

01674
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION
Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

“Empleo de las concentraciones plasmáticas
de cobre y ceruloplasmina para el
diagnóstico de deficiencias de cobre
en rumiantes.”

TESIS

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

presenta

GERARDO FEDERICO QUIROZ ROCHA
291104

TUTOR: JAN BOUDA

COMITE TUTORAL: JOSE LUIS ROMANO MUÑOZ
GUILLERMO VALDIVIA ANDA



México, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD NACIONAL

DE LA AMÉRICA LATINA

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES LINGÜÍSTICAS Y LINGÜÍSTICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES LINGÜÍSTICAS Y LINGÜÍSTICAS

Para los fines de la presente tesis se ha utilizado

el material que se encuentra en el archivo de la biblioteca

de la Universidad Nacional de la América Latina

de la Universidad Nacional de la América Latina

DE 2

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMÉRICA LATINA

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES LINGÜÍSTICAS Y LINGÜÍSTICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES LINGÜÍSTICAS Y LINGÜÍSTICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES LINGÜÍSTICAS Y LINGÜÍSTICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES LINGÜÍSTICAS Y LINGÜÍSTICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES LINGÜÍSTICAS Y LINGÜÍSTICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES LINGÜÍSTICAS Y LINGÜÍSTICAS



El autor da su consentimiento al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal y a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM para que la tesis esté disponible para cualquier reproducción e intercambio bibliotecario.

DEDICATORIA

A mis padres
Eloisa H. Rocha de Quiroz
Jorge G. Quiroz Yamada

A mi hermana
Georgina A. Quiroz Rocha

Al Dr. Jan Bouda

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jan Bouda, por su invaluable y desinteresado apoyo a mi formación profesional y mi desarrollo personal

Al Dr. Luis Núñez Ochoa, por su respaldo, sus consejos y su orientación.

A los Dres. Pedro Ochoa Galván y Carlos Sosa Ferreyra, por su ayuda en el procesamiento estadístico de los resultados.

Al personal del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal, especialmente al Dr. Javier Valencia Méndez y MVZ Aldo Alberti Navarro, por su apoyo durante la fase experimental de la tesis.

Al Dr. José Luis Romano Muñoz y el personal del CENIFyMA, INIFAP, SAGAR, Ajuchitlán Qro. por el apoyo para la realización de la prueba de desaparición de cápsulas en rumen.

A la QFB Ma. Antonieta Aguirre y al laboratorista Martín Flores Rodríguez, por su apoyo en la determinación del Cu en hígado y los Análisis Químico Proximales de la dieta.

Al Departamento de Nutriología Clínica del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, especialmente a la Quím. Norma López Orea, por la determinación de la ceruloplasmina.

A la QBP Arlette Castillo Mata, por su apoyo en la determinación de analitos bioquímicos.

Al Laboratorio Experto, especialmente al MVZ Agustín Montes de Oca Álvarez, por su apoyo en el tratamiento de muestras para su conservación.

Al Dr. Guillermo Valdivia Anda, por su participación y recomendaciones como miembro del comité tutorial.

Al Dr. Jorge Tórtora Pérez, por su valiosa aportación como jurado durante la revisión de tesis.

Un agradecimiento muy significativo al Programa de Becas Crédito Nacionales del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de posgrado.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Summary.....	3
Abreviaturas.....	5
Introducción.....	6
Revisión bibliográfica.....	7
Material y Métodos.....	21
Resultados.....	27
Discusión.....	31
Literatura citada.....	38
Cuadros y figuras.....	45

GERARDO F. QUIROZ ROCHA. Empleo de las concentraciones plasmáticas de cobre y ceruloplasmina para el diagnóstico de deficiencias de cobre en rumiantes. (Bajo la tutoría de Dr. Jan Bouda, Dr. José Luis Romano Muñoz, Dr. Guillermo Valdivia Anda).

El diagnóstico de deficiencias de cobre (Cu) o hipocuprosis en rumiantes se ha basado tanto en determinaciones plasmáticas como en la concentración hepática. Sin embargo esta última es técnicamente complicada. Otro indicador de hipocuprosis es la concentración plasmática de ceruloplasmina (Cp). Con la finalidad de buscar una alternativa confiable y práctica para detectar deficiencias de Cu en sangre, se realizaron dos estudios. En el primer estudio, un grupo experimental de cabras (n=12) de 5 a 7 meses de edad recibió 233 ppm de molibdeno (Mo) como molibdato de amonio por vía oral en cápsulas de gelatina 3 veces por semana durante 9 semanas para inducirles hipocuprosis. Un grupo testigo (n=6) recibió la misma dieta sin adición de Mo. Para determinar la presencia de hipocuprosis, en muestras de plasma sanguíneo se determinaron las concentraciones de Cu y ceruloplasmina (Cp) a las 0, 3, 6 y 9 semanas de tratamiento. Además, a las 0 y 9 semanas se determinaron urea, proteínas totales, albúmina, calcio, fósforo inorgánico, aspartato-aminotransferasa, gammaglutamil-transferasa, globulinas, hematócrito, leucocitos totales y fibrinógeno para verificar el estado de salud de los animales y posibles relaciones con el metabolismo de Cu. Con los valores de Cp y Cu plasmáticos se determinó la relación Cp:Cu para emplearlo como indicador de la hipocuprosis. En el segundo estudio, se determinó el Cu y la Cp en el suero de 20 vacas lecheras de rastro, así como la concentración de Cu en muestras hepáticas, esta última como indicador preciso del estado de cobre. También se determinó la relación Cp:Cu para tratar de detectar hipocuprosis. Las concentraciones de Cu y Cp estuvieron en rangos de valores de referencia en los muestreos de las cabras. Los análisis de varianza de las medias y las correlaciones entre Cu y Cp fueron no significativas ($p>0.05$). Los valores obtenidos en las vacas estuvieron en rangos

de valores de referencia. Tampoco hubo significancia estadística en las correlaciones y los análisis de varianza de las medias entre los diferentes analitos ($p>0.05$). Las concentraciones de Cu en cabras y vacas indicaron que no existió hipocupremia en ningún grupo. Con los resultados obtenidos en las otras determinaciones bioquímicas y hematológicas en cabras no se identificaron estados de hipocuprosis. En las vacas tampoco se detectó hipocuprosis al tener concentraciones adecuadas de Cu en el hígado. De acuerdo a los resultados obtenidos, no es confiable la relación Cp:Cu como indicador del estado de Cu en cabras o vacas.

Palabras clave: Cobre, ceruloplasmina, cabra, vaca, hipocuprosis, hipocupremia, diagnóstico

Use of plasmatic concentrations of copper and ceruloplasmin for the diagnosis of copper deficiencies en ruminants.

The diagnosis of copper (Cu) deficiencies in ruminants is based on the blood plasma or hepatic concentrations of this trace element. However, determining Cu in the liver is technically difficult. Another method for assessing hypocuprosis is the determination of ceruloplasmin (Cp) in plasma. In order to find a confident and practical diagnostic procedure of Cu deficiencies in blood, two trials were carried out. In the first trial, 12 goats, 5 to 7 month old (experimental group), for induction of hypocuprosis, received gelatin capsules containing 233 ppm of molybdenum (Mo) as ammonium molybdate orally 3 times a week during 9 weeks, a control group (n=6) received the same diet without supplementing Mo. In blood plasma samples Cu and Cp concentrations were determined at 0, 3, 6 and 9 weeks of treatment. In addition, in blood plasma were measured urea, proteins, albumin, calcium, inorganic phosphorus, aspartate-aminotransferase, gammaglutamil-transferase, globulins, packed cell volume, white blood cells count and fibrinogen at 0 and 9 weeks with regard to Cu metabolism and health status. The Cp:Cu ratio was determined as a possible predictor of hypocuprosis. In the second trial, from 20 dairy cows before slaughter, Cu and Cp were determined in blood serum, as well as Cu concentrations in liver samples collected from carcass, and Cp:Cu ratio was calculated. Blood plasma Cu and Cp concentrations in goats were within the ranges of reference values in all samplings. Analyses of variance and correlation coefficients between Cu and Cp values were not significant ($p>0.05$) for Cu and Cp. All determined values in cows were within reference values ranges. There was no statistical significance for correlation coefficients and analyses of variance for the different analytes ($p>0.05$). Concentrations of Cu in goats and cows did not indicate hypocupremia in any case. The other biochemical and hematological results obtained by analysis of blood in goats did not support the diagnosis of hypocuprosis. On the basis of the obtained results, it was not

possible to establish the usefulness of Cp:Cu ratio as a predictor for Cu status in goats or cows.

Key words: Copper, ceruloplasmin, goat, cow, hypocuprosis, hypocupremia, diagnosis

ABREVIATURAS

AST	Aspartato-aminotransferasa
Ca	Calcio
Cp	Ceruloplasmina
Cu	Cobre
GGT	Gamma-glutamilttransferasa
Ht	Hematócrito
LT	Leucocitos totales
Mo	Molibdeno
MS	Materia seca
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	Molibdato de amonio, 4 hidrato
P	Fósforo
PP	Proteínas plasmáticas
S	Azufre
SOD	Superóxido-dismutasa
TM	Tiomolibdatos
TM1	Monotiomolibdato
TM2	Ditiomolibdato
TM3	Tritiomolibdato
TM4	Tetratimolibdato

INTRODUCCIÓN

El óptimo desempeño productivo de los animales esta dado por diferentes factores incluida una nutrición adecuada. Cuando ésta es inadecuada, se presenta una afectación directa sobre la producción¹. Dentro de los componentes esenciales que deben consumir los animales, se encuentran los microelementos, los cuales tienen gran cantidad y diversidad de funciones en el organismo^{2,3}.

Para evaluar el estado mineral de los animales se requiere determinar las concentraciones de minerales presentes en los suelos, conocer las proporciones de éstos en las raciones alimenticias y sobre todo, determinar las concentraciones de cada elemento en el organismo. Por lo tanto, las técnicas para el diagnóstico de deficiencias deben ser seguras y confiables.

El cobre (Cu) es un mineral esencial que cumple diversas funciones en el organismo de los animales. Los rumiantes en particular presentan con frecuencias concentraciones inadecuadas de este elemento, ocasionando deficiencias o intoxicaciones, éstas últimas particularmente frecuentes en borregos. Se describen una variedad de signos clínicos asociados a la deficiencia de Cu, por lo cual es importante realizar diagnósticos precisos sobre el estado de Cu en los rumiantes para establecer las medidas correctivas y preventivas correspondientes a fin de mejorar la producción en estas especies.

La ceruloplasmina (Cp) es una enzima que contiene Cu en su molécula, es la principal transportadora de este elemento y tiene función oxidasa³. Se ha utilizado su concentración en plasma como indicador del estado de Cu en el organismo³.

Actualmente los métodos de diagnóstico de deficiencias de Cu como la determinación de concentraciones plasmáticas o hepáticas de Cu o las concentraciones plasmáticas de Cp son poco prácticos⁴, por lo cual es conveniente desarrollar nuevas técnicas para evaluar el estado del Cu de los animales con base en análisis sanguíneos sencillos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Microelementos en la nutrición y causas de alteración

Un nutriente esencial se define como aquel que requiere consumir un animal en cantidades adecuadas para poder subsistir y reproducirse². Distintos minerales son importantes para el organismo y se dividen en macroelementos y microelementos. Cada uno de ellos participa en funciones múltiples en todo el organismo⁵⁻⁷. Los microelementos se definen así porque el animal requiere concentraciones muy pequeñas de éstos en su organismo, por lo cual necesita consumirlos en cantidades bajas y se encuentran en concentraciones menores al 1% en el organismo³; no por ello dejan de considerarse esenciales. Los elementos de este grupo con importancia metabólica son: As, Cd, Co, Cr, Cu, F, Fe, I, Mn, Mo, Ni, Se, Si, Sn, Vn y Zn^{2,3,8}.

Existen algunos elementos o sustancias que favorecen la utilización o disminuyen las necesidades de algún mineral, a estos se les denomina 'agonistas', un ejemplo de esto es que la vitamina E disminuye los requerimientos de Se².

La presentación de deficiencias de un mineral en el organismo se agrupa en dos situaciones generales. Las deficiencias primarias, se presentan cuando existe un aporte insuficiente del elemento en los alimentos y/o agua de bebida. Mientras que las deficiencias secundarias se presentan cuando los elementos están en cantidades adecuadas en el alimento, pero no tienen una absorción y un metabolismo óptimos en el organismo por alguna de las causas que se describen a continuación³.

- Procesamiento de los alimentos. En donde existe una pérdida de elementos por la refinación (ej. cocción).
- Interacciones dietarias. Por la presencia de sustancias o elementos 'antagonistas' que compiten por las mismas vías metabólicas o forman complejos no biodisponibles.

- Enfermedad adquirida y desórdenes genéticos. Cuando se afectan los mecanismos de absorción, excreción o redistribución en el organismo.
- Efecto de fármacos. Disminuyendo la absorción o incrementando la excreción.

En los rumiantes empleados en producción, la causa más común de deficiencias secundarias es la presencia de elementos o compuestos que causan interacciones en la dieta. Como ejemplo de esta situación se ha identificado que el exceso de Ca disminuye la absorción de Zn y el exceso de éste reduce la absorción de Cu^{2,9}.

Fundamentos para el diagnóstico de las deficiencias de microelementos

El estado mineral en los animales depende de que se mantenga una adecuada relación entre los diferentes elementos dentro del ciclo suelo - planta - animal⁷. Fallas en cualquiera de estos niveles tienen un impacto negativo sobre la salud y desempeño de los animales en proporción equivalente. El suelo debe contener cantidades adecuadas de los diferentes minerales. Cuando existe exceso de algún elemento, se pueden formar compuestos que resultan no biodisponibles para la planta. El tipo de suelo también influye en la disponibilidad de cada mineral. Los alimentos con baja cantidad de algún nutriente pueden directamente causar deficiencias. Igualmente al mezclar nutrientes en raciones que contengan elementos o compuestos antagonistas, se puede causar un efecto adverso a pesar de que cada uno se encuentre en cantidades adecuadas. Por último, el óptimo estado mineral en el animal depende de las correctas proporciones de los nutrientes en el alimento, absorción apropiada, rutas metabólicas eficientes y procesos de eliminación normales³.

Por las circunstancias antes descritas, cuando se está llevando a cabo un programa de diagnóstico de deficiencias minerales, será importante conocer el estado mineral de los suelos de donde se obtienen los insumos. Debe hacerse una revisión de la dieta, incluyendo las premezclas minerales, para conocer el

aporte de cada elemento y será fundamental hacer las determinaciones en el organismo, a fin de conocer el estado de cada elemento en los animales⁸. No es suficiente evaluar la dieta debido a que pueden existir interferencias entre componentes en la ración y requerimientos mayores por condiciones de fisiología productiva en el animal o excesos de eliminación.

Se recomienda realizar un estudio del estado mineral de la explotación a manera de prevención, al menos una vez al año. En los casos de problemas clínicos, deberá hacerse la revisión del ciclo suelo - planta - animal¹⁰. Algunos minerales presentan variaciones estacionales de concentración en la planta, por lo que se sugiere que el estudio se realice durante la estación de menor disponibilidad. El examen debe realizarse mediante un sistema de diagnóstico preventivo que incluya: anamnesis con los datos relevantes de producción y reproducción, examen físico completo de los animales incluyendo las diferentes etapas críticas (ej. 2-3 semanas preparto y 1-6 semanas posparto), análisis de muestras de líquidos y tejidos (orina, sangre, líquido ruminal, hígado, hueso), examen patológico de muestras de rastro o necropsias¹¹.

Importancia del Cu en el organismo

El Cu es un metal de la familia IB dentro de la tabla periódica de los elementos, con peso atómico de 63.5. Está incluido en el grupo de los microelementos o minerales traza esenciales, debido a que las cantidades que los animales o el hombre necesitan de éste son muy pequeñas. Este elemento participa en muchos procesos biológicos del organismo, la mayoría relacionados a actividades enzimáticas^{5,7}.

El Cu forma parte integral del sistema citocromo, es parte estructural de las enzimas Cu-superóxido dismutasa (CuSOD), CuZn-superóxido dismutasa (CuZnSOD), ceruloplasmina (Cp), citocromo oxidasa, tirosinasa (polifelin oxidasa), ácido ascórbico oxidasa, monoamina oxidasa plasmática, lisil oxidasa y uricasa dependiente de Cu^{3,12,13}.

En todas las especies domésticas se ha descrito la presentación de efectos adversos por deficiencias de Cu; así como por intoxicación, particularmente en ovinos^{1,3}. Las deficiencias de Cu en los rumiantes se presentan con frecuencia bajo una amplia diversidad de suelos, condiciones nutricionales y climáticas. Se considera que las deficiencias de Cu son las segundas más frecuentes en los rumiantes en todo el mundo después del fósforo^{9,14,15}, con una distribución cosmopolita.

Absorción, transporte y metabolismo del cobre

La absorción del Cu se lleva a cabo en varios sitios del tracto digestivo en las diferentes especies, desde el estómago hasta el intestino grueso. En los rumiantes la absorción principal es a nivel de duodeno y yeyuno, en menor proporción en íleon y en el ovino hay una absorción importante en intestino grueso¹⁶.

Las principales formas de absorción son por transporte activo que es un mecanismo saturable y por difusión simple, la cual es insaturable. Los compuestos más fácilmente absorbidos son los hidróxidos, yoduros, glutamatos, citratos y pirofosfatos; mientras que los sulfatos, óxidos, el Cu metálico y los compuestos de Cu no hidrosolubles, tienen una pobre absorción³. La presencia de aminoácidos favorece su absorción. El paso del Cu a través del enterocito por transporte activo está mediado principalmente por las concentraciones de metalotioneína. La capacidad máxima de absorción intestinal es de aproximadamente 30 - 60%, sin embargo gran cantidad del elemento se secreta nuevamente dando una tasa final de absorción aproximadamente de 5 a 10%^{3,12}.

La absorción del Cu presenta diferencias entre las especies domésticas y se puede afectar por circunstancias propias de los animales, como la edad, la raza o variación individual^{17,18}. Los animales jóvenes tienen una capacidad de absorción mayor que los adultos y sus reservas son mayores³. Existen diferentes trabajos

que han descrito variaciones en la capacidad de absorción de Cu en diferentes razas de bovinos y ovinos¹⁹⁻²².

El Cu es el elemento que tiene más antagonistas de todos los microelementos²³ con respecto a la absorción. Su principal antagonista es el molibdeno (Mo)². La función más destacada del Mo en los organismos es la regulación que hace con el Cu. Cuando existen concentraciones elevadas de Mo, se presentan frecuentemente casos de hipocuprosis, mientras que animales alimentados con niveles bajos de Mo son susceptibles a sufrir intoxicación por Cu¹⁶. El mecanismo por el cual se presenta principalmente esta interferencia es a nivel ruminal. Las bacterias presentes en la cámara fermentativa tienen la capacidad de sintetizar compuestos denominados tiomolibdatos a partir de Mo y S. Las proporciones varían entre monotioliolibdato (MoO_3S , TM1), ditioliolibdato (MoO_2S_2 , TM2), tritioliolibdato (MoOS_3 , TM3) y tetraoliolibdato (MoS_4 , TM4)^{23,24}. Estos tioliolibdatos (TM) forman complejos con los átomos de Cu libres sin utilidad metabólica. Los tioliolibdatos, principalmente TM3 y TM2, pueden ser absorbidos a través de la mucosa ruminal y duodenal. Una vez en circulación se unen a la albúmina para ser transportados. Ya en el torrente sanguíneo no pierden su capacidad de enlace con el Cu, por lo que puede continuar su efecto de interferencia. El exceso de TM causa redistribución del Cu dentro del hepatocito, favorece la acumulación de Cu en el riñón y promueve su eliminación en la orina. La relación recomendada de Cu:Mo en la ración alimenticia está entre 3:1 y 6:1, cuando ésta está fuera del rango, hay predisposición de los animales a alteraciones en su estado de Cu^{7,25}. Otras funciones del Mo son participar en el metabolismo de las purinas, desintoxicación de productos finales de oxidación lipídica y formar algunas metaloenzimas como xantina oxidasa, aldehído oxidasa y sulfito oxidasa^{3,8,23}.

El S también es un componente importante para la formación de los TM, este elemento está considerado el segundo más importante antagonista del Cu, generalmente presente en la ración alimenticia en forma de sulfatos (SO_4)⁷. Otros

elementos que causan interferencia con la absorción adecuada de Cu si se encuentran en grandes cantidades son Zn, Fe, Ca y Cd^{2,7}.

Una vez en la sangre, el Cu se adhiere en mayor cantidad a la albúmina y en menor proporción a la histidina. En esta forma queda disponible para algunos tejidos, sin embargo la mayor parte de éste es asimilada por el tejido hepático. Dentro del hepatocito se sintetiza la metalotioneína, compuesto con función de reserva. En el propio hepatocito se sintetiza la ceruloplasmina (Cp), proteína responsable del transporte de Cu hacia los tejidos y órganos donde sea requerido^{3,7,26}.

La secreción del Cu se realiza principalmente por vía biliar hacia la luz intestinal. El organismo elimina la mayor cantidad de Cu a través de las heces^{12,13}. Cuando existe una obstrucción de vías biliares la alternativa del organismo para la eliminación de Cu es mediante la secreción intestinal y la diuresis. Debido a que existe una tasa de absorción de Cu muy baja, las heces contienen grandes cantidades de Cu^{13,16}.

Fisiopatología de deficiencias de cobre

En el bovino se han descrito gran cantidad de signos asociados a la deficiencia de Cu o hipocuprosis:

- Anemias. El Cu participa en forma importante en el metabolismo del Fe, este elemento es fundamental para la formación de la hemoglobina, principal componente del eritrocito²³.
- Infertilidad variable. Aún es incierto el papel de la hipocuprosis en la infertilidad, se ha sugerido que el problema se debe más al aumento de Mo que a la deficiencia primaria de Cu^{2,7,9}. Existen informes que señalan a la hipocuprosis como causa directa de problemas en la fertilidad^{18,27}. Entre los efectos adversos está la alteración de la duración del ciclo estral, llegando a veces al anestro, ovarios quísticos, ovulación alterada, retrasos en la pubertad,

reducción de los índices de concepción^{2,13,18}. Es necesario profundizar los estudios con relación a fertilidad y Cu.

- Acromotriquia. El Cu es necesario en la síntesis de la polifenil oxidasa, tirosinasa. Esta enzima es utilizada en la transformación de la tironina en melanina y dopamina. La melanina es responsable de proporcionar el color a la piel y el pelo^{3,7,13}. Se describe que pelajes de color negro se tornan rojizos, mientras que pelajes rojos adquieren un aspecto amarillento⁴. En el caso de lanas negras puede blanquearse, mientras que lanas de color oscuro tornan a tonos más pálidos.
- Mala estructura de lana. El aspecto normal de la lana está relacionado en forma importante por los grupos disulfuro que presenta la queratina^{13,18}. Se necesitan enzimas Cu-dependientes para realizar la transformación de grupo sulfhidrilo a disulfuro. La lana de animales deficientes en Cu pierde el rizo, se observa áspera, sin brillo y se desprende fácilmente²³.
- Claudicación. La enzima lisil oxidasa es responsable de formar las cadenas polipeptídicas de colágeno, el cual es importante para una adecuada conformación del cartílago y del hueso. Otros problemas asociados son fracturas, inflamación de articulaciones en miembros, endurecimiento de articulaciones^{3,25}. También el defecto en la queratina produce uñas blandas y alteradas¹³.
- Ataxia enzoótica (necrosis neuronal y degeneración Walleriana). Al estar disminuida la actividad citocromo oxidasa, la síntesis de fosfolípidos es inadecuada y éstos son esenciales para la apropiada formación de mielina a nivel de sistema nervioso central. Este problema principalmente se ha descrito en borregos recién nacidos de madres que han desarrollado hipocuprosis crónicas^{28,29}.
- Diarrea. Frecuentemente observada en hipocuprosis secundaria por exceso de Mo, sin embargo en cualquier deficiencia se presenta. Se mencionan dos mecanismos generales atribuidos a esta alteración. El primero es una atrofia

acinar pancreática debida a la excesiva peroxidación de los lípidos de membrana y la infiltración de proteasas séricas. El segundo mecanismo es una alteración en la conformación de la mucosa intestinal. La lisil oxidasa participa en la conformación de colágeno y elastasa, su deficiencia causa una mala conformación del tejido. Además la disminución de citocromo oxidasa promueve la atrofia de vellosidades^{3,4,19,28}.

- Predisposición a enfermedades infecciosas. Hay diversos procesos que desarrollan inmunodepresión en los animales. Los leucocitos son dependientes de la SOD para tener un funcionamiento óptimo, la disminución de esta enzima reduce la vida media de estas células. La citocromo oxidasa es necesaria para la actividad fagocítica. Durante las hipocuprosis por exceso de Mo o Fe, el efecto adverso es más marcado que en las deficiencias primarias^{29,30}.
- Afecciones cardiovasculares. Al disminuir las concentraciones de dopamina y particularmente de noradrenalina, el endotelio vascular y cardiaco se afectan; además, la disminución de colágeno dificulta el buen funcionamiento de los vasos sanguíneos¹⁶.
- Crisis hemolíticas. Cuadro semejante a la hemoglobinuria posparto, la deficiencia de SOD provoca una oxidación del eritrocito y su consecuente destrucción prematura. Además la afectación de la membrana eritrocítica provoca lisis por activación esplénica¹⁶.
- Úlceras abomasales. Aún no se conoce con precisión la patogenia: se ha sugerido que al disminuir la inmunidad, existe proliferación de microflora oportunista, incluido el *Clostridium perfringens*, aunado a una estasis ruminal e intestinal generada por los defectos en la producción de elastina y colágeno¹⁶.
- Polioencefalomalacia. Bajas concentraciones Cu afectan el metabolismo normal de la tiamina, porque se producen análogos de la tiaminasa, los cuales bloquean la oxidación del piruvato¹³.
- Mala condición corporal y fallas en el crecimiento. Consecuentes a las diferentes alteraciones antes descritas¹⁹.

- Muerte súbita. Se piensa que es la suma de los factores anteriores, pero en forma particular se atribuye una falla cardiaca como la causa más importante^{1,28}.

En las cabras, los efectos generales de hipocuprosis son similares a los observados en bovinos^{8,31}; siendo más evidentes los signos de ataxia enzoótica³², además se describe la presentación de abortos³³.

En forma directa o indirecta las alteraciones antes descritas causan descensos en la producción de leche, número de partos o ganancia de peso, que representan la repercusión económica última y fundamental, para justificar el estudio de la hipocuprosis.

Diagnóstico del estado de Cu en animales

El diagnóstico del estado de Cu es particularmente difícil, porque involucra muchos factores, incluyendo los antagonistas de este elemento.^{10,34} Actualmente se emplea con mayor frecuencia la determinación de la concentración de Cu en plasma/suero y en tejido hepático para identificar su deficiencia^{2,3}.

- Concentraciones sanguíneas de Cu

La evaluación del estado de Cu en el organismo puede hacerse mediante la determinación del Cu en plasma o suero sanguíneo de los animales³⁵⁻³⁸. Los valores de referencia para el Cu plasmático en bovinos son de 11 a 18 $\mu\text{mol/L}$ (70-120 $\mu\text{g/dL}$)^{2,9}. En cabras existen diferencias entre autores pero los rangos se encuentran entre 8 a 24 $\mu\text{mol/L}$ (50 y 150 $\mu\text{g/dL}$)^{31,32}. Sin embargo se ha observado que este método es poco confiable, debido a que en muchas ocasiones, animales con deficiencias de Cu pueden tener cupremias dentro de rango, ya que los tejidos en donde normalmente se acumula siguen enviando sus reservas de Cu a la circulación. Por otro lado, animales con intoxicación crónica por Cu pueden tener acumulación excesiva principalmente en el hígado y los niveles séricos encontrarse dentro de rangos de referencia^{9,19}.

- Concentraciones de Cu en tejido hepático

El hígado es el principal órgano de deposición y reserva de Cu en el organismo^{5,9}. Por esta razón se ha descrito la determinación del contenido de Cu en el hígado como la técnica más precisa para determinar la concentración corporal de Cu^{4,39}, obteniendo muestras del órgano ya sea por medio de biopsia, necropsia o a nivel de rastro^{2,13,40}. Con la digestión de tejido se efectúa la determinación de los átomos de Cu por medio de espectrofotometría de absorción atómica²⁰. Sin embargo, esta técnica presenta algunas complicaciones para ser una práctica rutinaria, ya que debe realizarse con agujas de calibres 14G o mayores y mínimo de 12 cm de longitud, siendo un método muy invasivo. Otra dificultad es la renuencia de los propietarios para permitir tomar muestras en animales vivos o los problemas que hay para acceder a los animales o los productos en los rastros. También son pocos los laboratorios que pueden realizar estas determinaciones^{2,4}. Suttle⁴⁰ describe que la concentración del Cu en hígado es más un criterio sobre las reservas existentes, que un indicador de deficiencias.

- Concentraciones de Cu en otros tejidos u órganos

Se han empleado otros órganos y tejidos para la evaluación corporal del Cu como el riñón, bazo, pelo y lana⁷. Sin embargo estas determinaciones son poco eficientes. El Cu en lana o pelo está influido por varios factores como longitud de la fibra o estacionalidad²⁸. Suttle⁴¹ demostró que no existe relación confiable de las concentraciones de Cu entre el hígado y el pelo o la lana.

- Determinación de sustancias con Cu en su molécula

Otras formas que se han establecido para conocer el comportamiento del Cu en el organismo es la medición de actividad o concentración de enzimas que contienen Cu en su molécula. Entre ellas se encuentran la Cp, la citocromo-oxidasa y la SOD de los eritrocitos^{2,20,42}.

Ceruloplasmina

La Cp es una α_2 -glucoproteína que contiene 8 átomos de Cu en cada molécula y su peso molecular medio es aproximado a 134,000⁴³. Se sintetiza en los hepatocitos tomando el metal a partir de la metalotioneína. Esta enzima tiene una vida media aproximada de 37 h en bovino y 70 h en ovino¹⁶, los valores de referencia determinados por Wikse et al. en bovinos son de 200 a 400 $\mu\text{mol/L}$ (10 a 20 mg/dL)⁹. Evans y Wiederanders⁴⁴ refieren valores de 530 $\mu\text{mol/L}$ (26.5 mg/dL) como promedio para borregos. No se conocen informes sobre valores de referencia en cabras. A esta proteína se le ha caracterizado una doble función. Es el principal transportador de Cu en el organismo, aproximadamente el 80 - 95 % del Cu circulante se encuentra unido a la Cp^{12,13}. Las células que requieren de Cu para sus procesos vitales lo obtienen a partir de esta molécula. Por otro lado, es una enzima con actividad oxidasa sobre sustratos como poliaminas y polifenoles. La Cp cataliza la conversión del hierro, al oxidarlo del estado ferroso al estado férrico a nivel de superficie celular, por éste recibe el sinónimo de ferroxidasa^{12,38}. Este mecanismo es el que justifica la aparición de anemia en los animales deficientes en Cu.

La Cp no puede ganar o perder átomos de Cu en circulación. Se considera que el elemento está en proporción no dializable cuando se une a la Cp y en proporción dializable cuando está ligeramente unido a albúmina. En estados de hipocuprosis se forma una apo-Cp con secuencia de aminoácidos idéntica pero sin actividad oxidasa^{26,45}. Es necesario que la Cp entre a las células para transferir sus átomos de Cu. Las células requieren un átomo del elemento para formar enzimas como monoamino oxidasa, diamino oxidasa o ascorbato oxidasa⁴³.

La enzima Cp es una proteína de fase aguda, su concentración plasmática se eleva durante procesos inflamatorios. Una posible función en esta circunstancia es prevenir la peroxidación lipídica y la producción de radicales libres⁴³. Entre las causas de elevación de la Cp en las especies domésticas están las infecciones agudas y crónicas, linfosarcomas, neoplasias malignas, infartos de miocardio,

enfermedades hepáticas, artritis reumatoide e hipertensión, con la consecuente hipercupremia³.

La Cp tiene fracciones de ácido siálico en las terminales de algunas cadenas de oligosacáridos. El mecanismo de depuración de la enzima es mediante la remoción de la circulación por parte del hepatocito una vez que han perdido esas fracciones de ácido^{26,46}.

Algunos autores han indicado que las concentraciones plasmáticas de Cu y Cp están directamente relacionadas, la disminución en la actividad de Cp manifiesta deficiencia de Cu, mientras que una actividad incrementada de Cp puede indicar una acumulación excesiva de Cu^{3,9}. Sin embargo, otros autores consideran que esta relación no es un reflejo confiable del estado de Cu^{16,34}. Una de las causas que se argumentan es que por ser la Cp una proteína de fase aguda, su producción se incrementa por causas diversas ya descritas³ además de estados de hipercuprosis. Otra razón es el hecho de que la Cp se relaciona con las concentraciones de Cu en hígado, mientras que el Cu plasmático está influido por otros factores como el ingreso en la dieta¹⁶.

Telfer et al.⁴⁵ han indicado que es posible hacer un diagnóstico preciso sobre el estado de Cu en el organismo determinando la relación que existe entre Cu y Cp en el plasma sanguíneo. Este método plantea la posibilidad de establecer una técnica rápida y relativamente sencilla, empleando métodos poco invasivos para la obtención de muestras⁴⁷⁻⁴⁹, sin tener que recurrir a la biopsia hepática. Es importante profundizar en el estudio de esta técnica y evaluar su confiabilidad⁴⁸.

En el mundo existen diferentes investigaciones sobre la presentación de hipocupremia en rumiantes^{19,21,30}. Sin embargo, no se han podido establecer métodos de diagnóstico sencillos y precisos para este problema.

Es necesario efectuar el diagnóstico exacto, reconocer los mecanismos y el grado de hipocupremias que se presentan en diferentes poblaciones productoras de leche en México, con la finalidad de establecer recomendaciones terapéuticas

y preventivas, que reduzcan las pérdidas económicas generadas por estas deficiencias^{19,45,49}.

HIPÓTESIS

El estado del cobre en rumiantes se puede determinar al determinar la concentración de cobre y ceruloplasmina en plasma sanguíneo, así como la relación ceruloplasmina:cobre.

OBJETIVOS

1. Empleando a la cabra como modelo para rumiantes, determinar la concentración plasmática de cobre y ceruloplasmina, así como la relación ceruloplasmina:cobre durante inducción de hipocuprosis secundaria por administración de molibdato de amonio.
2. Obtener valores basales de la concentración plasmática de Cp en cabras.
3. Determinar el estado de cobre de vacas lecheras con base en la determinación de las concentraciones plasmáticas de cobre y ceruloplasmina relacionándolas a la concentración hepática de cobre.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para cumplir los objetivos planteados, la investigación se dividió en 2 estudios.

Estudio sobre concentración de cobre y ceruloplasmina en cabras

El experimento se realizó en el área de pequeños rumiantes del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicado Topilejo, México, D.F. a una altitud de 2800 msnm.

Animales

Se utilizaron 18 cabras criollas entre 5 y 7 meses de edad, con un peso corporal promedio de 17.6 kg. Las prácticas de medicina preventiva que se realizaron fueron la administración de vitaminas A, D y E[Ⓞ], desparasitación interna contra nematodos[Ⓞ] y externa contra artrópodos[Ⓞ] al momento del destete. El rebaño se mantuvo libre de brucelosis según las pruebas serológicas

Se dividieron en 2 grupos de animales clínicamente sanos, con la dieta siguiente:

Alimento	% de inclusión en la dieta en MS
Heno de alfalfa	58.99
Ensilado de maíz	3.98
Paja de avena	23.08
Concentrado comercial a base de granos	13.95

MS = materia seca. Contenido aproximado de Cu = 13 ppm.

La composición química de los alimentos se describe en el Cuadro 1.

[Ⓞ] Aderovet. Roussel-Hoechst, México.

[Ⓞ] Valbazen 2.5. Smith Kline & French, México

[Ⓞ] Tiguvon Spot-on. Bayer de México, México

El grupo testigo (n=6) recibió la dieta descrita, al grupo experimental (n=12), adicionalmente se le proporcionó un exceso de Mo en forma de molibdato de amonio, 4-Hidrato, cristal $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ en cápsulas de gelatina.

Administración del molibdato de amonio

Con objeto de inducir hipocuprosis secundaria por formación de TM, se preparó una mezcla de 48.75% de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, y 51.25% de fécula de maíz, se llenaron cápsulas de gelatina con 500 mg de esta mezcla. Cada cabra recibió por vía oral 2 cápsulas 3 veces por semana durante 9 semanas, resultando una administración media de 100 ppm del elemento por día en relación con la materia seca (MS).

Para constatar la disponibilidad del $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ en el rumen de acuerdo al método, se realizó una prueba de desaparición de las cápsulas *in situ*. En el Centro Nacional de Investigación en Fisiología y Mejoramiento Animal (CENIFyMA) del INIFAP, ubicado en Ajuchitlán, Qro., se emplearon 4 cabras con cánula ruminal. Se introdujeron al rumen, a través de la cánula, 2 bolsas de nylon (11 X 5 cm, poro de 50 μm) con 4 cápsulas cada una en los siguientes tiempos 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24 y 36 h. Se observó el ánimo y el apetito de los animales durante este tiempo. Las bolsas se pusieron a peso constante mediante secado, se pesaron antes y después de introducir las cápsulas. Al retirarse las bolsas del rumen después de la permanencia *in situ*, se lavaron con agua corriente incluyendo las correspondientes a las 0 h. Se volvieron a poner a peso constante y se pesaron nuevamente. Se determinó la desaparición de las cápsulas en función a las diferencias de peso de las bolsas antes y después de la introducción al rumen.

Obtención, manejo y análisis de muestras sanguíneas

Se tomaron muestras de sangre a partir de vena yugular en tubos de vidrio con vacío y heparina sódica (vacutainer®) a las 0, 3, 6 y 9 semanas de iniciado el

tratamiento. Las muestras se centrifugaron a 1200 g durante 10 min en un tiempo máximo de 2 h después de haber sido tomadas, el plasma obtenido fue separado y congelado a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis. En las muestras de plasma se determinó la concentración de Cu y de Cp en ambos grupos a las 0 y 3 semanas; por limitaciones económicas, a las 6 y 9 semanas de tratamiento se determinó la concentración de Cp sólo en grupo experimental. La determinación de la concentración de Cp se realizó mediante la técnica de nefelometría⁴³ en un equipo automatizado Array Protein System, mod. 7571[†]. La determinación de la concentración plasmática de Cu se realizó en un espectrofotómetro de absorción atómica, mod. 3110^{††}. Con los valores obtenidos de Cp, expresada en mg/dL, y Cu, expresado en $\mu\text{mol/L}$, se obtuvo la relación entre Cp y Cu (Cp:Cu) aplicando la fórmula descrita por Telfer et al⁴⁵. Relación Cp:Cu = $\text{Cp} \div \text{Cu}$. Con los valores de esta relación se buscó obtener un dato confiable para la identificación precisa del estado de Cu en los animales.

Adicionalmente, con el objeto de evaluar el estado general de salud de los animales y buscar posibles relaciones metabólicas del Cu y la Cp, a las 0 y 9 semanas se determinó en el plasma sanguíneo la urea con la técnica de Talque y Shuber[‡], proteínas totales por reacción de biuret^{‡‡}, albúmina mediante formación de complejos con verde de bromocresol^{‡‡‡}, calcio (Ca) por formación de complejos con Arsenazo III^{‡‡‡‡}, fósforo (P) inorgánico mediante reacción con molibdato de amonio^{‡‡‡‡} y las actividades de aspartato-aminotransferasa (AST) por conversión de α -cetoglutarato + L-aspartato en L-glutamato + oxalacetato, y conversión secundaria de oxalacetato + $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ en malato + NAD^+ ^{‡‡‡‡} y gamma-glutamilttransferasa (GGT) por conversión de γ -glutamil-p-nitroanilida + glicilglicina

[†] Beckman, Brea, Ca, USA.

^{††} Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA.

[‡] King Diagnostics Inc. Indiana, USA.

^{‡‡‡‡} Diagnostic Chemicals Limited, Charlottetown, Can. Reacción de punto final.

^{‡‡‡‡} Diagnostic Chemicals Limited, Charlottetown, Can. Reacción cinética.

en p-nitroanilina + L- γ -glutamilglicilglicina^{*****}. Estas determinaciones bioquímicas se realizaron en un espectrofotómetro^{*****}.

También se tomaron muestras de sangre de vena yugular en tubos de vidrio con vacío y sal tripotásica de ácido etilendiaminotetraacético para realizar determinación de hematócrito (Ht) y leucocitos totales (LT) empleando técnicas manuales⁵⁰. Las proteínas plasmáticas (PP) se determinaron mediante refractometría.

Previo a cada muestreo, en los animales se realizó la evaluación de la frecuencia respiratoria por inspección, frecuencia cardíaca por auscultación y de la temperatura rectal con termómetro. Los animales se observaron permanentemente, especialmente con relación a apetito y aspecto de las heces, con objeto de relacionar posibles alteraciones digestivas.

Estudio de la concentración sérica de ceruloplasmina y cobre y hepática de cobre en vacas lecheras

En el rastro municipal de Tlanepantla, Estado de México, se seleccionaron 20 vacas lecheras que habían sido desechadas por baja producción. A éstas se les realizó un examen físico general incluyendo frecuencias respiratoria y cardíaca por auscultación y temperatura rectal con termómetro. Antes del sacrificio se les tomaron muestras de sangre de la vena coccígea en tubos de vidrio con vacío sin aditivos. Los tubos se centrifugaron a 1200 g durante 10 min dentro de las siguientes 2 h después de la toma de las muestras. El suero se transfirió a otros tubos y se congeló a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Entre los 15 min posteriores al sacrificio de los animales se obtuvieron muestras de hígado del borde ventral del lóbulo derecho y se conservaron en congelación a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis.

En el suero sanguíneo se determinaron la concentración de Cp y Cu con los mismos métodos descritos para cabras. Aplicando la fórmula mencionada en

^{*****} Cobas-Mira, Roche. Switzerland.

cabras y con el mismo objetivo que en éstas, se obtuvieron los valores de la relación Cp:Cu. En las muestras de hígado se determinó la concentración de Cu bajo el siguiente procedimiento: Se colocaron las muestras de hígado en charolas individuales, se pesaron y secaron en estufa a 105 °C por 48 h hasta alcanzar peso constante⁵¹, se pesaron nuevamente y se sometieron a incineración en mufla a 550 °C durante 48 h. La ceniza se digirió con ácido nítrico y se preparó una dilución final 1:100. La determinación de Cu se hizo en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer Mod. 3110". El resultado se expresó en $\mu\text{mol/g}$ de materia seca (MS). Además se determinó el porcentaje de humedad del tejido.

Análisis estadístico

Estudio en cabras.- Para las determinaciones de Cu y Cp y la relación Cp:Cu, se realizaron análisis de varianza por medio de modelos lineales generalizados (MLG), utilizando un diseño para muestras repetidas. Las concentraciones de Cu se compararon en los diferentes muestreos del grupo experimental y el grupo testigo. Con objeto de inferir la relación existente entre las concentraciones de Cp y Cu en el plasma sanguíneo se obtuvieron los coeficientes de correlación entre estas concentraciones para cada muestreo del grupo experimental, así como los mismos coeficientes en los grupos testigo y experimental en la semana 0. Las comparaciones entre promedios se llevaron a cabo por mínimos cuadrados para las variables de respuesta. La determinación de Cp y la relación Cp:Cu se compararon entre las 0 y 3 semanas de tratamiento para los grupos experimental y testigo.

Se realizaron pruebas de T de Student para cada uno de los analitos bioquímicos y hematológicos (urea, proteínas totales, albúmina, Ca, P inorgánico, AST, GGT, Ht, LT y PP). Se describió previamente que la Cp es una α_2 -globulina, por este motivo se hizo un análisis de correlación a fin de comparar la concentración de Cp y de globulinas totales en ambos grupos en la semana 0 y en el grupo experimental a las 9 semanas de tratamiento.

Estudio en vacas.- Se obtuvieron las estadísticas descriptivas: media y desviación estándar, así como los coeficientes de correlación entre los valores de las concentraciones de Cu en suero, Cp en suero y Cu en hígado.

Los análisis estadísticos se efectuaron aplicando el programa computacional SAS⁵².

RESULTADOS

Estudio de la concentración plasmática de Cu y Cp en cabras

Durante el proceso de desaparición *in situ* de las cápsulas, el ánimo y el apetito de los animales fue normal, no se observaron signos clínicos indicativos de compromiso de salud. El comportamiento de la tasa de desaparición de materia de las cápsulas de gelatina se observa en la Figura 1. A partir de las 2 h de digestión intraruminal se observó una desaparición del 95.39% del material de las cápsulas y se mantuvo casi constante hasta las 36 h en que terminó el experimento. Con base en esta desaparición, se pudo inferir una disponibilidad completa del $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ a nivel ruminal.

A lo largo de las 9 semanas, los animales en el experimento estuvieron clínicamente sanos, no se observó aspecto anormal en las heces. Sólo una cabra del grupo experimental presentó secreción nasal y tos. Se le diagnosticó rinitis y laringitis catarral. El animal fue aislado, se le aplicó oxitetraciclina durante 4 días, se recuperó y continuó dentro del experimento.

El consumo estimado de alimento por cabra por día fue de 0.935 kg de materia seca. Los animales recibieron en la dieta 13 ppm de Cu diariamente, y la relación Cu:Mo fue menor de 0.13 dividiendo el consumo semanal de Mo a partir de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ entre 7 días.

El rango de la concentración de Cu en el plasma de las cabras antes de iniciar el tratamiento fue de 10.92 a 29.42 $\mu\text{mol/L}$ (69.38 a 186.91 $\mu\text{g/dL}$), a lo largo de los diferentes muestreos, los valores se encontraron entre 14.17 y 21.67 $\mu\text{mol/L}$ (90.0 a 137.7 $\mu\text{g/dL}$). Se presentó efecto en la interacción entre los grupos y los muestreos (grupo*muestreo) ($p=0.0147$). En la Figura 2 se presentan los valores medios de Cu en cada muestreo, se aprecia que hubo cruzamiento de las líneas. Esta situación indicó que el comportamiento de la concentración de Cu en

los grupos experimental y testigo durante el experimento fue independiente al tratamiento.

El rango obtenido como referencia para Cp al inicio del experimento fue de 136.4 a 847.0 $\mu\text{mol/L}$ (6.82 a 42.35 mg/dL). En este caso, no se encontraron valores de referencia en cabras en la literatura. Estos valores son más amplios a los descritos en bovinos por Wikse (200 a 400 $\mu\text{mol/L}$)⁹. El valor medio determinado fue 463.2 $\mu\text{mol/L}$ (23.16 mg/dL), que es aproximado a los 530 $\mu\text{mol/L}$ (26.5 mg/dL) que Evans y Wiederanders⁴⁴ informaron para borregos. En el análisis para la concentración plasmática de Cp no se observó diferencia significativa entre las medias por el muestreo de las semanas 0 y 3 ($p=0.1800$). Esto indica que los cambios en la concentración de Cp de la semana 0 a la semana 3 no fueron significativos. No se detectó interacción muestreo*grupo ($p=0.6244$); o sea, que no se determinaron cambios a lo largo de los muestreos, relacionados con la pertenencia al grupo testigo o a grupo experimental.

La correlación entre las concentraciones medias de Cu y Cp de todos los animales en el muestreo en la semana 0, fue no significativa ($r=-0.1945$, $p=0.4544$), por lo cual no se aprecia que los valores basales de Cu y Cp antes del tratamiento tuvieran una asociación entre ellos. En el grupo experimental, no se encontraron correlaciones significativas ($p>0.05$) entre las concentraciones de Cu y Cp en cada muestreo, con excepción de la semana 9 ($r=0.6085$, $p=0.0357$). Los valores de correlación y su significancia estadística para estos analitos en los 4 muestreos se presentan en el Cuadro 2.

En el Cuadro 3 se presentan las medias de la relación Cp:Cu obtenidas en los muestreos de las diferentes semanas. Mediante los análisis de varianza de los valores de la relación Cp:Cu no se encontró diferencia estadística entre los muestreos del grupo experimental ($p=0.1712$). Esto indicó que no existieron diferencias en los valores de relación Cp:Cu asociados al tratamiento o a los diferentes muestreos. Tampoco se observó efecto de muestreo ($p=0.1109$), ni de

interacción muestreo*grupo ($p=0.2399$) al comparar el grupo testigo contra el grupo experimental en las semanas 0 y 3.

Los valores obtenidos de Cu indican que no se logró inducir hipocupremia. En conjunto con los resultados de Cp plasmática y la relación Cp:Cu no fue posible identificar un estado de hipocuprosis en las cabras.

Los analitos de bioquímica y del hemograma no mostraron diferencias significativas entre los muestreos de las semanas 0 y 9 ($p>0.05$). Sólo el fibrinógeno disminuyó significativamente ($p=0.033$) de la semana 0 a la semana 9 al comparar todos los animales. En ambos muestreos los valores individuales de fibrinógeno y el promedio estuvieron dentro del rango de 1 a 4 g/L. No hubo diferencias significativas ($p>0.05$) en las concentraciones de globulinas entre las 0 y 9 semanas. En el muestreo de la semana 9, se presentó significancia estadística ($p=0.001$) entre las medias de globulinas del grupo experimental y el grupo testigo. La correlación entre las concentraciones plasmáticas de globulinas y Cp sólo resultó significativa en la semana 9 ($r=-0.737$, $p=0.0053$). En el Cuadro 4 se presentan los valores medios de la concentración plasmática de globulinas y fibrinógeno.

Estudio de las concentraciones séricas de la ceruloplasmina y el cobre y la concentración hepática de cobre en vacas lecheras

Al examen físico todas las vacas incluidas en el estudio presentaron constantes fisiológicas (frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca y temperatura) dentro de valores de referencia antes del sacrificio. Cinco vacas presentaron hiperemia ligera en la zona de la corona en miembros posteriores, pero no mostraron signos de claudicación.

Las medias de las concentraciones fueron: Cp en suero sanguíneo, 338.4 $\mu\text{mol/L}$ (16.92 mg/dL) y Cu en suero sanguíneo, 14.18 $\mu\text{mol/L}$ (90.09 $\mu\text{g/dL}$). El cálculo de la relación Cp:Cu fue de 1.30 ± 0.72 , sólo 3 vacas tuvieron valores superiores a 2.0.

Al momento de tomar la muestra de tejido hepático se hizo una inspección general de la víscera buscando hallazgos de alguna alteración. En ningún caso se observaron cambios patológicos. La concentración media del Cu en hígado fue de $3.95 \mu\text{mol/g}$ de MS (251.08 mg/kg). La humedad en el tejido hepático fue de $72.75 \pm 2.65 \%$.

En el Cuadro 5 se muestran los análisis de varianza correspondientes a las correlaciones entre la Cp y el Cu sérico y el Cu hepático. Estos datos no muestran que exista asociación entre los tres analitos.

DISCUSIÓN

Existen muchas referencias sobre las deficiencias de Cu en el mundo^{2,7,9,15}. Wikse⁹ mencionó a la hipocuprosis como la segunda deficiencia de importancia clínica en rumiantes. Da Silva et al.⁵³ determinaron las deficiencias minerales más frecuentes en ovinos y bovinos de Brasil y en 7 regiones de 4 estados del país, señalaron deficiencias de cobre en ambas especies. En México no existen datos precisos sobre la distribución y la prevalencia de estas deficiencias en rumiantes. Avila et al.⁵⁴ observaron la deficiencia de Cu en vacas lecheras del altiplano mexicano. Teniendo una técnica sencilla y confiable para la detección de deficiencias de Cu en México, se podrá mejorar el conocimiento sobre la distribución y prevalencia de este padecimiento.

Los rumiantes en su mayoría tienen una alta capacidad de almacenaje de Cu en el hígado²⁸. El metabolismo del Cu se comporta de manera semejante entre las diferentes especies de rumiantes domésticos, a excepción de los borregos, que tienen una predisposición alta a sufrir intoxicación con Cu.²⁸ Por estas razones se decidió utilizar a la cabra como modelo experimental para buscar una alternativa diagnóstica confiable y práctica para detectar deficiencias de Cu.

Se han utilizado cápsulas de gelatina como método de administración de sustancias en rumiantes^{55,56}, pero no se encontró información sobre el tiempo de destrucción de éstas por parte de las bacterias ruminales o su disolución en el medio ruminal. La curva de desaparición de las cápsulas en el rumen indicó que la desaparición se efectuó en un tiempo adecuado (menos de 2 h), por lo cual existe cierta seguridad de que la forma de administración dió oportunidad a la liberación del $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ para dar paso a la potencial formación de los TM de Cu.

En todos los muestreos las concentraciones plasmáticas de Cu y Cp se encontraron dentro de los valores de referencia obtenidos a partir de las concentraciones determinadas en la semana 0 en todos los animales. El rango obtenido para el Cu antes del tratamiento, 10.78 a 23.04 $\mu\text{mol/L}$, fueron similares

a los descritos como referencia de otros autores (8 a 24 $\mu\text{mol/L}$)^{9,57}. Lo anterior indicó que no existió hipocuprosis demostrable a través de los analitos determinados en plasma sanguíneo de cabras. Los valores de Cp

La interacción muestreo*grupo mostró que las concentraciones de Cu tuvieron un comportamiento independiente a que fueran valores del grupo testigo o del grupo experimental, esto es, que no hubo un efecto directo de la aplicación de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ sobre el Cu plasmático.

Las correlaciones entre las concentraciones de Cu y Cp en los muestreos de las 3, 6 y 9 semanas indicaron que no existe una relación muy directa entre ambos analitos, esto indica que el determinar alguno de ellos, no puede utilizarse como indicador de la concentración plasmática del otro. Para identificar estados de hipocuprosis no es adecuado inferirlo a través de los valores de Cp plasmática ya que ésta puede variar por factores distintos a la acumulación de Cu en los tejidos⁴³.

La suplementación de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ no causó la variación plasmática de Cu esperada. No se puede relacionar la ausencia de hipocupremia con las cantidades de Cu suministradas en el alimento, ya que la dieta se mantuvo sin variación durante todo el experimento.

Se consultaron distintas referencias sobre inducción de hipocuprosis en rumiantes. La dosis más alta de 100 ppm de Mo por día fue empleada por Sharma y Parihar⁵⁸. El protocolo empleado por ellos fue una administración diaria en forma de solución rociada sobre el alimento. Aunque en el presente trabajo se aseguró la disponibilidad del $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ en el rumen, es posible que la dosis de 233 ppm de Mo 3 veces por semana no fuera suficiente para lograr un efecto significativo para inducir hipocupremia. Algunas razones que pueden haber influido son, el tiempo empleado para inducir la hipocuprosis, el tiempo que el Molibdeno estuvo en el rumen no fue adecuado para obtener la inducción, o la proporción de otros metales en el medio ruminal interfirieron con la formación de los tiomolibdatos.

Gooneratne¹⁶ describió que durante la inducción de hipocuprosis por presencia de TM, existe disminución de la concentración de Cu en el hígado frecuentemente acompañada de un incremento en la concentración de Cu plasmático, progresivamente el Cu plasmático tiende a disminuir. No se especificaron los tiempos en que suceden estos fenómenos. Bremner y Young⁵⁹ trabajando con borregas, observaron que al suplementar con Mo o Mo y S en la dieta, existió una disminución de las reservas hepáticas de Cu, pero éste se incrementó ligeramente en riñón. En su trabajo, la reserva total de Cu a las 30 semanas disminuyó, sin embargo refirieron que durante el proceso, la concentración de Cu en sangre tendió a incrementarse ligeramente sin afectar los valores de Cp solamente cuando existió administración simultánea de Mo y S. El aumento más importante estaba en el Cu unido a la albúmina.

Sharma y Parihar⁵⁸ al inducir hipocuprosis con $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, observaron un incremento en la concentración de Cp a las 12 semanas. La tendencia a aumentar continuó hacia las 16 semanas de tratamiento. A las 13 semanas, el Cu plasmático también incrementó su concentración. En este trabajo se presentaron incrementos similares a las 6 semanas de tratamiento. Phillippo et al.⁶⁰ describieron una situación similar en vacas que recibieron dosis altas de Mo en la dieta, a las 18 semanas se observó un incremento en la concentración plasmática de Cu, después de haberse presentado disminución progresiva de este elemento.

El comportamiento irregular del Cu durante la inducción de la hipocuprosis por efecto de TM se asocia a una redistribución del Cu hepático^{59,61} y a un cambio en las proporciones de las proteínas que contienen o transportan Cu en el plasma¹⁶. La presencia de TM en circulación, causa que el Cu absorbido en intestino y unido para su transporte a la albúmina no pueda ser adecuadamente introducido al hepatocito. Además, dentro del hepatocito existe una disminución de la metalotioneína, permitiendo la liberación de su reserva de Cu⁶¹.

Mason et al.⁶² observaron que mediante la administración intraduodenal de TM2 y TM3 se presentó una disminución en la actividad oxidasa de la Cp en los

primeros 60 min posadministración. Sin embargo había una recuperación de la actividad transcurridas 4 a 6 h. La reducción en la actividad de Cp es un efecto temporal y reversible⁶³. Mason et al.⁶² no hicieron un seguimiento bajo administración crónica para determinar los efectos sobre Cp en tiempos posteriores. En el presente trabajo se determinó la concentración total de la Cp independientemente de su actividad. Existen trabajos donde se utilizó la actividad de la Cp como indicador de hipocuprosis^{34,64}, mientras que otros emplearon los valores de su concentración con el mismo objetivo^{12,44}. Es probable que la actividad y concentración de Cp tengan un comportamiento diferente sobre el estado de Cu de los animales en presencia de TM en forma crónica.

Telfer et al.⁴⁵ describieron que la relación Cp:Cu es un indicador de la presencia de TM en circulación que están causando una disminución en la disponibilidad del Cu, aún cuando las concentraciones plasmáticas de Cu o Cp se encuentren en rangos de referencia. Estos investigadores postularon que el valor de la relación Cp:Cu en los bovinos debe ser mayor a 2.0, por lo que disminuciones de este valor tenían relación con la presencia de los tiomolibdatos en sangre. No se pudo demostrar esta situación en esta tesis. Los valores máximos de la relación Cp:Cu encontrados fueron de 1.33 ± 0.63 en el grupo experimental en la semana 0. En este experimento no se pudo demostrar la hipocuprosis mediante la determinación de las concentraciones de Cu y Cp, y la relación Cp:Cu. Sin embargo el comportamiento de la concentración de Cu a lo largo de los muestreos es compatible a lo informado por diversos autores^{56,57,59} cuando existe presencia de TM en la sangre.

Es necesario mencionar que debido a limitaciones técnicas, se tuvo que recurrir al uso de la técnica nefelométrica basada en una reacción antígeno:anticuerpo para determinar la concentración de Cp. El anticuerpo utilizado fue producido en cabra, lo cual implica que pudo presentarse una reacción cruzada parcial subestimando los valores reales de Cp. No se encontró

ningún dato de equivalencia o relación entre este método y determinaciones espectrofotométricas.

Las globulinas en los muestreos de las semanas 0 y 9 estuvieron dentro de valores de referencia⁵⁷. Durante el muestreo de la semana 9 hubo una correlación altamente significativa entre la concentración de globulinas y de Cp en el grupo testigo ($p=0.0053$, $r=-0.737$). Estos datos tienen poca relevancia para explicar el comportamiento de la Cp en los animales tratados, ya que los valores estuvieron dentro de rangos de referencia y las variaciones en la concentración de globulinas no se relacionan a un proceso inflamatorio o inmune⁵⁷. En las demás comparaciones entre grupos y entre muestreos no hay correlación estadística ($p>0.05$). A pesar de que la Cp es una proteína de fase aguda que se desplaza en la banda de las α -globulinas, no existe correlación constante de acuerdo a los cambios en globulinas totales. La Cp no es la proteína de fase aguda de mayor importancia en rumiantes, la haptoglobina es el mejor indicador en estas circunstancias⁶⁵. El fibrinógeno, al igual que la Cp, son proteínas de fase aguda^{57,65}. A pesar de haberse encontrado mayores valores de fibrinógeno a las 9 semanas de tratamiento que al inicio del experimento, en ambos periodos correspondió con el rango de valores de referencia⁶⁶.

Las determinaciones hematológicas y bioquímicas fueron incluidas en este estudio con el objetivo de evaluar el estado de salud y poder encontrar posibles relaciones de estos con el metabolismo de la Cp. Los resultados observados en cada uno de estos analitos, no aportaron información al respecto.

Las concentraciones plasmáticas de Cp y Cu se encontraron dentro de rangos de referencia^{2,9}. La concentración de Cu en hígado varía según diferentes autores^{2,4,34,40}. La mayoría coincide en que deben encontrarse entre 0.47 y 4.72 $\mu\text{mol/g}$ de MS (30 a 300 mg/kg)². Mulryan y Mason³⁴ indican que las concentraciones de analitos como el Cu y la Cp se mantienen en valores adecuados, mientras el hígado tenga al menos 0.47 $\mu\text{mol/g}$ de MS de hígado, y

que sólo cuando la concentración de Cu hepático sea menor a $0.31 \mu\text{mol/g}$ (20 mg/kg) se presenta una hipocupremia importante. Abdelrahim et al.⁶⁷ demostraron que no existen diferencias significativas en la distribución del Cu en diferentes áreas del hígado.

De acuerdo a los resultados obtenidos del Cu en suero, Cu en hígado y Cp en suero, todos los analitos se encontraron dentro de valores de referencia^{2,9,57}, por eso no se tuvieron indicios de hipocuprosis en los animales muestreados. Para la evaluación de Cu y de la Cp no existen diferencias en cuanto al empleo de suero o plasma⁴². En este caso tampoco se observa que la determinación de Cp y Cu tengan una relación directa, por lo que no es posible emplear la concentración sérica de Cp como indicador de hipocuprosis. Aplicando el criterio descrito por Telfer et al.⁴⁵ respecto a los valores de la relación Cp:Cu, sólo 3 de 20 vacas tuvieron valores superiores a 2.0, lo cual supondría presencia de TM en circulación en la mayoría de las vacas estudiadas. Sin embargo ninguna de las determinaciones individuales ayudaron a demostrar esta situación, particularmente las concentraciones de Cu hígado. El porcentaje de humedad determinado en el tejido hepático correspondió a lo descrito por Graham².

Se concluye que la concentración, la vía, la duración o la forma utilizada para administrar el $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ en el experimento para inducir hipocuprosis en las cabras no fue exitosa. No se demostró que la administración de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ en cabras disminuyera las concentraciones de Cu y Cp en plasma. De acuerdo a los resultados de Cp y Cu, no se determinaron deficiencias de Cu, por lo que no se comprobó la utilidad de la relación Cp:Cu para identificar estados de hipocuprosis, especialmente por consumo excesivo de Mo.

En las vacas, no se demostró que el valor de 2.0 para la relación Cp:Cu propuesto para determinar deficiencia de Cu por presencia de TM en esta especie sea válida. Es necesario seguir realizando estudios encaminados a encontrar

métodos más sencillos y de alta confiabilidad para la determinación del estado de Cu en los rumiantes.

Con la finalidad de obtener indicadores precisos sobre el uso de la relación Cp:Cu para el diagnóstico de deficiencias de Cu en rumiantes recomienda que la administración de Mo en forma de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ se realice en forma más continua, ofreciéndolo cada tercer día en lugar de 3 veces por semana, dosificando a 200 ppm de Mo en cada toma. Es necesario alargar el tiempo de tratamiento a 14 semanas mínimo a fin de rebasar el periodo de adaptación fisiológica a la disminución en la absorción de Cu. Debido a que existen dudas sobre la efectividad del procedimiento utilizado para determinar las concentraciones de Cp, es importante comparar este método con alguno que cuantifique a la enzima por su actividad oxidasa y no por su estructura antigénica.

LITERATURA CITADA

1. Radostits OM, Blood DC, Gay CC. Veterinary medicine. 8th Ed. London: Baillière Tindall, 1994
2. Graham TW. Trace Element Deficiencies in Cattle. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 1991;7:153-215.
3. Keen CL, Graham TW. Trace elements. In: Kaneko JJ ed. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 4th Ed. San Diego: Academic Press, Inc, 1989.
4. Gay CC, Pritchett LC, Madson W. Copper deficiency in cattle: a review. *Proceedings of the 20th Annual Meeting, American Association of Bovine Practitioners* 1988 september 18-21; Kansas City (Kansas) USA. Georgia (Rome): American Association of Bovine Practitioners, 1988: 134-138.
5. Smith BP. *Large animal internal medicine*. St Louis, Mo: Mosby, 1990.
6. Howard JI. *Current veterinary therapy 3. Food animal practice*. Philadelphia: WB Saunders, 1993.
7. Grace N. *Managing trace element deficiencies*. AgResearch, New Zealand Pastoral Agriculture Research Institute Ltd. New Zealand, 1994.
8. Church DC. *Fundamentos de nutrición y alimentación de animales*. México: UTEHA-Noriega editores, 1994.
9. Wikse SE, Herd D, Field R, Holland P. Diagnosis of copper deficiency in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1992;200:1625-1629.
10. Clark RG, Ellison RS. Mineral testing - The approach depends on what you want to find out. *New Zeal Vet J* 1993;41: 98-100.
11. Bouda J, Paasch ML, Yabuta OA. Desarrollo y empleo de diagnóstico preventivo de los trastornos ruminales y metabólicos en bovinos. *Vet Méx* 1997;28:189-195.
12. Herrera C. *Bioquímica*, 2^a ed. Vol II. México: McGraw Hill-Interamericana, 1991.

13. Swenson MJ, Reece WO. Duke's physiology of domestic animals. 11th ed. New York: Comstock Pub Assoc, 1993.
14. Sanders DE, Sanders JA. Diagnosis and management of copper deficiency in dairy cattle. *Modern Vet Pract* 1983;64:613-616.
15. Underwood EJ. Trace elements in human and animal nutrition. 4th ed. New York: Academic Press, 1977.
16. Gooneratne SR, Buckley WT, Christensen DA. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. *Can J Anim Sci* 1989;69:819-845.
17. Dalley DE. Within herd variability in the mineral status of grazing dairy cows in early lactation. *Proceedings for the New Zealand Society of Animal Production*. 1994;54:27-30.
18. Ward JD, Spears JW, Kegley EB. Bioavailability of copper proteinate and copper carbonate relative to copper sulfate in cattle. *J Dairy Sci* 1996;79:127-132.
19. Suttle NF. Copper deficiency in ruminants; recent developments. *Vet Rec* 1986;119: 519-522.
20. Smart ME, Christensen DA. The effect of cow's dietary copper intake, sire breed, age on her copper status and that of her fetus in the first ninety days of gestation. *Can J Comp Med* 1985;49:156-158.
21. Ward JD, Spears JW, Gengelbach GP. Differences in copper status and copper metabolism among Angus, Simmental and Charolais cattle. *J Anim Sci* 1995;73:571-577.
22. Du Z, Hemken RW, Harmon RJ. Copper metabolism of Holstein and Jersey cows and heifers fed diets high in cupric sulfate or copper proteinate. *J Dairy Sci* 1996;79:1873-1880.
23. Underwood EJ. Los minerales en la nutrición del ganado. 2^a Ed. Zaragoza, España: Acribia, 1983.
24. Suttle NF. The role of comparative pathology in the study of copper and cobalt deficiencies in ruminants. *J Comp Path* 1988;99:241-257.

25. Agricultural Research Council. The nutrient requirements of ruminant livestock. CAB International, 1980.
26. Loeb FW, Quimby WF. The clinical chemistry of laboratory animals. 2nd ed. USA: Taylor & Francis 1999.
27. Ingraham RH, Kappel LC, Morgan EB, Srikandakumar A. Correlation of subnormal fertility with copper and magnesium supplementation. J Dairy Sci 1987;70:167-180.
28. Mertz W, Davis GK. Copper. In: Mertz W. Trace elements in human and animal nutrition, Vol I, 5th ed. Philadelphia: Academic Press, 1987.
29. Aiello SE. The veterinary merck manual, 8th ed. Whitehouse Station, USA: Merck & Co. Inc., 1998.
30. Gengelbach GP, Ward JD, Spears JW, Brown TT. Effects of copper deficiency and copper deficiency coupled with high dietary iron or molybdenum on phagocytic cell function and response of calves to a respiratory disease challenge. J Anim Sci 1997;75:1112-1118.
31. Faye B, Grillet C, Tessema A, Kamil M. Copper deficiency in ruminants in the Rift Valley of East Africa. Tropical Anim Health Prod 1991;23:172-180.
32. Lofstedt J, Jakowski R, Sharko P. Ataxia, arthritis, and encephalitis in a goat herd. J Am Vet Med Assoc 1988;193:1295-1298.
33. Unanian MM, Silva AEDF. Studies associating malnutrition with abortion in goats in the northeastern region of Brazil. Pesquisa Agropec Brasileira 1989;24:1221-1228.
34. Mulryan G, Mason J. Assessment of liver copper status in cattle from plasma copper and plasma copper enzymes. Ann Rech Vét. 1992; 23: 233-238.
35. Tanner, DQ, Stednick JD, Leininger WC. Minimal herd sample size for determination of blood copper status of cattle. J Am Vet Med Assoc 1988;192:1074-1076.
36. Mills CF. Biochemical and physiological indicators of mineral status in animals: copper, cobalt and zinc. J Anim Sci 1987;65:1702-1711.

37. Ramírez CE, Ferrer CG. Influencia de diferentes fuentes de variación sobre la concentración plasmática de Cu y Zn en bovinos de tambo. *Rev Med Vet* 1991;72:16-18.
38. Vermunt JJ, West DM. Predicting copper status in beef cattle using serum copper concentrations. *New Zeal Vet J* 1994;42:142-143.
39. Suttle NF. Problems in the diagnosis and anticipation of trace element deficiencies in grazing livestock. *Vet Rec* 1986;119:148-152.
40. Badiei K. Comparative measurement of copper in different anatomical locations of liver in goats. *Proceedings of the 10th International Conference of Production Diseases in Farm Animals, 1998. Utrecht, The Netherlands. August 24-28, 1998.*
41. Suttle NF, McMurray CH. Use of erythrocyte copper:zinc superoxide dismutase activity and hair or fleece copper concentrations in the diagnosis of hypocuprosis in ruminants. *Res Vet Sci* 1983;35:47-52.
42. Kincaid RL, Gay CC, Krieger RI. Relationship of serum and plasma copper and ceruloplasmin concentrations of cattle and the effects of whole blood sample storage. *Am J Vet Res* 1986;47:1157-1159.
43. Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz textbook of clinical chemistry, 2nd ed.* Philadelphia: WB Saunders, 1994.
44. Evans GW, Wiederanders RE. Blood copper variation among species. *Am J Physiol* 1967;213:1183-1185.
45. Telfer SB, Mackenzie AM, Illingworth D.V. Jackson DW. The use of caeruloplasmin activities and plasma copper concentrations as indicators of copper status in cattle. *Proceedings of the XIX World Buiatrics Congress; 1996 July 8-12; Edinburgh (UK). Edinburgh (UK): British Cattle Veterinary Association, 1996:402-404.*
46. Lenninger LA. *Bioquímica, 2^a ed.* Barcelona, España: Ediciones Omega SA, 1991.

47. The Perkin Elmer Company. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrometry. Perkin Elmer, Norwalk, CT. 1994.
48. Henry RJ, Canon DC, Winkelman JW. Clinical chemistry, principles and technics. London: Harper & Row, 1974.
49. Blincoe C. Computer simulation of bovine copper metabolism. J Agric Sci 1993;121:91-96.
50. Villiers E, Dunn JK. Basic haematology. In: Else R. Lumsden J, editors. Manual of small animal clinical pathology. Dorset, UK: British Small Animal Veterinary Association, 1998: 33-60.
51. Ayres GH. Análisis Químico Cuantitativo. 2ª Ed. México: Harla, 1970.
52. S A S/STAT User's guide: Volume 2 GLM-VARCOMP. Version 6, 4th Ed. Cary, NC: SAS Inst. Inc., 1990.
53. da Silva MS, Hubinger TC, Döbereiner J. Deficiências e desequilíbrios de microelementos em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil. Pesq Vet Bras 1999;19:19-33.
54. Avila GJ, Bouda J, Quiroz RGF, Yabuta OA. Impacto de deficiencias minerales sobre la reproducción de vacas lecheras. Memorias del XXI Congreso Nacional de Buiatria; 1997 Julio 9-12; Colima (Colima) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1997:191-193.
55. Duncan AJ, Frutos P, Young SA. Rates of oxalic acid degradation in the rumen of sheep and goats in response to different levels of oxalic acid administration. J Anim Sci 1997;65:451-455.
56. Provenza FD, Nolan JV, Lynch JJ. Temporal contiguity between food ingestion and toxicosis affects the acquisition of food aversions in sheep. Applied Anim Behavior Sci 1993;38: 269-281.
57. Kaneko, JJ. Blood analyte reference values in large animals. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, editors. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. p 890-895. San Diego: Academic Press, 1997.

58. Sharma AK, Parihar NS. Clinicopathology of induced molybdenum toxicity in young goats. *Indian J Anim Sci* 1994; 64:2:120-125.
59. Bremner I, Young BW. Effects of dietary molybdenum and sulphur on the distribution of copper in plasma and kidneys of sheep. *Br J Nutr* 1978;39:325-336.
60. Phillippo M, Humphries WR, Atkinson T. The effect of dietary molybdenum and iron on copper status, puberty, fertility and oestrous cycles in cattle. *J Agric Sci* 1987;109:321-336.
61. Mason J. Thiomolybdates: Mediators of molybdenum toxicity and enzyme inhibitors. *Toxicology* 1986;42:99-109.
62. Mason J, Lamand M, Kelleher CA. The effects of duodenal infusion of tri- and dithiomolybdate on plasma copper and on the diamine oxidase activity of caeruloplasmin (EC1.16.3.1) in sheep. *J Comp Path* 1982;92:509-518.
63. Lannon B, Mason J. The inhibition of bovine caeruloplasmin oxidase activity by thiomolybdates in vivo and in vitro: a reversible interaction. *J Inorg Biochem* 1986; 26:107-110.
64. Quiroga M, Igarza L, Landa R, Ruiz Moreno M, Perotti R, Silva E. SA. Evaluación del tratamiento con glicinato de cobre en bovinos con deficiencia de cobre. *Memorias de la XIV Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal*. 1994 Noviembre 26 – Diciembre 1º; Mar del Plata Argentina; Rosario Argentina, *Revista Argentina de Producción Animal*. 1995:806-808.
65. Eckersall PD. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue Méd Vét* 2000; 151: 577-584.
66. Jain, N.C.: *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

67. Abdelrahim AI, Wensing T, Schotman AJH. Distribution of iron and copper in the liver and spleen of veal calves in relation to the concentration of iron in the diet. *Res Vet Sci* 1986;40:209-211.

Cuadro 1. Composición de los alimentos utilizados en la ración

Alimento	Heno de alfalfa	Ensilado de maíz	Paja de avena	Concentrado comercial a base de granos	Total
% Materia seca	92	31	90	87	
	Medición en base seca 100%				
% PC (nitrógeno*6.25)	18.16	7.72	7.18	13.7	14.59
Extracto Etéreo %	2.89	5.23	1.61	5.06	2.99
Cenizas %	10.88	9.8	6.03	12.44	9.93
Fibra cruda %	19.70	36.12	34.80	9.69	22.44
Extracto libre de N %	48.37	41.14	50.04	59.10	> 38.41
TND %	65.62	65.29	67.00	78.57	> 52.27
ED kcal/kg (Aprox.)	2887.30	2878.48	2949.21	3463.97	> 2300.99
EM kcal/kg (Aprox.)	2372.28	2360.11	2422.10	2840.16	> 1889.54
Cobre ppm	9.8	7.0	3.0	12.0	Aprox. 13

PC. Proteína cruda

N. nitrógeno

TND. Total de nutrientes digeribles

ED. Energía digerible

EM. Energía metabolizable

Cuadro 2. Correlaciones entre medias de las concentraciones plasmáticas de cobre y ceruloplasmina en cabras del grupo experimental a lo largo de los 4 muestreos y su probabilidad estadística^{a,b}.

Semana de tratamiento		Cobre				Ceruloplasmina		
		0	3	6	9	0	3	6
Cobre	3	0.680 0.132						
	6	0.451 0.240	0.023 0.646					
	9	0.912 0.036	0.409 0.262	0.153 0.439				
Ceruloplasmina	0	0.844 -0.067	0.380 -0.294	0.161 -0.453	0.709 -0.127			
	3	0.799 -0.082	0.663 -0.141	0.686 -0.130	0.105 0.491	0.712 0.125		
	6	0.690 -0.129	0.989 -0.004	0.556 0.189	0.018 0.666	0.242 0.385	0.226 0.378	
	9	0.679 0.133	0.063 0.551	0.069 0.541	0.036 0.608	0.726 -0.120	0.636 -0.153	0.107 0.488

Valor superior indica coeficientes de correlación. Valor inferior indica la probabilidad de $|r|$

Cuadro 3. Valores de la relación cobre:ceruloplasmina en cabras con adición de molibdeno en la dieta

	Grupo Experimental	Grupo Testigo
Inicio del tratamiento	1.33 ±0.63	1.12 ±0.59
3 semanas de tratamiento	0.91 ±0.40	1.05 ±0.24
6 semanas de tratamiento	1.04 ±0.34	N.D.
9 semanas de tratamiento	0.95 ±0.22	N.D.

N.D. No determinadas

Cuadro 4. Valores medios de las concentraciones de globulinas y fibrinógeno al inicio y al final del tratamiento

Muestreo		Fibrinógeno g/L	Globulinas g/L
Semana 0	Testigo	2.0 ±0.6	39.3 ±4.9
	Experimental	1.7 ±0.7	37.4 ±5.0
Semana 9	Testigo	1.6 ±0.7	46.33 ±3.88
	Experimental	2.0 ±0.6	37.5 ±3.68

Cuadro 5. Correlaciones entre concentraciones de ceruloplasmina plasmática, cobre plasmático y cobre en hígado de vacas lecheras y su probabilidad estadística^{a,b}.

Cp en plasma X Cu en plasma	0.446 -0.222
Cu en plasma X Cu en hígado	0.846 -0.060
Cu en hígado X Cp en plasma	0.255 -0.341

Valor superior indica coeficientes de correlación. Valor inferior indica la probabilidad de $|r|$

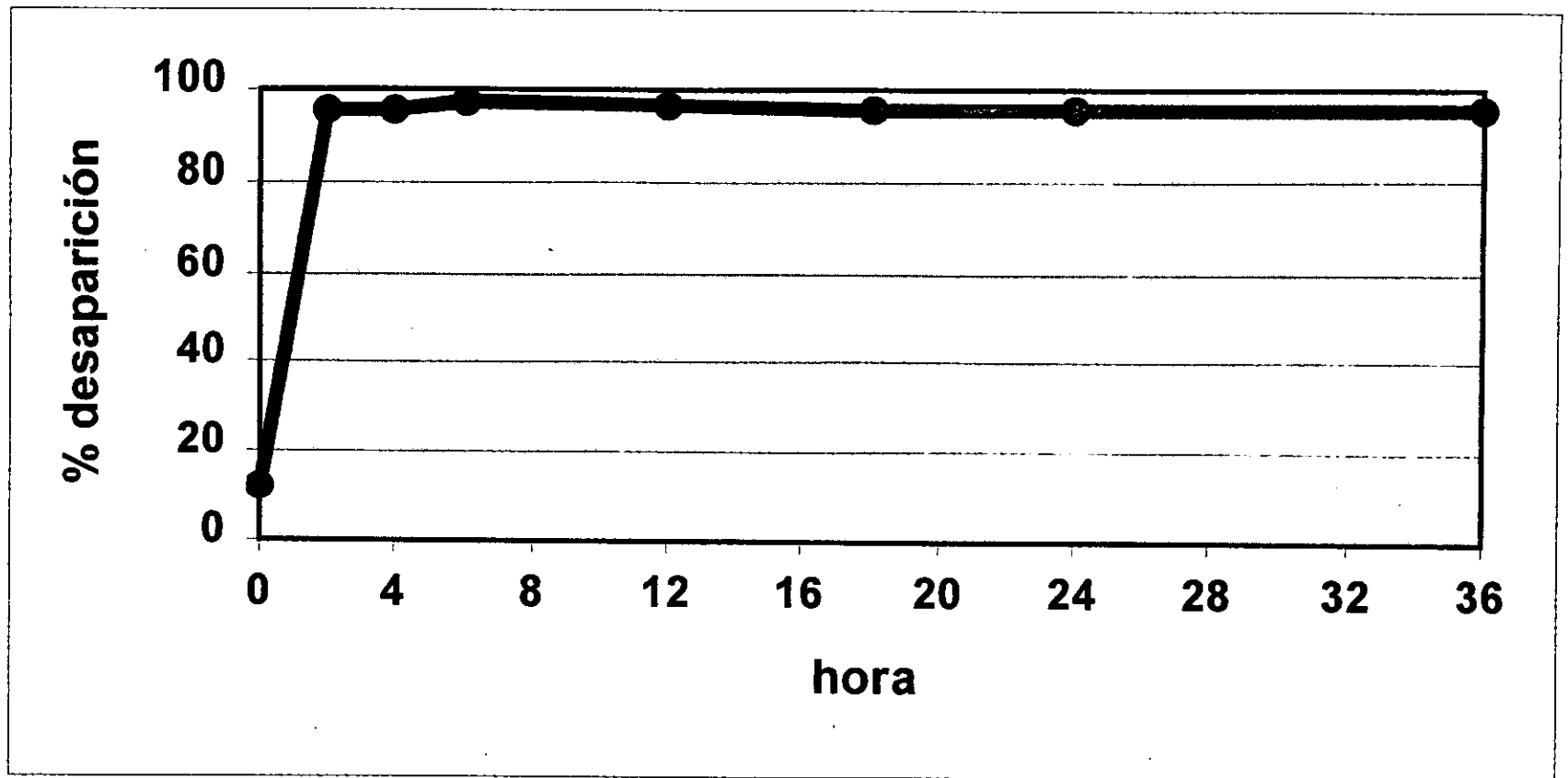


Figura 1. Desaparición de materia seca de cápsulas de gelatina por digestión ruminal *in vivo*, expresada en porcentaje.

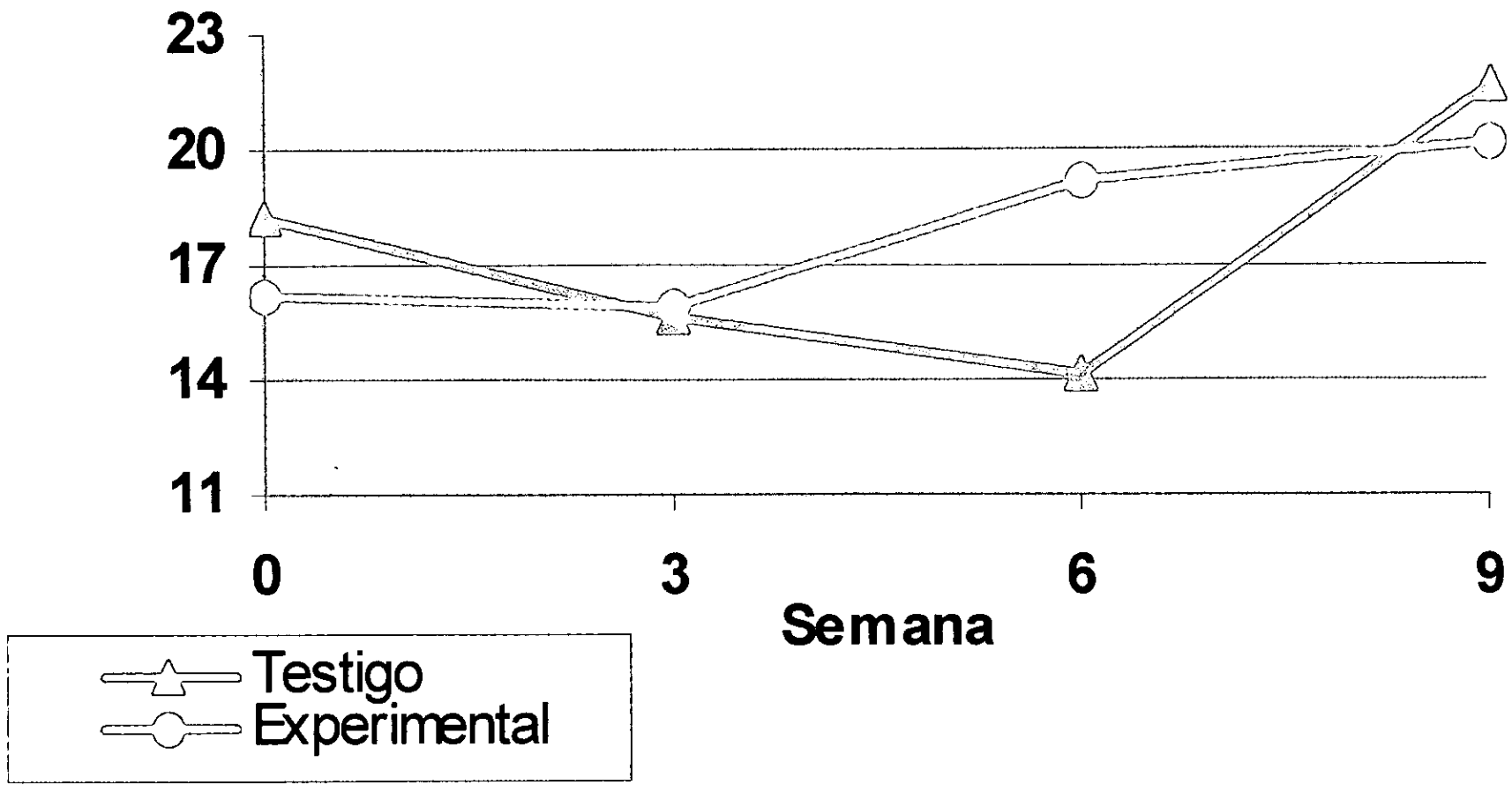


Figura 2. Valores medios de cobre plasmático en cabras con y sin administración de molibdato de amonio en 4 muestreos diferentes.