner, I., Davies, N.T., 1976. The induction of metallothionein in rat liver by zinc injections and restriction of food intake. *Biochem. J.* 149, 733-738.
- Bremner, I., Young, B.W., 1976. Isolation of (Copper, Zinc)-th pig liver. *Biochem. J.* 155, 631-635.
- Bremner, I., Beattie, J.H., 1990. Metallothionein and trace minerals. *Annual Reviews Nutrition*, 10, 63-83.
- Bremner, I., Beattie, J.H., 1995. Copper and zinc metabolism in health and disease: Speciation and interactions. *Proc. Nutr. Soc.* 54, 489-499.
- Bremner, I., Hoekstra, W.G., Davies, N.T., Young, B.W., 1978. Effect of zinc status of rats on the synthesis and degradation of copper induced metallothionein. *Biochem. J.* 174, 883-892.
- Bremner, I., Mills, C.F., 1981. Absorption, transport and tissue storage of essential trace elements. *Phil.Trans.R.Lond.B.* 294, 75-89.
- Bremner, I., Mehra, R.K., 1983. Metallothionein: some aspects of its structure and function with special regard to its involvement in copper and zinc metabolism. *Chemica Scripta*, vol.21, 117-121.
- Bremner, I., Williams, R.B., Young, B.W., 1977. Distribution of copper and zinc in the liver of the developing sheep foetus. *Br. J. Nutr.* 38, 87-92.
- Bremner, I., Williams, R.B., Young, B.W., 1981. The effects of age, sex and zinc status on the accumulation of (copper-zinc)-metallothionein in rat kidneys. *J. Inorg. Biochem.*, 14(2), 135-146.
- Brewer, G.J., Hill, G.M., Prasad, A.S., Cossack, Z.T., Rabbani, P., 1983 Oral zinc therapy for Wilson's Disease. *Ann. Intern. Med.* 99, 314-320.
- Brewer, G.J., Hill, G.M., Dick, C.; Prasad, A.S., Cossack, Z.T., 1985. Interactions of trace elements: Clinical significance. *J. Am. Coll. Nutr.*, 4, 33-38.
- Brinckerhoff, C.E., Coffey, J.W., Sullivan, A.C., 1983. Inflammation and collagenase production in rats with adjuvant arthritis reduced with 13-cis-retinoic acid. *Science*, 221, 756-758.
- Buck, W.B., 1970. Diagnosis of feed-related toxicoses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 156, 1434-1443.
- Buckingham, K., Heng-Khou, C.S., Dubick, M., Lefevre, M., Cross, C., Julian, L., Rucker, R., 1981. Copper deficiency and elastin metabolism in avian lung. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 166, 310-319.
- Buckley, W.T., Huckin, S.N., Fisher, L.J., Eigendorf, G.K., 1986. Effect of selenium supplementation on copper metabolism in dairy cows. *Can.J.Anim.Sci.* 66, 1009-1018.
- Bush, J.A., Jensen, W. N., Athens, J.W., Ashenbrucker, H., Cartwright, G.E., Wintrobe, M.M., 1956. Studies on copper metabolism. XIX. The kinetics of iron metabolism and erythrocyte life-span in copper-deficient swine. *J. Exp. Med.* 103, 701.
- Butler, E.J., 1963. The influence of pregnancy on the blood, plasma and ceruloplasmin copper levels of sheep. *Comp. Biochem. Physiol.* 9, 1-12.
- Cabral, F., Vasconcelos, E., Cordovil, C.M.D.S., 1998. Effects of soil phase from pig slurry on iron, copper, zinc and manganese content of soil and wheat plants. *J. Plant Nutrition*. 21(9), 1955-1966.

- Cameron, H.J., Boila, R.J., McNichol, L.W., Stanger, N.E., 1989. Cupric oxide needles for grazing cattle consuming low-copper,high-molybdenum forage and high-sulfate water. *J. Anim. Sci.*(67), 252-261.
- Campbell, C.H., Brown, R., y Linder, M.C., 1981. Circulating ceruloplasmin is an important source of copper for normal and malignant animal cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 678, 27-38.
- Carballas Fernández, T., Díaz-Fierros Viqueira, F.,1990. El Purín de vacuno en Galicia. Caracterización, poder fertilizante y problemas ambientales. Ed. Gráficas Minerva S.L. Santiago de Compostela.
- Carlos, G., Zervas, G., Driver, P.M., Anderson, P., Illingworth, D., Al- Tekrity, S. A., Telfer, S.B., 1985. The effect of soluble glass boluses on the copper, cobalt, and selenium status of Scottish Blackface ewes, In: Proc. 5th. Int. Symp. On Trace Element Metabolism in Man and Animals. Mills, C.F., Bremner, I., Chesters, J.K., (eds). Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, U.K., 714.
- Cavanagh, N.A., Judson, G.J., 1994. Copper-oxide powder as a supplement for sheep. *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease*, 8(3-4), 183-188.
- Cerkleroski, F.L., Forbes, R.M., 1977. Influence of dietary copper on lead toxicity in the young male rat. *J. Nutr.* 107, 143.
- Chao, P.Y., Allen, K.G.D., 1992. Glutathione production in copper-deficient isolated rat hepatocytes. *Free Rad. Biol. Med.* 12, 145-50.
- Charmley, L.L., Symonds, H.W., 1985. A comparison of the ability of cattle and pigs to clear excess copper from the plasma and excrete it in bile. *Commonwealth Agriculture Bureau Scotland.* 5, 339-341.
- Chen, Y., Saari, J.T., Kang, Y.J., 1995. Expression of σ -glutamyl cysteine synthetase in the liver of copper deficient rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 210, 102-106.
- Cherian, M.G., 2003. Metallothionein in homeostasis and oxidative damage of copper. *Biometals.* 16(1), 226-226.
- Chmielnicka, J., Bem, E.M., Kaszubski, P., 1983. Organ and subcellular distribution of cadmium in the rats exposed to cadmium, mercury and selenium. *Environ. Res.* 31, 266-272.
- Choudhury, H., Hastings, L., Menden, E., Brockman, D., Cooper, G.P., Petering, H.G., 1978. En: *Trace Element Metabolism in Man and Animals-3.* M. Kirchgessner (ed). Freising-Weihenstephan:Arbeitsgemeinschaft für Tierernährungsforschung. p.549
- Chowdhury, B., Chandra, P., 1987. Biological and health implications of toxic heavy metal and essential trace element interactios. *Progr. Fd. Nutr. Sci.* 11, 55-113.
- Christie, Costa, M., 1984. In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. *Biol. Trace Elem. Res.* 6, 139-158.
- Christie, P., Beattie, J.A.M., 1989. Grassland soil microbial biomass and accumulation of potentially toxic metals from long-term slurry application. *J. Appl. Ecol.* 26, 597-612.
- Cleary, E.G., Fanning, J.C., 1975. Effects of copper deficiency on connective tissues in sheep. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2, 75.
- Coleman, M.E., Elder, R.S., Basu, P., Koppenaar, G., 1992. Trace elements in edible tissues of livestock and poultry. *J. AOAC Int.* 75(4), 615-625.
- Cook, C.M., Vardaka, E., Lanaras, T., 1997. Concentrations of Cu, and chlorophyll content of field-cultivated wheat growing in naturally enriched Cu soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 248-253.
- Coppenet, M., Golven, J., Simon, J.C., Le Corre, L., Le Roy, M., 1993. Chemical evolution of soils in intensive animal-rearing farms. The example of Finistère. *Agronomie.* 13(2), 77-83.

- Corah, L.R., Ives, S., 1991. The effects of essential trace minerals on reproduction in beef cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Animal Practice*. 7(1), 41-57.
- Corbett, W.S., Saylor W.W., Long, T.A., Leach, R.M., 1978. Intracellular distribution of hepatic copper in normal and copper-loaded sheep. *J. Anim. Sci.*, 47, 1174-1179.
- Cosson, R.P., 1994. Heavy metal intracellular balance and relationship with metallothionein induction in the liver of carp after contamination by silver, cadmium and mercury following or not pre-treatment by zinc. *Biometals* 7, 9-19.
- Counotte, G.H.M., Hartmans, J., 1989. Reaction between selenium content and glutathione-peroxidase activity in blood of cattle. *Vet. Q.* 11, 155-160.
- Cousins, R.J., 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to Metallothionein and Ceruloplasmin. *Phys. Rev.* 65, 238-309.
- Croubels, S., Baert, K., Torck, T., Deprez, P., De Backer, P., 2001. Chronic copper intoxication in veal calves. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 70(2), 142-146.
- Crow, G., Smart, M.E., Stricklin, W.R., Christensen, D.A., Janzen, E.D., 1980. Breed, age and sex effects on blood plasma copper levels in beef cattle. *Dept. Anim. Poult. Sci. University of Saskatchewan, Saskatoon. Res. Rep. Pub.* 411, 19-21.
- Dameron, C.T., Harrison, M.D., 1998. Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 67(supl), 1091S-7S.
- Day, F.A., Panemangalore, M., Brady, F.O., 1981. In vivo and ex vivo effects of copper rat liver metallothionein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 168, 306-310.
- De la Torre, A.I., Jiménez, J.A., Carballo, M., Fernández, C., Roset, J., Muñoz, M.J., 2000. Ecotoxicological evaluation of pig slurry. *Chemosphere*, 41, 1629-1635.
- Deland, M.P.B., Cunningham, P., Milne, M.L., Dewey, D.W., 1979. Copper administration to young calves: oral dosing with copper oxide compared with subcutaneous copper glycinateinjection. *Aust. Vet. J.* 55, 493.
- Denko, C.W., 1979. Protective role of ceruloplasmin in inflammation. *Agents Actions* 9, 333-336.
- Dhawan, D., Singh, B., Chand, B., Singh, N., Mangal, P.C., 1995. X-ray fluorescence in the assessment of inter-elemental interaction in rat liver following lead treatment. *Biometals* 8, 105-110.
- Directiva 70/524 CEE del Consejo de 23 de noviembre de 1970, sobre aditivos en la alimentación animal. *Diario Oficial* de 14 de diciembre de 1970.
- Dixon, J.W., Sarkar, B., 1974. Isolation, amino acid sequence and copper (II)-binding properties of peptide (1-24) of dog serum albumin. *J. Bio. Chem.* 249, 5872-5877.
- Donaldson, W.E., 1991. Interactions of dietary lead fish oil and antioxidant in chicks. *Bio. Trace Elem. Res.* 31, 215-222.
- Dormandy, T.L., 1980. Free radical reactions in biological systems. *Am. R. Coll. Surg. Engl.* 62, 188-194.
- Doyle, J.J., Pfander, W.H., 1975. Interactions of cadmium with copper, iron, zinc, and manganese in ovine tissues. *J. Nutr.* 105, 599.
- Du, Z., Hemken, R.W., Harmon, R.J., 1996. Copper metabolism of Holstein and Jersey cows and heifers fed diets high in cupric sulphate or copper proteinate. *J. Dairy Sci.* 79, 1873-1880.
- Dudley, R., Gammal, L., Klassen, C., 1985. Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: likely role of hepatic cadmium-metallothionein in nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77, 414-426.

- Duncan, J.R., Prasse, K.W., 1986. *Veterinary Laboratory Medicine*, Ames, Iowa: Iowa State University Press.
- Dunlop, G., Innes, J.R.M., Shearer, G.D., Wells, H.E., 1939. The feeding of copper to pregnant ewes in the control of swayback. *J.Comp. Pathol.* 52, 259.
- Eckert, G.E., Greene, L.V., Carsteens, G.E., Ramsey, W.S., 1999. Copper status of ewes fed increasing amounts of copper from copper sulfate or copper proteinate. *J. Anim. Sci.*, 77, 244-249.
- Eleftheriou, E.P., Karataglis, S., 1989. Ultrastructural and morphological characteristics of cultivated wheat growing on Cu-polluted fields. *Bot. Acta.* 102, 134-140.
- El-Gallad, T.T., Mills, C.F., Bremner, I., Summers, R., 1983. Thiomolybdates in rumen contents and rumen cultures. *J. Inorg. Biochem.* 18, 323-334.
- Ellen, G., Vanloon, J.W., Tolsma, K., 1989. Copper, chromium, manganese, nickel and zinc in kidney of cattle, pigs, and sheep and in chicken livers in Netherlands. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 189 (6), 534-537.
- Engle, T.E., Spears, J.W., 2000a. Effects of dietary copper concentration and source on performance and copper status of growing and finishing steers. *J.Anim. Sci.* 78, 2446-2451.
- Engle, T.E., Spears, J.W., 2000b. Dietary copper effects on lipid metabolism, performance, and ruminal fermentation in finishing steers. *J. Anim. Sci.* 78, 2452-2458.
- Esselink, H., van der Geld, F.M., Jager, L.P., Posthuma-Trumpie, G.A., Zoun, P.E.F., Baars, A.J., 1995. Biomonitoring heavy metals using the Barn Owl (*Tyto Alba Guttata*): Sources of variation especially relating to body condition. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28, 471-486.
- Evans, G.W., Wiederanders, R.E., 1968. Effect of hormones on ceruloplasmin and copper concentrations in the plasma of the rat. *Am. J. Physiol.* 214, 1152-1154.
- Evans, G.W., 1973. Copper Homeostasis in the Mammalian System. *The American Physiological Society.* vol. 53, (3).
- Evans, G.W., Myron, D.R., Wiederanders, R.E., 1969. Effect of protein synthesis inhibitors on plasma ceruloplasmin in the rat. *Am. J. Physiol.*, 216, 340-342.
- Evans, G.W., Cornatzer, N.F., Cortnazer, W.E., 1970a. Mechanism for hormone-induced alterations in serum ceruloplasmin. *Am.J. Physiol.* 218, 613-615.
- Evans, G.W., Majors, P.F., Cornatzer, W.E., 1970b. Ascorbic acid interaction with metallothionein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1244-1247.
- Evans, G.W., Myron, D.R., Cortnazer, N.F., Cortnazer, W.E., 1970c. Age-dependent alterations in hepatic subcellular copper distribution and plasma ceruloplasmin. *Am. J. Physiol.* 218, 298-300.
- Fahrenbach, W.H., Sandberg, L.B., Cleary, E.G., 1966. Ultrastructural studies on early elastogenesis. *Anat. Rec.* 155, 563.
- Falandysz, J., 1993. Some toxic and essential trace metals in cattle from the northern part of Poland. *Sci. Total Environ.* 136, 177-191.
- Farmer, P.E., Adams, T.E., Humphries, W.R., 1982. Copper supplementation of drinking water for cattle grazing molybdenum rich pastures. *Vet. Rec.* 111, 193.
- Farmer, P.E., 1983. The use of copper tablets to supplement the drinking water of cattle grazing "Teart" pastures. En: *Trace Elements in Animal Production and Veterinary Practice*, Suttle, N.F., Gunn, R.G., Allen, W.M., Linklater, K.A., y Wiener, G. (eds). Occasional Publication No. 7, British Society of Animal Production, Edinburgh, 142.
- FEDNA, 1999. Fuentes de microminerales. Disponible en: http://www.etsia.upm.es/fedna/minerales/fuentes_microminerales.htm

- Feldman, S.L., Failla, M.L., Cousins, R.J., 1978. Degradation of liver metallothionein in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 544, 638-646.
- Fell, B.F., Dinsdale, D., Mills, C.F., 1975. Changes in enterocyte mitochondria associated with deficiency of copper in cattle. *Res. Vet. Sci.* 18, 274.
- Floris, G., Medda, R., Padiglia, A., Musci, G., 2000. The physiopathological significance of ceruloplasmin-A possible therapeutic approach. *Biochem. Pharmacol.* 60(12), 1735-1741.
- Foulkes, E.C., 1993. Metallothionein and glutathione as determinants of cellular retention and extrusion of cadmium and mercury. *Life Sci.* 52, 1617-1620.
- Freeland, J.H., Cousins, R. J., Schwartz, R., 1976. Relationship of mineral status and intake to periodontal disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 29, 745-749.
- Freudenberger, D.O., Familton, A.S., Sykes, A.R., 1987. Comparative aspects of copper metabolism in silage-fed sheep and deer (*Cervus elapbus*). *J. Agr. Sci.* 108, 1-7.
- Frieden, E., 1986. Perspectives on Copper Biochemistry. *Clin. Physiol. Biochem.* 4, 11-19.
- Funk, A.E., Day, F.A., Brady, F.O., 1987. Displacement of zinc and copper from copper-induced metallothionein by cadmium and by mercury: in vivo and ex vivo studies. *Comp. Biochem. Physiol.* 86, 1-6.
- Gailer, J., 2002. Reactive selenium metabolites as targets of toxic metals/metalloids in mammals: a molecular toxicological perspectives. *Appl. Organomet. Chem.* 16(12), 701-707.
- Galey, F.D., Maas, J., Tronstad, R.J., Woods, L.W., Jonson, B.J., Littlefield, E.S., Wallstrum, R., Dorius, L.C., 1991. Copper toxicosis in two herds of beef calves following injection with Copper disodium edetate. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 260-263.
- Gallagher, C.H., 1979. Biochemical and Pathological effects of copper deficiency. En: *Copper in the Environment, Part II : Health Effects*. Miagu, J.D. (ed). John Wiley y Sons, New York, 57.
- García-Fernández, A.J., Motas Guzman, M., Navas, I., María Mojica, P., Romero, D., 1999. Sunflower meal as cause of chronic copper poisoning in lambs in southeastern Spain. *Can. Vet. J.* 40, 799-801
- Garrick, M.D., Dolan, K.G., Ghio, A., Horbinski, C., Higgins, D., Porubcin, M., 2003a. DMT1 (Divalent Metal Transporter): a mammalian transporter for multiples metals. *Biometals.* 16(1), 41-41.
- Garrick, M.D., Nunez, M.T., Olivares, M., Harris, E.D., 2003b. Parallels and contrasts between iron and copper metabolism. *BioMetals* 16(1), 1-8.
- Gartrell, J.W., 1981. Distribution and correction of copper deficiency in crops and pastures. En: *Copper soils and Plants*. Loneragan, J.F.; Robson, A.D., Graham, R.D. (eds). Academic Press, Sidney, 313.
- Gawthorne, J.M., 1987. Copper interactions. En: *Copper in Man and Animals*. J.M. Howell, J.M. Gawthorne (eds). Vol. I. pp. 79-99. CRC Press Inc.: Boca Raton, Florida.
- Gay, C.C., Prichett, L.C., Madson, W., 1988. Copper deficiency in ruminants, In: *Proceedings. 20th. Ann. Meet Am Assoc Bovine Pract.* 134-138.
- Gengelbach, G.P., Spears, J.W., 1998. Effects of dietary copper and molybdenum on copper status cytokine production, and humoral immune response of calves. *J. Dairy Sci.* 81(12), 3286-3292.
- Gengelbach, G.P., Ward, J.D., Spears, J.W., 1997. Effect of copper deficiency and copper deficiency coupled with high dietary iron or molybdenum on phagocytic function and response of calves to a respiratory disease challenge. *J. Anim. Sci.* 75, 112-1118.
- Gibson, D.M., Kennelly, J.J., Mathison, G.W., 1987. The performance of dairy and feedlot cattle fed sulphur dioxide-treated high-moisture barley. *Can J. Anim. Sci.* 68, 471-482.

- Givens, D.I., Hopkins, J.R., Brown, M.E., Walsh, W.A., 1981. The effect of copper therapy on the growth rate and blood composition of young growing cattle. *J. Agric. Sci.* 97, 497-505.
- Gleed, P.T., Allen, W.M., Mallinson, C.B., Rowlands, G.J., Sansom, B.F., Vagg, M.J., 1983. Effect of selenium and copper supplementation on the growth of beef steers. *Vet. Rec.* 103, 388.
- Grobler, D.G., 1999. Copper poisoning in wild ruminants in the Kruger National Park: Geobotanical and environmental investigation. *J. Vet. Res.* 66, 81-93.
- Grobler, D.G., Swan, G.E., 1999a. Copper poisoning in the Kruger National Park: Field investigation in wild ruminants. *J. Vet. Res.* 66, 157-168.
- Grobler, D.G., Swan, G.E., 1999b. Attempted induction of chronic copper poisoning in boma confined impala. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 66, 169-174.
- Gochfeld, M., 1997. Factors Influencing Susceptibility to Metals. Vol.105, Supplement 4, 817-822.
- Gollan, J.L., 1975. Studies on the nature of complexes formed by copper with human alimentary secretions and their influence on copper absorption in the rat. *Clin. Sci. Mol. Med.* 49, 237-245.
- Goodman, J.R., Dallman, P.R., 1970. Role of copper in iron localization in developing erythrocytes. *Blood*, 34, 747.
- Gooneratne, S.R., Howell, J. McC., 1983. Structural changes in the kidney of chronic copper poisoned sheep. En: Proc. 2nd. Int. Workshop in Trace Element-Analytical Chemistry in Medicine and Biology. Schramel, P., Bratter, P. (eds). Watter de Guyter, Boston, 34L.
- Gooneratne, R., Christensen, D.A., 1985. Gestation age and maternal-foetal liver copper levels in bovines. En: Proc. 5th. Int. Symp. on Trace Element Metabolism in Man and Animals. Mills, C.F., Bremner, I., Chesters, J.K. (eds). Commolwealh Agricultural Bureaux, Farham Royal, U.K. 334.
- Gooneratne, S.R., Howell, J. McC., Gawthorne, J., 1979. Intracellular distribution of copper in the liver of normal and copper loaded sheep. *Res. Vet. Sci.* 27, 30-37.
- Gooneratne, S.R., Howell, J. McC., Cook, R.D., 1980. An ultrastructural and morphometric study of the liver of normal and copper-poisoned sheep. *Am. J. Pathol.* (99), 429-450.
- Gooneratne, S.R., Buckley, W.T., Christensen, D.A., 1989a. Review of copper deficiency and metabolims in ruminants. *Can J Anim Sci* 69, 819-845.
- Gooneratne, S.R., Howell, J. McC., Gawthorne, J.M., Kumaratilake, J.S., 1989b. Subcellular Distribution of Copper in the Kidneys of Normal, Copper-Poisoned, and Thiomolybdate-Treated Sheep. *J. Inorg. Biochem.* 35, 23-36.
- Gooneratne, S.R., Symonds, H.W., Bailey, J.V., Christensen, D.A., 1994. Effects of dietary copper, molybdenum and sulphur on biliary copper and zinc excretion in Simmental and Angus cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 74, 315-325.
- Gooneratne, S.R., Christensen, D.A., 1997. Effect of Chelating Agents on the Excretion of Copper, Zinc and Iron in the Bile and Urine of Sheep. *Vet. J.* 153, 171-178.
- Goyer, A., 1986. Hepatic toxicity. En: Casarett y Doull's toxicology: the basic science of poisons. Klassen, C., Andur, M., Doull, J. (eds). 3rded. Pergamon Press, New York. p. 211.
- Goyer, R.A., 1995. Factors influencing metal toxicity. En: Goyer, R.A., Klaassen, C.D., Waalkes, M.P. (eds). Metal toxicology. Academic Press, San Diego, C. A., pp. 31-45.
- Goyer, R.A., 1997. Toxic and essential metal interactions. *Annu. Rev. Nutr.* 17, 37-50.
- Grace, N.D., 1983. Amounts and distribution of mineral elements associated with the fleece-free empty body weight gains of the grazing sheep. *N. Z. J. Agric. Res.* 26, 59-70.

- Gregoriadis, G., Sourkes, T.L. 1967. Intracellular distribution of copper in the liver of the rat. *Can. J. Biochem.* 45, 5833-5837.
- Gregoriadis, G., Sourkes, T.L., 1970. Regulation of hepatic copper in the rat by the adrenal gland. *Can. J. Biochem.* 48, 160-163.
- Gross, A.M., Prohaska, J.R., 1990. Copper-deficient mice have higher cardiac epinephric turnover. *J. Nutr.* 120, 88-96.
- Groten, J.P., Sinkeldam, E.J., Muys, T., Luten, J.B., Bladeren, P.J., 1991. Interactions of dietary Ca, P, Mg, Mn, Cu, Fe, Zn and Se with the accumulation and oral toxicity of cadmium in rats. *Food Chem. Toxic.* 29, 249-258.
- Gummow, B., 1996. Experimentally induced chronic copper toxicity in cattle. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 63(4), 277-288.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 388, 482-488.
- Hadrich, J., 1996. High amounts of copper in calf's livers. Recent data and estimation of potential health hazards. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau.* 92 (4), 103-113.
- Hall, A.C., Young, B.W., Bremner, I., 1979. Intestinal metallothionein and the mutual antagonism between copper and zinc in the rat. *J. Inorg. Biochem.* 11, 57.
- Hamaguchi, R.A., 1999. Innovative reclamation research at Highland Valley Copper. Technical Paper. *CIM Bulletin.* 92 (1033), 78-84.
- Hamar, D., Bedwell, C.L., 1997. Iatrogenic copper toxicosis induced by administering copper oxide boluses to neonatal calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9(4), 441-443.
- Hamilton, S.J., Mehrle, P.M., Jones, J.R., 1987. Evaluation of metallothionein as a biological indicator of stress from cadmium on brook trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 116, 551-560.
- Hanlon, J., Monks, E., Hughes, C., Weavers, E., Rogers, M., 2002. Metallothionein in bovine spongiform encephalopathy. *J. Comp. Pathol.* 127(4), 280-289.
- Haralambie, G., Kreul, J., 1970. Das Verhalten von Serum-Coeruloplasmin und Kupfer bei langdauernder Koeperbelastung. *Arzneimittel-Forsch* 24, 112-115.
- Harris, E.D., 2000. Cellular copper transport and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 20, 291-310.
- Harris, E.D., 2001. Copper homeostasis: The role of cellular transporters. *Nutr. Rev.* 59(9), 281-285.
- Harris, Z.L., Gitlin, J.D. 1996. Genetic and molecular basis for copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 836S-841S.
- Harrison, M.D., Dameron, C.T., 1999. Molecular mechanism of copper metabolism and the role of the Menkes disease protein. *J. Biochem. Molecular Toxicol.* 13(2), 93-105.
- Harrison, M.D., Jones, C.E., Dameron, C.T. 1999. Copper chaperones: function, structure, and copper-binding proteins. *JIBS* 4, 145-153.
- Hart, E.B., Steenbock, H., Waddell, J., Elvehjem, C.A., 1928. Iron in nutrition. 7 Copper as a supplement to iron haemoglobin building in the rat. *J. Biol. Chem.* 77, 797-812.
- Harter, R.D., 1979. Adsorption of copper and lead by Ap and B2 horizons of several Northeastern United States Soils. *Soil Sci. Am. J.* 43, 679.
- Hartman, F., van Ryssen, J.B.J., 1997. Metabolism of selenium and copper in sheep with and without sodium bicarbonate supplementation. *J. Agr. Sci.* 128, 357-364.
- Hartman, H.J., Weser, U., 1977. Copper-thionein from fetal bovine liver. *Biochem. Biophys. Acta.* 491, 211-222.

- Hayness, R.J., 1997. Micronutrient status of a group of soils in Canterbury, New Zealand, as measured by extraction with EDTA, DPTA y HCl, and its relationship with plant response to applied Cu and Zn. *J. Agr. Sci.* 129, 325-333.
- Haywood, S., Muller, T., Muller, W., Heinz-Erian, R., Tanner, M.S., Ross G., 2001. Copper-associated liver disease in North Ronaldsy sheep: A possible animal model for non-Wilsonian hepatic copper toxicosis of infancy and childhood. *J. Pathol.* 195(2), 264-269.
- Herbert, E., Small, J.N. W., Jones, D.G., Suttle, N.F., 1991. Evaluation of superoxide dismutase assays for the routine diagnostic assessment of copper status in blood samples. En: Momcilovic, B. (ed.) *Proceedings of the 7th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals*, Dubrovnik. IMI, Zagreb, pp. 5-15-5-16.
- Herd, D.B., 1990. Minerals-Does your supplement Program Need Fine Tuning pp. 130-139. *Limousin World*.
- Hidiroglou, M., Heaney, D.P., Martin, K.E., 1984. Copper poisoning in a flock of sheep. Copper excretion patterns after treatment with molybdenum and sulphur or penicillamine. *Can. Vet. J.* 25, 377-382.
- Hill, C.H., Matrone, G., Payne, W.L., Barber, C.W., 1963. In vivo interactions of cadmium with copper, zinc and iron. *J. Nutr.* 80, 227.
- Hill, C.H., Matrone, G., 1970. Chemical parameters in the study of in-vivo and in-vitro interactions of transitions elements. *Fed. Proc.* 29, 1474.
- Horn, N., Tumer, Z., 1999. Molecular genetics of intracellular copper transport. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 12(4), 297-313.
- Howel, J.McC., Gooneratne, R.S., 1987. The pathology of copper toxicity in animals. En: Howel, J.McC., Gawthorne, J.M. (eds.). *Copper in Animals and Man*, vol. II. CRC Press, Florida, pp. 53-78.
- Howell, J.McC., Kumaratilake, J.S., 1985. Observations on the morphological distribution of Cu loaded and necrotic hepatic parenchymal cells during the development of chronic copper poisoning in sheep. En: *Proc 5th Int Symp on Trace Element Metabolism in Man and Animals*. Mill, C.F. Bremner, J. and Chesters, J.K. (eds). Commonwealth Agricultural Bureaux, Farham Royal. U.K., 184.
- Humann-Ziehanke, E., Coenen, M., Ganter, M., Bickhardt, K., 2001. Long-term observation of subclinical chronic copper poisoning in two sheep breeds. *J. Vet. Med. A.* 48(7), 429-439.
- Humphries, B., 1989. Treatment for copper poisoning. *Agric. Food Res.* Feb. 8,8.
- Humphries, W.R., Phillippo, M., Young, B.W., Bremner, I., 1983. The influence of dietary iron and molybdenum on copper metabolism in calves. *Br. J. Nutr.* 49, 77-86.
- Humphries, W.R., Morrice, P.C., Bremner, I., 1988. A convenient method for the treatment of chronic copper poisoning in sheep using subcutaneous ammonium tetrathiomolybdate. *Vet. Rec.* 123, 51-53.
- Humphreys, D. J., 1990. *Toxicología veterinaria*. 3^a ed. Ed. McGraw-Hill-Interamericana, Buenos Aires. pp. 17-85.
- Hunt, C.E., Landesman, J., Newberne, P.M., 1970. Copper deficiency in chicks: effects of ascorbic acid on iron, copper, cytochrome oxidase activity, and aortic mucopolysaccharides. *Br. J. Nutr.* 24, 607-614.
- Hussein K. S.M., Jones, B-E.V., Frank, A., 1985. Selenium copper interaction in goats. *Zbl.Vet. Med. A.* 32, 321-330.
- Hynes, M., Woods, M., 1975. Some studies on the Metabolism of Labelled Molybdenum Compounds in Cattle. *J. Inorg. Biochem.* 24, 279-288.

- Hyvarinen, H., Nygren, T., 1993. Accumulation of copper in the liver of moose in Finland. *J. Wildlife Manag.* 57 (3), 469-474.
- Igarza, L.M., Auza, Y., 1995. Molibdeno en rumiantes: aspectos fisiológicos y tóxicos. *Arch. Med. Vet.* 27(1), 5-13.
- Ivan, M.M., 1988. The effect of faunation of rumen on solubility and liver content of copper in sheep fed low or high copper diets. *J. Anim. Sci.* 66, 1498-1501.
- Jain, R.K., Gerlowski, L.G., 1981. Kinetics of uptake, distribution, and excretion of zinc in rats. *Ann. Biomed. Eng.* 9, 347-361.
- Jamieson, S., Alcroft, R., 1950. Copper pine of calves. *Br. J. Nutr.* 4, 86.
- Janssens, A.R., Bosman, F.T., Ruiter, D.J., Van der Hamer, C.J.A., 1984. Immunohistochemical demonstration of the cytoplasmic copper-associated protein in the liver in primary biliary cirrhosis: its identification as metallothionein. *Liver.* 4, 139-147.
- Jenkins, K.J., 1989. Effect of copper loading of preruminant calves on intracellular distribution of hepatic copper, zinc, iron, and molybdenum. *J. Dairy Sci.* 72, 2346-2350.
- Jenkins, K.J., Hidioglou, M., 1989. Tolerance of the calf for excess copper in milk replacer. *J. Dairy Sci.* 72, 150-156.
- Jenkinson, S.G., Lawrence, R.A., Burk, R.F., Williams, D.M., 1982. Effects of copper deficiency on the activity of the selenoenzyme glutathione peroxidase and on excretion and tissue retention of $^{75}\text{SeO}_3^{-2}$. *J. Nutr.* 112, 197.
- Jilg, T., Unglaub, W., Eckstein, B., 1997. Influence of copper supplementation in milk replacers on the copper concentration of calf livers. *Fleischwirtschaft.* 77 (6), 559-562.
- Jobling, M.F., Huang, X., Stewart, L.R., Barnham, K., Curtain, C., Volitakis, I., Perugini, M., White, A., Cherny, R., Masters, C., Barrow, C., Collins, S., Bush, A., Cappai, R., 2001. Copper and zinc binding modulates the aggregation and neurotoxic properties of the prion peptide PrP106-126. *Biochemistry*, 40 (27), 8073-8084.
- Johnson, G.F., Morell, R., Stockert, R.J., 1981. Hepatic lysosomal copper protein in dogs with an inherited copper toxicosis. *Hepatology.* 1, 243-248.
- Johnson, M.A., Murphy, C.L., 1988. Adverse effects of high dietary iron and ascorbic acid on copper status in copper-deficient and copper-adequate rats 1-3. *Am. J. Clin. Nutr.* 47, 96-101.
- Johnson, N.C., Kheim, T., Kountz, W.B., 1959. Influence of sex hormones on total serum copper. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 102, 98-99.
- Jones, D.G., Suttle, N.F., 1981. Some effects of copper deficiency on leucocyte function in sheep and cattle. *Res. Vet. Sci.* 31, 151-156.
- Jorhem, L., Sundstrom, B., Astrand, C., Haegglund, G., 1989. The levels of zinc, copper, manganese, selenium, chromium, nickel, cobalt, and aluminum in the meat, liver and kidney of Swedish pigs and cattle. *Z. Lebensm Unters Forsch.* 188, 39-44.
- Judson, G., Brown, T.H., Gray, D., Dewey, D.W., Edwards, J.B., McFarlane, J.D., 1982. Oxidised copper wire particles for copper therapy in sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 33, 1073.
- Judson, G.J., Brown, T.H., Gray, D., Dewey, D.W., Babidge, P.J., 1984. Oxidised wire as a copper supplement for sheep: a study of some variables which may alter copper availability. *Aust. Vet. J.* 61, 294-295.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 1984. Trace elements in Soils and Plants. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Kagi, J.H.R., Vallee, B.L., 1960. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* 235, 3460-3465.

- Kegley, E.B., Spears, J.W., 1994. Bioavailability of fed-grade copper sources (oxide, sulfate or lysine) in growing cattle. *J. Anim. Sci.* 72, 2728-2734.
- Kerr, L.A., McGavin, H.D., 1991. Chronic copper poisoning in sheep grazing pastures fertilized with swine manure. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198, 99-101.
- Khan, A.T., Diffay, B.C., Forester, D.M., Thompson, S.J., 1995. Trace element concentrations in tissues of goats from Alabama. *Vet. Human Toxicol.* 37(4):327-329.
- Kitano, S., 1980. Membrane and contractile of rat vascular tissue in copper-deficient conditions. *Circ. Res.* 46, 681.
- Klauder, D.S., Murthy, L., Petering, H.G., 1972. Effect of dietary intake of lead acetate on copper metabolism in male rats. En: *Trace Substances in Environmental Health*. Hemphill, DD (ed). University of Missouri Press, Columbia. vol 11, 131.
- Knudsen, C.B., Bjornsdottir, I., Jons, O., Honoré Hansen, S., 1998. Detection of metallothionein isoforms from three different species using on-line capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 265, 167-175.
- Koh, T.S., Judson, G.J., 1986. Trace elements in sheep grazing near a lead-zinc smelting complex at Port Pirie, South Australia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 87-95.
- Koh, T.S., Judson, G.J., 1987. Copper and selenium deficiency in cattle: an evaluation of methods of oral therapy and an observation of a copper-selenium interaction. *Vet. Rec.* 11, 133-148.
- Korte, C.J., Smith, D.R., Deaker, J.M., Scotland, T., Willimott, M., 1996. Copper and sulphur deficiencies and interactions with others factors in the Wairoa Region. Unpublished survey report to New Zealand meat Research and Development Council, Wellington.
- Kottferová, J., Koréneková, B., 1995. The effect of emissions on heavy metals concentrations in cattle from the area of an industrial plant in Slovakia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 29, 400-405.
- Kottferová, J., Koréneková, B., 1997. Comparison of the occurrence of risk elements in bulls and dairy cows coming from the fallout region of a metallurgical plant on the territory of Slovakia. *Archiv fur Tierzucht.* 40(4), 309-316.
- Kramer, H.L., Steiner, J.W., Vallely, P.J., 1983. Trace element concentration in the liver, kidney and muscle of Queensland cattle. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 30, 588-594.
- Krebs, H.A., 1928. Über das kupfer in menschlichem Blutserum *Klin Wochschr* 7, 584-585.
- Kreuzer, W., Kracke, W., Sansoni, B., Wissmath, P., 1978. Untersuchungen über den Blei (lead) und Cadmium (cadmium) gehalt in Fleisch und Organen von Schkachtirndern. 1. Rinder aus eienm wenig umweltbelasteten Gebiet. *Fleischwirtsch.* 6, 1022-1030.
- Kumaratilake, J.S., Howell, J.McC., Gooneratne, S.R., 1981. Blood copper sorbitol dehydrogenase and acid phosphatase in copper poisoning. En: *Proc. 4th Int. Symp. On Trace Element Metabolism in Man and Animals*. Howell, J. McC. Gawthorne, J.M., White, C.L. (eds). Australian Academy of Sciences, Canberra, 457.
- Kumaratilake, J.S., Howell, J.McC., 1987. Histochemical study of the accumulation of copper in the liver of sheep. *Res. Vet. Sci.* (42), 73-81.
- Kumaratilake, J.S., Howell, J.McC., 1989. Intracellular distribution of copper in the liver of copper-loaded sheep-a subcellular fractionation study. *J. Comp. Path.* 101, 161-176.
- L'Herroux, L.L., Le Roux, S., Appriou, P., Martinez, J., 1997. Behaviour of metals following intensive pig slurry applications to a natural field treatment process in Brittany (France). *Environ. Pollut.* 97(1-2), 119-130.
- Ladefoged, O., Stürup, S., 1995. Copper deficiency in cattle, sheep and horses caused by excess molybdenum from fly ash: A case report. *Vet. Human Toxicol.* 37(1), 63-65.

- Lahey, M.E., Gubler, C.J., Chase, M.S., Cartwright, G.E., Wintrobe, M.M., 1952. Studies on copper metabolism. II. Hematologic manifestations of copper deficiency in swine. *Blood*. 7, 1053.
- Langlands, J.P., Donald, G.E., Smith, A.J., 1987. Analysis of data collected in a residue survey: copper and zinc concentrations in liver, kidney and muscle in Australian sheep and cattle. *Aust. J. Exp. Agric.* 27:485-491.
- Larson, B.L., Arthington, J., Corah L.R., 1995. Recognizing and treating copper imbalances in cattle. *Vet. Med.* 90(6), 613-619.
- Lavín, S., 1986. Contribución al estudio de la carencia subclínica de cobre y cinc en ganado vacuno de montaña. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
- Lavín, S., Monreal, L., Abad, M., Fernández, L., 1987. Niveles de cobre en plasma y pelo de ganado vacuno en diferentes estados productivos. *Med. Vet.* 4(9), 415-420.
- Ledoux, D.R., Henry, P.R., Ammerman, C.B., 1996. Response to high dietary copper and duration of feeding time on tissue copper concentration in sheep. *Nutr. Res.* 16(1), 69-78.
- Lee, G.R., Nacht, S., Lukens, J.N., Cartwright, G.E., 1968. Iron metabolism in copper deficient swine. *J. Clin. Invest.* 47, 2058-2069.
- Lee, H.J., Jones, G.B., 1976. Interaction of selenium, cadmium and copper in sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 27, 447-452.
- Lewis, N.J., Fallah-Rad, A.H., Connor, M.L., 1997. Copper toxicity in confinement-houses ram lambs. *Can. Vet. J.* 38, 496-498.
- Licata, P., Trombetta, D., Cristani, M., Giofrè, F., Martino, D., Calò, M., Naccari, F., 2004. Levels of "toxic" and "essential" metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. *Environ. Int.* 30(1), 1-6.
- Linder, M.C., Zerounian, N.R., Moriya, M., Malpe, R., 2003. Iron and copper homeostasis and intestinal absorption. *Biometals.* 16(1), 145-160.
- Lindquist, R.R., 1968. Studies on the pathogenesis of hepatolenticular degeneration. III. The effect of copper on rat liver lysosomes. *Am. J. Pathol.* 53, 903-922.
- Littledike, E.T., Young, L.D., 1993. Effect of sire and dam breed on copper status of fat lambs. *J. Anim. Sci.* 71(3), 774-778.
- Littledike, E.T., Wittan, T.E., Jenkins, T.G., 1995. Effect of breed, intake and carcass composition on the status of several macro and trace minerals of adult beef cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 2113-2119.
- Livesey, C.T., 2002. Investigation of copper poisoning in adult cows by veterinary laboratories agency. *Cattle Practice.* 10, 289-294.
- Loneragan, J.F., 1981. Distribution and movement of copper in plants. En: *Copper in Soils and Plants*. Loneragan, J.F.; Robson, A.D., Graham, R.D. (eds). Academic Press, New York, 165.
- López Alonso, M., 1999. Estudio de los principales elementos contaminantes en ganado vacuno de Galicia. Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela.
- López Alonso, M., Benedito, J.L., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Shore, R., 2000a. Arsenic, cadmium, lead, copper and zinc in cattle from Galicia, NW Spain. *Sci. Total Environ.* 246, 237-248.
- López Alonso, M., Benedito, J.L., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Shore, R., 2000b. The effect of pig farming on copper and zinc accumulation in cattle in Galicia (North-Western Spain). *Vet. J.* 160, 259-266.

- López Alonso, M., Benedito, J.L., Miranda, M., Hernández, J., Shore, R.F., 2002. Interactions between toxic and Essential Trace Metals in Cattle from a Region with Low Levels of Pollution. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 165-172.
- López Alonso, M., Prieto Montaña, F., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L., 2004a. Interactions between toxic (As, Cd and Pb) and nutritional essential (Ca, Co, Cr, Mn, Mo, Ni, Se, Zn) elements in the tissues of cattle from NW Spain. *BioMetals.* 17, 389-397.
- López Alonso, M., Prieto, F., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L., 2004b. The role of metallothionein and zinc in hepatic copper accumulation in cattle. *Vet. J.* (in press).
- Loué, A., 1988. Los microelementos en Agricultura. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 107-154.
- Luza, S.C., Speiky, H.C., 1996. Liver copper storage during development: Implications for cytotoxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 63(3), S812-820.
- Lynne, L., Charmley, H., Symonds, W., Mallinson, C.B., 1982. The clearance of copper from the plasma of cattle and its excretion in bile during the intravenous infusion of copper sulphate solutions. *Proc. Nutr. Soc.* 41, 81A.
- Ma, W., 1996. Lead in mammals. En: Beyer, W.N.; Heinz, G.H.; Redmon-Norwood, A.W. (eds). *Environmental contaminants in wildlife. Interpreting tissue concentrations.* SETAC Special Publication Series. CRC. Lewis Publishers, New York. pp. 281-296.
- Maiorka, P.C., Massoco, C.O., 1998. Copper Toxicosis in Sheep: A Case Report. *Vet. Human Toxicol.* 40 (2), 99-100.
- Margoshes, M., Vallee, B. L., 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813-4814.
- Mason, R.F., Brady, F.O., Webb, M., 1981. Metabolism of zinc and copper in the neonate: accumulation of Cu in the gastrointestinal tract of the newborn rat. *Br. J. Nutr.* 45, 391-399.
- Mattioli, G.A., Ramírez, C.E., Giuliadori, M.J., Tittarelli, C.M., Yano, H., Matsui, T., 1996. Characterization of cattle copper deficiency in the Magdalena district. *Livest. Prod. Sci.* 47, 7-10.
- McMurray, C.H., 1980. Copper deficiency in ruminants. En: *Biological Roles of copper.* Ciba Foundation 79 (New Series) Elsevier, New York, 183-207.
- McAllister, J.S.V., 1976. Studies in Northern Ireland on problems related to the disposal of slurry. *Agric. Water Qual.* 418-431.
- McArdle, H., 1992. The transport of iron and copper across the cell membrane: different mechanism for different metals. *Proc. Nutr. Soc.* 51, 199-209.
- McAuslan, B.R., Hannan, G.N., Reilly, W., Wittaker, R.G., Florence, M., 1980. Reappraisal of evidence for the role of copper in angiogenesis. En: *Symp. On the Importance of Copper in Biology and Medicine.* McAuslan, B.R., (ed). C.S.I.R.O., Canberra, 42.
- McFarlane, J.D., Judson, J.D., Gouzos, J., 1990. Copper deficiency in ruminants in the South East of Australia. *Aust. J. Agri. Res.* 30, 187-193.
- McFarlane, J.D., Judson, J.D., Turnbull, R.K., Kempe, B.R., 1991. An evaluation of copper-containing soluble glass pellets, copper oxide particles and injectable copper as supplements for cattle and sheep. *Aust. J. Exp. Agric.* 31, 165-174.
- McKee, D.J., Frieden, E., 1971. Binding of transition metal ions by ceruloplasmin (ferroxidase). *Biochemistry.* 10, 3880-3883.
- McPherson, A., Hemingway, R.G., 1965. Effects of protein intake on the storage of copper in the liver of sheep. *J. Sci. Food Agric.* 16, 220-227.
- McPherson, A., 1983a. Oral treatment on trace element deficiencies in ruminant livestock. En: *Trace Elements in Animal Production and Veterinary Practice.* Suttle, N.F.; Gunn, R.G.;

- Allen, W.M.; Linklater, K.A., Wiener, G. (eds). Occasional Publications No.7, British Society for Animal Production, 93.
- McPherson, A., 1983b. Copper oxide wire for the bovine. En: Trace elements in Animal Production and Veterinary Practice. Suttle, N.F.; Gunn, R.G.; Allen, W.M.; Linklater, K.A.; Wiener, G. (eds). Occasional of Publication, No.7. British Society for Animal Production, Edinburg, 140.
- McPherson, A., Milne, E.M., MacPherson, A.J., 1997. Copper poisoning in ewes. *Vet. Rec.* 141, 631.
- Mehra, R.K., Bremner, I., 1984. Species differences in the occurrence of copper-metallothionein in the particulate fractions of the liver of copper-loaded animals. *Biochem. J.* 219, 539-546.
- Mercer, J., Barnes, N., Stevenson, J., Strausak, D., Llanos, R.M., 2003. Copper-induced trafficking of the Cu-ATPases: a key mechanism for copper homeostasis. *Biometals*, 16(1): 175-184.
- Mercer, J.F.B., 1997. Gene regulation by copper and the basis for copper homeostasis. *Nutrition*. 13(1), 48-49.
- Mercer, J.F.B., 2001. The molecular basis of copper-transport diseases. *Trends Mol. Med.* 7(2), 64-69.
- Michaelson, I.A., Sauerhoff, M.W., 1973. The effect of chronically ingested inorganic lead on brain levels of Fe, Zn, Cu and Mn of 25-day old rats. *Life Sci.* 13, 417.
- Miller, J.K., Ramsey, N., Madsen, F.C., 1993. Elementos vestigiales. En: *El Rumiante: fisiología digestiva y nutrición*. Church, C.D. (ed). Zaragoza: Acribia, 391-457.
- Mills, C.F., 1954. Copper complexes in grassland herbage. *Biochem. J.* 57, 603-610.
- Mills, C.F., 1956. Studies on the copper compounds in aqueous extracts of herbage. *Biochem. J.* 63, 187-190.
- Mills, C.F., Dalgarno, A.C., 1972. Copper and zinc status of ewes and lambs receiving increased dietary concentration of cadmium. *Nature*. 239, 171.
- Mills, C.F., Dalgarno, A.C., Wenham, G., 1976. Biochemical and pathological changes in tissues of Frisian cattle during the experimental induction of copper deficiency. *Br. J. Nutr.* 35, 309.
- Milltimore, J.E., Mason, J.L., 1971. Copper to molybdenum ratio and molybdenum and copper concentrations in ruminants feeds. *Canadian J.An. Sci.* 51, 193-200.
- Minatel, L., Carfagnini, J.C., 2002. Evaluation of the diagnostic value of plasma copper levels in cattle. *Prev. Vet. Med.* 53(1-2), 1-5.
- Minson, D.J., 1990. Copper. En: *Forage in Ruminant Nutrition*. Academic Press, Sydney. 316-324.
- Miranda, M., 1999. Estudio de los principales elementos contaminantes en ganado vacuno de Asturias. Tesis doctoral, Universidade de Santiago de Compostela.
- Miranda, M., López Alonso, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L., 2000. Effect of sex on arsenic, cadmium, lead, copper and zinc accumulation in calves. *Vet. Human Toxicol.* 42(5):265-268.
- Miranda, M., López Alonso, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L., 2004. Effects of pollution on toxic and trace metal levels in calves from a polluted area of northern Spain. *Environ. Int.* (In press).
- Miyajima, H., Takahashi, Y., Kono, S., 2003. A ceruloplasminemia, an inherited disorder of iron metabolism. *Biometals*. 16(1), 205-213.
- Mulhern, S.A., Koller, L.D., 1988. Severe or marginal copper deficiency results in a graded reduction of the mimime status in mice. *J. Nutr.* 118, 1041-1047.

- Mullis, L.A., Spears, J.W., McCraw, R.L., 2003. Effects of breed (Angus vs Simmental) and copper and zinc source on mineral status of steers fed high dietary iron. *J. Anim. Sci.* 81(1), 318-322.
- National Research Council, 2000. Subcommittee on mineral toxicology in animals mineral tolerance of domestic animals. National Academic of Sciences, Washington DC.
- Nederbragt, H., van den Ingh, T.S.G.A.M., Wensvoort, P., 1984. Pathobiology of copper toxicity. *Vet. Q.* 6, 179-235.
- Nicholson, F.A., Chambers, B.J., Williams, J.R., Unwin, R.J., 1999. Heavy metals content of livestock feeds and animal manures in England and Wales. *Bioresour. Technol.* 70, 23-31.
- Nicholson, J.K., Osborn, D., Kendall, M.D., 1984. Comparative distributions of zinc, cadmium, and mercury in the tissues of experimental mice. *Comp. Biochem. Physiol.* 77(2), 249-256.
- Nordberg, M. y Nordberg, G.F., 2000. Toxicological aspects of metallothionein. *Cel. Mol. Biol.* 46 (2), 451-463.
- O'Leary, J.A., Spellacy, W.N., 1968. Serum copper alteration after ingestion of an oral contraceptive. *Science.* 162, 682.
- Oh, S.H., Deagan, J.T., Whanger, P.D., Weswig, P.H., 1978. Biological function of metallothionein. Its induction in rats by serious stresses. *Am. J. Physiol.* 234 3, E282-E285.
- Opazo, C., Barría, M.I., Ruiz, F.H., Inestrosa, N.C., 2003. Copper reduction by copper binding and its relation to neurodegenerative diseases. *Biometals.* 16(1), 91.
- Oshiro, S., Nozawa, K., Hori, M., Zhang, C., Hashimoto, Y., Kitajima, S., 2002. Modulation of iron regulatory protein-1 by various metals. *Biochem. Biophys. Res.* 290, 213-218.
- Oskarsson, A., Norrgren, L., 1998. Copper pipes as a source of copper exposure in man and environment. *Environ. Rev.* 6, 139-150.
- Parkinson, R.J., Yells, R., 1985. Copper content in soil and herbage following pig slurry application to grassland. *J. Agric. Sci.* 105, 183-185.
- Patel, B.N., Dunn, R.J., David, S., 2000. Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain. *J. Biol. Chem.* 275, 4305-4310.
- Paynter, D.I. 1980. The role of dietary copper, manganese, selenium and vitamin E in lipid peroxidation in tissues of the rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 2,121.
- Pena, M.M.O., Lee, J., Thiele, D.J., 1999. A delicate balance: Homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.*, 129(7), 1251-1260.
- Perrin, D.J., Schiefer, B., Blakley, B.R., 1990. Chronic copper toxicity in a dairy herd. *Can. Vet. J.* 31, 629-632.
- Petering, H.G., 1980. The influence of dietary zinc and copper on the biological effects of orally ingested lead in the rat. *Amn. N. Y. Acad. Sci.* 355, 298.
- Phillippo, M., 1983. The role of dose response trials in predicting trace element deficiency disorders. En: *Trace Elements in Animal Production and Veterinary Practice.* Suttle, N.F., Gunn, R.G., Allen, W.M., Winklatter, K.A. y Wiener, G. (eds). Occasional publication of the British Society of Animal Production. Edinburgh. 7, 51-59.
- Phillippo, M., Graca, D.S., 1983. Biliary copper secretion in cattle. *Proc. Nutr. Soc.* 42, 46A.
- Phillippo, M., Humphries, W.R., Lawrence, C.B., Price, J., 1982. Investigation of the effect of copper therapy on fertility in beef suckler herds. *J. Agr. Sci.* 99, 359-364.
- Piscator M., 1979. Copper. En: *Friberg L, Piscator M, Nordberg G, Vouk VB. (eds). Handbook on the Toxicology of Metals.* Elsevier, Amsterdam, pp. 411-420.

- Poole, D.B.R., McGrath, D., Fleming, G.A., Moore, W., 1990. Effects of applying copper-rich pig slurry to grassland. *Irish. J. Agr. Res.* 29, 34-40.
- Porter, H., Wiener, W., Barker, M., 1961. The intracellular distribution of copper in immature liver. *Biochem. Biophys. Acta.* 52, 419-423.
- Porter, H., 1964. Tissue copper proteins in Wilson's disease. *Arch. Neurol.* 11, 341-349.
- Poulsen, H.D., 1998. Zinc and copper as feed additives, growth factors or unwanted environmental factors. *J. Anim. Feed Sci.* 7, 135-142.
- Price, J., Chesters, J.K., 1985. A new bioassay for assessment of copper bioavailability and its application in a study of the effect of molybdenum on the distribution of available copper in ruminant digesta. *Br. J. Nutr.* 53, 323-336.
- Prohaska, J.R., Heller, L.J., 1982. Mechanical properties of the copper-deficient rat heart. *J. Nutr.* 112, 2142.
- Prohaska, J.R., Bailey, W.R., 1995. Offspring of female brindled mice fed a copper-deficient diet develop anaemia. *Fed. Proc.* 45, 235.
- Pufahl, R.A., Singer, C.P., Peariso, K.L., Lin, S.J., Schmitdt, P.J., Fahrni, C.J., Curlotta, V.C., Penner-Hahn, J.E., O'Halloran, T.V., 1997. Metal ion chaperone function of the soluble Cu (I) receptor Axl. *Science.* 278, 853-856.
- Puls, R., 1994. Mineral Levels in Animal Health, 2nd eds. Diagnostic Data, Sherpa International, Clearbook, BC, 83-109.
- Purdey, M., 2000. Ecosystems supporting clusters of sporadic TSEs demonstrate excesses of the radical-generating divalent cation manganese and deficiencies of antioxidant cofactors Cu, Se, Fe, Zn. *Med. Hypotheses.* 54 (2), 278-306.
- Quiroz-Rocha, G.F., Bouda, J., 2001. Fisiopatología de las deficiencias de cobre en rumiantes y su diagnóstico. *Vet. Méx.* 32 (4), 289-296.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W., 2002. *Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino.* Mc Graw-Hill Interamericana, 9^a ed., Madrid.
- Rahil-Khazen, R., Bolann, B.J., Ulvik, R.J., 2002. Correlations of trace elements levels within and between different normal autopsy tissues analyzed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). *BioMetals* 15, 87-98.
- Riet-Correa, F., Oliveira, J.A., Giesta, S., Schild, A.L., Méndez, M.C., 1989. Intoxicação crônica por cobre em ovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 9(3/4), 51-54.
- Riordan, J.R., Richards, V., 1980. Human fetal liver contains both zinc-and copper-rich forms of metallothionein. *J. Biol. Chem.* 255, 5380-5383.
- Ríos Granja, M.A., 1996. Contribución al estudio de la subcarencia de cobre y cinc en ganado bovino de la montaña leonesa. Tesis Doctoral, Universidad de León.
- Roeser, H.P., Lee, G.R., Cartwright, G.E., 1970. Role of ceruloplasmin (plasma ferroxidase) in hyperferremia associated with chronic inflammation and endotoxin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142, 1155-1158.
- Roth, J.A., Feng, L., Dolan, K.G., Lis, A., Garrick, M.D., 2003. Copper-binding proteins in human erythrocytes: searching for potential biomarkers of copper over-exposure. *Biometals*, 16(1), 42-50.
- Rucker, R.B., Tinker, D., 1977 Structure and metabolism elastin. En: *International Review of Experimental Pathology.* Vol.17 Richter, GW and Epstein, MA, Eds; Academic Press, New York.

- Rucker, R.B., Romero-Chapman, N., Wong, T., Lee, J., Steinberg, F.M., McGee, C., Clegg, M.S., Reiser, K., Kosonen, T., Uriu-Hare, J.Y., Murphy, J., Keen, C.L., 1996. Modulation of llsil oxidase by dietary copper in the rat. *J. Nutr.* 126, 51-60.
- Russanov, E., Banskalieva, V., Ljutakova, S., 1981. Influence of sex hormones on the subcellular distribution of copper in sheep liver. *Res. Vet. Sci.* 30, 223.
- Saenko, E.L., Yaroplov, A.I., Harris, E.D., 1994. Biological functions of caeruloplasmin expressed throught copper-binding sites. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 7, 69-88.
- Salisbury, C.D.C., Chan, W., Saschenbrecker, P., 1991. Multielement concentrations in liver and kidneys tissues from five species of Canadian slaughter animals. *J. AOAC Int.* 74(4), 587-591.
- Sansinanea, A., Cerone, S., Auza, N., 1995. Copper poisoning in sheep: the treatment with ammonium tetra-thiomolybdate. *Rev. Med. Vet.* 75, 150-154.
- Sargison, N.D., Scott, P.R., 1996. The diagnosis and treatment of chronic copper poisoning in 4- to 12- week-old single-sucked calves. *Agric. Pract. Toxicol.* 17(3-4), 36-40.
- Sato, M., Bremner, I., 1984. Biliary excretion of metallothionein and a posible degradation product in rats injected with copper and zinc. *Biochem. J.* 223, 475-479.
- Saylor, W.W., Leach, R.M., 1980. Intracellular distribution of copper and zinc in sheep: effect of age and dietary levels of the metals. *J. Nutr.* 110, 448-459.
- Seawright, A.A., 1982. Animal health in Australia. Chemical and plants poisons, Australian Burneau of animal health, Australian, Governement Publishing Service, Camberra, 157.
- Smart, M.E., 1984. Factors influencing plasma and liver copper and zinc in beef cattle. Desertion, Saskatchewan, University of Saskatchewan.
- Smart, M.E., Christensen, D.A., 1982. Is supplementation of the cow during pregnancy with copper, zinc or selenium of any benefit to the calf. *Proc. 3rd West Nutr. Cong.* 81-87.
- Smart, M.E., Cymbaluk, N.F., Christensen, D.A., 1992. A review of copper status of cattle in Canada and recomendations for supplementation. *Can. Vet. J.* 33, 163-170.
- Smith, B.S.W., Field, A.C., Suttle, N.F., 1968. Effect of intake of copper, molybdenum and sulphate on copper metabolism in sheep. III. Studies with radioactive copper in mate castrated sheep. *J. Comp. Pathol.* 78, 449-461.
- Smith, B., Woodhouse, D.A., Frazer, A.J., 1975. I fields investigations N.Z. *Vet. J.* 23: 73.
- Smith, R.M., 1980. Copper and the gronuth of the central nervous system: observations in fetal and neonatal lambs. En: *CSIRO Symp on the importance of copper in Biology and Medicine.* Mc Auslam, B.R. (ed). C.S.I.R.O., Camberra. 92. pp: 65.
- Smith, G.M., White, C.L., 1997. A molybdenum-sulfur-cadmium interaction in sheep. *Austr. J. Agric. Res.* 48, 147-154.
- Smith, R.M., Griel, L.C., Muller, L.D., Leach, R.M., Baker, D.E., 1991a. Effects of dietary cadmium chloride throughout gestation on blood and tissue metabolites of primigravid and neonatal dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 69, 4088-4096.
- Smith, R.M., Leach, R.M., Muller, L.D., Griel, L.C., Baker, D.E., 1991b. Effects of long-term dietary cadmium chloride on tissue milk and urine milk and urine mineral concentration lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 69, 4088-4096.
- Sobocinski, P.Z., Canterbury, W.J.Jr., Mapes, C.A., Dinterman, R.E., 1978. Involvement of hepatic metal lothionein in hipozincemia associated with bacterial infection. *Am. J. Physiol.* 234 (3), E399-E406.
- Soli, N.E., 1980. Chronic copper poisoning in sheep. *Nordisk Vet. Med.* 32, 75.

- Sorenson, J.R. J., 1978. An evaluation of altered copper, iron, magnesium, manganese and zinc concentrations in rheumatoid arthritis. *Inorg. Perspect. Biol. Med.* 2, 1-26.
- Spengler, S.D., 1989. PCB as acute cause of a chronic diseases in sheep. *Tieraztl Umsetran.* 48, 800-806.
- Spierenburg, T.J., De Graaf, G.N., Baars, A.J., Brus, D.H.J., Tielen, M.J.M., Arts, B.J., 1988. Cadmium, zinc, lead and copper in livers and kidneys of cattle in the neighbourhood of zinc refineries. *Environ. Monit. Asses.* 11, 107-114.
- Steffen, D.J., Carlson, M.P., Casper, H.H., 1997. Copper toxicosis in suckling beef calves associated with improper administration of copper oxide boluses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9(4), 443-446.
- Sternlieb, I., 1980. Copper and liver. *Gastroenterology* .78, 1615-1628.
- Sugawara, N., Sugawara, C., 1984. Comparative study of effect of acute administration of cadmium and silver on ceruloplasmin and metallothionein: involvement of disposition of copper, iron, and zinc. *Environ. Res.* 35, 507-515.
- Sugawara, N., Sugawara, C., 1987. Relationship between ceruloplasmin and Cu status involving metallothionein induced by several heavy metals in the mouse. *Arch. Toxicol.* 59, 432-436.
- Sullivan, J.M., Janovitz, E.B., Robinson, F.R., 1991. Copper toxicosis in veal calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 161-164.
- Sutherland, R.J., Deol, H.S., Hood, P.J., 1992. Changes in plasma bile acids, plasma amino acids, and hepatic enzymes as indices of functional impairment in liver-damaged sheep. *Vet. Clin. Pathol.* 21(2), 51-56.
- Suttle, N.F., 1981. Comparison between parenterally administered copper complexes of their ability to alleviate hypocupraemia in sheep and cattle. *Vet. Rec.* 109, 304-307.
- Suttle, N.F., 1983a. Effects of molybdenum concentration in fresh herbage, hay and semi-purified diets on the copper metabolism of sheep. *J. Agr. Sci.* 100, 651-656.
- Suttle, N.F., 1983b. Assessing the mineral and trace element status of feeds. En: *Proceeding of the second symposium of the international Network of Feed Information Centres.* Robards, GE; Packham, RG (eds). Commonwealth. Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK. 211-237.
- Suttle, N.F., 1986. Copper deficiency in ruminants: recent developments. *Vet. Rec.* 119, 519-422.
- Suttle, N.F., 1987. The nutritional requirement for copper in animals and man. En: *Copper in Animals and Man.* Howell, JMcC. And Gawthorne, J.M. (eds). CRC Press, Boca Raton, Florida 1, 21-44.
- Suttle, N.F., 1991. The interactions between copper, molybdenum and sulphur in ruminant nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 11, 121-140.
- Suttle, N.F., 1994. Meeting the copper requirements of ruminants. En: *Garnyworthy, P.C.; Cole, D.J.A. (eds). Recent Advances in Animal Nutrition.* Nottingham University Press, Nottingham. 173-188.
- Suttle, N.F., 2003. Differential diagnosis of micronutrient-responsive disorders in beef suckler herds. *Cattle Pract.* 11, 161-166.
- Suttle, N.F., Field, A.C., Barlow, R.M., 1970. Experimental copper deficiency in sheep. *J. Comp. Pathol.* 80, 151.
- Suttle, N.F., Angus, K.W., 1976. Experimental copper deficiency in the calf. *J. Comp. Pathol.* 86, 595-608.

- Suttle, N.F., Angus, K.W., 1978. Effects of experimental copper deficiency on the skeleton of the calf. *J. Comp. Pathol.* 88, 135-145.
- Suttle, N.F., McMurray, C.H., 1983. Use of erythrocyte copper: Zinc superoxide dismutase activity and hair or free concentrations in the diagnosis of hypocuprosis in ruminants. *Res.Vet. Sci.* 35, 47-52.
- Suttle, N.F., Abrahams, P., Thornton, I., 1984. The role of a soil X dietary sulphur interactions in the impairment of copper absorption by ingested soil in sheep. *J. Agric. Sci.* 103, 81.
- Suttle, N.F., Peter, D.W., 1985. Rumen sulphide metabolism as a major determinant of copper availability in the sheep's diet. En: *Proc. 5th. Int. Symp. On Trace Element Metabolism in Man and Animals.* Mills, C.F.; Bremner, I.; Chesters, J.K. (eds). Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, U.K. 367.
- Suttle, N.F., Bremner, J., 1996. A comparison of the availability of copper in copper: lysine and copper sulphate for sheep. *An. Sci.* 62, 690.
- Suttle, N.F., MacPherson, A., Phillips, P., Wright, C.C., 1999. The influence of trace elements status on the pre-weaning growth of lambs on improved hill pastures in Scotland. I. Copper, molybdenum, sulphur and iron. *J. Agr. Sci.* 10, 125-129.
- Suttle, N.F., Lewis, R.M., Smal, N.W., 2002. Effects of breed and family on rate of copper accretion in the liver of purebred Charollais, Suffolk and Texel lambs. *An. Sci.* 75, 295-302.
- Tahvonen, R., Kumpulainen, J., 1994. Lead and cadmium contents in pork beef and chicken and in pig cow liver in Finland during 1991. *Food Addit. Contam.* 11, 415-426.
- Taylor, G.G., Bettger, W.J., Bray, T.M., 1988. Effect of dietary zinc or copper deficiency on the primary free radical defence system in rats. *J. Nutr.* 118, 613-621.
- Terao, T., Owen, C.A., 1977. Nature of copper compounds in liver supernates and bile of rats: studies with ⁶⁷Cu. *Am. J. Physiol.* 224, 682-6.
- Terres-Martos, C., Navarro-Alarcon, M., Martin-Lagos, F., Lopez de la Serrana, H., Lopez Martinez, M.C., 1997. Determination of copper levels in serum of healthy subjects by atomic absorption spectrometry. *Sci. Total Environ.* 198, 97-103.
- Tessman, R.K., Lakritz, J., Tyler, J.W., Casteel, S.W., Willians, J.E., Dew, R.K., 2001. Sensitivity and specificity of serum copper determination for detection of copper deficiency in feeder calves. *JAVMA.* 218(5), 756-760.
- Thompson, K.G., Audige, L., Arthur, D.G., Juhan, A.F., Orr, M.B., McSpornan, K.D., Wilson, P.R., 1994. Osteochondrosis associated with copper deficiency in young farmed red deer and wapiti X red deer hybrids. *N. Z. Vet. J.* 42, 137-143.
- Tokarnia, C.H.; Dobereiner, J., Peixoto, P.V., Moraes, S.S., 2000. Outbreak of copper poisoning in cattle fed poultry litter. *Vet Human Toxicol.* 42(2), 92-95.
- Tremblay, R.R.M., Baird, J.D., 1991. Chronic copper poisoning in two holstein cows. *Cornell Vet.* 81, 205-213.
- Underwood, E.J., Suttle, N.F., 2002. Los minerales en la nutrición del ganado. Editorial Acribia S.A. Zaragoza.
- Van Campen, D.R., Scaife, P.U., 1967. Zinc interference with copper absorption in rats. *J. Nutr.* 91, 473.
- Van der Berg, R., Levels, F.H., van der Schee, W., 1983. Breed differences in sheep with respect to the accumulation of copper in the liver. *Vet. Q.* 5, 26-31.
- Van der Schree, S., Van der Berg, S., 1983. Levels of enzyme activities in blood serum as indicators of a high copper status in sheep flocks. *Zbl.Vet. Med. A,* 30, 664-673.
- Van der Watt, H.v.H., Summer, M.E., Cabrera, M.L., 1994. Bioavailability of copper, manganese, and zinc in poultry litter. *J. Environ. Qual.* 23, 43-49.

- Van Ryssen, J.B.J., Barrowman, P.R., 1987. Effect of ionophores on the accumulation of copper in the livers of sheep. *Anim. Prod.* 44, 255-261.
- Van Wyk, J.J., Baxter, J.H., Akeroyd, J.H., Motulsky, A.G., 1953. The anaemia of copper deficiency in dogs compared with that produced by iron deficiency. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 93, 41.
- Vasak, M., 1991. Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. En: *Methods in Enzymology*. Abelson, JN; Simon, MI (eds). Academic, San Diego CA, USA. 452-458.
- Vermunt, J.J., West, D.M., 1994. Predicting copper status in beef cattle using serum copper concentrations. *N. Z. Vet. J.* (42), 194-195.
- Vilafranca, M., 1997. Gestión y tratamiento de los purines en porcino. *Producción Animal*. 125, 38-47.
- VLA Surveillance Report, 2001. July sees an increased incidence of copper poisoning in cattle. *Vet. Rec.* 149, 257-260.
- Vos, G., Hovens, J.P.C., Van Delft, W., 1987. Arsenic, cadmium, lead and mercury in livers and kidneys of cattle slaughtered in The Netherlands during 1980-1985. *Food Addit. Contam.* 4, 73-88.
- Wada, Y., Kajiwara, W., Kato, A., 1995. Wilson's disease-like lesion in a calf. *Vet. Pathol.*, 32, 538-539.
- Ward, S.G., 1993. Effect of copper level and source (copper lysine vs copper sulphate) on copper status, performance, and immune response in growing steer fed diets with or without supplemental molybdenum and sulphur. *J. Anim. Sci.* 71, 2748-2755.
- Weast, R.C., 1978. *CRC Handbook of chemistry and physics*. 59th edition, CRC Press. Boca Raton. Florida.
- Weaver, D.M., Tyler, J.W., Marion, R.S., Castell, S.W., Loiacono, C.M., Turk, J.R., 1999. Subclinical copper accumulation in llamas. *Can. Vet. J.* 40, 422-424.
- Webb, M., 1972. Binding of cadmium ions by rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 2751-2765.
- Webb, M., 1979. *The chemistry, biochemistry and biology of cadmium*. Topics in environmental health. Vol. 2. Ed. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 195-266.
- Wentink, G.H., Wensing, T., Baars, A.J., van Beek, H., Zeeuwen, A.A.P.A., Schotman, A.J.H., 1988. Effects of cadmium on some clinical and biochemical measurements in heifers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 131-138.
- Wentink, G.H., Smolders, G., Boxem, T., Wensing, T., Muller, K.E., Van den Top, A.M., 1999. Lack of clinical abnormalities in dairy heifers with low blood and liver copper levels. *Vet. Rec.* 145, 258-259.
- Whanger, P.D., Weswig, P.H., 1970. Effects of some copper antagonistic on induction of ceruloplasmin in the rat. *J. Nutr.* 100, 341-348.
- Whanger, P.D., Weswig, P.H., 1971. Effect of supplementary zinc on the intracellular distribution of hepatic copper in rats. *J. Nutr.* 101, 1093-1098.
- Whitelaw, A., Russel, A.J.F., Armstrong, R.H., Evans, C.C., Fawcett, A.R., 1983. Studies in the prophylaxis of induced copper deficiency in sheep grazing resseeded hill pastures. *Anim. Prod.* 37, 441-448.
- Whitelaw, A., Fawcett, A.R., McDonald, A.J., 1984. Cupric oxide needles in the bovine hypocuprosis. *Vet. Rec.* 115, 357.
- Wiener, G., Suttle, N.F., Field, A.C., Herbert, J.G., Woolliams, J.A., 1978. Breed differences in copper metabolism in sheep. *J. Agr. Sci. Cambridge* 91, 433-441.

- Wiener, G., Wilmut, I., Woolliams, C., Woolliams, J.A., Field, A.C., 1984a. The role of the breed of lamb in determining the copper status of the lamb. 1. Under a dietary regime low in copper. *Anim. Prod.* 39, 207-217.
- Wiener, G., Wilmut, I., Woolliams, C., Woolliams, J.A., Field, A.C., 1984b. The role of the breed of lamb in determining the copper status of the lamb. 2. Under a dietary regime moderately high in copper. *Anim. Prod.* 39, 219-227.
- Wikse, S.E., Herd, D., Field, R., Holland, P., 1992. Diagnosis of copper deficiency in cattle. *JAVMA.* 200 (11), 1625-1629.
- Wilkinson, J.M., Hill, J., Livesey, C.T., 2001. Accumulation of potentially toxic elements in the body tissues of sheep grazed on grassland given repeated applications of sewage sludge. *An. Sci.* 72, 179-190.
- Willians, B., 1993. *Biostatistics: concepts and applications for biologist.* 1st ed. Chapman & Hall, London.
- Wittenberg, K.M., Boila, R.J., Shariff, M.A., 1990. Comparison of copper sulfate and copper proteinate as copper sources for copper-depleted steers fed high molibdenum diets. *Can. J. An. Sci.* 70, 895-904.
- Woolliams, J.A., Suttle, N.F., Wiener, G., Field, A.C., Woolliams, C., 1982. The effect of breed of sire on the accumulation of copper in lambs with particular reference to copper toxicity. *Anim. Prod.* 35, 299-307.
- Woolliams, J.A., Suttle, N.F., Wiener, G., Field, A.C., Woolliams, C., 1983. The long-term accumulation and depletion of copper in the liver of different breeds of sheep fed diets of differing copper content. *J. Agric. Sci. Camb.* 100, 441-449.
- Woolliams, J.A., Wiener, G., Woolliams, C., Suttle, N.F., 1985. Retention of copper in the liver of sheep genetically selected for high and low concentrations of copper in plasma. *Anim. Prod.* (41), 219-226.
- Woolliams, J.A., Woolliams, C., Suttle, N.F., Jones, D.G., Wiener, G., 1986. Studies on lambs from lines genetically selected for low and high copper status. 1. Differences in mortality. *Anim. Prod.* 43, 293-301.
- Xin, Z., Silvia, W.J., Waterman, D.F., Hemken, R.W., Tucker, W.B., 1993. Effect of copper status on luteinizing hormone secretion in dairy steers. *J. Dairy Sci.* 76, 437-444.
- Yost, G.P., Arthington, J.D., McDowell, L.R., Martin, F.G., Wilkinson, N.S., Swenson, S.K., 2002. Effect of copper source and level on the rate and extent of copper repletion in Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 85(12), 3297-3303.
- Zervas, G., Nikolaou, E., Mantzios, A., 1990. Comparative study of chronic copper poisoning in lambs and young goats. *Anim. Prod.* 50, 497-506.