

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**  
**FACULTADE DE VETERINARIA DE LUGO**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOXÍA ANIMAL**

**EVALUACIÓN DE LA NECESIDAD DE  
SUPLEMENTACIÓN CON COBRE EN TERNEROS  
DE CRÍA INTENSIVA**



**Memoria presentada por el licenciado D. Marco Antonio García Vaquero**

**para optar al grado de Doctor en Veterinaria**

**ISBN 978-84-9887-755-7 (Edición digital PDF)**

**Lugo, Marzo 2011**

**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 I. MIRANDA CASTAÑÓN**, Profesora Titular del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidade de Santiago de Compostela

INFORMAN

Que la Tesis Doctoral titulada “Evaluación de la necesidad de suplementación con cobre a terneros de cría intensiva”, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria **D. MARCO ANTONIO GARCÍA VAQUERO**, 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 1 de Marzo de 2011.

Fdo. José Luis Benedito Castellote

Fdo. Marta López Alonso

Fdo. Marta I. Miranda Castañón

**A AMÉRICA**

**A TODA MI FAMILIA Y AMIGOS**

*Profesor Dr. D. José Luis Benedito Castellote, codirector de esta Tesis Doctoral, por invitarme a entrar en el Departamento y hacerme sentir incorporado desde el principio.*

*Profesora Dra. Dña. Marta Miranda Castañón, codirectora de este trabajo, por su guía y apoyo durante todos estos años.*

*Profesora Dra. Dña. Marta López Alonso, codirectora de esta Tesis, sin su ayuda, guía y dedicación, incluso en momentos en los que es muy complicado pensar en trabajar, este trabajo nunca hubiera salido adelante.*

*A los Profesores Doctores D. Joaquín Hernández Bermúdez y Dña. Cristina Castillo Rodríguez por su constante apoyo, simpatía y consejos dados durante todo este tiempo.*

*Mis compañeros del Departamento de Patología General Betiana, Isa, Patricia, Víctor y Lucía por todos los buenos momentos pasados durante y después del horario laboral.*

*Dr. D. Jesús Velasco el único capaz de convertir un día de muestreo en algo divertido y a Betiana que siempre estaba dispuesta a ponerse las botas para acompañarme.*

*Lucía Casanova Iglesias por su ayuda con los análisis laboratoriales de esta Tesis.*

*A todos los compañeros de la Sección de Neuroprotección de la Universidad de Copenhague, en especial a Milena Penkowa por permitirme realizar una estancia que supuso un enriquecimiento tanto personal como profesional, y a Dan por toda la paciencia y ayuda prestada con las técnicas histológicas y manejo del microscopio.*

*A toda la gente que conocí en Dinamarca: Florence, Dan, Sarika, Ilnaz, Nina, Umberto y en especial a Patrik y Sindri...gracias por todos esos buenos momentos.*

*A Vanesa y Ana, amigas desde la infancia, porque siempre que nos juntamos es como si no hubiera pasado ni un solo día.*

*A Jaime por aguantarme y conseguir que me despegue del ordenador.*

*A mis compañeras de piso presentes y pasadas Bea, Eva, Alba, Sandra, Esperanza y Susana por todos los momentos que hemos vivido juntos y por soportarme durante la carrera, tesina, tesis y demás aventuras.*

*A toda mi familia, en especial mis padres y mi hermana porque a ellos les debo absolutamente todo.*

**A TODOS ELLOS...MUCHAS GRACIAS**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a una Beca Predoctoral María Barbeito otorgada por la Dirección Xeral de Investigación, Desenvolvemento e Innovación from Xunta de Galicia y por fondos del FSE (Fondo Social Europeo) a través del Programa de Recursos Humanos, del Plan Galego de Investigación, Desenvolvemento e Innovación Tecnolóxica de Galicia. El presente trabajo se enmarca dentro del Proyecto de Investigación código 07MRU030261PR 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.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	1
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	
I. Necesidades y fuentes de cobre en rumiantes	5
II. Metabolismo y funciones del Cu	10
III. Acumulación crónica de cobre	25
IV. Parámetros para valorar el estatus de cobre	30
V. Factores de variación en la acumulación orgánica de cobre	36
<b>MATERIAL Y MÉTODOS GENERAL</b>	47
<b>BIBLIOGRAFÍA GENERAL</b>	66
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
Capítulo 1/ <i>Chapter 1</i>	91
Capítulo 2/ <i>Chapter 2</i>	101
Capítulo 3/ <i>Chapter 3</i>	135
Capítulo 4/ <i>Chapter 4</i>	166
Capítulo 5/ <i>Chapter 5</i>	189
<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</b>	217
<b>RESUMEN/SUMMARY/RESUMO</b>	220

# **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**



## INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Los metales esenciales son compuestos necesarios para la vida de los animales cuya función es salvaguardar la integridad funcional-estructural de los tejidos y mantener el crecimiento, la salud y la productividad de los mismos. Dentro de este grupo encontramos al cobre (Cu), importante cofactor de numerosas enzimas y procesos metabólicos entre los que se incluyen la fosforilación oxidativa, el transporte de oxígeno y la detoxificación de radicales libres. Sin embargo, la concentración excesiva de este metal, al igual que otros elementos no esenciales como el cadmio, plomo o arsénico, puede llevar a los animales a un estado de intoxicación (Horn y Tümer, 1999; Mercer, 2001). Es por esto que a lo largo del proceso evolutivo los organismos vivos han desarrollado mecanismos homeostáticos altamente especializados para secuestrar, almacenar y excretar Cu, así como eficientes mecanismos detoxificadores para contrarrestar sus posibles efectos deletéreos cuando está presente en concentraciones excesivas.

Ante la prevalencia de trastornos metabólicos en los animales por carencias o excesos de Cu, su metabolismo fue estudiado en profundidad desde hace muchos años y a día de hoy se sigue avanzando al respecto. Entre los últimos avances destacan el descubrimiento de proteínas implicadas en su metabolismo como las metalotioneínas (MT), chaperones y Cu-ATPasas, su función como base molecular en importantes enfermedades hereditarias humanas (Enfermedad de Menkes y Enfermedad de Wilson) y su implicación en procesos neurológicos como la encefalopatía espongiiforme bovina (Mercer, 2001; Bounias y Purdey, 2002; Hanlon *et ál.*, 2002). Sin embargo, a pesar de todos estos avances no se conocen en detalle los mecanismos homeostáticos que regulan el metabolismo de Cu a nivel celular (Mercer, 2001). El Cu en el hígado se acumula ligado a MT, proteínas implicadas en la desintoxicación de metales esenciales y no esenciales, almacenamiento de metales esenciales y el secuestro de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (López-Alonso *et ál.*, 2005; Yoshida *et ál.*, 2005; Formigari *et ál.*, 2007) y forma parte del sistema de defensa antioxidante de las células debido a su papel en la superóxido dismutasa Cu-Zn (SOD) y ceruloplasmina (Pan y Loo, 2000). Por lo tanto, la deficiencia de Cu en se ha asociado con un aumento de los daños oxidativos (Ward y Spears, 1997; Cerone *et ál.*, 2000ab). Sin embargo, las mismas propiedades que hacen al Cu esencial, cuando el metal se encuentra presente en exceso también generan radicales libres que pueden ser seriamente perjudiciales para las células (Rana, 2008). La toxicidad hepática por sobrecarga de Cu puede ser debida a las propiedades redox del metal que puede provocar una generación de ROS (Britton, 1996; Luza y Speisky, 1996), altamente reactivos y capaces de dañar todas las macromoléculas biológicas como las proteínas, los lípidos y el ADN (Grune *et ál.*, 1995), pudiendo conducir a una apoptosis (Lin *et ál.*, 2003; Wätjen y Beyersmann, 2004; Banasik *et ál.*, 2005; Xu *et ál.*, 2006).

Existen importantes diferencias en la susceptibilidad de los animales a padecer procesos de intoxicación por Cu en función de la especie (Bremner, 1998; Radostits *et ál.*, 2002; Underwood y Suttle, 2002). Los rumiantes son más susceptibles que el ganado porcino

(altamente tolerante a niveles elevados de Cu en la dieta), hecho que se manifiesta en su suplementación (junto con zinc) como promotor de crecimiento a altas concentraciones (250 mg Cu/kg materia seca (MS)) en los sistemas de producción intensiva (Poulsen, 1998). Dentro de los rumiantes el ganado ovino es particularmente susceptible a la intoxicación por Cu, probablemente por su incapacidad de incrementar la excreción biliar en respuesta a niveles altos en su dieta.

Durante muchos años se consideró al ganado vacuno como una especie resistente ya que los episodios de toxicidad eran poco frecuentes. No obstante, en los últimos años el número de casos de intoxicación por Cu en ganado vacuno se incrementó de forma drástica (Bradley, 1993; Engle y Spears, 2000a), incluso con niveles de acumulación hepática claramente inferiores a los considerados como tóxicos de forma clásica (Perrin *et ál.*, 1990; Gummow, 1996) que podrían estar asociados a un cambio en el tipo y disponibilidad de los suplementos de Cu empleados (Galey *et ál.*, 1991; Steffen *et ál.*, 1997). Estudios recientes en animales suplementados con Cu ponen de manifiesto que se alcanzan niveles de Cu por encima de los valores de normalidad (25-100 mg/kg; Puls, 1994) y un menor consumo de alimento y ganancia de peso en comparación con los animales control (Engle and Spears, 2000a). Estos niveles de Cu 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 animales (Hadrich, 1996; Jilg *et ál.*, 1997) o a la contaminación de pastos o forrajes por emisiones industriales, mineras o lodos, especialmente purines de cerdo ricos en este metal (Tokarnia *et ál.*, 2000; López-Alonso *et ál.*, 2000b).

A la hora de estudiar el metabolismo y acumulación de Cu 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 Cu 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 ál.*, 1989). 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 los requerimientos nutricionales de Cu. Así, a modo de ejemplo, podemos 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 Cu en los rumiantes, dando como resultado síndromes clínicos tanto de deficiencia como de toxicidad (Suttle, 1991; Smith y White, 1997). De hecho, la elevada suplementación con Cu en algunos casos ha sido justificada en vista de la interferencia de Cu con sus antagonistas (Kendall *et ál.*, 2001). Así, las dietas del ganado son suplementadas con altas concentraciones de Cu (de hasta 35 mg/kg de MS, nivel máximo de los suplementos de Cu para el ganado establecido por la Unión Europea; Reglamento 1334/2003/EC), que por lo general son superiores a sus necesidades fisiológicas (10 mg / kg de MS; NRC, 2000).

En Galicia en un estudio reciente llevado a cabo por nuestro grupo de investigación sobre el estatus mineral en ganado vacuno procedente de distintos sistemas productivos (Blanco-Penedo *et ál.*, 2009) se observó que los animales de explotaciones intensivas, que recibían una dieta comercial de engorde típica en España basada principalmente (hasta un 80%) en una ración de concentrado suplementado con 15-20 mg de sulfato de Cu/kg MS, presentaron una mayor acumulación hepática de Cu en comparación con los terneros de sistemas de producción ecológica (sin suplementación mineral), y aproximadamente el 60% de los animales de cría intensiva presentaron concentraciones que excedían las consideradas como seguras para esta especie animal.

En granjas de cría intensiva en Galicia, la composición del alimento concentrado es bastante estándar, principalmente a base de maíz (40% MS) y cebada (20% MS) procedentes del mercado internacional. Es posible que este tipo de dieta posea una biodisponibilidad de Cu bastante alta, así como una baja concentración de sus antagonistas (Engle y Spears, 2000a), de modo que la suplementación con Cu puede no estar justificada. A pesar de ello, los animales de las granjas intensivas reciben normalmente suplementos de este mineral muy por encima de sus necesidades fisiológicas, pudiendo conducir a una excesiva acumulación hepática de Cu, muy difícil de evaluar durante el crecimiento de los animales a menos que sus concentraciones se determinen mediante toma de muestra por biopsia hepática (López Alonso *et ál.*, 2006), pero que puede provocar efectos negativos en el rendimiento de los animales (toxicidad subclínica). Además, esta suplementación con Cu superior a los requerimientos nutricionales representa un peligro ambiental debido a su excreción por las heces, dando lugar a purines ricos en Cu (Jondreville *et ál.*, 2003) que cuando se usan como fertilizantes en los pastos puede llevar a un aumento concentraciones de Cu en el suelo y efectos tóxicos en las plantas y microorganismos (Coppenet *et ál.*, 1993).

El objetivo general de este estudio fue evaluar si, con el manejo nutricional de las granjas de cría intensiva del noroeste de España (basado principalmente en alimento concentrado de materias primas del mercado internacional), el uso de suplementos de Cu está justificado para mantener las necesidades fisiológicas de este metal, así como su influencia sobre el status de diferentes elementos tóxicos y esenciales que pudieran dar lugar a una mayor susceptibilidad de los animales al padecimiento de otros procesos patológicos relacionados con los desórdenes en el metabolismo mineral. Para ello se plantearon los siguientes objetivos concretos:

*1- Evaluar la necesidad de la suplementación con Cu en terneros de cebo de cría intensiva.*

*2- Valorar la influencia de la suplementación de Cu sobre la acumulación de metales tóxicos y esenciales en terneros de cría intensiva.*

*3- Efecto del tipo de músculo y de la suplementación con Cu sobre la acumulación de metales tóxicos y esenciales en la carne de terneros.*

*4- Efecto de la suplementación con Cu sobre parámetros metabólicos y de estrés oxidativo séricos en terneros.*

*5- Estudio histopatológico sobre los efectos de la suplementación con Cu en la defensa antioxidante y daño oxidativo en el hígado de ganado vacuno.*

# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



El cobre (Cu) se incluye dentro de los metales esenciales para la vida, presentando tres niveles de actividad biológica: como elementos traza para un adecuado crecimiento y desarrollo, a modo de niveles homeostáticos también denominados de depósito o almacenamiento, y finalmente niveles tóxicos (Goyer, 1996).

A consecuencia de las actividades humanas y otras fuentes de liberación de metales al medio se han observado importantes aumentos de Cu, Zn y otros elementos esenciales en el suelo, pastos y por tanto también en los tejidos animales (Ronneau y Cara, 1984; Khan *et ál.*, 1995).

Con el fin de ayudar a la comprensión de la importancia del Cu, metal en el que se centra nuestro estudio, se intentará describir lo más detalladamente posible distintos aspectos referentes a su presencia en el medio y su metabolismo en el animal.

## **I. NECESIDADES Y FUENTES DE COBRE EN RUMIANTES**

Para poder establecer las necesidades dietéticas de Cu, al igual que otros nutrientes o minerales, es necesario previamente tener conocimiento de cuáles son las principales fuentes del nutriente para los rumiantes, así como los factores que pueden influenciar la disponibilidad de los mismos.

### **I.1. Fuentes y usos del Cu**

El Cu es uno de los metales menos abundantes de la corteza terrestre y a pesar de esto puede obtenerse fácilmente, aunque de manera laboriosa dada la pobreza del mismo en las rocas. Generalmente el Cu se encuentran formando parte de minerales como la cuprita y la pirita combinado con otros elementos como Zn, Cd y Mo (Piscator, 1979).

El Cu es el primer metal usado por el hombre, existiendo constancia del uso de Cu y bronce en la fabricación de monedas, armas, utensilios domésticos y sistemas de tuberías. La mayoría del Cu se destina a equipamientos eléctricos como material conductor (cables), pero también se emplea en tubos de condensadores, fontanería, calefacción y en aleaciones, generalmente junto con Ag, Sn, Cd y Zn (Piscator, 1979).

Las sales de Cu se utilizan ampliamente en agricultura y en veterinaria, como es el caso del sulfato de Cu o piedra azul que es el compuesto de mayor importancia industrial, empleada en la purificación del agua, conservante de la madera, como pulverizaciones frente a micosis de la vid, árboles frutales, patatas, contra moluscos que pueden ser huéspedes intermediarios en la distomatosis hepática, para el tratamiento del pedero y gastritis parasitarias en ovinos y como promotor de crecimiento en cerdos y aves. Otras sales como subacetato, oxiclورو, clورو y óxido de Cu muestran también propiedades fungicidas (Humphreys, 1990).

### I.1.1. Cobre en los suelos

Los niveles de Cu descritos en los suelos varían de 6-60 mg/kg (Kabata-Pendias, 2001). La concentración inicial de Cu en los suelos depende fundamentalmente de la composición de la roca madre (en rocas eruptivas como los granitos el Cu se encuentra en concentraciones muy bajas) y de las características físicas del propio suelo (el contenido de Cu suele ser más alto en suelos ricos en Fe y más bajo en suelos arenosos y orgánicos).

El Cu se suele acumular en las capas más superficiales del terreno, por lo que la determinación de la concentración del metal a este nivel se relaciona con la bioacumulación del mismo y las deposiciones recientes provocadas por el manejo del hombre. La variación del pH del suelo afecta a la asimilación del Cu, ya que si se eleva el pH se produce una reducción del Cu asimilado, hecho que explica que las carencias de Cu se observen con más frecuencia en los suelos calizos (Kabata-Pendias, 2001).

Además del Cu presente de modo natural en el suelo, uno de los puntos de mayor relevancia es la contaminación del mismo debido fundamentalmente al uso de purines de cerdo (y en menor medida de gallinaza) como fertilizantes, aunque también al empleo de fitosanitarios, aerosoles y otros productos con un contenido elevado del metal (García Fernández *et ál.*, 1999) y en el caso de zonas industriales a distintas emisiones procedentes de actividades humanas que pueden contribuir de forma significativa al enriquecimiento de Cu de los suelos (Grobler, 1999; Grobler y Swan, 1999ab; Underwood y Suttle, 2002).

La suplementación con Cu en las explotaciones de ganado porcino es muy común como promotor de crecimiento y el control de la disentería, añadiéndose simultáneamente Zn para prevenir cuadros de intoxicación por Cu y problemas de paraqueratosis y/o deficiencia de Zn (Christie y Beattie, 1989). La suplementación de Cu y Zn no ajustada a las necesidades reales de los animales en función de su estado productivo provoca una mayor eliminación de ambos, de ahí el gran poder contaminante de los purines o estiércoles procedentes de esta especie animal (Coppenet *et ál.*, 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; Coppenet *et ál.*, 1993; L'Herroux *et ál.*, 1997), Dinamarca (Bak *et ál.*, 1997), Holanda (Esselink *et ál.*, 1995) e incluso Reino Unido (Poole *et ál.*, 1990; Nicholson *et ál.*, 1999). El abonado continuo de los campos con purines de cerdo produce acúmulos considerables de Cu y Zn, que pueden llegar a ser tóxicos para los animales, sobre todo para el ganado ovino (Christie y Beattie, 1989). Existen numerosos estudios en ganado ovino en que describen niveles hepáticos muy elevados de Cu en animales alimentados a base de forrajes sobre los que se aplican estos purines, siendo frecuentes los casos de intoxicación (Christie y Beattie, 1989; Poole *et ál.*, 1990; Kerr y McGavin, 1991); describiéndose también con menor frecuencia casos de toxicidad en ganado vacuno (Batey *et ál.*, 1972; Braude, 1973).

### I.1.2. Cobre en las plantas

Los mecanismos de absorción del Cu por las plantas no se conocen en detalle, existiendo evidencias de que se trata de un proceso de absorción activa, aunque puede darse también de modo pasivo en el caso de niveles del metal excesivos en los suelos. Se ha observado una correlación entre la concentración del metal en las soluciones nutrientes o en el suelo y la concentración en las plantas, siendo esta asociación muy evidente en el rango de toxicidad (Cook *et ál.*, 1997; Kabata-Pendias, 2001).

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 Cu y de otros minerales íntimamente relacionados en su metabolismo como Fe, Mo y S (McFarlane *et ál.*, 1990). En cuanto a las diferencias en función de la especie vegetal se observa que bajo similares condiciones de cultivo las gramíneas retienen menor cantidad de Cu que las leguminosas. Dentro de la propia planta la distribución del elemento no es homogénea, así, las hojas de las gramíneas contienen poseen niveles 35% superiores a los de los tallos, por lo que las concentraciones de este elemento en los pastos pueden disminuir considerablemente durante la estación de crecimiento. Además, la concentración de Cu en las semillas de gramíneas suele ser baja, a diferencia de las semillas de leguminosas, y presentar escasa variación entre especies (Underwood y Suttle, 2002).

El contenido de Cu de los forrajes no depende directamente del pH del suelo, sino que primeramente influye sobre otros elementos como el Mo, detectándose aumentos de las concentraciones tanto de Mo como de S en casos de suelos alcalinos y con grandes cantidades de materia orgánica, que producen como consecuencia una disminución de la absorción de Cu por parte de la planta. También se han descrito concentraciones inferiores de Cu en los pastos conservados como heno o silo con respecto a los descritos en los frescos, pudiendo reflejar este hecho su grado de maduración (Underwood y Suttle, 2002). Cuando el contenido de Cu de los forrajes y de los pastos es de 1-3 mg/kg MS, las enfermedades carenciales en los animales son muy probables (Loué, 1988).

### I.1.3. Cobre en los alimentos concentrados

El contenido en Cu de las materias primas que suelen formar parte de los concentrados varía entre 5-20 mg/kg MS. Los alimentos de origen animal, a excepción de las harinas de hígado, crustáceos y peces, son unas fuentes pobres o moderadas de Cu. La leche y productos lácteos presentan por lo general niveles <1 mg Cu/kg MS (Licata *et ál.*, 2004), si bien es posible la contaminación de estos productos durante los procesos de elaboración y almacenamiento. Las harinas de carne y pescado contienen niveles variables entre 5-15 mg/kg MS, mientras que la harina de hígado posee entre 80-100 mg/kg MS (Underwood y Suttle, 2002). Además, a parte de su presencia normal en las diversas materias primas de los concentrados, el Cu está reconocido como un ingrediente seguro para su inclusión en el pienso del ganado, por lo que se le añade normalmente en la mayor parte de mezclas comerciales (Buck *et ál.*, 1981).

## I.2. Necesidades de cobre

El nivel de Cu en la dieta necesario para el mantenimiento de la salud depende de la especie animal y sobre todo de numerosos factores nutricionales, cobrando especial relevancia los niveles de Mo y S inorgánico. En el caso de los rumiantes se ha estimado que niveles de 8-10 mg Cu/kg MS son suficientes para cubrir las necesidades de los animales en condiciones dietéticas óptimas para la utilización del metal (NRC, 2004). En determinadas situaciones como en periodos de alta producción láctea, crecimiento rápido o estrés, las necesidades de Cu aumentan, debiendo realizarse una suplementación superior a la anteriormente descrita (Underwood y Suttle, 2002).

Un punto importante a la hora de establecer las necesidades de Cu de los animales es, más que el contenido en Cu ingerido, la disponibilidad del metal presente en los mismos que a su vez va a depender de distintos factores (Suttle, 1986).

La disponibilidad de un micromineral se define como el porcentaje del mismo que es utilizado por el animal. Numerosos factores como el animal, las características de la dieta y las interacciones entre minerales influyen en los valores obtenidos, por lo que es difícil determinar la disponibilidad real de los microminerales con fiabilidad (FEDNA, 1999).

Nederbragt *et ál.* (1984) indican que la disponibilidad de Cu en rumiantes depende de la valencia del Cu en la ingesta y está condicionada por las variaciones en la microflora del rumen. Sin embargo, otros factores como la composición del suelo y de la ración, la estación del año y la genética del animal también pueden influir en la disponibilidad del mismo.

### I.2.1. Factores dependientes del suelo

La influencia de la composición del suelo para una mayor o menor disponibilidad de Cu por parte de los animales ha sido demostrada ser dependiente casi en su totalidad de la presencia o no de componentes que interfieren directamente sobre la absorción y utilización del metal por parte del animal (Phillippo, 1983). De este modo, se observó una deficiencia leve de Cu en ganado vacuno en zonas de Inglaterra debido a una contaminación del suelo por Fe (Underwood y Suttle, 2002); así como una baja captación de Cu en los vegetales procedentes de zonas ricas en Mo que llegaron a causar deficiencia de Cu en los animales alimentados con estos pastos, siendo considerado el estatus del Mo en el suelo como el factor más influyente del que dependen los niveles de Cu (Boila *et ál.*, 1984).

### I.2.2. Factores dependientes de la ración

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

Se han descrito concentraciones inferiores de Cu en los pastos conservados como heno o silo con respecto a los descritos en los frescos, pudiendo reflejar este hecho su grado de diferencias en el grado de maduración vegetal; sin embargo, la disponibilidad del Cu presente en el heno y el silo es mayor, debido a que poseen unos niveles inferiores de S (antagonista del Cu) con respecto al pasto fresco (Underwood y Suttle, 2002).

De modo general la biodisponibilidad del Cu es inferior en fuentes vegetales que en fuentes animales o inorgánicas, probablemente debido a que en las primeras se encuentra en forma de fitatos. Además, la intoxicación por Cu es más frecuente en animales alimentados a base de concentrados, debido a que el coeficiente de absorción del Cu presente en los cereales es 10 veces superior debido a su menor porcentaje de fibra (Suttle, 1986).

### I.2.3. Factores estacionales

Los factores estacionales resultan de especial interés al influir de forma muy marcada sobre diversos antagonistas del Cu. Así, el Fe se encuentra en sus máximos niveles en primavera y otoño, el Mo aumenta de forma marcada en la primavera (Korte *et ál.*, 1996) llegando incluso a duplicarse durante la estación de pastoreo (Suttle *et ál.*, 1994) y la concentración de S descende con la maduración de la planta. Todos estos factores hacen que existan importantes variaciones en el estatus del Cu en animales entre la primavera y el otoño, registrándose fluctuaciones estacionales en los niveles plasmáticos de Cu, con concentraciones más bajas entre febrero y marzo y más altas en agosto y septiembre (Smart, 1984).

### I.2.4. Factores genéticos

La constitución genética resulta de especial relevancia al demostrarse que los desórdenes metabólicos del Cu podrían ser controlados por manipulación genética (Underwood y Suttle, 2002). Este hecho ha sido ampliamente estudiado en ganado ovino, permitiendo seleccionar en función de la tolerancia al Cu el tipo de raza ovina adecuada a los pastos (Suttle *et ál.*, 2002). En ganado vacuno el efecto de la genética sobre las necesidades de Cu 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 Cu (Littledike *et ál.*, 1995; Mullis *et ál.*, 2003 ab).

## II. METABOLISMO Y FUNCIONES DEL CU

### II.1. Metabolismo

#### II.1.1. Absorción

El mecanismo de absorción intestinal del Cu en los animales adultos todavía no se conoce con claridad, aunque se han podido diferenciar dos componentes: activo o saturable (mediado por metalotioneínas y relacionado con bajas concentraciones de Cu) y pasivo o insaturable (relacionado con altas concentraciones de Cu), pudiendo ser este el punto en el que difieren los animales rumiantes y no rumiantes (Underwood y Suttle, 2002). Además, compuestos de Cu en forma de hidróxidos, yoduros, glutamatos, citratos y pirofosfatos presentan una fácil absorción, mientras que sulfatos, óxidos, Cu metálico y los compuestos no hidrosolubles resultan ser de más complicada absorción (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001).

La absorción de Cu en los rumiantes es baja, variando entre < 1-10% (NUEVA-Spears, 2003), siendo el intestino delgado y más concretamente su porción media el punto de mayor absorción del metal en las vacas (1-3%) (McDowell *et ál.*, 1993), presentando los animales jóvenes y no rumiantes una absorción más eficaz en torno al 60% (Hidiroglou *et ál.*, 1990). La absorción en los animales recién nacidos de todas las especies se produce por pinocitosis y debido a las altas concentraciones de Cu que presenta el calostro se asegura que los aportes de este elemento sean adecuados. En corderos jóvenes alimentados a base de leche se han observado unos rangos de absorción de entre 70-85%, mientras que tras el destete disminuye a niveles <10% (Underwood y Suttle, 2002).

Los animales no rumiantes absorben aproximadamente el 60% del Cu presente en raciones digeribles y con concentraciones moderadas del elemento (Underwood y Suttle, 2002). La absorción en estos animales está regulada por los depósitos corporales y necesidades del organismo, desempeñando un papel importante en esta regulación las MT presentes en las células epiteliales del intestino (Hidiroglou *et ál.*, 1990), aunque también influye el pH del contenido intestinal, describiendo algunos autores que las sales de calcio reducen la absorción de Cu al elevar el pH (Piscator, 1979; Goyer, 1996), mientras que otros estudios destacan la falta de evidencias de esta disminución (Underwood y Suttle, 2002). El grado de absorción también varía en función de los niveles de proteína de la dieta y por interacciones con otros elementos como Hg, Mo, Zn y Cd.

La interacción Cu/Mo es muy importante en los rumiantes debido a que el Mo limita la retención de Cu en el organismo en presencia de cantidades adecuadas de sulfato inorgánico. La vulnerabilidad de los rumiantes a deficiencias de Cu se debe a que en el rumen se degrada el S (tanto orgánico como inorgánico) a sulfuro, produciéndose una precipitación de la mayor parte del Cu liberado durante la digestión ruminal en forma de sulfuro de Cu que permanece

sin absorberse. Además, se ha demostrado que los protozoos ruminales son grandes productores de sulfuro y que en animales que han sido liberados de patógenos o bien en aquellos a los que se le administran ionóforos antiprotozoarios, se produce un aumento en la absorción de Cu (Underwood y Suttle, 2002). También como consecuencia de la interacción en el rumen de sulfatos y molibdatos se producen tiomolibdatos que se unen al Cu o bien al Cu de las proteínas en el tubo digestivo, de manera que el Cu no está disponible para poder realizar ni una normal absorción ni sus funciones enzimáticas propias (Underwood, 1983; Suttle *et ál.*, 1994; Smith y White, 1997), observándose en estos casos rangos de absorción <1%. Se ha observado un antagonismo con el Fe que se puede dar por dos mecanismos: por un lado mediante la retención de S por la formación ruminal de sulfuro de Fe a partir de Fe soluble y a la adsorción de Cu realizada por el Fe insoluble. En el caso del Zn se ha demostrado una reducción del metabolismo del Cu en ovejas. Con el Cd se observa una reducción de la transferencia placentaria de Cu en vacas y ovejas, y a elevadas concentraciones de Cd en la dieta el nivel de absorción de Cu disminuye proporcionalmente (Smith *et ál.*, 1991ab).

También se han descrito otros mecanismos que interfieren con la absorción del Cu como los casos del Cd y el Zn que son capaces de desplazar al Cu de sus uniones a los grupos sulfidrilo de las proteínas transportadoras del mismo en el duodeno de ganado vacuno (Evans *et ál.*, 1970a); el ácido ascórbico que produce una disminución en la absorción de Cu bien por la reducción del metal de su forma divalente (más fácilmente absorbible) a monovalente (Johnson y Murphy, 1988) o bien por la interacción del ácido ascórbico con las MT (Evans *et ál.*, 1970a).

#### II.1.2. Transporte y almacenamiento

El Cu una vez absorbido se transporta por el organismo a través de la sangre unido a la albúmina y posteriormente se distribuye a los distintos tejidos. El metal es captado por las células del parénquima hepático (principal depósito del Cu), para lo que primeramente se liga a la glutatión y posteriormente a las MT (MT) y otras proteínas citoplasmáticas, siendo usado en el metabolismo hepático y almacenado en forma de Cu-MT y sus excesos eliminados vía biliar. En casos de deficiencia de Cu (Chen *et ál.*, 1995) y también en excesos de Se (Hartman y van Ryssen, 1997), se ha observado un aumento de enzimas hepáticos necesarios para la formación de glutatión que aumentan la eficacia de captación de Cu por el hígado. Desde el hígado el Cu es liberado al plasma como ceruloplasmina (CP) o unido a otras proteínas como albúmina (Piscator, 1979; Hidioglou *et ál.*, 1990; Goyer, 1996). Los restantes tejidos del organismo captan Cu fundamentalmente mediante receptores de CP situados en las membranas celulares (Saenko *et ál.*, 1994), aunque en estudios *in vitro* también se ha demostrado que la albúmina y determinados aminoácidos como la histidina facilitan su captación (Underwood y Suttle, 2002).

La CP plasmática constituye la porción de Cu más elevada, representando el 95 % en animales no rumiantes y el 80% en los rumiantes (Underwood y Suttle, 2002). Así, en ganado vacuno los niveles de CP disminuyen drásticamente durante una deficiencia de Cu y pueden alcanzar niveles no detectables en ganado aparentemente sano (Humphries *et ál.*, 1983).

El Cu sanguíneo se encuentra principalmente en los eritrocitos, en donde el 60% está asociado a la enzima SOD y el 40% restante se encuentra libre, pudiendo constituir una reserva del metal con el fin de asegurar la actividad de la SOD (Bush *et ál.*, 1956).

### II.1.3. Metabolismo hepático

Los rumiantes, y dentro de ellos sobre todo el ganado ovino, son los animales más sensibles tanto a deficiencias como a intoxicaciones por Cu debido a que almacenan el Cu a nivel hepático incluso en el caso de excesos del mineral, mientras que las especies no rumiantes mantienen bajos niveles hepáticos de Cu eliminando sus excesos por vía biliar, por lo que muestran ser más resistentes a alteraciones provocadas por el Cu (Bremner, 1998).

En los tejidos extrahepáticos el metabolismo del Cu se relaciona fundamentalmente con la síntesis y degradación de diversas enzimas Cu-dependientes, mientras que en el caso del hígado, además de estas funciones está implicado en el mantenimiento de la homeostasis del mineral en el animal. Es por esto que dentro del hígado el Cu se encuentra asociado a distintas fracciones celulares en las que desempeña un papel específico, bien formando enzimas Cu dependientes o ligado a proteínas de almacenamiento. En estudios de fraccionamiento subcelular realizados mediante técnicas de centrifugación diferencial (Corbett *et ál.*, 1978; Gooneratne *et ál.*, 1979; Saylor y Leach, 1980; Jenkins, 1989; Kumaratilake y Howell, 1989) se observó que el Cu en el interior de los hepatocitos está contenido en cuatro fracciones y que el metal desempeña unas funciones específicas en cada una de ellas:

Fracción microsomal ( $\approx$  10% del Cu total). Representa el Cu presente en el retículo endoplasmático liso y rugoso, aparato de Golgi y ribosomas. En esta fracción se realiza la síntesis de proteínas que contienen Cu, bien para su uso posterior o para su secreción.

Fracción nuclear ( $\approx$  20% del Cu total en la mayoría de los mamíferos). El Cu presente en esta fracción puede funcionar como un almacén temporal del metal y básicamente está constituido por ácido nucleico y proteínas a las cuales se une el Cu.

Fracción granular (20% del Cu total en animales con estatus adecuado del metal). Esta fracción representa el Cu contenido en las mitocondrias y lisosomas, éstos últimos con un papel muy importante para el mantenimiento de la homeostasis ya que se encargan de almacenar el exceso del metal hasta que se excreta vía biliar.

Fracción citosólica (es el mayor almacén de Cu en los hepatocitos de los mamíferos adultos). El Cu de esta fracción se encuentra formando parte mayoritariamente de proteínas

metal-afines como las MT (principal almacenamiento de Cu en el hepatocito) y en menor medida a enzimas dependientes de Cu como la SOD.

La proporción de Cu en las distintas fracciones subcelulares mencionadas varía en función de diversos factores, de entre los que caben destacar 3: la especie animal, la edad y el estatus de Cu.

**Especie animal.** En la mayor parte de los mamíferos con un estatus de Cu normal la mayor proporción de Cu está localizada en el citosol (>50%) almacenado temporalmente unido a las MT. La capacidad de almacenamiento de Cu en esta fracción va a variar en función de la capacidad de las distintas especies animales para sintetizar MT, observándose por tanto que especies con gran capacidad de síntesis de MT (perro y el cerdo) presentan un gran % de Cu en esta fracción citosólica en comparación con las especies que poseen una capacidad de síntesis limitada de esta proteína (rumiantes). Esta escasa capacidad de síntesis de MT en los animales rumiantes (sobre todo en ganado ovino) explica que la excreción biliar de Cu vía lisosomal sea muy limitada, lo que conduce a una gran acumulación del Cu en la fracción granular.

**Edad.** La concentración hepática de Cu en la mayoría de los mamíferos aumenta durante el periodo intrauterino alcanzando su máximo nivel en el momento del nacimiento, pudiendo deberse estas mayores concentraciones hepáticas a una limitada capacidad de eliminación biliar (Evans *et ál.*, 1970b); y posteriormente va disminuyendo hasta alcanzar los niveles presentes en los adultos (Underwood y Suttle, 2002).

En estudios de centrifugación diferencial en hígado humano (Porter, 1964), bovino (Porter *et ál.*, 1961) y de rata (Gregoriadis y Sourkes, 1967; Evans *et ál.*, 1970b) se observó que  $\approx 80\%$  del Cu está presente en las fracciones granular y nuclear durante el desarrollo neonatal y el 15% en la fracción citosólica. A lo largo del desarrollo del animal se ponen en funcionamiento los mecanismos homeostáticos que facilitan la eliminación biliar del metal, observándose una gran disminución del % de Cu de las fracciones granular-nuclear, una pequeña reducción en el citosol y un mantenimiento de los niveles del metal en las restante organelas.

Esta distribución subcelular cambiante a lo largo de la edad del animal se explica por la existencia de mecanismos homeostáticos de protección de las células hepáticas: en animales inmaduros (reducida eliminación biliar) las uniones del Cu en el citosol se ven saturadas y los excesos del metal se van acumulando en los lisosomas y en las proteínas mitocondriales y nucleares; mientras que en animales maduros (mejor eliminación biliar) la acumulación de Cu en la célula es menor, disminuyendo su proporción presente en las organelas celulares, por lo que en animales maduros el mayor % de Cu estará presente en el citosol unido a MT, a excepción de especies animales con escasa capacidad de síntesis de estas proteínas como los rumiantes (Evans, 1973; Cousins, 1985).

**Estatus del Cu.** En presencia de altos niveles de Cu en el hígado, su distribución subcelular se asemeja a la de los animales neonatos (Gregoriadis y Sourkes, 1967; Evans *et ál.*, 1970b), existiendo un gran % de Cu en las fracciones granular-nuclear y menor % en la citosólica, por lo

que se deduce que el retículo endoplasmático liso y las proteínas del núcleo son los encargados de mantener la homeostasis del Cu hepático.

#### II.1.4. Proteínas implicadas en el metabolismo del cobre

##### Ceruloplasmina (CP)

Es la principal proteína encargada del transporte del Cu desde el hígado hasta los restantes tejidos, ligando alrededor del 90-95% del Cu en el torrente sanguíneo (Cousins, 1985) y posteriormente regresa al hígado donde es degradada en los lisosomas (Frieden, 1980).

La CP ejerce también una importante función en el mantenimiento del equilibrio entre el Cu hepático y extrahepático. En caso de aumentos de la concentración hepática de Cu, se induce la síntesis de CP que permite una mayor redistribución del metal hacia los tejidos periféricos y el mantenimiento de unos niveles de Cu hepáticos dentro de los límites fisiológicos, aunque los niveles de CP presentan una fase de meseta una vez alcanzados determinados niveles de Cu hepático (Eckert *et ál.*, 1999).

La CP es considerada como una proteína de fase aguda con propiedades antiinflamatorias (Denko, 1979), observándose incrementos de esta proteína en procesos inflamatorios como la artritis (Sorenson, 1978) y la enfermedad periodontal (Freeland *et ál.*, 1976); y también ha demostrado presentar un papel protector frente a procesos de peroxidación lipídica (Dormandy, 1980).

También se han demostrado aumentos de CP ante enfermedades como la cirrosis biliar humana, la enfermedad de Wilson (Sternlieb, 1980) y cirrosis biliar primaria (Jain y Gerlowski, 1981) en las que se aprecia un aumento de Cu hepático que conduce a la producción de agentes oxidantes ( $O_2^-$  y  $H_2O_2$ ), actuando la CP a modo de antioxidante.

A parte del Cu existen otros metales que condicionan la actividad de la CP. El Cd administrado por vía parenteral estimula la actividad de la CP sérica y un aumento de Cu hepático, mientras que la Ag administrada por la misma vía disminuye la actividad de CP y la concentración de Cu en suero y aumenta ligeramente el Cu hepático (Sugawara y Sugawara, 1987).

##### Metalotioneínas (MT)

Las MT se aislaron por primera vez en 1957 en el riñón de caballos como una proteína unida al Cd (Kagi y Vallee, 1960). Posteriormente en animales de experimentación se demostró que su síntesis podía ser inducida por metales, sugiriéndose que podrían participar en la detoxificación del Cd y otros metales pesados (Bremner y Beattie, 1990).

También se demostró que las MT participaban en el metabolismo de metales esenciales, al observarse su unión al Cu y al Zn en gran cantidad de tejidos (Bremner y Young, 1976) y que su síntesis podía ser inducida por la administración de uno de estos metales esenciales (Webb, 1972; Bremner *et ál.*, 1978) y por un gran número de procesos fisiológicos como el hambre o el estrés (Oh *et ál.*, 1978; Sobocinski *et ál.*, 1978). Las MT 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 Zn (Nordberg y Nordberg, 2000).

En cuanto a sus propiedades físico-químicas, las MT están formadas por una cadena polipeptídica única de 61 aminoácidos, con entre 25-30 % residuos de cisteína, capaz de unir a 5-7 átomos de Cu por molécula y que presentan una secuencia homóloga, indicando la conservación de la estructura primaria a lo largo de la cadena evolutiva (Knudsen *et ál.*, 1998).

En el hígado las MT desempeñan una importante función en el metabolismo del Cu, si bien este papel no está demasiado claro. El exceso de Cu del citosol se une a las MT para ser eliminado a través de los lisosomas vía biliar (Bremner, 1987), el hecho de que en animales con altos niveles de Cu hepático se observen grandes concentraciones de complejos Cu-MT en los lisosomas y organelas granulares parece confirmar esta teoría (Riordan y Richards, 1980; Johnson *et ál.*, 1981; Mehra y Bremner, 1984). Sin embargo, el hecho de que no se detecten anormalidades en el metabolismo hepático del Cu en animales deficientes de Zn (en los cuales las MT unidas al Cu están ausentes) parecen indicar que esta proteína no resulta imprescindible para el transporte intracelular del Cu (Bremner, 1987).

No obstante, la mayor o menor capacidad de síntesis de MT observada entre distintas especies podría explicar una mayor o menor susceptibilidad a la acumulación de Cu y por tanto a su toxicidad. De hecho especies como el perro o el cerdo (gran capacidad de síntesis de MT y gran cantidad de Cu unido a las mismas en el citosol) son muy resistentes a intoxicaciones por Cu, mientras que la especie ovina (escasa capacidad de síntesis de MT) es muy susceptible a intoxicaciones por este metal (Bremner y Beattie, 1990). Además, en cerdos en crecimiento (Mehra y Bremner, 1984), en razas de perros como los Bedlington terriers o los Doberman pinscher (Johnson *et ál.*, 1981) que presentan un defecto inherente en el metabolismo de Cu que conlleva a una acumulación excesiva de este metal o en enfermedades colestáticas en humanos (Janssens *et ál.*, 1984), la mayor parte del Cu está unido a MT del citosol, de lisosomas y otras porciones particuladas. Sin embargo, en ovejas con elevados niveles de Cu hepático (Taylor *et ál.*, 1988; Mehra y Bremner, 1984), ratas alimentadas con suplementos de Cu (Bremner y Mehra, 1983) y en animales deficientes en Zn de muchas especies animales (Bremner, 1991ab), tan sólo una pequeña porción de Cu se encuentra unido a las MT.

En fetos y animales neonatos, que presentan unas concentraciones hepáticas de Cu/Zn muy elevadas, estos metales se encuentran ligados en un porcentaje muy alto a las MT (Bremner *et ál.*, 1977; Bakka y Webb, 1981; Mason *et ál.*, 1981). Observándose que la distribución de Cu en

fetos y neonatos en humanos (Riordan y Richards, 1980) y ganado vacuno (Hartman y Weser, 1977) es similar a la de animales adultos expuestos a niveles excesivos de Cu.

Las MT, a parte de ligar Cu, también pueden fijar otros elementos tanto esenciales (Zn) como tóxicos (sobre todo Cd, aunque también Hg o Ag), pudiendo dar lugar a interacciones entre estos metales tanto a la hora de la síntesis de las MT o su degradación, como por la unión a los puntos de fijación (Bremner, 1987). Las metalotioneínas poseen distinta afinidad para unir los diferentes cationes a sus grupos tiol: Hg(II) > Cu(II) > Ag(I) > Bi(III) > Cd(II) > Pb(II) > Zn(II) > Co(II) > Fe(II) (Funk, 1987; Vasak, 1991).

Se observó que el Cd<sup>+2</sup> y Hg<sup>+2</sup> desplazaban al Zn<sup>+2</sup> de Zn-MT hepática en ratas *in vivo* y *ex vivo* (Day *et ál.*, 1981) y que al realizar una inducción previa del hígado con Cu, Cd y Hg estos elementos podían desplazar al Zn de (Zn, Cu)-MT *in vivo* y *ex vivo*, pero al contrario de lo esperado el Hg era incapaz de desplazar al Cu de las MT, explicando este hecho que la unión de los distintos cationes a las MT dependen no solo de la afinidad de los mismos por los residuos de cisteína sino también de la cantidad relativa de los mismos en la célula (Hamilton *et ál.*, 1987).

Así, se ha demostrado que el Cd y el Cu compiten por su unión a los grupos tiol de las MT (Wentink *et ál.*, 1988), que las MT inducidas por el Cd se van a unir con más facilidad al Cd que al Cu (Foulkes, 1993) y que en presencia de concentraciones de Cd relativamente altas en relación a los ratios de Cu hepáticos se facilita el desplazamiento del Cu (Cosson, 1994). Estas relaciones negativas entre el Cd y el Cu hepático se observaron en ganado vacuno y ovino expuesto experimentalmente a Cd o que procedía de zonas contaminadas (Smith *et ál.*, 1991ab; Miranda, 1999; Miranda *et ál.*, 2005).

El Cu desplaza al Zn y al Cd de sus puntos de unión en las MT (Bremner y Marshal, 1974) pudiendo explicar este hecho los casos de deficiencia de Cu en animales con dietas altas en Zn y Cd. Las uniones entre el Cu y las MT son muy sólidas, siendo el EDTA incapaz de desplazar al Cu de sus puntos de unión (aunque sí desplaza al Zn y en menor medida al Cd), sin embargo el tetratiomolibdato (TTM) es capaz de desplazar fácilmente al Cu de sus puntos de unión, pudiendo explicar este hecho los efectos adversos del Mo en el metabolismo del Cu en rumiantes (Bremner y Mehra, 1983).

#### Otras proteínas involucradas en el transporte intracelular

Los chaperones de Cu y las Cu ATP-asas son proteínas citosólicas pequeñas, encargadas del transporte del Cu en el citoplasma hacia su lugar de uso por las proteínas dependientes de Cu (Harris, 2000, 2001; Arnesano *et ál.*, 2004). De manera similar a lo observado en las MT, la estructura de estas proteínas esta muy conservada entre las distintas especies (Pena *et ál.*, 1999).

Todavía no se conoce con claridad la función de los Cu-chaperones suponiéndose que juega una papel importante en la prevención de la interacción inadecuada del metal con otros componentes celulares durante la transferencia del Cu o bien durante el tránsito del mismo a través del citoplasma celular (Harrison y Dameron , 1999). A parte de esta función protectora, los chaperones también intervienen en el reconocimiento del Cu para su incorporación en proteínas específicas (Pufahl, 1997); de este modo se ha sugerido que cada proteína Cu-dependiente utiliza un chaperón de Cu específico, señalándose que enfermedades como la de Wilson o la de Menkes en medicina humana podrían obedecer a defectos genéticos en estas proteínas transportadoras (Harris y Gitlin, 1996).

#### II.1.5. Distribución tisular de cobre

El hígado es el principal reservorio de Cu a nivel orgánico y sus niveles del metal en el caso de los rumiantes son muy altos en comparación con otras especies de monogástricos. Esto es debido a que los rumiantes, especialmente las ovejas, presentan una limitada eliminación biliar del mismo cuando su consumo es superior a las necesidades fisiológicas, llegando a observarse concentraciones de 600-1200 mg/kg (Miller *et ál.*, 1993; Underwood y Suttle, 2002) sin llegarse a apreciar alteraciones patológicas hasta que la capacidad de almacenamiento del órgano se ve superada, como en casos de exposición superiores a 6 meses, en los que el Cu se libera a la sangre dando lugar a una crisis hemolítica que concluye en la mayor parte de los casos con la muerte del animal.

Las concentraciones renales suelen ser bajas ( $\leq 10$  mg Cu/kg peso fresco), no presentando este órgano una capacidad para almacenar Cu, excepto en los casos en los que se produce una crisis hemolítica (por la superación de la capacidad almacenadora del hígado) en los que se aprecia un aumento grande de los niveles tanto de Cu como de Fe en el riñón (Puls, 1994).

El músculo, grasa y hueso (principales constituyentes de la canal) presentan concentraciones de Cu muy bajas, debido a esto, los niveles medios del metal que se describen en las canales suelen ser bajas, de 1.2 mg/kg y 0.8 mg/kg peso fresco en ganado ovino y bovino respectivamente (Grace, 1983), y superiores en animales no rumiantes 4.8 y 1.7 mg/kg peso vivo respectivamente en ratas y pollos (Suttle, 1987).

Los niveles de Cu presentes en sangre también son bajos, aunque reflejan la cantidad de oligoelemento que el animal ingiere sobre todo en casos de altos niveles de Cu en la dieta (Gummow, 1996; Radostits *et ál.*, 2002).

#### II.1.6. Excreción

La bilis es la principal vía para la excreción de Cu en mamíferos (Luza y Speisky, 1996; Underwood y Suttle, 2002), si bien en menor medida también se puede eliminar por las secreciones intestinales, pancreáticas, por el sudor y por la leche (Hidiroglou *et ál.*, 1990).

Además, el Cu suele presentarse en la sangre unido a la CP o en el interior de los eritrocitos siendo muy poco permeable en los capilares glomerulares y por tanto su excreción por vía urinaria es prácticamente insignificante, excepto en casos de obstrucción biliar o en la enfermedad de Wilson en humanos y en el ganado ovino expuesto a Mo (Smith *et ál.*, 1968; Marcilese *et ál.*, 1969).

La excreción biliar permite combatir los excesos de Cu en la dieta y posibilita la realización de un reciclaje enterohepático del metal que resulta de especial relevancia en animales rumiantes debido a su baja absorción intestinal. Gooneratne *et ál.* (1989b) han propuesto tres vías de transferencia de Cu del hígado a la bilis para su excreción: (1) vía transbiliar: Cu pasa a la bilis sin entrar en el hepatocito, (2) transhepatocelular: el Cu entra en los hepatocitos, se une a transportadores celulares (posiblemente también a MT) y se elimina a través de la bilis y (3) la hepatolisosomal (más importante): el Cu entra en los hepatocitos, se une a las MT para su captación por los lisosomas y a través de ellos se elimina en la bilis.

La velocidad de excreción biliar es muy variable en función de la especie; así, se ha observado que en animales a los que se les administra Cu se observan rangos de eliminación del mismo de 4% y de 80-90% a los 3 días posteriores a la administración en terneros y cerdos respectivamente, explicando este hecho la mayor susceptibilidad de los rumiantes a procesos de intoxicación crónica en comparación con los cerdos. Además, también se observó que el Cu infundido llega más rápidamente al hígado en el caso de los terneros, mientras que en el caso de los cerdos este traslado del metal desde el plasma al hígado se produce más lentamente (Charmley y Symonds, 1985). Similares resultados fueron obtenidos en el caso de la especie bovina en donde  $\approx 95\%$  del Cu pasa rápidamente del plasma al hígado, siendo su excreción biliar muy limitada 10 días posteriores a la infusión del metal (Lynne *et ál.*, 1982).

## **II.2. Funciones del cobre**

El Cu es un elemento esencial para la vida tanto en mamíferos, plantas como en organismos inferiores, desempeñando gran cantidad de efectos biológicos (Buck *et ál.*, 1981). La necesidad de la inclusión del mismo en la dieta animal se descubrió al observarse su necesidad en el proceso de formación de hemoglobina a pesar de no ser un constituyente de la misma, interviniendo para mejorar la capacidad de los animales para absorber Fe (Underwood, 1983; Miller *et ál.*, 1993). Además, se ha demostrado en vacas la existencia de una correlación positiva entre la concentración de Cu en plasma y el hematocrito, confirmando de este modo la importancia del Cu en la eritropoyesis (Awolaja *et ál.*, 1997).

El Cu se encuentra formando parte de un gran número de enzimas, de entre las que destacan las descritas de modo esquemático en la siguiente tabla (Frieden, 1986).

Enzima	Localización	Función	Déficit
Citocromo-c-oxidasa	Membrana mitocondrial interna	Transporte electrónico	Producción de energía y conducción nerviosa deficientes, fallo respiratorio
Superóxido dismutasa (SOD)	Citoplasma. Cerebro, hígado, corazón, eritrocitos	Eliminación de radicales superóxido	Degeneración del SNC, convulsiones
Tirosinasa	Melanocitos del ojo y piel	Producción de melanina	Despigmentación
Dopamina-β-hidroxilasa	Plasma, médula adrenal	Producción de catecolaminas	Desequilibrio centro hipotalámico: hipotermia, anorexia, fallo respiratorio, somnolencia, deshidratación, ataxia
Amino-oxidasa	Plasma, cerebro, pulmón, riñón, intestino, placenta	Oxidación de mono-, di- y poliaminas	Aumento de los niveles de histamina que producen urticaria
Lisil-oxidasa	Cartílago, hueso, sangre	Entrecruzado de colágeno y elastina	Manifestaciones del tejido conectivo: ruptura vascular, anomalías óseas
Ceruloplasmina	Plasma	Transporte de Cu, movilización de Fe, antioxidante	Anemia, enzimas de Cu bajos

Por tanto, como se deduce de la tabla anterior, el Cu es necesario para una gran variedad de funciones entre las que cabe citar la eritropoyesis, protección antioxidante, formación ósea y cardíaca, desarrollo del tejido conectivo y sistema nervioso central, queratinización y pigmentación de tejidos (Radostits *et ál.*, 2002; Underwood y Suttle, 2002).

### II.2.1. Eritropoyesis

La sangre es uno de los tejidos diana del Cu al estar el metal fuertemente involucrado en los procesos de síntesis de la médula ósea (Barceloux, 1999). Se ha observado la aparición de anemia en casos de deficiencias de Cu intensas o prolongadas, no pudiendo darse una hematopoyesis normal cuando las concentraciones del metal encuentran entre 0.095-0.190 mg/dL. El tipo de anemia que se desarrolla en los animales ante deficiencias de Cu es diferente entre las distintas especies animales, así, en el caso del ganado vacuno y ovino se observa una anemia hipocrómica y macrocítica, en perros es normocrómica y normocítica, mientras que en cerdos, conejos y ratas la anemia es hipocrómica y microcítica (al igual que la anemia por deficiencia de Fe). En un principio se creía que el principal efecto del Cu era actuando durante la formación de hemoglobina, de tal modo que las alteraciones en el metabolismo del Fe agravaban las consecuencias de la deficiencia de Cu, sin embargo en conejos y ratas se observó

que la administración de suplementos de Cu se acompañaba de una mejora en la eritropoyesis de los animales sin aumentos en la concentración de hemoglobina. Se han descrito diversos mecanismos de participación del Cu durante la hematopoyesis:

**Citocromo-c-oxidasa.** En animales con un estatus adecuado de Cu se observa una alta actividad de la enzima en la médula ósea relacionada con la hematopoyesis, mientras que en animales deficientes en Cu esta enzima está disminuída (eritroblastos con mitocondrias aumentadas y apiladas) y la hematopoyesis se ve afectada. Además, deficiencias de esta enzima afectan a la síntesis de fosfolípidos y retrasan la maduración de los eritrocitos.

**Ceruloplasmina (CP).** Interviene en la saturación de la transferrina con Fe y por tanto su uso en la médula ósea. En animales deficientes en Cu la actividad plasmática de la CP disminuye, si bien para que se observe una disminución de la movilización del Fe, las deficiencias de Cu deben ser largas y severas con niveles intensamente disminuídos de CP, explicando este hecho que la anemia sea un signo tardío en animales deficientes en Cu.

**Superóxido-dismutasa (SOD).** Si bien esta enzima no interviene de modo directo en los procesos de formación de los eritrocitos o hemoglobina, una deficiencia de la misma en animales deficientes en Cu provocó una menor supervivencia de los eritrocitos circulantes en cerdos y la aparición de cuerpos de Heinz en los eritrocitos de los corderos, efectos atribuídos a los daños oxidativos producidos en casos de disminución de esta enzima.

### II.2.2. Protección frente a oxidantes

El papel protector del Cu frente a la oxidación se debe a que se encuentra formando parte de enzima CuZnSOD, de este modo, el descenso de CuZnSOD se correlaciona con una disminución del Cu hepático y con situaciones de daño oxidativo hepático por radicales libres (Taylor *et ál.*, 1988). Además, la CP también actúa como agente antioxidante al capturar el Fe y los radicales libres (Saenko *et ál.*, 1994) y interacciona con otras moléculas con propiedades antioxidantes como Mn, Se y vitamina E.

### II.2.3. Desarrollo cardíaco

En animales deficientes en Cu se han observado defectos en la síntesis de proteínas miofibrilares asociados a una baja actividad del enzima citocromo-c-oxidasa (Chao y Allen, 1992), conduciendo a un agrandamiento del tamaño cardíaco en ratas (Abraham y Evans, 1972) y ganado vacuno (Mills *et ál.*, 1976); así, en caso de que la deficiencia de Cu sea prolongada o severa podría provocar el remplazo del miocardio por tejido fibroso o la muerte del animal por la aparición de hemopericardio o hemotórax (a consecuencia de una ruptura cardíaca).

Microscópicamente en el ganado vacuno las miofibrillas cardíacas se encuentran deformadas y aumentadas como consecuencia de un aumento del número de mitocondrias que aisladas *in vitro*, no presentaron anomalías en sus funciones respiratorias y fosforilativas (Goodman y Dallman, 1970). En diversos estudios histoquímicos realizados con las mitocondrias en casos de déficit de Cu se observó que a medida que la actividad de la citocromo-c-oxidasa se veía disminuída, aumentaba la actividad de otras enzimas oxidativas mitocondriales y que los mecanismos para la producción de energía estaban también aumentados por el uso de vías glucolíticas que son menos eficientes.

En ganado vacuno que padece deficiencia crónica de Cu, a nivel histológico se observó un espesamiento de la red de fibras miocárdicas y el reemplazo de las fibras atróficas por tejido fibroso, mientras que en otras especies como la porcina (menor susceptibilidad a deficiencias de Cu) no se observaron lesiones específicas en las fibras miocárdicas (Underwood y Suttle, 2002).

### II.2.4. Desarrollo de los vasos sanguíneos

En casos de deficiencia de Cu se produce una disminución de la actividad de la enzima lisil-oxidasa, por lo que 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). Además, se conoce un papel activo del Cu como componente de ciertas sustancias angiogénicas que promueven la migración celular y el crecimiento de capilares, por lo que una deficiencia del metal en fetos, particularmente durante la organogénesis, o en recién nacidos durante su crecimiento, puede dar lugar a severas hemorragias (McAuslan *et ál.*, 1980).

La debilidad progresiva de las paredes arteriales conduce a la aparición de aneurismas y muerte repentina por rotura arterial en un gran número de especies animales como pollos, pavos, cerdos, conejos y cobayas (Underwood y Suttle, 2002). Sin embargo, en el ganado vacuno (Mills *et ál.*, 1976) y ovino (Cleary y Fanning, 1975) no se ha observado ni fragmentación del tejido elástico ni la ruptura de la aorta, aunque sí cambios en el tejido elástico en el ligamento nugal en las vacas (Mills *et ál.*, 1976).

A consecuencia de la fragmentación del tejido elástico también se evidenciaron casos de hemorragias subcutáneas e internas en pollos que pueden comprometer la vida del animal, y casos de hidropericardio, hidrotórax, efusión pleural y ascitis, que resultan difíciles de diferenciar de los efectos provocados por la anemia y los defectos cardíacos que como comentamos anteriormente se dan en las deficiencias de Cu (Gallagher, 1979).

#### II.2.5. Desarrollo óseo

El Cu interviene en el desarrollo óseo a través de la enzima lisil-oxidasa que se encarga del entrecruzamiento de las fibras de colágeno y elastina, proceso importante para la mineralización del colágeno y por tanto para las fases iniciales del desarrollo óseo (Suttle, 1987).

Las anomalías en el desarrollo óseo varían entre especies y razas. Las alteraciones de la osificación endocondrial que provoca un crecimiento óseo anormal (osteochondrosis) afectan únicamente a animales en fase de crecimiento, por lo que la mayor o menor cantidad de alteraciones dependerá del ritmo de crecimiento, de la distribución del peso corporal y de los movimientos característicos de cada especie animal. Así, en el ganado vacuno deficiente en Cu en fase de crecimiento se suele observar un ensanchamiento de las epífisis en los huesos de las extremidades posteriores, sobrecrecimiento de las articulaciones costocondrales (“rosario”) y una gran incidencia de fracturas óseas espontáneas.

#### II.2.6. Importancia en el sistema nervioso central

La importancia del Cu en el desarrollo del SNC se descubrió al investigar la “ataxia neonatal o enzoótica” de los corderos (Brady y Helvig, 1984). En esta enfermedad se observaron niveles disminuidos de la enzima citocromo-c-oxidasa necesaria para el mantenimiento de la integridad axonal y neuronal y también para la síntesis de fosfolípidos necesarios para la posterior formación de mielina (Bremner y Mehra, 1983). En animales sanos la actividad de la citocromo-c-oxidasa es muy elevada en el sistema nervioso y durante las fases iniciales de la deficiencia de Cu se produce una disminución de la actividad de la enzima en el cerebro, aunque en menor medida que la observada en otros tejidos como el hígado, hecho que probablemente se deba a un intento por asegurar el correcto desarrollo del sistema nervioso; sin embargo, en casos de deficiencia avanzados se puede observar una reducción de la actividad cerebral del enzima de  $\approx 70\%$  con anomalías importantes en el sistema nervioso central (Abraham y Evans, 1972). Por tanto, uno de los factores más importante para el desarrollo de la ataxia neonatal parece ser la concentración de Cu en el cerebro, considerándose como valor umbral entre la clínica normal y la enfermedad en 3 mg Cu/kg peso húmedo cerebro, observándose que a concentraciones inferiores se producía una deplección importante de la enzima citocromo-c-oxidasa a nivel del núcleo rojo (Smith, 1980).

Además, también se constató una reducción importante de la actividad citocromo-c-oxidasa en la región de núcleo rojo del cerebro, así como del contenido en Cu, en la ataxia neonatal tardía.

Estudios recientes sitúan al Cu, junto con otros oligoelementos como el manganeso, en la etiología de patologías nerviosas como la Encefalopatía Espongiforme Transmisible Bovina o EETB (Thackray *et ál.*, 2002; Tsenkova *et ál.*, 2004; Deloncle *et ál.*, 2006) o la Enfermedad de Alzheimer (Berthon, 2000; Strausak *et ál.*, 2001; Angel *et ál.*, 2002; Lech *et ál.*, 2002; Perry *et ál.*, 2003); describiéndose proteínas que ligan Cu relacionadas con estas enfermedades como son la Proteína priónica (PrP) en el enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Prusiner, 1991) y la proteína precursora de amilode (PPA) en el Alzheimer (AD) (Selkoe, 1997).

En el caso de la EETB se ha observado que la proteína priónica celular (PrP<sup>c</sup>) necesita de su unión al Cu para estabilizarse (Hornshaw *et ál.*, 1995) y adquirir una función antioxidante a nivel cerebral similar a la SOD (Brown *et ál.*, 1997; Wong *et ál.*, 2000), y que disminuciones de Cu y aumentos de Mn en el cerebro se asocian a la aparición de la EETB debido a que el Mn puede desplazar al Cu de sus puntos de unión en la PrP<sup>c</sup> provocando cambios bioquímicos en la proteína (Thackray *et ál.*, 2002). Es por este motivo por el que en la actualidad se está estudiando en toda Europa la posible influencia de factores medioambientales (particularmente de elementos traza como el Cu y el Mn) en la incidencia de EETB (Imrie *et ál.*, 2009). Recientemente en un estudio llevado a cabo con ganado vacuno adulto se observó que ante una disminución cerebral de Cu, tanto la concentración y forma bioquímica del PrP<sup>c</sup> como la actividad SOD cerebral permanecían invariables, cuestionando de este modo la importancia del Cu en el desarrollo de la EETB (Leigher *et ál.*, 2007). Sin embargo, los niveles de MT I/II presentes en la médula de los animales afectados por esta enfermedad pueden desempeñar funciones aún no bien esclarecidas en respuesta a las infecciones priónicas (Hanlon *et ál.*, 2002).

Se han descrito lesiones similares a las de la Encefalopatía Espongiforme Bovina en terneros con elevados niveles de Cu en hígado y cerebro y con actividades bajas de CP plasmática, sugiriendo la conexión de esta enfermedad con la Enfermedad de Wilson en humanos, en donde al no poder distribuirse el Cu de forma adecuada, el metal se acumula en hígado y sistema nervioso central causando importantes lesiones (Wada *et ál.*, 1995).

#### II.2.7. Pigmentación

El Cu forma parte de la enzima tirosinasa que interviene en el proceso de generación de melanina a partir de tirosina, resultando ser este proceso muy sensible a las alteraciones en el estatus del metal (Underwood y Suttle, 2002). La despigmentación suele ser el síntoma clínico más precoz de la deficiencia de Cu en todas las especies animales de capa pigmentada (Underwood y Suttle, 2002); así, el pelo rojo se despigmenta a amarillo y del negro cambia a gris, sobre todo alrededor de los ojos, punta de las orejas y en los flancos (Herd, 1990). Sin

embargo, la despigmentación es un síntoma común a otros procesos carenciales como deficiencias de vitaminas o Co, por lo que carece de valor diagnóstico (Underwood y Suttle, 2002). Además, también se pueden dar casos de alopecia y alteraciones de queratinización.

#### II.2.8. Inmunocompetencia

El Cu juega un papel muy importante para el correcto funcionamiento de los linfocitos B y T, los neutrófilos, macrófagos y función del complemento (Gengelbach y Spears, 1998). En animales de laboratorio se ha observado que la deficiencia de Cu provoca un aumento de los mastocitos (células inespecíficas) y disminuye las células T (células específicas del sistema inmune) (Mulhern y Koller, 1988), y en el caso del ganado vacuno deficiente en Cu se aprecia un aumento en el número de leucocitos (Arthington *et ál.*, 1996; Gengelbach *et ál.*, 1997). Además, en ganado vacuno al que se infectó de modo intramamario con *E. coli* se observó una disminución en la severidad de la infección en animales suplementados con 20 mg/kg de Cu frente a los animales control, si bien no pudo apreciarse una disminución en la duración del proceso (Scaletti *et ál.*, 2003).

Sin embargo, en experimentos realizados con vacas jóvenes con una deficiencia de Cu inducida por Mo, las respuestas febriles a infecciones virales experimentales se mantuvieron inalteradas (Arthington *et ál.*, 1996) o no estuvieron relacionadas con el contenido de Cu (Gengelbach *et ál.*, 1997).

### III. ACUMULACIÓN CRÓNICA DE COBRE

El Cu es un elemento esencial para la vida, realizando multitud de funciones como hemos comentado anteriormente, sin embargo, en el caso de que sus concentraciones superen un determinado umbral pueden aparecer casos de toxicidad. Los niveles de Cu tolerables sin que el metal resulte tóxico para el organismo varían mucho entre las distintas especies animales, siendo el ganado ovino el más susceptible (no se observa un aumento de la eliminación biliar de Cu en casos de aumentos en los niveles del metal) y el porcino el más resistente. Estas diferencias observadas entre rumiantes y no rumiantes también están relacionadas con el metabolismo del S y a diferencias dietéticas en los niveles de S, Mo, Zn, Fe y Se (Underwood y Suttle, 2002). Dentro de la intoxicación por Cu en rumiantes debemos distinguir dos tipos: aguda (infrecuente), puede darse por ingestiones excesivamente altas o por administración por vía parenteral de elevadas concentraciones de Cu, aumentando excesivamente los niveles del metal en el organismo en un tiempo muy breve; y la crónica (más frecuente), que se produce por un aumento de la acumulación hepática de Cu debido a niveles dietéticos del metal por encima de las necesidades nutricionales del animal.

#### III.1. Etiopatogenia

La intoxicación crónica por Cu suele darse principalmente en 3 circunstancias: (1) ingesta alta de Cu junto con niveles adecuados-bajos de Mo, (2) dieta con bajos niveles de Mo pero concentraciones de Cu normales-elevadas, (3) ingestión de plantas hepatotóxicas.

Se han dado casos de intoxicación en rebaños de vacas que pastaban en campos abonados con gallinaza (323-362 mg Cu/kg MS), llegando a describirse síntomas de intoxicación crónica en los animales, cuyas concentraciones hepáticas del metal llegaron a superar los 1000 mg/kg peso fresco (Tokarnia *et ál.*, 2000). En este caso los altos niveles de Cu procedían de la propia dieta, sin embargo, generalmente se debe a la aplicación de suplementos minerales que exceden las necesidades nutricionales de los animales durante periodos de tiempo largos. En ganado vacuno se han descrito episodios de toxicidad en terneros alimentados con lactorreemplazantes (que contenían de 120-159 mg Cu/kg MS) en los que se observaron niveles hepáticos de 297-500 mg Cu/kg peso fresco (Croubels *et ál.*, 2001); en rebaños lecheros alimentados a base de un concentrado (800-1000 mg Cu/kg MS), en los que se observó una elevada mortalidad tanto de animales adultos como de los terneros y graves deterioros en el estado físico de los animales y en su producción láctea (Perrin *et ál.*, 1990).

También se han observado intoxicaciones de tipo iatrogénico; así, terneros neonatos a los que se administraron bolos de óxido de Cu desarrollaron síntomas de intoxicación y muerte de un gran número de animales entre las 6-8 semanas de edad con concentraciones hepáticas y renales de 1000 y 250 mg Cu/kg peso fresco respectivamente (Hamar *et ál.*, 1997) y en terneros de 2-4 meses a los que se les administró antihelmínticos ricos en Cu se produjo una

gran mortalidad, describiéndose niveles de 277-684 mg Cu/kg peso fresco en hígado y de 1,1-82 mg Cu/kg peso fresco en riñón (Sullivan *et ál.*, 1991).

En otras ocasiones la suplementación de Cu administrada a las vacas puede ser adecuada (dentro de los límites legales) y darse casos de intoxicación por este metal debido a la existencia de factores estresantes o deficiencias dietéticas de otros oligoelementos como el Se o el Mo (Galey *et ál.*, 1991; Tremblay y Baird, 1991).

El ganado de cría intensiva es el más susceptible a la intoxicación crónica por Cu, aunque también se dan casos de toxicidad en animales en pastoreo, como la intoxicación crónica descrita en ganado vacuno por la contaminación de los pastos por residuos de minería o emisiones industriales, o por el uso de purines de cerdo (Grobler y Swan, 1999ab; Tokarnia *et ál.*, 2000).

Los estudios de distribución subcelular de Cu hepático en ganado ovino resultan de gran utilidad a la hora de esclarecer la patogenia de la intoxicación crónica por Cu (Gooneratne *et ál.*, 1979; Kumaratilake y Howell, 1989). En las fases tempranas de acumulación el metal se acumula unido a las MT en el citosol de las células hepáticas y cuando los sitios de unión se saturan (en el ganado ovino se produce muy rápidamente) comienza la absorción del Cu por los lisosomas (fracción granular), organelas importantes para mantener unas concentraciones constantes del Cu en el citoplasma (Kumaratilake y Howell, 1989) y para la eliminación biliar del mismo, si bien hay otras vías para su excreción (Bremner, 1998). En los momentos iniciales de acumulación lisosomal se produce un aumento en el número de estas organelas, relacionándose positivamente el número de lisosomas con la concentración hepática de Cu, y a medida que la acumulación progresa se reduce el incremento de los mismos, acumulándose los excesos del metal en los lisosomas ya existentes que por tanto aumentan en volumen. Mientras los lisosomas sean capaces de desempeñar eficazmente el almacenamiento de Cu el animal no manifiesta signos clínicos de daño hepático (Howell y Gooneratne, 1987), sin embargo, una vez saturados los lisosomas el Cu comienza a acumularse en el núcleo y otras organelas, o incluso puede permanecer libre en el citosol causando importantes lesiones celulares.

Las distinta susceptibilidad de las especies animales a padecer procesos de intoxicación crónica parece estar relacionado con la mayor o menor capacidad de los lisosomas para acumular Cu, observándose una saturación lisosomal a concentraciones de entre 160-180 mg Cu/kg peso fresco en ganado ovino (concentraciones < 2 veces los niveles descritos como adecuados para estos animales) (Saylor y Leach, 1980), mientras que en otras especies menos susceptibles como las ratas esta saturación se da a concentraciones de entre 210-300 mg Cu/kg peso fresco (niveles  $\approx$  100 veces superiores a los descritos como óptimos para esta especie) (Corbett *et ál.*, 1978).

El mecanismo por el cual se produce una necrosis hepática en animales con intoxicación crónica por Cu puede deberse a la ruptura de la membrana lisosomal ante un acúmulo

excesivo del metal, provocando la liberación de enzimas hidrolasas ácidas al citosol (Gooneratne *et ál.*, 1980), a la formación de radicales libres que producirían una peroxidación lipídica de la membrana celular (Kumaratilake y Howell, 1989) o a que la acumulación de Cu en la fracción nuclear desestabilice el ADN e inhiba la actividad de la enzima RNA-polimerasa (Bremner, 1998).

### III.2. Cuadro clínico

Las manifestaciones clínicas en la intoxicación crónica por Cu pueden dividirse en 3 fases:

Fase prehemolítica. Fase asintomática durante la cual el Cu se acumula fundamentalmente en el hígado durante un periodo de tiempo de semanas-meses (Howell y Gooneratne, 1987).

Fase hemolítica o clínica. Cuando la capacidad de almacenamiento hepática se ve superada se produce un gran daño en este órgano y una liberación del metal a la circulación sanguínea, dando lugar a una hemólisis que en función de su severidad va a condicionar la vida del animal. Los síntomas clínicos de los animales son típicos de una anemia hemolítica como letargia, polidipsia, mucosas ictéricas, ojos hundidos y orina oscura característica del daño renal producido por la crisis hemolítica.

Fase posthemolítica. En los animales que sobreviven se vuelven a repetir las crisis hemolíticas incluso después de que la fuente de Cu haya sido eliminada. El animal puede recobrar el estado de salud, aunque la recuperación es más lenta cuanto más intensa haya sido la fase hemolítica.

### III.3. Lesiones

#### III.3.1. Alteraciones hepáticas

Durante el periodo prehemolítico se ha observado un gran aumento en el número y tamaño de los lisosomas, presentando algunos de ellos interrupciones en sus membranas que se asocia a la rotura y liberación del contenido de estas organelas (Gooneratne *et ál.*, 1980). Además, la acumulación de Cu comienza en los hepatocitos de la zona periportal, si bien en determinadas razas ovinas como la Merina la acumulación comienza alrededor de las venas centrales y a medida que progresa la acumulación se extiende a la zona periportal; sin embargo, las células hepáticas necróticas no siguen un patrón de localización si no que se distribuyen aleatoriamente (Howell y Gooneratne, 1987).

En la fase hemolítica se observa un elevado número de células necróticas y de Kupffer (sobre todo alrededor de la vena centrolobulillar), focos de neutrófilos y densos depósitos granulares

de Cu tanto en las células parenquimatosas como en las células de Kupffer (Howell y Gooneratne, 1987).

### III.3.2. Alteraciones sanguíneas

El aumento de la concentración de Cu en sangre que da lugar a la crisis hemolítica procede, como ya se ha comentado anteriormente, de la ruptura de los lisosomas hepáticos que conduce a la lisis de los hepatocitos.

El mecanismo por el que el Cu produce la lisis de los eritrocitos no está claro, pero podría ser debido a efectos tanto directos como indirectos del metal deformando la membrana eritrocitaria, dando lugar a cuerpos de Heinz; o bien actuando sobre la actividad enzimática de enzimas como la glucosa-6-P-deshidrogenasa, glutatión y adenosina-trifosfato. Otras alteraciones en la bioquímica sanguínea están asociadas al daño hepático. En la fase prehemolítica se observa un aumento de la actividad de determinadas enzimas hepáticas como sorbitol-deshidrogenasa, arginasa o glutamato deshidrogenasa que aumenta significativamente en casos de intoxicación crónica por Cu, siendo considerado como el mejor indicador de este tipo de intoxicación (Humann-Ziehanck *et ál.*, 2001). Estos cambios sanguíneos están correlacionados con aumentos de la enzima fosfatasa ácida y Cu plasmático, debido a la liberación del contenido lisosomal hepático (Spengler, 1989).

### III.3.3. Alteraciones renales

Durante la fase prehemolítica el Cu se va acumulando sin que se vea alterada la función renal, observándose mínimos daños estructurales. Sin embargo, durante la fase hemolítica los niveles renales de Cu y Fe aumentan conduciendo a una incapacidad glomerular y tubular y a un aumento de la degeneración y necrosis celular en los que probablemente se vean implicados los mismos mecanismos fisiopatológicos que afectan al parénquima hepático (Ledoux *et ál.*, 1996).

#### III.4. Acumulación subclínica de cobre en el hígado

Como ya se ha indicado anteriormente existe una fase prehemolítica, clínicamente silente y más o menos prolongada, durante la cual el Cu se va acumulando en el hígado, detectándose pequeñas alteraciones hepáticas que se pueden medir laboratorialmente analizando determinadas enzimas marcadoras de daño hepático y que pueden ser responsables de un menor rendimiento de los animales (toxicidad subclínica) (Weaver *et ál.*, 1999).

En estudios de monitorización del estatus del Cu llevados a cabo en los últimos años (Hadrich, 1996; Jilg *et ál.*, 1997; López Alonso *et ál.*, 2000b) se observa que un elevado porcentaje de animales presenta niveles del metal por encima de los límites fisiológicos y por tanto tienen un riesgo potencial de toxicidad; hecho que se debe fundamentalmente a la suplementación de los animales con Cu por encima de sus necesidades fisiológicas (Engle y Spears, 2000a).

En estudios realizados con ganado vacuno adulto suplementado con Cu por largos periodos de tiempo se observó la aparición de toxicidad subclínica a dosis diarias  $\geq 12$  mg Cu/kg peso (concentración de Cu con la que habitualmente se suele suplementar a los animales). Al estudiar la actividad de la enzima hepática aspartato aminotransferasa (ASAT) se observó que en animales suplementados con 10 mg Cu/día se detectaba daño hepático a partir del día 40 en adelante, apareciendo picos de la actividad plasmática de esta enzima cada 80 días intercalados con periodos de actividad enzimática normal; pudiendo significar este hecho que no todos los hepatocitos acumulan Cu al mismo tiempo y en la misma cantidad, dañándose antes unos hepatocitos que otros. Además, los niveles plasmáticos fueron superiores en los animales suplementados diariamente con 10 o 20 mg Cu/kg peso con respecto a animales no suplementados que indica que cuando se produce una lisis celular el Cu se libera de estas células provocando un aumento significativo del metal en la sangre de los animales clínicamente normales (Gummow, 1996).

En otros estudios con ganado vacuno suplementado (10 y 20 mg/kg peso) y no suplementado, se observó una correlación positiva entre el nivel de suplementación y los niveles de Cu en el hígado y que durante la fase de acabado la adición de Cu reducía la ganancia de peso, la ingesta de alimento y por tanto el índice de conversión (consumo alimento/ganancia peso), efectos que pueden ser atribuidos a que altos niveles dietéticos de Cu pueden alterar la fermentación ruminal (Engle y Spears, 2000ab).

#### **IV. PARÁMETROS PARA VALORAR EL ESTATUS DE COBRE**

Para poder valorar correctamente el estatus del Cu se debe analizar en primer lugar la existencia de síntomas clínicos o subclínicos de pérdida de producción, la concentración de Cu en los distintos tejidos y sangre, la presencia o no de lesiones en los tejidos mediante un examen patológico de las mismos en caso de que se realice una necropsia y las concentraciones del metal en la dieta (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001; Underwood y Suttle, 2002).

##### **IV.1. Cobre dietético y sus antagonistas**

La determinación del Cu en la ración o pastos carece de valor diagnóstico si no se acompaña del análisis de otros elementos que interaccionan con este metal como el Mo. La relación Cu/Mo en la dieta se ha usado para determinar la mayor o menor predisposición de los animales a sufrir procesos de toxicidad o deficiencia de Cu (Milltimore y Mason, 1971). Sin embargo, este ratio no refleja la forma de Cu ingerida (más o menos absorbible) ni la influencia de otros elementos importantes en el estatus del Cu como el S y el Fe (Suttle, 1983a), por lo que el ratio Cu/Mo debe interpretarse con cuidado, aunque por lo general es aceptado que  $Cu/Mo < 1$  representa un riesgo elevado de alteración y entre 1-3 un riesgo de deficiencia.

##### **IV.2. Cobre en hígado**

La concentración de Cu hepático es el indicador más sensible del nivel de exposición de Cu en rumiantes, ya que aproximadamente entre el 50-60% del Cu total del organismo está almacenado en esta víscera; sin embargo la mayor limitación para su uso es la obtención de la muestra que tendría que realizarse en matadero (pudiendo ser una técnica demasiado tardía como para monitorizar el estatus de Cu en el rebaño) o biopsias que a menudo son invasivas y de difícil obtención (Underwood y Suttle, 2002). La concentración de Cu en el hígado va a estar influenciada por una serie de factores, entre los que destacan:

Especie. Relacionadas sobre todo con la excreción del metal, ya que como hemos comentado anteriormente las especies más susceptibles como el ovino y bovino poseen una elevada capacidad de almacenamiento de Cu en el hígado y una menor capacidad de excreción; además, los niveles sanguíneos de Cu en estos animales no aumentan en respuesta a aumentos en la ingesta del metal (a diferencia de las ratas) a no ser que los niveles sean excesivos y se supere la capacidad de almacenamiento hepático (Arnhold *et ál.*, 1998 ab).

Edad. Los animales neonatos de la mayoría de las especies poseen mayores concentraciones de Cu en hígado que los adultos, a excepción de los rumiantes, en los que se ha observado que la concentración de Cu en el hígado ovino va aumentando con la edad, mientras que en el ganado vacuno las concentraciones hepáticas del metal de los animales neonatos son similares a los de las vacas adultas.

Dieta. Las concentraciones hepáticas de Cu en ovino y bovino pueden reducirse significativamente por un aumento en la dieta de Mo y S, y también están influenciadas por los niveles de Zn, Cd y Fe (Bremner y Beattie, 1995).

Otras enfermedades. En ratas que sufrían infecciones de carácter agudo o crónico se observó una disminución del Cu hepático como consecuencia del aumento en la síntesis y secreción de CP (Beisel *et ál.*, 1974).

En función de las concentraciones hepáticas de Cu, distintos autores han realizado clasificaciones con el fin de determinar si los animales presentan riesgos de deficiencia del metal. Así, concentraciones < 6 mg Cu/kg MS representan un riesgo elevado de deficiencia, 6-20 mg Cu/kg MS un riesgo de alteración y > 20 mg Cu/kg MS adecuados (Underwood y Suttle, 2002); mientras que Puls (1994) establece un rango de deficiencia, marginalidad y óptimo de 0.5-10, 5-25 y > 25 mg Cu/kg peso fresco respectivamente.

La presencia de elevadas concentraciones hepáticas de Cu es uno de los parámetros más importantes para realizar el diagnóstico de intoxicación del metal (Howell y Gooneratne, 1987), si bien los niveles asociados a la toxicidad en ganado vacuno no están bien definidos: se considera que el umbral de toxicidad de esta especie es de 250 mg/kg peso fresco (Wikse *et ál.*, 1992; Radostits *et ál.*, 2002), aunque se han descrito casos de intoxicación por Cu en animales con concentraciones hepáticas medias de  $152 \pm 56.6$  mg/kg peso fresco con un rango entre 69-194 mg/kg peso fresco (Gummow, 1996) y de  $126 \pm 17.5$  mg/kg peso fresco con rango de 51-313 mg/kg peso fresco (Perrin *et ál.*, 1990). Además, hay que tener en cuenta que cuando se produce una necrosis hepática una vez excedida la capacidad de almacenamiento de Cu de la víscera, el metal pasa a la sangre, por lo que las concentraciones hepáticas que se detectan en esta fase de la intoxicación son más bajas.

### IV.3. Cobre en riñón

La concentración de Cu en riñón resulta de utilidad en animales con niveles de Cu en el umbral de toxicidad hepática para confirmar el diagnóstico de intoxicación, ya que los niveles de Cu en el riñón permanecen dentro de los rangos de normalidad de 4-6 mg/kg peso fresco (Puls, 1994) durante la fase de almacenamiento del metal en el hígado y posteriormente los niveles de Cu, junto con los del Fe, se incrementan una vez saturada la capacidad de almacenamiento hepático y desencadenada la crisis hemolítica (Riet-Correa *et ál.*, 1989). Confirmando este hecho se han observado concentraciones de Cu en hígado dentro del rango de normalidad de 36-166 mg/kg y en riñón de 22-35 mg/kg (muy elevados) en terneros intoxicados por Cu (Sargison y Scott, 1996).

#### IV.4. Cobre plasmático y sérico

La concentración de Cu en plasma o suero es uno de los parámetros más utilizados para establecer el estatus de Cu debido a la facilidad de obtención y procesamiento de las muestras (Tessman *et ál.*, 2001; Minatel y Carfagnini, 2002). Si bien hay que tener en cuenta que las concentraciones normales del metal en plasma son amplias y varían en función de un gran número de factores (McMurray, 1980). Así, se observa que las muestras de suero de animales adultos poseen concentraciones de Cu entre 10-20% inferiores a las de plasma debido a que parte de la CP se pierde con la coagulación (Suttle, 1994), por lo que los valores séricos deben ser corregidos multiplicándolos por 1.2 y restando 0.032 (Wikse *et ál.*, 1992). En un estudio en el que a los terneros se les inyectaban 160 mg de Cu en forma de metionina de Cu, no se apreciaron diferencias en la concentración sérica de este elemento con respecto al grupo no suplementado a lo largo de todo el estudio (Heidarpour-Bami *et ál.*, 2008) y en vacas en periodo de lactación suplementadas con los niveles recomendados de Cu-Zn frente a vacas que recibían el doble de suplementación de ambos elementos, los niveles séricos de Cu no se vieron afectados, observándose además la presencia de una gran variación interindividual de dichos valores (Spolders *et ál.*, 2010). En el caso de que el animal padezca enfermedades infecciosas u otros procesos que estimulen el sistema inmune (como la vacunación) se observan aumentos del Cu sanguíneo, debido a que se produce un incremento de la síntesis de CP incluso en animales inicialmente hipocuprémicos (Suttle, 1994). También existe la posibilidad de “falsos positivos” en dietas con elevado Mo debido a que el Cu se liga a los tiomolibdatos en sangre, no estando disponible para su metabolismo normal (Wikse *et ál.*, 1992). Esta falta de especificidad ha contribuido al escaso interés del Cu sérico como ayuda diagnóstica en comparación con el Cu hepático (Xin *et ál.*, 1993; Vermunt y West, 1994).

A pesar de la variación que presenta la medición de Cu en suero/plasma se suele aceptar que niveles  $< 0.5$  mg/L son indicativos de deficiencia del metal (Radostits *et ál.*, 2002), si bien en ganado ovino y bovino que presenta manifestaciones clínicas de deficiencia las concentraciones plasmáticas suelen ser de entre 0.2-0.3 mg/L (McFarlane *et ál.*, 1991; Underwood y Suttle, 2002).

#### IV.5. Cobre sanguíneo

La concentración de Cu en sangre total no se ha empleado de forma rutinaria para el diagnóstico de deficiencias de Cu, aunque algunos estudios han descrito que concentraciones entre 0.38-0.63 mg Cu/L representan un intervalo marginal para el desarrollo de deficiencias (Koh y Judson, 1987).

En la fase prehemolítica en ganado ovino se detectan pequeños incrementos momentáneos del Cu sanguíneo 14 semanas previas a la fase hemolítica, coincidiendo los mayores niveles del metal el primer día en que se observa la crisis hemolítica o los dos días previos a la misma, por lo que la concentración sanguínea de Cu tiene una validez limitada para el diagnóstico de la

acumulación crónica de Cu (Kumaratilake *et ál.*, 1981). Por tanto en el caso de intoxicaciones la determinación de Cu sanguíneo presenta una utilidad limitada, al encontrarse estos niveles dentro de la normalidad durante la fase prehemolítica y aumentando solo en caso de que se produzca una crisis hemolítica (Howell y Gooneratne, 1987); sin embargo se asume que concentraciones  $> 3$  mg Cu/L son indicativas de intoxicación (Bidewell *et ál.*, 2000).

#### **IV.6. Ceruloplasmina (CP)**

La actividad de la CP, principal exportador de Cu hepático hacia los tejidos, se considera un buen indicador del estatus de Cu en vacuno (Barboza y Blake, 2001) ya que este parámetro permite cuantificar únicamente el Cu fisiológicamente disponible (Wikse *et ál.*, 1992). Así, a concentraciones sanguíneas y hepáticas  $< 0.3$  mg/L y 40 mg/kg respectivamente la actividad de CP estará significativamente disminuida (Larson *et ál.*, 1995; Arthington *et ál.*, 1996), considerándose que valores de CP en plasma de 10-20 mg/dL son indicativos de un estatus de Cu adecuado, entre 5-10 mg/dL de deficiencia y  $< 5$  mg/dL de deficiencia severa (Gay *et ál.*, 1988).

#### **IV.7. Cu-Zn-Superóxido dismutasa (CuZnSOD)**

La medición de CuZnSOD de los eritrocitos constituye un método indirecto para valorar el estatus de Cu en animales, ya que en ganado ovino se ha comprobado que la actividad de esta enzima está relacionada con los niveles hepáticos del metal cuando la ingesta es de baja a moderada (Underwood y Suttle, 2002).

Ante una deficiencia de Cu la actividad de la SOD desciende de un modo lineal y lento (Suttle y McMurray, 1983).

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 ál.*, 1991). Gracias a que la actividad de SOD está correlacionada de forma importante con el Cu eritrocitario, la medición del Cu en los glóbulos rojos sería más útil y menos problemática (Arthington *et ál.*, 1996).

#### **IV.8. Biomarcadores de acumulación hepática de cobre**

En la actualidad los métodos de diagnóstico de intoxicación por Cu únicamente son válidos durante la fase clínica de la enfermedad, en la que ha ocurrido un importante daño orgánico, por lo que se está llevando a cabo una importante labor investigadora con el fin de identificar marcadores de las fases tempranas de la intoxicación por el metal antes de que se produzcan alteraciones funcionales.

La CP (principal componente del Cu en la sangre) se ve afectada por multitud de factores que no dependen de la exposición al Cu, sin embargo, se ha demostrado que la fracción no-CP de Cu en el suero está positivamente correlacionada con los niveles séricos del metal tanto en pacientes con altos niveles dietéticos de Cu como en casos de alteraciones metabólicas que conducen a grandes depósitos de Cu hepático (como enfermedad de Wilson o otras cirrosis en niños) (Eife *et ál.*, 1999; Araya *et ál.*, 2003; López-Alonso *et ál.*, 2006). Además, el Cu posee una gran afinidad para unirse a proteínas eritrocitarias, por lo que ciertos estudios realizados en humanos indican que podrían usarse como marcadores de sobreexposición al metal (Speisky *et ál.*, 2003).

En rumiantes se ha empleado el ratio CP/Cu sérico en el diagnóstico de deficiencia de Cu, permitiendo valorar la interferencia de elevadas concentraciones de Mo sobre el estatus de Cu, si bien se desconoce su utilidad en los casos de intoxicación (Mackenzie *et ál.*, 1997; Arnhold *et ál.*, 1998a).

#### **IV.9. Enzimas marcadoras de daño hepático**

La determinación de ciertas enzimas hepáticas permite evaluar el grado de necrosis celular una vez finalizada la fase prehemolítica de intoxicación por Cu. En rumiantes las enzimas hepáticas más empleadas con este fin son la aspartato-aminotransferasa (AST) liberada en respuesta a cambios en la permeabilidad hepatocelular, daño subletal y necrosis (Bakley *et ál.*, 1982) y la gamma-glutamil-transferasa (GGT) asociada a las membranas microsomales y liberada durante la necrosis (Lewis *et ál.*, 1997). También se han empleado otras enzimas hepáticas como la arginasa, sorbitol deshidrogenasa y la glutamato deshidrogenasa que aumentan significativamente en casos de intoxicación crónica por Cu (Humann-Ziehank *et ál.*, 2001) o enzimas lisosomales como la fostatasa ácida (Zervas *et ál.*, 1990; Sutherland *et ál.*, 1992). Sin embargo, algunos estudios muestran que las actividades de las enzimas hepáticas únicamente se elevan al comienzo de la crisis hemolítica, por lo que no deben considerarse como técnicas diagnósticas válidas (Humann-Ziehank *et ál.*, 2001).

#### **IV.10. Hematología**

Durante la fase clínica de intoxicación por Cu se observa una gran disminución del hematocrito y hemoglobina y en el frotis se aprecian numerosos fragmentos celulares, anisocitosis,

poiquilocitosis, policromasia y cuerpos de Heinz en >15% de los eritrocitos. Los glóbulos blancos están aumentados entre 2-3 órdenes de magnitud con un marcado aumento de los neutrófilos (Underwood y Suttle, 2002).

#### **IV.11. Hallazgos de necropsia**

En los animales que mueren durante la fase hemolítica se observa una ictericia generalizada, líquido seroso en las cavidades, hígado friable y de color anaranjado-amarillento; riñones edematosos y color marrón oscuro y orina de color rojo oscuro (Underwood y Suttle, 2002). Al realizar un examen histológico en el hígado se aprecia una necrosis de un gran número de hepatocitos (sobre todo alrededor de la vena central), hepatocitos con gran vacuolización y a veces con un pigmento granular de color amarillo claro, células de Kupffer repletas de pigmentos de color marrón y retención de la bilis en los canalículos biliares. En el riñón se puede observar un gran número de cilindros granulares rojos o hialinos, vacuolización de las células epiteliales o con pigmentos de color amarillo claro, dilatación de los túbulos renales y necrosis de las células de los túbulos contorneados proximales (Maiorka *et ál.*, 1998).

## **V. FACTORES DE VARIACIÓN EN LA ACUMULACIÓN ORGÁNICA DE COBRE**

Como hemos comentado anteriormente, la acumulación orgánica tanto de metales tóxicos como esenciales va a verse condicionada por diferentes factores, por lo que es difícil poder establecer una relación directa entre los niveles de exposición y las concentraciones tisulares encontradas (Ma, 1996; Gochfeld, 1997). Estos factores pueden ser propios del animal (especie, raza, sexo, edad) o depender de otros factores (dieta, interacciones entre elementos, etc.) (Goyer, 1995).

### **V.1. Influencia de la especie**

Como ya se ha comentado anteriormente existen especies altamente tolerantes al Cu como los caballos y los cerdos que pueden tolerar concentraciones > 250 mg/kg MS sin que se observe ningún tipo de alteración; mientras que los rumiantes (sobre todo el ganado ovino) son altamente susceptibles, ya que poseen una escasa capacidad para eliminar el exceso de Cu vía biliar (debido a su baja capacidad para inducir la síntesis de MT), por lo que acumulan grandes cantidades de Cu a nivel hepático.

### **V.2. Influencia de la raza**

A diferencia del ganado ovino, en ganado vacuno la información de la que se dispone es escasa y se refiere a un número muy limitado de razas. Así, en vacuno adulto suplementado con Cu y Zn se observó que la raza Simmental mostraba un menor estatus de Cu que los de raza Aberdeen Angus, lo que sugiere unos mayores requerimientos de este mineral (Radostits *et ál.*, 2002; Mullis *et ál.*, 2003b). En un estudio llevado a cabo con animales alimentados a base de pastos suplementados con purines de cerdo (ricos en Cu) se observó que las concentraciones hepáticas de Cu de terneros de raza Frisona fueron  $\approx$  50% superiores a las de raza Rubia Gallega y un 20% a las de los cruces industriales de ambas razas; y que además, el % de animales con niveles hepáticos superiores al rango de normalidad para la especie bovina fue de 42.13 y 27 % en los de raza Frisona, Rubia Gallega y cruces industriales respectivamente (Miranda *et ál.*, 2006).

Estas diferencias raciales en ganado vacuno, al igual que en ganado ovino, podrían deberse tanto a diferencias en la absorción intestinal de Cu como en su excreción biliar. De este modo se observó que la excreción biliar de Cu en la raza Simmental fue > 2 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 (Gooneratne *et ál.*, 1994). Además, las diferencias de concentración orgánica de Cu observadas entre las distintas razas también podrían deberse a diferencias en la cantidad de alimento ingerido, parámetro que dependería de las necesidades fisiológicas propias de cada animal (Du *et ál.*, 1996) o incluso a la existencia de diferencias raciales en el tamaño del hígado y los estatus normales de otros

oligoelementos; así, se observó que la raza Limousin acumula más Cu a nivel hepático, hecho que se podría explicar debido al pequeño tamaño del hígado y a la existencia de unos mayores niveles de Zn hepático en comparación con otras razas (Littledike *et ál.*, 1995).

### V.3. Influencia del sexo

En ganado vacuno adulto se observó que las hembras acumulaban mayores concentraciones de Cu en hígado y riñón que los machos, no existiendo diferencias en el tejido muscular (Kottferová y Koreneková, 1997); en otros estudios únicamente se apreciaron diferencias de acumulación significativamente superiores en las hembras a nivel sanguíneo (López-Alonso *et ál.*, 2000a). Sin embargo, en otros trabajos realizados con ganado vacuno se apreciaron que los niveles de Cu hepáticos eran significativamente superiores en los machos, mientras que los renales lo eran en las hembras, no existiendo diferencias de acumulación significativas en el músculo y la sangre (Miranda *et ál.*, 2000).

En animales de laboratorio se observó una influencia hormonal de los niveles de estrógenos en el metabolismo de Cu (Terres-Martos *et ál.*, 1997). Así, se describieron concentraciones séricas y sanguíneas de Cu superiores en las hembras debido a una mejor eficacia en la absorción intestinal del metal que aumenta con la gestación y a que las hembras presentan unos mayores niveles de CP (Ruslanov *et ál.*, 1981).

### V.4. Influencia de la edad

En la hembra gestante se observa un aumento de la eficacia de absorción intestinal y una disminución de la tasa de excreción biliar de Cu con el fin de asegurar el aporte del metal al feto (Gooneratne *et ál.*, 1989a). Además, el feto posee mecanismos muy eficaces de captación de Cu acumulándose el metal de modo exponencial, de tal modo que la cría en el momento del nacimiento posee unas reservas hepáticas superiores a las de la madre, y tras el nacimiento estas reservas irán disminuyendo ya que dependerán de la presencia del metal en la dieta (Evans, 1973).

En ganado vacuno se ha observado un incremento en los niveles de Cu en hígado, riñón y músculo con la edad en zonas con alta contaminación del metal (Spiereburg *et ál.*, 1988), mientras que en zonas poco contaminadas no se apreciaron diferencias significativas en función de la edad (Khan *et ál.*, 1995). El hecho de que los rumiantes almacenen elevadas concentraciones de Cu a nivel hepático cuando la exposición al metal es elevada y se sobrepasa la capacidad de excreción biliar, podría explicar el aumento de la concentración de Cu con la edad en el caso de zonas altamente contaminadas.

En otros estudios realizados con terneros se observó un aumento de la concentración renal de Cu con la edad, que no se apreció en el caso del hígado (Miranda *et ál.*, 2006), mientras que en ganado vacuno adulto se observó que los niveles renales de Cu disminuían con la edad, hecho

que se relacionó con el aumento en el riñón de Cd (antagonista del Cu) a medida que aumentaba la edad del animal (López Alonso *et ál.*, 2000a).

#### **V.5. Influencia hormonal en el metabolismo del Cu**

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 Cu se describió al observar que los niveles de Cu en suero de hembras preñadas eran casi el doble de la que presentaban los individuos control (Evans, 1973).

En la actualidad se sabe que la hormona del crecimiento interviene en la homeostasis del Cu, ya que esta hormona produce un aumento en la síntesis proteica (Evans, 1973), y que la adrenalina asociada a un ejercicio físico intenso produce un aumento plasmático de Cu y CP (Gregoriadis y Sourkes, 1970; Evans, 1973). En el caso de las hormonas sexuales, los estrógenos producen un aumento en la absorción intestinal de Cu y aceleran la síntesis de CP y otras proteínas ligantes del metal; así, en ganado vacuno lechero suplementado accidentalmente con cantidades excesivas del metal se observó una intoxicación por Cu con el desarrollo de una crisis hemolítica en hembras al final de la preñez o que habían parido recientemente (Perrin *et ál.*, 1990).

#### **V.6. Interacciones del cobre con otros metales**

La alteración del metabolismo de los elementos traza puede darse ante niveles relativamente bajos de metales tóxicos o niveles inadecuados de otros oligoelementos (por exceso o defecto), provocando una mayor susceptibilidad al padecimiento de enfermedades y una disminución de la productividad (López Alonso *et ál.*, 2005). La interacción entre elementos esenciales y tóxicos es uno de los factores que más condiciona la susceptibilidad del ganado vacuno a padecer intoxicaciones por metales tóxicos (Goyer, 1995), por lo que la alteración en la homeostasis de un elemento traza puede ser considerado como un mecanismo de toxicidad (Liu *et ál.*, 1992).

En un estudio realizado en ganado vacuno, se observó que el mayor número de correlaciones significativas entre elementos tóxicos y traza, y también entre elementos esenciales, fue encontrado en el riñón y en menor medida en el hígado (López Alonso *et ál.*, 2004), lo que podría reflejar el papel principal de ambos órganos en el metabolismo de los elementos traza (Rahil-Khazen *et ál.*, 2002).

La interacción del Cu con otros metales tóxicos o esenciales es uno de los factores más importantes en la absorción y deposición de metales en el organismo (Goyer, 1995). Las interacciones pueden ser competitivas y no competitivas:

Interacciones competitivas. Se da entre elementos con la misma estructura electrónica, que comparten la tendencia a formar complejos en los que los ligandos se reúnen alrededor del metal, ocurriendo los antagonismos cuando se produce el reemplazo de un elemento por otro en un punto funcional. Todas las interacciones competitivas son negativas y mutuas. Un ejemplo típico de este tipo de interacción es el que se observa entre el Cu y el Zn (Underwood y Suttle, 2002).

Interacciones no competitivas. Se dan cuando la deficiencia o exceso de uno (o más) elementos influye en el metabolismo final de un segundo elemento o interfieren en algún proceso biológico que afecta a la expresión final de su actividad biológica. Como ejemplos de este tipo de interacción destacan la del Cu-Fe y la del Mo y S-Cu (Underwood y Suttle, 2002).

### V.6.1. Interacciones del cobre con elementos tóxicos

#### Cadmio

Las interacciones entre Cd, Zn y Cu se han registrado tanto en mamíferos procedentes de áreas contaminadas como en estudios experimentales (Nicholson *et ál.*, 1984; Spierenburg *et ál.*, 1988) y se debe a la capacidad de estos metales de inducir la síntesis de MT y competir por su unión a los grupos tiol de las mismas (Webb, 1979). En ratas se observó una disminución de la absorción de Cu al realizar una suplementación dietética con Cd debido a la unión del Cu a MT a nivel intestinal. El Cd actuó como un inhibidor más potente que el Zn, siendo necesarias concentraciones de Zn > 100 veces las concentraciones de Cd para disminuir la absorción de Cu a un 50% (Bremner, 1979). Además, también se ha comprobado que el Cd dietético afecta a la absorción intestinal y contenido tisular de Fe, Cu y Zn (Groten *et ál.*, 1991). La interacción Cu-Cd-Zn se ha descrito a niveles de exposición a Cd bajos, tanto en humanos (Rahil-Khazen *et ál.*, 2002) como en animales (López Alonso *et ál.*, 2002). Así, a concentraciones de 1.5-12 mg Cd/kg se observó una marcada disminución en los niveles hepáticos y séricos de Cu y en ocasiones síntomas de alteración ósea y retraso en el crecimiento tanto en ratas y ovejas preñadas como en sus crías (Mills y Dalgarno, 1972; Campbell *et ál.*, 1978). Además, se ha observado que el antagonismo entre Cu-Zn con el Cd puede provocar una disminución de  $\approx$  50% de la concentración renal de Cd en ratas; por lo que ante una exposición prolongada de Cd la aparición del daño renal podría retrasarse mediante una suplementación con Cu (Campbell *et ál.*, 1978).

Como hemos comentado anteriormente, en estudios *in vitro* se observó la siguiente secuencia de afinidad de unión de distintos metales a los grupos tiol de las MT: Zn < Cd < Cu < Hg (Funk, 1987). En estudios experimentales se ha demostrado que el Cd y el Cu compiten por su unión a los grupos tiol de las MT (Wentink *et ál.*, 1988); si bien las MT inducidas por el Cd se unirán más fácilmente al Cd que al Cu (Foulkes, 1993), la capacidad de unión a las MT va a depender de las concentraciones relativas de cada metal, de manera que si se presentan concentraciones de Cd relativamente altas a las de Cu en el hígado, se facilita el desplazamiento de este último metal (Cosson, 1994). Este hecho fue observado también en el hígado de ganado bovino y ovino expuesto experimentalmente o procedente de zonas contaminadas por Cd (Smith *et ál.*, 1991ab; Miranda, 1999).

También existen evidencias de que el antagonismo Cd-Cu ocurre antes del nacimiento, ya que en ovejas y ratas preñadas se observó una disminución de la transmisión placentaria de Cu hacia el feto cuando las madres recibían suplementos de Cd, dando lugar a crías deficientes en Cu y con bajo peso al nacimiento (Mills y Dalgarno, 1972; Choudhury *et ál.*, 1978).

## Plomo

A pesar de no ser una interacción tan estudiada como la de Pb-Ca o Pb-Fe (Goyer, 1995), en ratas a las que se les administraba suplementos de Pb elevados en la dieta se observó una disminución de la absorción de Cu (Dhawan *et ál.*, 1995), presentando estos animales una disminución de la tasa de crecimiento, bajas concentraciones séricas de CP, cardiomiopatía y anemia con administraciones de 0,5-3% de acetato de plomo trihidratado (Petering, 1980). Además, se ha observado que una deficiencia de Cu aumenta la acumulación de Pb, y que la suplementación con Cu a estos animales produce una rápida disminución del Pb en glóbulos rojos, hígado, riñón, y cerebro, sugiriéndose que la interacción entre estos elementos se produce a nivel de su absorción intestinal, si bien el mecanismo de interacción se desconoce (Cerkleroski y Forbes, 1977).

También se ha descrito una asociación entre el Pb y el Cu a nivel hepático en ganado vacuno, si bien esta relación no está del todo esclarecida, ya que en ciertos estudios se aprecia una asociación negativa entre ambos metales (Miranda, 1999), en otros no se aprecian asociaciones estadísticamente significativas (Rahil-Khazen *et ál.*, 2002; López-Alonso *et ál.*, 2002) y otros autores describen una fuerte correlación positiva (López-Alonso *et ál.*, 2004; Blanco-Penedo *et ál.*, 2006), sugiriéndose que la exposición de los animales a altos niveles de Cu favorecería la acumulación hepática de Pb (Blanco-Penedo *et ál.*, 2006), que la interacción podría depender de los niveles relativos de ambos metales en los tejidos o incluso la existencia de una fuente común de ambos metales en la dieta (López-Alonso *et ál.*, 2004).

## V.6.2. Interacción del cobre con otros elementos esenciales

### Molibdeno

La interacción triple entre Cu-Mo-S es de tipo no competitiva negativa y se da muy frecuentemente en la nutrición de rumiantes (Suttle, 1991; Smith y White, 1997). A nivel digestivo el Mo y el S reaccionan dando lugar a tiomolibdatos (TM) que presentan una alta afinidad por el Cu por lo que pueden unirse al metal de modo que se disminuye su absorción intestinal (Suttle, 1991; Telfer *et ál.*, 2004). Sin embargo, en diversos estudios acumulativos puede observarse la existencia de una asociación positiva entre el Cu y el Mo que se puede deber a que si los TM no se unen al Cu en el interior del rumen, estos compuestos pueden absorberse a través de la pared ruminal, llegando a la sangre y de ahí al hígado y los distintos tejidos donde puede reaccionar con el Cu (Mackenzie *et ál.*, 1997). Los TM son absorbidos en el rumen, pero la mayor parte de este compuesto se absorbe en el intestino delgado, donde los sulfatos (principales inhibidores de la absorción de molibdatos) se encuentran en menor concentración (Igarza y Auza, 1995). Los principales efectos de los TM sobre el metabolismo del Cu son el aumento de la excreción biliar del Cu hepático, la eliminación del Cu de sus metaloenzimas y la unión de los TM al Cu presente en la albúmina (Suttle, 1991). Cuando los TM absorbidos se unen al Cu y albúmina en el torrente sanguíneo, dan lugar a compuestos muy estables resistentes a la hidrólisis. Los TM poseen un sitio de unión distinto al del Cu en la albúmina (la afinidad por estos puntos de unión aumentan cuanto mayor sea la concentración de Cu y viceversa), dando lugar a complejos proteína-TM-Cu en la sangre que conduce a un retardo de la transferencia de Cu desde el plasma hacia el espacio extravascular y los distintos tejidos, lo que conlleva a una baja utilización del Cu hepático. Por tanto, las interacciones a nivel del aparato digestivo pueden reducir la disponibilidad del Cu procedente del alimento y las interacciones sistémicas pueden contribuir al desarrollo de estados metabólicos deficitarios de Cu por depleción de sus reservas tisulares (Igarza y Auza, 1995).

De este modo en estudios en los que se aplicaban inyecciones intravenosas e intraduodenales de tetratiomolibdatos en ovejas se observó un aumento del Cu plasmático en la misma fracción cromatográfica que el Mo (El-Gallad *et ál.*, 1983) y al administrar el mismo compuesto a ratas se apreció un aumento del Cu en el plasma y riñón, estando unidos el Cu y Mo a los mismos complejos proteicos ácido-insolubles (Mills *et ál.*, 1976).

En el caso del ganado vacuno, en un experimento realizado en regiones con forraje pobre y rico en Mo (1.7 mg/kg y 72.1 mg/kg respectivamente), se observó que animales alimentados en pastos ricos en Mo durante periodos de tiempo > 125 días o incluso mayores, no presentaron alteraciones en su redimiento productivo o deficiencias de Cu. En estos animales se observó un aumento de las concentraciones de Mo en leche, sangre e hígado, mientras que los niveles de Cu no se vieron afectados, y una vez que los animales fueron separados de la fuente de Mo, los niveles tisulares del metal volvieron a ser normales (Hamaguchi, 1999).

Esta interacción Cu-Mo ha sido empleada eficientemente en el tratamiento de las alteraciones de Cu, así en el ganado ovino se consigue un control de la intoxicación de Cu mediante inyecciones subcutáneas de tetratiomolibdato de amonio (3 dosis de 3-4 mg/kg p.v. en días alternos), observándose una disminución de las concentraciones orgánicas de Cu y de la mortalidad de los animales que presentaban una crisis hemolítica (Humphries *et ál.*, 1988).

Independientemente de la triple interacción Cu-Mo-S, el S por sí mismo ha demostrado actuar disminuyendo la biodisponibilidad del Cu. Así, en ganado ovino deficiente en Cu alimentado con bajos niveles de Mn al aplicar suplementos de S se observó una disminución de la biodisponibilidad del Cu por la formación de compuestos insolubles de sulfuro de Cu (Suttle, 1974).

### Zinc

El antagonismo Cu-Zn es el típico ejemplo de interacción de tipo competitivo entre metales con propiedades químicas y físicas similares, observándose que la suplementación con Zn disminuye la intoxicación por Cu y viceversa (Bremner y Beattie, 1995). Esto se debe a que ambos metales compiten por los puntos de unión de las MT, cuya síntesis puede estar inducida por ambos metales así como por ciertos metales tóxicos y que funcionan a modo de almacén intracelular de Cu y Zn (Bebe y Panemangalore, 1996). En ganado vacuno se ha sugerido que la alta susceptibilidad de estos animales a padecer intoxicaciones por Cu podría estar relacionada con su baja capacidad de síntesis de MT, actuando estas proteínas un papel fundamental en la detoxificación celular del metal (Bremner, 1980). Recientemente se ha demostrado que la concentración hepática de MT no estaba relacionada con la concentración de Cu sino con la de Zn; aunque, se observó que si bien el Cu es un pobre inductor de la síntesis de MT, puede competir con el Zn por los sitios de unión (López-Alonso *et ál.*, 2005a; Gutierrez, 2008), debido a que el Cu tiene una mayor afinidad por las MT que el Zn incluso después de haber inducido su síntesis este último metal (Bremner y Beattie, 1995; Bremner, 1998).

### Hierro

El metabolismo del Cu y del Fe están íntimamente relacionados (Garrick *et ál.*, 2003b). Las primeras interacciones encontradas entre ambos se descubrieron al observarse la necesidad de Cu durante el proceso de eritropoyesis (Hart *et ál.*, 1928). Así, posteriormente se observó que el Cu forma parte de la ferroxidasa-I, esencial para la movilización de Fe de sus almacenes para su posterior incorporación a la hemoglobina, disminuyendo su actividad en casos de deficiencias de Cu (Roeser *et ál.*, 1970); y en levaduras se ha demostrado que el Cu es un grupo prostético de la ferroxidasa involucrada en el transporte de alta afinidad de Fe (Askwith *et ál.*, 1994).

En rumiantes se ha observado un antagonismo entre ambos metales, ya que el Fe soluble procedente del suelo retiene S dando lugar a la formación en el rumen de compuestos insolubles como el FeS (Suttle *et ál.*, 1983b) que adsorben Cu (Suttle y Peter, 1985), por lo que la acción antagonista del Fe sobre la absorción de Cu podría prevenirse evitando el pastoreo de los animales o no suplementando con Fe a los animales adultos estabulados (Underwood y Suttle, 2002).

El Cu y el Fe son esenciales para la mayoría de los organismos, y muchas de sus funciones están relacionadas con su capacidad para oxidarse durante las reacciones de reducción. El Fe<sup>3+</sup> y el Cu<sup>2+</sup> son fundamentalmente tóxicos e insolubles en soluciones acuosas a pH neutro, por lo que precipitarán bajo la mayoría de las condiciones fisiológicas; de ahí que se asocien a transportadores y chaperones en casi todas las fases de su metabolismo, y que cuando la capacidad de los transportadores/chaperones/sistemas de almacenamiento esté saturada se produzcan reacciones de toxicidad. En el caso del Fe el control de su absorción, transporte y almacenamiento depende de la transferrina, ferritina y lactoferrina. En el caso del Cu las MT juegan un papel fundamental en el secuestro del metal por lo que se piensa que estas proteínas puedan realizar una función análoga a la de la ferritina en el caso del Fe (Cherian, 2003).

El transportador divalente de metal (DMT1) aparentemente transporta ambos metales iónicos (Gunshin *et ál.*, 1997), ya que en cultivos celulares se ha demostrado que ante disminuciones de Cu o Fe el DMT1 es capaz de aumentar la absorción celular de ambos elementos (Linder *et ál.*, 2003). Además, el DMT1 posee la capacidad de transportar otros metales divalentes como Mn, Cd, Ni, Co o Pb (Garrick *et ál.*, 2003a), pudiendo explicar este hecho la existencia de interacciones entre estos metales con el Fe y el Cu, así se observó que el estatus de Fe afectaba a la toxicidad de Mn (Roth *et ál.*, 2003). La CP y la hepaestina son oxidasas de Cu que también están involucradas en la exportación de Fe y además, en determinados tejidos como el cerebro fue identificada una forma isomorfa de CP denominada GPI con funciones similares en el metabolismo del Cu y del Fe (Patel *et ál.*, 2000). Otro mecanismo de interacción es el IRE/IRP (elementos sensibles al Fe/proteínas reguladoras de Fe), sistema que regula la expresión del ARN de los compuestos que precisan de Fe en función de la disponibilidad del mismo, aunque se observó que algún otro metal podría afectar a este sistema (Oshiro *et ál.*, 2002) y que la respuesta de la proteína sensible al Fe IRP1 frente al Cu era similar a la del Fe (Arredondo *et ál.*, 2003).

A pesar de todas estas similitudes metabólicas del Cu y el Fe, la excreción de ambos metales parece seguir una ruta diferente, ya que el Fe se elimina independientemente de los niveles de Fe en el organismo, si bien se ha observado un ligero aumento de su excreción en casos de mayor acúmulo celular de Cu (Linder *et ál.*, 2003). Además, se han detectado casos de altos niveles renales de DMT1 que podrían estar relacionados con el proceso de excreción, aunque se cree que aseguran la recuperación del Fe filtrado o que participan en la homeostasis de algún otro metal (Garrick *et ál.*, 2003a).

La actividad redox del Cu se ha relacionado con procesos de neurodegeneración (Opazo *et ál.*, 2003) y es uno de los síndromes asociados a enfermedades como la de Wilson y Menkes (Mercer, 1997; Mercer *et ál.*, 2003) y aceruloplasminemia (Miyajima *et ál.*, 2003), por lo que se constata que el Cu y el Fe resultan de especial relevancia para el desarrollo del sistema nervioso y que la toxicidad por uno o ambos metales puede desencadenar el desarrollo de muchas formas de neurodegeneración.

#### Selenio

El Se presenta interacciones tanto con elementos tóxicos (Cd, Ag y Hg) como con metales esenciales como el Cu. La interacción más estudiada es la de Se-Hg, observándose que el Se protege frente al daño celular producido por los radicales libres en una intoxicación por Hg mediante un aumento en la síntesis de la enzima glutation-peroxidasa (GSH-Px), que es inhibida por el Hg, y mediante la formación de complejos inactivos Se-Hg (Goyer, 1995).

En un estudio realizado en ganado vacuno se observó una fuerte correlación positiva entre el Cu-Se a nivel hepático (López-Alonso *et ál.*, 2004), al igual que en otros estudios previos llevados a cabo en rumiantes a los que se les inyectaba experimentalmente Se, observándose esta asociación tanto en animales con un estatus de Cu adecuado (Hussein *et ál.*, 1985) como en animales deficientes (Thomson y Lawson, 1970). Si bien los mecanismos bioquímicos de esta interacción no están bien esclarecidos (WHO, 1998), una posible explicación podría ser la inhibición de la síntesis de MT observada tras la administración de Se (Chmielnicka *et ál.*, 1983), que conllevaría a una menor unión del Cu en el citosol de los hepatocitos, saturación de la fracción nuclear y una menor excreción biliar del metal (López-Alonso *et ál.*, 2004). Además, en ganado ovino se observó que la suplementación con Se aumentaba la retención de Cu en el hígado (Millar *et ál.*, 1988) y que si se realizaba una suplementación conjunta de Se-Cu se producía un aumento de los niveles hepáticos de Se superior al observado en los animales suplementados únicamente con Se (Hartman y van Ryssen, 1997).

Gran parte de las interacciones del Se con otros metales se debe a su capacidad de intensificar los procesos de concentración y precipitación en los lisosomas de ciertos elementos presentes en la circulación sistémica. Así, tras la administración de Cu, Ag y Au se observó que estos elementos se concentraban en los lisosomas hepáticos y renales (Berry *et ál.*, 1995).

El Se, como ya hemos comentado anteriormente, forma parte de la GSH-Px, enzima presente en los eritrocitos y otros tejidos, que se encarga de reducir el peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos (Counotte y Hartmans, 1989), y por tanto protege a las células frente a daños oxidativos (Bires *et ál.*, 1991b). Por tanto en la intoxicación por Cu el Se neutraliza el daño oxidativo en los glóbulos rojos que causa la hemólisis (Hidiroglou *et ál.*, 1984) y la peroxidación de lípidos especialmente en los hepatocitos (Nederbragt *et ál.*, 1984). Sin embargo, en un estudio realizado con ganado ovino se observó que el Se administrado vía parenteral 3 veces

por semana no afectaba significativamente a la evolución de los animales intoxicados por Cu (Bires *et ál.*, 1991a).

En humanos se observó una asociación entre la deficiencia de Se y el desarrollo de cáncer. En animales expuestos de forma crónica a selenito de Na, Cd, Pb y As se observó que la presencia de estos metales contrarrestan el efecto anticarcinogénico de los compuestos de Se administrados (Gailer, 2002).

#### Otros elementos esenciales

En otros estudios acumulativos se ha descrito la existencia de correlaciones positivas y estadísticamente significativas entre Cu-Co a nivel del hígado y entre Cu-Mn en el riñón tanto en vacas procedentes de zonas con alta contaminación ambiental por Cu (Blanco-Penedo *et ál.*, 2006) como interesantemente también en animales sometidos a niveles de exposición normales (López-Alonso *et ál.*, 2004), sugiriéndose por tanto, que aunque los mecanismos de estas interacciones no se conozcan con claridad, es posible que se encuentren relacionados con el mantenimiento de la homeostasis mineral.

En un estudio reciente realizado con ganado vacuno al que se le inducía una deficiencia de Cu (dieta baja en Cu junto con suplementación con Mo) se observó una disminución en los niveles de Cu en el hígado así como de los valores plasmáticos de Cu cuando estos animales fueron suplementados adicionalmente con Mn, sugiriéndose que el Mn posee un efecto negativo sobre la absorción de Cu adicional al del Mo (Hansen *et ál.*, 2009). Estos efectos podrían explicarse por la presencia en el duodeno de los rumiantes del transportador de metales divalentes DMT1, que presenta una alta afinidad por el Mn en comparación con otros metales divalentes como el Fe o el Cu (Arredondo *et ál.*, 2003). En las vacas suplementadas con altos niveles de Mn se observa una reducción intestinal de DMT1, produciendo un menor transporte de Mn, Fe y probablemente también del Cu (Hansen y Spears, 2008).

# **MATERIAL Y MÉTODOS GENERAL**



## I. ANIMALES DE ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

### I.1. Animales de estudio

En total se usaron 30 terneros cruces industriales de las razas Rubia gallega y Frisona que se dividieron en 2 grupos en función de la suplementación mineral de la dieta: grupo control (n=10) que no recibió suplementación adicional con Cu, grupo suplementado (n=20) que recibió una suplementación adicional de 25ppm de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ).

Todos los animales incluidos en este estudio son machos con el fin de evitar posibles variaciones debidas al sexo de los animales y se adquirieron antes del destete con una edad aproximada de 1 mes. Las instalaciones de la explotación ganadera en Nadela (Lugo) en la que fueron alojados los animales, cumplieron en todo momento las directrices relativas al alojamiento y cuidado de los animales para experimentación (Anexo II al artículo 5 de la Directiva del Consejo de 24 de noviembre de 1986 de la U.E.; R.D. 223/1998; D. 86/609/CEE; RD 1201/2005).

Una vez introducidos los animales en la explotación, se procedió al destete y aclimatación de los mismos y se les aplicó un programa sanitario: desparasitación con ivermectina al 1% inyectable (1 mL/50 kg de peso vivo por vía subcutánea, Ivomec®, Laboratorios Merial) y albendazol en suspensión oral (1 ml/10 kg de peso vivo por vía oral, Albensol-10%®, Fort Dodge Veterinaria); vacunación contra IBR, PI<sup>3</sup>, síndrome respiratorio bovino y BVD (a dosis de 2 ml, Cattlemaster-4®, Laboratorios Pfizer) y frente a enterotoxemia (4 ml, Toxipra S7®, Laboratorios Hipra).

Los terneros se incorporaron al consumo de la dieta utilizada en el experimento de forma paulatina, primero mediante un pienso de arranque o starter, elaborado a base de lactorreemplazantes y cereales, y posteriormente se introdujo la dieta de crecimiento-cebo.

Se realizó un ciclo de 7 meses, lo que se corresponde con las fases de crecimiento y cebo de los actuales sistemas de cría intensiva de terneros (González y Llena, 1994). Los muestreos se realizaron entre los meses de mayo y noviembre de 2006.

### I.2. Características de la dieta

Una vez finalizada la fase de adaptación los terneros se alimentaron con un pienso comercial para crecimiento y cebo de terneros TERNIgranNG, cuyos ingredientes y composición química según el fabricante se muestran en la Tabla 1.

Los animales fueron separados en 2 lotes en función de si los animales recibieron o no 25 mg  $\text{CuSO}_4$ /kg de materia seca (MS). Ambos grupos recibieron libre acceso al concentrado, agua y paja de trigo.

**Tabla 1.** Composición de la etiqueta del pienso de los terneros durante el crecimiento y cebo. TERNIgranNG 0-15 en función de su contenido en cobre (presentación en harina).

Constituyentes analíticos	Crecimiento-cebo
Proteína bruta	15-14 %
Materias grasas brutas	5,2-5,25 %
Celulosa bruta	4,2-4,3 %
Cenizas brutas	6-6,2 %
<b>Aditivos</b>	
Vitamina A	1000 UI/Kg
Vitamina D3	2000 UI/Kg
Vitamina E	25 mg/Kg
Sulfato cúprico pentahidratado	0/15 mg/Kg
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CNCM 7077	1,5x10 <sup>9</sup> UFC/Kg
Butilhidroxitolueno E-321	
<b>Materias primas</b>	
Maiz	40-42 %
Cebada	20,8-21,2 %
Harina de extracción de soja	16,8-15 %
Salvado de trigo	9-5,2 %
Gluten feed de maiz	6-5 %
Aceite de soja	1,3-1 %
Melaza de caña de azúcar	1 %
Carbonato cálcico	1,2-1 %
Bicarbonato sódico	1-0,7 %
Fosfato monocálcico	0,4-0,2 %

Se realizaron análisis mensuales de las dietas empleadas con el fin de comprobar que tanto la composición de la dieta, como las características físico-químicas de la misma eran adecuadas y coincidían con lo certificado por el fabricante. El análisis se llevó a cabo en el laboratorio de Mouriscade, Finca Mouriscade, laboratorio certificado y de referencia de Galicia para análisis de alimentos animales. En la Tabla 2 presentamos los valores medios de los análisis realizados (n=14). En todo momento el análisis de la dieta coincidió con lo descrito por el fabricante.

**Tabla 2.** Análisis de la dieta de los animales del grupo no suplementado (NS, n=7) y suplementado (S, n=7) (media±ES).

Constituyentes analíticos	Crecimiento	Cebo
Humedad (%)	12,6±0,3	13,4±0,6
Proteína bruta (% MS)	14,7±1,1	13,7±1,4
Fibra bruta (% MS)	4±0,2	4,4±0,5
Fibra neutro detergente (% MS)	21,3±0,2	20,8±0,5
Fibra ácido detergente (% MS)	10,8±0,2	11,1±0,3
Cenizas (% MS)	5±0,7	6,1±0,5
Almidón (% MS)	40,8±1,8	40,8±2,5
Extracto etéreo (% MS)	3,4±0,3	3,5±0,4
Minerales		
S (% MS)	0,09±0,02	0,09±0,01
Ca (% MS)	0,9±0,2	0,9±0,2
Na (%MS)	0,19±0,09	0,31±0,07
K (%MS)	0,73±0,06	0,73±0,08
Mg (%MS)	0,29±0,03	0,26±0,05
P (%MS)	0,48±0,05	0,56±0,06
Mn (mg/kg MS)	50,7±17	71,3±37,3
Mo (mg/kg MS)	1,8±0,6	1,7±0,6
Fe (mg/kg MS)	193±54	265±43
Zn (mg/kg MS)	59±12	61,8±26
Cu (mg/kg MS) NS	5±1	8±3
Cu:Mo NS	3:01	5:01
Cu (mg/kg MS) S	23±8	26±10
Cu:Mo S	13:01	15:01

### I.3. Parámetros productivos

Durante el ciclo productivo de los animales se evaluó la ingesta media de los 2 grupos, se pesó a los animales y se calculó la ganancia media de peso. A nivel de matadero se determinaron los pesos medios de la canal y las diferentes vísceras que aparecen descritos en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Parámetros productivos de los animales del grupo no suplementado (NS) y suplementado (S).

	NS (n=10)			S (n=10)		
	media±ES	mediana	rango	media±ES	mediana	rango
Peso vivo inicial (kg)	115±9	116	97-128	129±15	126	111-160
Peso vivo final (kg)	399±43	387	331-469	422±36	429	364-466
Consumo pienso (kg/day)	1,7±0,2			1,8±0,2		
Ganancia media diaria (ADG) (kg)	1,7±0,23	1,65	1,3-2	1,74±0,23	1,8	1,3-1,9
Peso canal (kg)	220±27	220	177-267	228±24	229	167-259
Rendimiento canal (%)	55±2	56	51-58	54±1,5	54	51-56
Peso hígado (Kg)	5±0,72	4,9	3,9-6,5	5,6±0,6	5,7	4,7-6,4
Peso riñón (Kg)	0,45±0,11	0,45	0,3-0,6	0,52±0,15	0,48	0,4-0,9
Peso corazón (Kg)	1,6±0,27	1,5	1,1-2,1	1,65±0,15	1,6	1,4-1,9
Peso bazo (Kg)	0,78±0,16	0,8	0,6-1,1	0,76±0,11	0,8	0,6-0,9

## II. TOMA DE MUESTRAS

### II.1. Sangre

Se tomaron muestras de sangre mensualmente durante todo el ciclo productivo, desde los 3 meses hasta el momento del sacrificio, aproximadamente a los 9-10 meses de edad. La recogida de las muestras tuvo lugar entre de mayo y noviembre de 2006.

La toma de muestras se realizó siempre a la misma hora de la mañana. Los animales eran pasados por la manga, se pesaban y posteriormente se procedía a la extracción de 40 ml de sangre de cada animal mediante punción de la vena yugular. Se utilizaron agujas estériles (Microlance®, Braun, Barcelona, España) de 1,2 x 40 mm de diámetro y jeringas de 20 ml (Omnifix®, Braun, Barcelona, España). La sangre obtenida se distribuía en tres tipos de tubos Vacutainer®: con heparina (10 ml) para obtención de plasma y análisis de Cu en sangre entera, con EDTA (10 ml) para los análisis hematológicos y dos tubos sin aditivos para la obtención de suero (2x10 ml). Las muestras fueron trasladadas al laboratorio en condiciones de refrigeración.

De los tubos con EDTA se tomaba una pequeña alícuota para realizar el estudio hematológico en un analizador automático (MS9 Automatic Cell Counter, Melet Schloesing Laboratories), después esta muestra se ultracentrifugaba en capilares y se realizaba la lectura del microhematocrito y el valor de proteínas totales por refractometría. El resto de la muestra original se centrifugaba a 1200 rpm durante 10 minutos para obtener plasma (centrífuga Kubota 2700, Kubota Corporation, Tokio), luego se colocaba en tubos eppendorf con la correspondiente identificación y se almacenaban a -20°C hasta su posterior análisis laboratorial.

Los tubos con heparina se distribuían en dos tubos de sangre (2,5 ml) que se almacenaba a -20°C hasta su procesado laboratorial para la determinación de Cu en sangre entera. El resto de la muestra se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos y el plasma obtenido se distribuyó en tubos eppendorf y se almacenó a -20°C.

Los tubos sin aditivos fueron centrifugados (1200 rpm, 10 minutos), posteriormente el suero se distribuyó en tubos eppendorf y se congeló a -20°C. De estas muestras se realizaron las determinaciones de bioquímica, actividad de ceruloplasmina y concentración de Cu en suero.

### II.2. Biopsias hepáticas

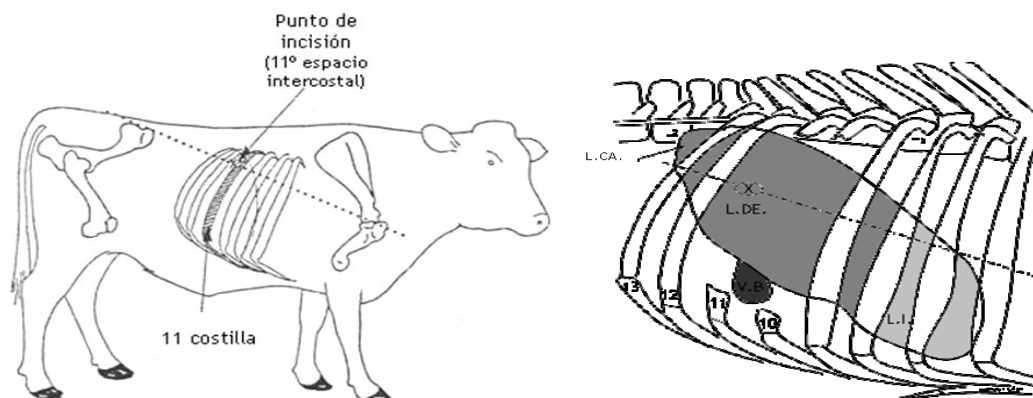
Se realizaron biopsias según la técnica descrita por Udall et al. (1952) y Larson et al. (1995). El punto de biopsia se realiza entre la 11ª y 12ª costilla en el lado derecho a la altura del fin de los procesos transversos de las vértebras lumbares (ver Figura 1); la incisión se realiza concretamente en el punto resultante de trazar una línea desde la tuberosidad coxal hasta el

hombro. En terneros la ubicación del hígado es más cercana a la línea media que en animales adultos, por lo que el punto a biopsiar fue comprobado mediante ecografía.

Los animales se inmovilizaron en una manga, la zona de incisión fue rasurada, lavada y posteriormente desinfectada con una solución acuosa de povidona yodada (Betadine®). Se infiltró el área a incidir con 10 ml de lidocaína al 2% (Xilocaina®, laboratorios Ovejero) para insensibilizar la piel y músculos de la zona. Se realizó una incisión de aproximadamente 0,5 cm con el bisturí y posteriormente se introdujo la aguja de biopsia junto al estilete, atravesando los músculos intercostales hasta la superficie del hígado. La dirección de la aguja de biopsia fue craneal y ventral hacia el codo opuesto (izquierdo), más o menos perpendicular a la superficie del cuerpo. Una vez en la superficie del hígado, se removió el estilete y se empujó la aguja a través del lóbulo hepático, cortando la cápsula. El corte del tejido hepático genera una característica crepitación fácil de reconocer. Finalmente se retira la aguja con el trozo de hígado que será colocado en crioviales, sumergidas en una cántara con nitrógeno líquido (-196°C) hasta su llegada al laboratorio y traspasadas a un arcón de -80°C hasta su análisis.

A todos los animales biopsiados se les administró un tratamiento antibiótico con penicilina+estreptomicina (Duphapen® Strip, Fort Dodge) con el fin de prevenir cualquier tipo de infección. Además, y tal como se señaló anteriormente, todos los animales fueron vacunados frente a *Clostridium spp.*

Ningún animal presentó signos de infección, ni reducción en el consumo de alimento a causa de las biopsias.



**Figura 1.** Izquierda. Punto de biopsia hepática en el animal (Larson *et ál.*, 1995). Derecha. Detalle de punto de biopsia en el hígado (Popesko, 1998). L.DE.: lóbulo derecho externo; L.I.: lóbulo izquierdo; L.CA.: lóbulo caudado; V.B: vesícula biliar.

### II.3. Tejidos post mórtem

Al final de la fase de acabado los animales fueron sacrificados en el matadero comercial Carnicosa, A Coruña (Galicia, España). En el momento del sacrificio se realizó un examen macroscópico de la canal y de las vísceras, así como al pesaje de las mismas de forma ordenada y rápida (antes de una hora desde el sacrificio). Se tomaron muestras de:

Hígado. Se tomaron muestras de 6 lóbulos: lóbulo derecho externo (DE), lóbulo derecho interno (DI), lóbulo caudado (CA), apófisis papilar (AP), lóbulo cuadrado (CU) y lóbulo izquierdo (I). Se procuró siempre tomar las muestras de la misma localización y de un tamaño aproximado de 7x5 cm (ver Figura 5).

Músculo. Se tomaron muestras de 3 músculos: diafragma, músculo pectoral y semitendinoso.

Riñón. Se recogió siempre el riñón derecho entero.

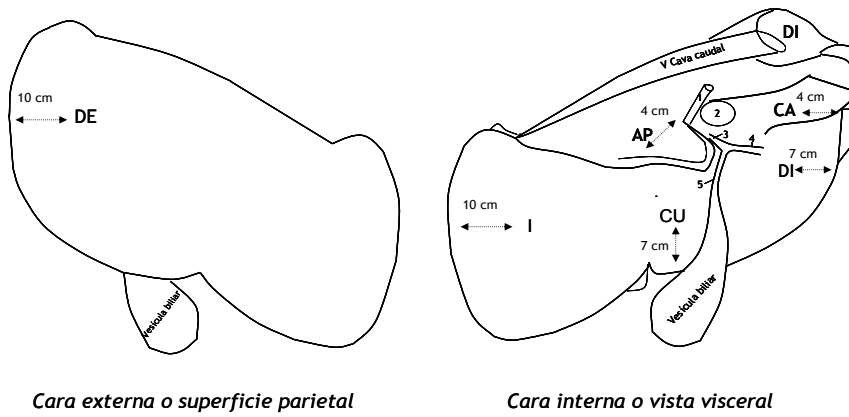
Cerebro. Muestra del mesencéfalo.

Corazón. Muestra del ventrículo izquierdo.

Bazo.

Todas las muestras fueron identificadas, colocadas en bolsas de polipropileno y mantenidas en refrigeración (4°C) hasta su llegada al laboratorio. Una vez en el laboratorio, las muestras se limpiaron de grasa, tejido conectivo, y principales vasos sanguíneos. En el caso del riñón, se realizó también una homogeneización para que la muestra fuera representativa de corteza y médula. De cada muestra se tomaron 3 submuestras de 10 g aproximadamente en bolsas de polipropileno y se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis laboratorial.

Además, se recogieron muestras adicionales del lóbulo derecho externo del hígado que se preservaron en formol (para análisis histológicos) o congeladas a -80°C (para el análisis de metalotioneínas y fraccionamiento subcelular).



**Figura 2.** Puntos de toma de muestras en el hígado. Cara externa: DE: lóbulo derecho externo a 10 cm. Cara interna: DI: lóbulo derecho interno a 10 cm; CA: lóbulo caudado a 4 cm; AP: apófisis papilar a 4 cm caudal a grandes vasos; CU: lóbulo cuadrado a 7 cm I: lóbulo izquierdo a 10 cm. 1: arteria hepática; 2: vena porta; 3: conducto hepático; 4: conducto colédoco; 5: conducto cístico.

### III. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

#### III.1. Hematología

Los parámetros hematológicos (glóbulos rojos (GR), hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto), glóbulos blancos (GB), proteínas totales (PT) y plaquetas (Plaq)) se realizaron en un analizador automático (MS9 Automatic Cell Counter, Melet Schloesing Laboratories).

En todos los muestreos se analizaron el microhematocrito y las proteínas totales por refractometría. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos por el contador automático para el hematocrito (CV=2%) y por bioquímica húmeda para proteínas totales (CV=3%).

#### III.2. Bioquímica

La determinación de la bioquímica (glucosa, albúmina, proteínas totales, colesterol, ácidos grasos no esterificados (NEFA), urea, creatinina, OXY-adsorbente y dROM) y la actividad de las enzimas hepáticas (aspartato aminotransferasa (ASAT) y gamma glutamil transferasa (GGT)) se llevaron a cabo empleando kits comerciales en un espectrofotómetro de luz ultravioleta visible Thermo modelo Genesys 6.

Glucosa (Gernon, RAL Técnica para el Laboratorio, Barcelona, España). La glucosa se determina por oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa, y el peróxido de hidrogeno formado, en presencia de peroxidasa, oxida el cromógeno 4-aminofenol a un compuesto de color rojo. Este compuesto, proporcional a la cantidad de glucosa presente en el suero, se lee en un espectrofotómetro de absorción UV/Vis a 500nm antes de 60 segundos.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (mg/dL)} = \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} / \Delta \text{ Abs}_{\text{standard}} \times 100$$

Albúmina (Laboratorios HumanH, Alemania). El verde bromocresol reacciona con la albúmina en tampón citrato formando un complejo coloreado cuya absorvancia se mide a una longitud de onda de 546 nm.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (g/L)} = 40 \times \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} / \Delta \text{ Abs}_{\text{standard}}$$

Proteínas totales (Laboratorios HumanH, Alemania). Los iones de Cu reaccionan con las proteínas en un medio alcalino dando lugar a un complejo de color violeta cuya absorvancia se mide a una longitud de onda de 546 nm.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (g/L)} = 80 \times \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} / \Delta \text{ Abs}_{\text{standard}}$$

Colesterol (Spinreact, S.A., Barcelona, España). Los ésteres del colesterol son hidrolizados por una colesterol esterasa y el colesterol producido en esta reacción, más el colesterol libre, es oxidado por acción de una colesterol oxidasa con formación de peróxido de hidrogeno. Este último, en presencia de peroxidasa, oxida el cromógeno 4-Aminofenazona/fenol a un compuesto de color rojo. Se realiza la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a 500 nm.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (mg/dL)} = 200 \times \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} / \Delta \text{ Abs}_{\text{Standard}}$$

Triglicéridos (Spinreact, S.A., Barcelona, España). Los triglicéridos se hidrolizan enzimáticamente en glicerol y ácidos grasos libres, por medio de una combinación especial de lipasas. El indicador es una quinona formada a partir de peróxido de hidrógeno + 4-aminoantipirina y 4-clorofenol, con la acción catalítica de una peroxidasa. La cantidad de quinona formada es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en el suero y su absorbancia se lee a 505 nm.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (mg/dL)} = 200 \times \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} / \Delta \text{ Abs}_{\text{Standard}}$$

Ácidos grasos no esterificados (NEFA) (Laboratorios Randox<sup>®</sup>, United Kingdom). A 37 °C los ácidos grasos libres reaccionan con ATP y coenzima A en una reacción catalizada por la acilCoA sintetasa formando acilCoA, este compuesto es oxidado por la acil-CoA-oxidasa formando peróxido de hidrógeno, éste último se valora al hacerlo reaccionar con N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina y 4-Aminoantipirina, en una reacción catalizada por la peroxidasa, formando un producto púrpura cuya absorbancia se lee a 550 nm.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (mmol/L)} = \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} / \Delta \text{ Abs}_{\text{Standard}}$$

Urea (Gernon, RAL Técnica para el Laboratorio, Barcelona, España). La urea es desdoblada por la acción específica de la enzima ureasa en CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>. En una segunda etapa el NH<sub>3</sub> con el 2-oxoglutarato y el NADH, pasan a dar en presencia de la enzima glutamato dehidrogenasa (GLDH), glutamato y NAD. El consumo de NADH es medido por la disminución de absorbancia a 340 nm y es proporcional a la concentración de urea en la muestra que es leída a los 60 segundos y a los 120 segundos.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (mg/dL)} = \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} \times 50 / \Delta \text{ Abs}_{\text{standard}}$$

Creatinina (Gernon, RAL Técnica para el Laboratorio, Barcelona, España). La creatinina reacciona con el picrato alcalino, según la reacción de Jaffé, para dar un cromógeno que se mide a 500 nm a los 30 segundos y a los 150 segundos.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (mg/dL)} = \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} / \Delta \text{ Abs}_{\text{standard}} \times 2$$

OXY-adsorbente (DIACRON, divisione diagnostici, Grosseto, Italia). Este test mide el poder antioxidante del plasma mediante la medición de la habilidad del mismo para contrarrestar un efecto oxidante masivo producido por el ácido hipocloroso. La absorbancia de las muestras fue leída a 546 nm y la actividad antioxidante fue calculada mediante la fórmula

$$\text{Actividad antioxidante } (\mu\text{moles HClO/mL}) = (\text{Abs}_{\text{blanco}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}) / (\text{Abs}_{\text{blanco}} - \text{Abs}_{\text{standard}}) \times 220$$

dROM (DIACRON, divisione diagnostici, Grosseto, Italia). Mide los hidroperóxidos (generados por el ataque oxidativo de ROS) a través de su reacción con el cromógeno N, N-dietilparafenilenodiamina. Se leen los incrementos de absorbancia cada minuto durante 3 minutos a 546 nm y la actividad de ROS se calcula mediante la fórmula.

$$\text{Actividad ROS (CARRU=0,08 mg H}_2\text{O}_2\text{/dL)} = \Delta \text{Abs}_{\text{muestra}} / \Delta \text{Abs}_{\text{calibrador}} \times 350$$

Aspartato aminotransferasa (AST) (Gernon, RAL Técnica para el Laboratorio, Barcelona, España). Esta enzima cataliza la reacción entre 2-oxoglutarato y L-aspartato, dando lugar a oxalacetato, el cual reacciona con NADH en presencia de malato deshidrogenasa, formándose malato y NAD<sup>+</sup>. Los incrementos de absorbancia que experimenta la muestra se miden a una longitud de onda de 340 nm a intervalos de 1 minuto durante 3 minutos y se calcula el incremento de absorbancia media por minuto.

$$\text{Actividad}_{\text{muestra}} \text{ (UI/L)} = \Delta \text{Abs}_{\text{muestra}} / \text{minuto} \times 952$$

Gamma glutamil transferasa (GGT) (Spinreact, S.A., Barcelona, España). La enzima cataliza la reacción entre el L-gamma-glutamil-3-carboxi-p-nitroanilinda y glicilglicina en la que se forma L-gamma-glutamilglicina y 5-amino-2-nitrobenzoato. Los incrementos de absorbancia que experimenta la muestra se miden a 405 nm a intervalos de 1 minuto durante 4 minutos y se calcula el incremento de absorbancia media por minuto.

$$\text{Actividad}_{\text{muestra}} \text{ (U/L)} = \Delta \text{Abs}_{\text{muestra}} / \text{minuto} \times 1190$$

Durante todo el experimento se llevó a cabo un estricto programa de control de calidad analítica. En cada ciclo de análisis se introdujeron muestras de referencia (Gernon control, suero bovino ensayado nivel 2 de Randox, Humanrol N: suero para control de calidad y calibración en química clínica, Spinrol "H" normal de Spinreact) para comprobar la precisión y exactitud del método como puede verse en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Control de calidad de los parámetros bioquímicos (n=18).

Parámetro	Niveles analizados (media±ES)	Niveles certificados (rango)
Glucosa (mg/dL)	98,3±1,12	76,2-105
Albúmina (g/dL)	3,11±0,073	2,35-3,39
Proteínas totales (g/dL)	4,91±0,062	4,31-5,17
Colesterol (mg/dL)	148±5,11	121-175
NEFA (mmol/L)	3,03±0,416	2,32-3,14
Urea (mg/dL)	36,1±0,923	30-46,8
Creatinina (mg/dL)	0,55±0,025	0,43-0,63
ASAT (UI/L)	35,7±1,56	30,6-49
GGT (UI/L)	7,31±0,184	6,04-8,92

### III.3. Ceruloplasmina

Los estudios de la actividad ceruloplasmina se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de luz ultravioleta visible Thermo modelo Genesys 6 mediante la técnica de Suderman y Nomoto (1970).

A pH 5.4, la ceruloplasmina cataliza la oxidación de la p-fenilenediamina dando lugar a un color púrpura intenso. El grado de formación de este producto de oxidación con color es proporcional a la concentración de ceruloplasmina en suero y se realiza una corrección para la oxidación no-enzimática de la p-fenilenediamina. La inhibición de la oxidación no-enzimática de la p-fenilenediamina se consigue mediante el empleo de azida sódica.

#### Reactivos

- Solución de acetato sódico 0.2 M.
- Solución de ácido acético 0.2 M.
- Tampón acetato 0.1 M, pH 5.45 a 37°C. Transferir a un frasco volumétrico 430 ml de la solución de acetato sódico 0.2 M, 70 ml de la solución de ácido acético 0.2 M y aproximadamente 400 ml de agua bidestilada. Calentar a 37 °C en un baño de agua y ajustar el pH a 5.45 añadiendo acetato sódico o ácido acético, y enrasar a un volumen final de 1 litro.
- Solución de azida sódica 1.5 M.
- Solución de p-fenilenediamina tamponada: Inmediatamente antes de usar, pesar 0,5 g de p-fenilenediamina dihidroclorito ( $C_6H_4(NH_2)_2 \cdot 2HCl$ ) y transferir a un frasco volumétrico de 100 ml, disolviéndolo en aproximadamente 75 ml de la solución de tampón acetato (pH 5.45)

calentada a 37 °C. El contenido del frasco se ajusta a un pH de 5.45 a 37°C. La solución es estable 3 horas.

#### Procedimiento

- Para cada muestra pipetear 2 ml de tampón acetato en dos tubos de ensayo R (reacción) y B (blanco).
- Añadir 0.1 ml de suero a cada tubo.
- Colocar los tubos en un baño a 37°C, junto con la solución de p-fenilenediamina hasta que alcancen un equilibrio térmico.
- Añadir 1 ml de la solución de p-fenilenediamina a cada tubo, mezclar bien y mantener sin tapar en el baño de agua durante 5 minutos. El baño debe estar tapado para evitar la exposición de los tubos a la luz.
- Añadir 50 µl de la solución de azida sódica en el tubo B, mezclar bien y colocar de nuevo en el baño de agua.
- Exactamente 30 minutos más tarde, añadir 50 µl de la solución de azida sódica en el tubo R y mezclar bien.
- Las muestras R y B se transfieren a cubetas de espectrofotómetro y la absorbancia se mide a 530 nm. El color de las muestras permanece estable durante 6 horas.

$$\text{Ceruloplasmina (g/l)} = 0.752 (A_R - A_B)$$

$A_R$  = absorbancia de la muestra y  $A_B$  = absorbancia del blanco

Durante todo el experimento se llevó a cabo un estricto programa de control de calidad analítica. La precisión del método, calculada como la desviación estándar relativa (% DSR) de la lectura de absorbancia de una muestra de referencia interna (suero bovino) fue 1,8%.

#### III.4. Determinación de los metales tóxicos y esenciales

##### Preparación de las muestras

Se pesó aproximadamente 1 g de tejido (hígado, riñón, cerebro, bazo, corazón y músculo) o 1 mL en el caso de la sangre entera utilizando una balanza electrónica (SALTER-AND, modelo ER-60A). La digestión ácida de las muestras se realizó en un sistema de microondas marca Milestone Ethos Plus, equipado con vasos de alta presión. A cada muestra se le añadieron 5 mL de ácido nítrico concentrado (Suprapur grade, Merck), 3 mL de peróxido de hidrógeno 30 % p/v. 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 15 ml y se almacenó en tubos de polipropileno hasta su posterior análisis químico.

En el caso de las biopsias debido al menor tamaño de muestra y para mejorar el límite de cuantificación se realizó una digestión ácida en una batería. Las muestras de biopsia se pesaron en tubos de digestión pirex y se secaron en una estufa (Selecta, modelo 210) hasta que alcanzaron un peso constante (aproximadamente 24 horas). A cada muestra se le añadieron 1 ml de ácido nítrico concentrado (Suprapur grade, Merck), permitiendo una digestión fría de las mismas durante 24 horas. Posteriormente las muestras se colocaron en un bloque termostático (Selecta Multiplaces) a  $120\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 60 min y se añadieron 1 ml de peróxido de hidrógeno 30 % p/v para completar la digestión de la materia orgánica durante otros 60 minutos. La solución resultante se diluyó con agua ultrapura hasta un volumen final de 5 mL.

La preparación de las muestras de suero se llevó a cabo por dilución de la muestra en proporción 1:4 con agua ultrapura.

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

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

Paso	Tiempo (min)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Potencia (W)
1	3	90	1000
2	15	165	1000
3	3	180	1000
4	10	180	1000

#### Determinación de metales por ICP-MS

La determinación de los niveles de los metales tóxicos y esenciales se realizó mediante Espectroscopia de Masa con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-MS) según las condiciones descritas en la Tabla 6. Los análisis se realizaron en el Laboratorio FISQITECNAL perteneciente a los Servicios Centrales de la Universidad de Santiago de Compostela.

**Tabla 6.** Condiciones instrumentales para el análisis de metales por Espectroscopia de Masa con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-MS).

Potencia	1,35 kW
Flujo gas nebulizador	0,8 mL/min
Flujo gas auxiliar	1 mL/min
Flujo gas enfriamiento	14 mL/min
Nebulización neumática	Meinhard 1 mL/min
Cámara nebulización	Scott doble paso, 4°C
Conos	Ni
Vacío cámara de expansión	2 mbar
Vacío cámara intermedia	0x10-4 mbar
Vacío analizador	7x10-7 mbar
Modo medida	Scan
Modo detección	DUAL (pulsos/analógico)
Tiempo medida	3 s/isótopo
Réplicas	3
Calibración	Externa, ajuste lineal mínimos cuadrados

Cálculo de las concentraciones de metales en las muestras

Para calcular la concentración de los metales en las muestras se empleó la siguiente formula:

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

K=concentración en la muestra (mg/kg o mg/l en sangre), a=concentración en la solución (µg/l o mg/l), b=concentración media del blanco (µg/l o mg/l), V= volumen final de la muestra (ml), m=peso de la muestra (g) o volumen para la sangre (mL).

Control de calidad analítica

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 dos muestras 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 7). 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.

Los estudios de recuperación analítica se llevaron a cabo empleando los materiales de referencia certificados Pig Kidney CRM 186 (BCR Reference Materials) y Fish protein DORM-3 (National Research Council, Ottawa, Ontario, Canada). Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 7 y, en general, se observa que 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. Los 2 materiales de referencia no poseen niveles certificados para Co, Mo y Sn y las recuperaciones analíticas de estos elementos fueron determinadas usando muestras con valores de 2-10 veces superiores a los presentes en las muestras. Las recuperaciones medias fueron 89, 96 y 85% respectivamente. La precisión del método analítico, calculado como la desviación estándar relativa (DSR) de 10 lecturas de una misma muestra para el Co, Mo y Sn estuvo entre 5,8-9,3%.

**Tabla 7.** Límites de detección (ld) y resultados de los análisis de los materiales de referencia certificados Pig kidney CRM 186 y Fish protein DORM-3 (mg/kg).

	Blanco (n=10) (µg/l)	ld (µg/g)	Materiales de referencia certificados			
			CRM 186		DORM-3	
			Niveles certificados (mg/kg)	Niveles analizados (mg/kg)	Niveles certificados (mg/kg)	Niveles analizados (mg/kg)
As	0,128 ± 0,006	0,0003	0,063 ± 0,009	0,0523 ± 0,0142	6,88 ± 0,300	6,07 ± 0,38
Cd	-0,005 ± 0,002	0,0001	2,71 ± 0,15	3,25 ± 0,63	0,290 ± 0,020	0,276 ± 0,031
Co	0,025 ± 0,004	0,0002	-	0,109 ± 0,017	-	0,224 ± 0,033
Cr	0,916 ± 0,034	0,0014	(0,058-0,142)	0,067 ± 0,142	1,89 ± 0,17	1,20 ± 0,24
Cu	8,42 ± 0,71	0,0304	31,9 ± 0,4	39,9 ± 6,3	15,5 ± 0,63	15,5 ± 2,3
Fe	-1,88 ± 3,06	0,136	299 ± 10	331 ± 36	347 ± 20	247 ± 31
Hg	0,024 ± 0,004	0,0002	1,97 ± 0,04	1,91 ± 0,21	0,382 ± 0,060	0,281 ± 0,037
Mn	0,229 ± 0,037	0,0016	8,5 ± 0,3	8,87 ± 1,51	-	2,06 ± 0,58
Mo	0,282 ± 0,107	0,0048	-	4,39 ± 0,79	-	0,644 ± 0,359
Ni	5,04 ± 0,06	0,0025	(0,420)	1,073 ± 0,940	1,28 ± 0,24	1,77 ± 0,35
Pb	0,225 ± 0,030	0,0013	0,306 ± 0,011	0,263 ± 0,040	-	0,270 ± 0,048
Se	0,186 ± 0,034	0,0015	10,3 ± 0,5	12,9 ± 1,8	-	3,81 ± 0,33
Sn	-0,031 ± 0,003	0,0001	-	0,0068 ± 0,0405	-	0,0861 ± 0,0618
Zn	18,3 ± 21,1	0,9	128 ± 3	141 ± 13	51,3 ± 3,1	46,8 ± 5,6

### III.5. Histología

Las muestras del lóbulo derecho externo del hígado preservadas en formol fueron fijadas en alcohol 70% y embebidas en parafina mediante un procesador automático Shandon Excelsior Histokinette. Posteriormente se realizaron cortes seriados de 6  $\mu\text{m}$  para los análisis histológicos.

Las secciones fueron rehidratadas mediante su inmersión en xileno (4 inmersiones de 5 min), alcohol 99% (2 inmersiones de 5 min), alcohol 96% (1 inmersión de 2 min) y alcohol 70% (1 inmersión de 2 min). Se realizó una recuperación de antígenos por calor mediante un microondas en una solución de citrato pH 6 durante 10 min para las secciones posteriormente usadas para la detección de caspasa 1 y 30 min para las metalotioneínas o en solución TEG pH 9,1 durante 10 min para iNOS y 30 min para NITT.

Las secciones fueron incubadas en 1,5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  en TBS/Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich, USA, código N-6507) durante 30 minutos a temperatura ambiente con el fin de bloquear la peroxidasa endógena. Posteriormente fueron preincubadas en suero caprino al 10% (In Vitro, Fredensburg, Denmark, 04009-1A) en TBS/Nonidet P-40 durante 30 min a temperatura ambiente con el fin de impedir las uniones no específicas de los anticuerpos.

A continuación de seguir estos pasos, las secciones estuvieron listas para realizar técnicas inmunohistoquímicas y detección de apoptosis mediante TUNEL.

## **V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa SPSS para Windows (v.15.0), licencia concedida por la Universidad de Santiago de Compostela. La normalidad de los datos se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y en los casos donde fue necesario, los datos se transformaron logarítmicamente antes de su análisis. En todos los casos se estableció la existencia de diferencias estadísticamente significativas a  $p < 0,05$ .



## **BIBLIOGRAFÍA GENERAL**

Abraham, P.A., Evans, J.L., 1972. Cytochrome oxidase activity and cardiac hypertrophy during copper depletion and repletion. *Trace Substances in Environmental Health-V*, University of Missouri, Columbia, 335.

Angel, I., Bar, A., Horovitz, T., Taler, G., Krakovsky, M., Resnitsky, D., Rosenberg, G., Striem, S., Friedman, J.E., Kozak, A., 2002. Metal ion chelation in neurodegenerative disorders. *Drug Dev. Res.* 56: 300-309.

Araya, M., Olivares, M., Pizarro, F., Gonzalez, M., Speisky, H., Uauy, R., 2003. Copper exposure and potential biomarkers of copper metabolism. *Biometals.* 16: 199-204.

Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Bonvin, A.M.J.J., 2004. A docking approach to the study of copper trafficking proteins: Interaction between metallochaperones and soluble domains of copper ATPases. *Structure.* 12: 699-676.

Arnhold, W., Anke, M., Glej, 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-2 cells. *Biometals.* 16(1): 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.

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.

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.

Awolaja, O.A.; Antia, R.E.; Oyejide, A. 1997. Trace element levels in plasma/serum and erythrocytes of Keteku and White Fulani cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 29(1): 2-6.

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.

Banasik, A., Lankoff, A., Piskulak, A., Adamowska, K., Lisowska, H., Wojcik, A., 2005. Aluminum-induced micronuclei and apoptosis in human peripheral-blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle. *Environ. Toxicol.* 20(4): 402-406.

Barboza, P.S., Blake, J.E., 2001. Ceruloplasmin as an indicator of copper reserves in wild ruminants at high latitudes. *J. Wild. Dis.* 37(2): 324-331.

Barceloux, D.G., 1999. Copper. *Clin. Toxicol.* 37(2):217-230.

Batey, T., Berryman, C., Line, C., 1972. The disposal of copper-enriched pig manure slurry on grassland. *J. Br. Grassland Soc.* 27: 139-143.

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.

Berry, J.P., Zhang, L., Galle, P., 1995. Interaction of selenium with copper, silver, and gold salts-electron-microprobe study. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 27 (1): 21-28.

Berthon, G., 2000. Does human beta A4 exert a protective function against oxidative stress in Alzheimer's disease? *Med. Hypotheses.* 54: 672-677.

Bidewell, C.A., David, G.P., Livesey, C.T., 2000. Copper toxicity in cattle. *Vet. Rec.* 147: 399-400.

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., Juhasova, Z., 1991a. Distribution of harmful metals in sheep organisms after experimental industrial contaminant intake. *Vet. Med.* 36(6): 361-371.

Blanco-Penedo, I., Cruz, J.M., López Alonso, M., Miranda M., Castillo C., Hernández J., Benedito, J.L. 2006. Influence of copper status on the accumulation of toxic and essential metals in cattle. *Environ. Int.* 32: 901-906.

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.

Bounias, M., Purdey, M., 2002. Transmissible spongiform encephalopathies: a family of etiologically complex diseases-a review. *Sci. Total Environ.* 297: 1-19.

Brady, F.O., Helvig, B., 1984. Effect of epinephrine and norepinephrine on zinc thionein levels and induction in rat liver. *Am. J. Physiol.* 247: 319-322.

Braude, R., Ryder, K., 1973. Copper levels in diets in growing pig. *J. Agric. Soc.* 80: 489.

Bradley, C.H., 1993. Copper poisoning in a dairy herd fed a mineral supplement. *Can. Vet. J.* 34: 287-292.

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): 1069-1073.

Bremner, I., Beattie, J.H., 1990. Metallothionein and trace minerals. *Annual Rev Nutr.* 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., Marshall, R.B., 1974. Hepatic copper-and zinc-binding proteins in ruminants. 2. Relationship between Cu and Zn concentrations and the occurrence of a metallothionein-like fraction. *Br. J. Nutr.* 32: 293-299.

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.* 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., Young, B.W., 1976. Isolation of (Copper, Zinc)-th pig liver. *Biochem. J.* 155: 631-635.

Britton, R.S., 1996. Metal-induced hepatotoxicity. *Semin. Liver Dis.* 16(1): 3-12.

Brown, D.R., Schulz-Schaeffer, W.J., Schmidt, B., Kretzschmar, H.A., 1997. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol.* 146: 104-112.

Buck, W.B., Osweiler, G.D., Van Helder, G.A., 1981. Toxicología veterinaria clínica y diagnóstica. Ed. Acribia, Zaragoza. pp. 347-446.

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.

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: 145-150.

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  $\sigma$ -glutamyl cysteine synthetase in the liver of copper deficient rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 210: 102-106.

Cherian, M.G., 2003. Metallothionein in homeostasis and oxidative damage of copper. *Biometals.* 16(1): 226.

Chimielnicka, J., Bem, E.M., Kaszubski, P. 1983. Organs and subcellular distribution of cadmium in the rats exposed to cadmium, mercury and selenium. *Environm.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.* 549.

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.

Cerone, S.I., Sansinanea, A.S., Streitenberg, S.A., García, M.C., Auza, N.J., 2000a. Cytochrome c-oxidase, Cu,Zn-superoxide dismutase and caeruloplasmin activities in copper-deficient bovines. *Biol. Trace Element Res.* 73: 269-278.

Cerone, S.I., Sansinanea, A.S., Streitenberg, S.A., García, M.C., Auza, N.J., 2000b. Bovine monocyte-derived macrophage function in induced copper deficiency. *Gen. Physiol. Biophys.* 19: 49-58.

Cleary, E.G., Fanning, J.C., 1975. Effects of copper deficiency on connective tissues in sheep. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2: 75.

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.

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.

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.

Deloncle, R., Guillard, O., Bind, J.L., Delaval, J., Fleury, N., Mauco, G., Lesage, G. 2006. Free radical generation of protease-resistant prion after substitution of manganese for copper in bovine brain homogenate. *Neurotoxicol.* 27: 437-444.

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.

Dormandy, T.L., 1980. Free radical reactions in biological systems. *Am. R. Coll. Surg. Engl.* 62: 188-194.

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.

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.

Eife, R., Weiss, M., Müller-Hocker, J., Lang, T., Barros, V., Sigmund, B., Thanner, F., Welling, P., Lange, H., Wolf, W., Podeck, B., Kittel, J., Schramel, P., Reiter, K., 1999. Chronic poisoning by copper in tap water: II. Copper intoxication with predominantly systemic symptoms. *Eur. J. Med.Res.* 4: 224-228.

El-Gallad, T.T., Mills, C.F., Bremner, I., Summers, R., 1983. Thyomolybdates in rumen contents and rumen cultures. *J. Inorg. Biochem.* 18: 323-334.

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., 1973. Copper homeostasis in the mammalian system. *Physiol. Rev.* 53: 535-570.

Evans, G.W., Majors, P.F., Cornatzer, W.E., 1970a. Ascorbic acid interaction with metallothionein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41: 1244-1247.

Evans, G.W., Myron, D.R., Cortnazer, N.F., Cortnazer, W.E., 1970b. Age-dependent alterations in hepatic subcellular copper distribution and plasma ceruloplasmin. *Am. J. Physiol.* 218: 298-300.

FEDNA, 1999. Fuentes de microminerales. Disponible en: [http://www.etsia.upm.es/fedna/minerales/fuentes\\_microminerales.htm](http://www.etsia.upm.es/fedna/minerales/fuentes_microminerales.htm)

Formigari, A., Irato, P., Santon, A., 2007. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 146(4): 443-59.

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.

Frieden, E., 1980. Caeruloplasmin: a multifunctional metalloprotein of vertebrate plasma. *CIBA Foundation Symposium.* 79: 93-124.

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., Litlefield, 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.

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.

Gochfeld, M., 1997. Factors Influencing Susceptibility to Metals. 105 (4): 817-822.

González, F.J., Llena, J., 1994. Manejo del ternero de cebo. Tratado de Veterinaria Práctica. Boris nº 61. Madrid.

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., Gawthorne, J.M., Kumaratilake, J.S., 1989. Subcellular Distribution of Copper in the Kidneys of Normal, Copper-Poisoned, and Thiomolybdate-Treated Sheep. *J. Inorg. Biochem.* 35: 23-36.

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., 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., 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., Buckey, W.T., Christensen, D.A., 1989a. Review of copper deficiency and metabolims in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 69: 819-845.

Goyer, R.A., 1996. Toxic effects of metals. En: Klaassen, C.D., Amdur, M.O., Doull, J. (eds). Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poison. 5 th ed. Ed. Mcgraw-Hill. USA. 691-736.

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. 31-45.

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.

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.

Grobler, D.G., 1999. Copper poisoning in wild ruminants in the Kruger National Park: Geobotanical and environmental investigation. *J. Vet. Res.* 66: 81-93.

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.

Grune, T., Reinheckel, T., Joshi, M., Davies, K.J., 1995. Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J. Biol. Chem.* 270(5): 2344-2351.

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.

Gutiérrez, B.A., 2008. Efecto de la raza sobre la acumulación de Cu en terneros de cebo. Tesis doctoral USC.

Hadrich, J., 1996. High amounts of copper in calf's livers. Recent data and estimation of potential health hazards. *Dtsch. Lebensmitt. Rundsch.* 92 (4): 103-113.

Hamaguchi, RA., 1999. Innovative reclamation research at Highland Valley Copper. Technical Paper. *CIM Bull.* 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.

Hansen, S.L., Ashwell, M.S., Leighter, L.R., Fry, R.S., Lloyd, K.E., Spears, J.W., 2009. The addition of high manganese to a copper deficient diet further depresses copper status and growth of cattle. *Br.J.Anim.Nutr.* 101(7): 1068-1078.

Hansen, S.L., Spears, J.W., 2008. Impact of copper deficiency in cattle on proteins involved in iron metabolism. *FASEB J.* 22: 443-445.

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: 836-841.

Harrison, M.D., Dameron, C.T., 1999. Molecular mechanism of copper metabolism and the role of the Menkes disease protein. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 13(2): 93-105.

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.

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.

Heidarpour Bami, M., Mohri, M., Seifi, H.A., alavi-Tabatabaee, A.A., 2008. Effects of parenteral supply of iron and copper on hematology, weight gain and health in neonatal dairy calves. *Vet. Res. Commun.* 33: 553-561.

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. 5(15): 5-16.

Herd, D.B., 1990. Minerals-Does your supplement Program Need Fine Tuning. *Limousin World*. 130-139.

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.

Hidiroglou, M., Ivan, M., McDowell, L.R., 1990. Metabolismo y estado de cobre en el ganado bovino. *XVI World Buiatrics Congress. Actas Simposio durante el XVI Congreso Mundial de Buiatría*. Salvador, Bahía, Brasil. pp. 21-32.

Horn, N., Tumer, Z., 1999. Molecular genetics of intracellular copper transport. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 12(4): 297-313.

Hornshaw, M.P., McDermott, J.R., Candy, J.M., Lakey, J.H., 1995. Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214: 993-999.

Howell, J.McC., Gooneratne, R.S., 1987. The pathology of copper toxicity in animals. En: Howell, J.McC., Gawthorne, J.M. (eds.). *Copper in Animals and Man*, vol. II. CRC Press, Florida. 53-78.

Humann-Ziehank, 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.

Humphreys, D.J., 1990. *Toxicología veterinaria*. 3ª ed. Ed. McGraw-Hill-Interamericana de España. pp. 17-85.

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.

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.

Hussein K. S.M., Jones, B-E.V., Frank, A., 1985. Selenium copper interaction in goats. *Zbl.Vet. Med. A.* 32: 321-330.

Igarza, L.M., Auza, Y., 1995. Molibdeno en rumiantes: aspectos fisiológicos y tóxicos. *Arch. Med. Vet.* 27(1): 5-13.

Imrie, C.E., Korre, A., Munoz-Melendez, G. 2009. Spatial correlation between prevalence of transmissible spongiform diseases and British soil geochemistry. *Environm. Geochem. Health.* 31: 133-145.

Jain, R.K., Gerlowski, L.G., 1981. Kinetics of uptake, distribution, and excretion of zinc in rats. *Ann. Biomed. Eng.* 9: 347-361.

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.

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.

Johnson, G.F., Morell, R., Stockert, R.J., 1981. Hepatic lysosomal copper protein in dogs with an inherited copper toxicosis. *Hepatol.* 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.

Jondreville, C., Revy, P.S., Dourmad, J.Y., 2003. Dietary means to better control the environmental impact of copper and zinc by pigs from weaning to slaughter. *Livest. Prod. Sci.* 84: 147-156.

Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in Soils and Plants. 3rd ed. CRC Press, Inc. USA. 413.

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.

Kendall, N.R., Illingworth, D.V., Telfer, S.B., 2001. Copper responsive infertility in British cattle: the use of a blood caeruloplasmin to copper ratio in determining a requirement for copper supplementation. In: Diskin, M.G. (Ed.), Fertility in the High-Producing Dairy Cow. *Brit. Soc. Anim.Sci.* vol. 26 (2). Occasional Publication, Edinburgh.

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.

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., 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., 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.

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.

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.

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.

Larson, B.L., Arthington, J., Corah L.R., 1995. Recognizing and treating copper imbalances in cattle. *Vet. Med.* 90(6): 613-619.

Lech, T., 2002. Lead, copper, zinc and magnesium content in hair of children and young people with some neurological diseases. *Boil. Trace Elem. Res.* 85: 111-126.

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.

Leigher, L.R., Ahola, J.K., Engle, T.E., Spears, J.W. 2007. Decreased brain copper due to copper deficiency has no effect on bovine prion proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352: 884-888.

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.

Lin, A.M.Y., Fan, S.F., Yang, D.M., Hsu, L.L., Yang, H.J., 2003. Zinc-induced apoptosis in substantia nigra of rat brain: neuroprotection by vitamin D3. *Free Radic. Biol. Med.* 34(11): 1416-1425.

Linder, M.C., Zerounian, N.R., Moriya, M., Malpe, R., 2003. Iron and copper homeostasis and intestinal absorption. *Biomaterials.* 16(1): 145-160.

Littledike, E.T., Wittum, 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 1. *J. Anim. Sci.* 73: 2113-2119.

Liu, X., Nordberg, G.F., Jin, T., 1992. Increased urinary excretion of zinc and copper by mercury chloride injection in rats. *BioMetals.* 5, 17-22.

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., Crespo, A., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L., 2006. Assesment of some blood parameters as potencial markers of hepatic copper accumulation in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18: 71-75.

López Alonso, M., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L. 2005. The role of metallothionein and zinc in hepatic copper accumulation in cattle. *Vet. J.*, 169: 262-267.

López Alonso, M., Prieto Montaña, F., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L., 2004. 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.

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): 812-820.

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.

Mackenzie, A.M., Allinworth, D.V., Jackson, D.W., Teifer, S.B., 1997. A comparison of methods of assessing copper status in cattle. In Trace Elements in Man and Animals, TEMA 9. Eds. P.W.F. Fischer, M.R. L'Abbé, K. A. Cackell, R.S. Gibson. NRC Research Press. Banff, Alberta, Canada.

Maiorka, P.C., Massoco, C.O., 1998. Copper Toxicosis in Sheep: A Case Report. *Vet. Human Toxicol.* 40 (2): 99-100.

Marcilese, N. A., Ammerman, C. B., Valsecchi, R., Dunavant, B. G., Davis, G. K. 1969. Effect of Dietary Molybdenum and Sulfate upon Copper Metabolism in sheep. *J. Nutr.* 99(2): 177-183.

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.

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.

McDowell, L.R., Conrad, J.H., Hembry, F.G., Rojas, L.X., Valle, G., Velásquez, J., 1993. Minerales para rumiantes en pastoreo en zonas tropicales. 2ª ed. Gainesville. Universidad de Florida.

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.

McMurray, C.H., 1980. Copper deficiency in ruminants. En: Biological Roles of copper. Ciba Foundation 79 (New Series) Elsevier, New York.

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. *Nutr.* 13(1): 48-49.

Mercer, J.F.B., 2001. The molecular basis of copper-transport diseases. *Trends Mol. Med.* 7(2): 64-69.

Millar, K.R., Meads, W.J., 1988. Selenium levels in the blood, liver, kidney and muscle of sheep after the administration of iron/selenium pellets or soluble glass boluses. *N.Z.Vet.J.* 37:8-10.

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., 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. *Can. 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.

Miranda, M., 1999. Estudio de los principales elementos contaminantes en ganado vacuno de Asturias. Tesis doctoral, Universidade de Santiago de Compostela.

Miranda, M., Cruz, J.M., López Alonso, M., Benedito, J.L., 2006. Variations in liver and blood copper concentrations in young beef cattle raised in north-west Spain: associations with breed, sex, age and season. *An. Sci.* 82(2): 253-258.

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., 2005. Effects of moderate pollution on toxic and trace metal levels in calves from a polluted area of northern Spain. *Environ. Int.* 31: 543-548.

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., 2003a. 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.

Mullis, L.A., Spears, J.W., McCraw, R.L., 2003b. Estimated copper requirements of Angus and Simmental heifers. *J. Anim. Sci.* 81(4): 865-873.

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., Willians, 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.

NRC (National Research Council), 2000. Nutrient Requirements of Beef Cattle 7th ed. National Academy Press, Washington. Revised.

NRC (National Research Council), 2004. Nutrient requirements of beef cattle. 7th revised edition. National Academy of Sciences, Washington DC.

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): 282-285.

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): 91-98.

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.

Pan, Y.J., Loo, G., 2000. Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T-lymphocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 824-830.

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.

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.

Perry, G., Taddeo, M.A., Petersen, R.B., Castellani, R.J., Harris, P.L.R., Siedlak, S.L., Cash, A.D., Liu, Q., Nunomura, A., Atwood, C.S., Smith, M.A., 2003. Adventiously-bound redox active iron and copper are at the centre of oxidative damage in Alzheimer disease. *Biometals.* 16: 77-81.

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.

Piscator M., 1979. Copper. En: Handbook on the Toxicology of Metals. Friberg L, Piscator M, Nordberg G, Vouk VB. (eds). Elsevier, Amsterdam. 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.

Popesko, P., 1998. Atlas de anatomía topográfica de los animales domésticos, 2ª ed. Barcelona.

Porter, H., 1964. Tissue copper proteins in Wilson's disease. *Arch. Neurol.* 11: 341-349.

Porter, H., Wiener, W., Barker, M., 1961. The intracellular distribution of copper in immature liver. *Biochem. Biophys. Acta.* 52: 419-423.

Poulsen, H.D., 1998. Zinc and copper as feed additives, growth factors or unwanted environmental factors. *J. Anim. Feed Sci.* 7: 135-142.

Prusiner, S.B., 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science.* 252: 1515-1522.

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 Atx1. *Science.* 278: 853-856.

Puls, R., 1994. Mineral Levels in Animal Health, 2nd ed. Diagnostic Data, Sherpa International, Clearbook, BC. 83: 109.

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, 9ª 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.

Rana, S.V., 2008. Metals and apoptosis: recent developments. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 22(4): 262-284.

Real Decreto 1201/2005 (10 de octubre) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE núm. 252, 21 de octubre de 2005.

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.

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.

Ronneau, C., Cara, J., 1984. Correlations of element deposition on pastures with analysis of cows' hair. *Sci. Total Environ.* 39: 135-142.

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.

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 through copper-binding sites. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 7: 69-88.

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.

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.

Scaletti, R.W., Trammel, D.S., Smith, B.A., Harmon, R.J., 2003. Role of dietary copper in enhancing resistance to *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Sci.* 86: 1240-1249.

Selkoe, D.J., 1997. Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science.* 275: 630-631.

Smart, M.E., 1984. Factors influencing plasma and liver copper and zinc in beef cattle. Desertion, Saskatchewan, University of Saskatchewan.

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, G.M., White, C.L., 1997. A molybdenum-sulfur-cadmium interaction in sheep. *Austr. J. Agric. Res.* 48: 147-154.

Smith, R. M., 1980. Copper and the growth 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: 65.

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 metallothionein in hypozincemia associated with bacterial infection. *Am. J. Physiol.* 234(3): 399-406.

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.

Spears, J.W., 2003. Trace mineral bioavailability in ruminants. *J.Nutr.* 133: 1506S-1509S.

Speisky, H., Navarro, P., Cherian, M.G., Jimenez, I., 2003. Copper-binding proteins in human erythrocytes: Searching for potential biomarkers of copper over-exposure. *Biometals.* 16: 113-123.

Spengler, S.D., 1989. PCB as acute cause of a chronic diseases in sheep. *Tierarztl 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.

Spolders, M., Ohlschlager, S., Rehage, J., Flachowsky, G. 2010. Inter and intra individual differences in serum copper and zinc concentrations after feeding different amounts of copper and zinc over two lactations. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 94(2): 162-73.

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. *Gastroenterol.* 78: 1615-1628.

Strausak, D., Mercer, J.F.B., Dieter, H.H., Stremmel, W., Multhaup, G., 2001. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res. Bull.* 55: 175-185.

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.

Sunderman, F.W., Nomoto, S., 1970. Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. *Clinical Chem.* 16: 903-910.

Sutherland, R.J., Deol, H.S., Hood, P.J., 1992. Changes in plasma bile acids, plasma amino acids, and hepatic enzymes pools as indices of functional impairment in liver-damaged sheep. *Vet. Clin. Pathol.* 21(2): 51-56.

Suttle, N.F. 1974. Effects of organic and inorganic sulphur on the availability of dietary copper to sheep. *Br.J.Nutr.* 32:559-568.

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: *Recent Advances in Animal Nutrition*. Garnyworthy, P.C.; Cole, D.J.A. (eds). Nottingham University Press, Nottingham. 173-188.

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.

Suttle, N.F., McMurray, C.H., 1983. Use of erythrocyte copper: Zinc superoxide dismutase activity and hair or free concentrations in the diagnosis of hypocuporsis in ruminants. *Res. Vet. Sci.* 35: 47-52.

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.

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.

Telfer, S.B., Kendall, N.R., Illingworth, D.V., Mackenzie, A.M. 2004. Molybdenum toxicity in cattle: an underestimated problem. *Cattle Pract.* 12: 259-263.

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.

Thackray, A.M., Knight, R., Haswell, S.J., Bujdoso, R., Brown, D.R. 2002. Metal imbalance and compromised antioxidant function are early changes in prion disease. *Biochem. J.* 362: 253-258.

Thomson, G.G., Lawson, B.M. 1970. Copper and Selenium interaction in sheep. *N. Z. Vet. J.* 18: 79-82.

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.

Tsenkova, R.N., Iordanova, I.K., Toyoda, K., Brown, D.R. 2004. Prion protein fate governed by metal binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325: 1005–1012.

Udall, R.H., Warner, R.G., Smith, S.E., 1952. A liver biopsy technique for cattle. *Cornell Vet.* 42(1): 25-27.

Underwood, E. J., 1983. Los minerales en la nutrición del ganado. 2ª ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 107-169.

Underwood, E.J., Suttle, N.F., 2002. Los minerales en la nutrición del ganado. Editorial Acribia S.A. Zaragoza.

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.

Wada, Y., Kajiwara, W., Kato, A., 1995. Wilson's disease-like lesion in a calf. *Vet. Pathol.* 32: 538-539.

Ward, J.D., Spears, J., 1997. Long-term effects of consumption of low-copper diets with or without supplemental molybdenum on copper status, performance and carcass characteristics of cattle. *J Anim Sci.* 75: 3057–3065.

Wätjen, W., Beyersmann, D., 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *BioMetals.* 17: 65–78.

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.

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.

WHO, 1998. Environmental Health Criteria 200: Copper. International Programme on Chemical Safety. Geneva: WHO.

Wikse, S.E., Herd, D., Field, R., Holland, P., 1992. Diagnosis of copper deficiency in cattle. *JAVMA.* 200(11): 1625-1629.

Wong, B.S., Pan, T., Liu, T., Li, R., Gambetti, P., Sy, M.S. 2000. Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273: 136–139.

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.

Xu, J., Ji, L.D., Xu, L.H., 2006. Lead-induced apoptosis in PC 12 cells: involvement of p53, Bcl-2 family and caspase-3. *Toxicol. Lett.* 166: 160–167.

Yoshida, M., Saegusa, Y., Fukuda, A., Akama, Y., Owada, S., 2005. Measurement of radical-scavenging ability in hepatic metallothionein of rat using in vivo electron spins resonance spectroscopy. *Toxicol.* 213(1-2): 74-80.

Zervas, G., Nokolaou, E., Mantzios, A., 1990. Comparative study of chronic copper poisoning in lambs and young goats. *Anim. Prod.* 50: 497-506.



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **CAPÍTULO 1**

### *CHAPTER 1*

#### **Evaluación de la necesidad de suplementación con cobre en terneros de carne de cría intensiva**

*Evaluation of the need of copper supplementation in intensively reared  
beef cattle*



## Introducción

Tradicionalmente se creía que el ganado vacuno era relativamente tolerante al cobre (Cu) y los informes de casos clínicos describiendo intoxicación por Cu fueron, hasta hace poco, raros. De hecho, la deficiencia de cobre en el ganado bovino es un trastorno bastante común en todo el mundo y las dieta del ganado se suelen suplementar generalmente con altas concentraciones de Cu (hasta 35 mg/kg de materia seca (MS), el nivel máximo de suplementación de Cu para el ganado bovino establecido por la Unión Europea; Reglamento 1334/2003/EC), muy por encima de sus necesidades fisiológicas (10 mg/kg de MS; NRC, 2000). El relativamente amplio rango para la suplementación de Cu se debe a que en el ganado, y en los rumiantes en general, los requisitos de Cu nutricional no depende exclusivamente las concentraciones de Cu en la dieta, sino que también depende en gran medida de su disponibilidad y elevados niveles de suplementación con Cu han sido justificados en vista de la interferencia de Cu con sus antagonistas, principalmente Mo, S, Fe y Zn (Kendall *et ál.*, 2001).

En los últimos años se ha descrito un aumento en el número de episodios de toxicidad de Cu en ganado bovino de cría intensiva, principalmente debido a que el Cu procedente de los cereales añadidos a los alimentos concentrados es más accesible que de forraje (NRC, 2000) y también a cambios en el tipo y la biodisponibilidad de los suplementos dietéticos Cu (Laven *et al.*, 2004). También se ha demostrado que los suplementos dietéticos que conducen a acúmulos de Cu en el hígado sólo ligeramente superiores a lo normal (de alrededor de 125 mg/kg de peso fresco) mostraron efectos negativos sobre el rendimiento de los animales en términos de un menor consumo de pienso y de la ganancia media diaria (Engle y Spears, 2000).

El objetivo de este estudio fue evaluar si, con el manejo nutricional de las granjas de cría intensiva del noroeste de España y también de muchos países (basado principalmente en alimento concentrado a base de materias primas internacionales), es necesaria la suplementación con Cu para mantener las necesidades fisiológicas de los animales. Esto se realizó mediante la evaluación de los parámetros sanguíneos durante el ciclo productivo y la acumulación de Cu orgánica a nivel de matadero de animales que recibieron una dieta estándar con y sin suplementación con Cu. Dado que los trastornos hematológicos y del rendimiento, tales como la anemia y retraso del crecimiento, son signos comunes de alteraciones en el estado de Cu en los bovinos, en particular en los animales deficientes en Cu (NRC, 2000), algunos parámetros hematológicos y productivos fueron medidos durante el estudio.

## Material y métodos

### Diseño experimental

20 cruces de rubia gallega x Holstein-Friesian de carne fueron adquiridos para este estudio. Todos los animales eran de sexo masculino, con edades entre 8 semanas y un peso

aproximado de 90 a 120 kg a la adquisición. En la etapa previa al engorde los animales fueron alojados en la granja, con suelos cubiertos con ranuras y alimentados con lactoreemplazantes y una dieta de arranque sin suplementación con Cu hasta la edad de 12 semanas (comienzo del estudio, día 0). Más detalles sobre el tratamiento sanitario de los animales después de la compra en Miranda *et ál.* (2010).

Posteriormente, los animales fueron asignados aleatoriamente en dos grupos: no suplementado ( $n = 10$ ) y suplementados con Cu ( $n = 10$ ) y se mantuvieron en unas instalaciones típicas para el engorde comercial de terneros en España durante los períodos de crecimiento (de 12 a 24 semanas) y cebo (24 a 36 semanas). Ambos grupos recibieron exactamente la misma dieta (Tabla 1) con la adición de 15 mg de sulfato de Cu/kg MS para el concentrado del grupo de animales suplementados con Cu a lo largo de todo el período de estudio. Se realizaron análisis de la dieta mensualmente para asegurarse de la composición química del concentrado antes de alimentar a los animales. A ambos grupos de animales se les permitió el acceso libre al concentrado, agua y paja de trigo. La ración fue suministrada una vez al día por la mañana (pienso y paja), y la ingesta diaria se determinó pesando tanto la ración nueva cada día como los sobrantes, que se retiraron antes de servir la nueva ración al día siguiente. La ingesta media diaria de paja de trigo durante el estudio fue de 1,5 kg/animal. Los animales fueron tratados y manejados, durante todo el proceso de cría y extracción de muestras de sangre, conforme a las directrices del Gobierno español (RD 1201/2005).

#### Toma de muestras

Los animales fueron pesados, y las muestras de sangre fueron extraídas de la vena yugular, entre las 08:00 y las 10:00 h en los días 0 (justo antes de la introducción a la dieta de estudio), 28, 56, 84 (primer día del periodo de acabado), 112 y 140 (antes del sacrificio). Para la determinación de los parámetros hematológicos y de Cu en sangre entera las muestras se recogieron en tubos Vacutainer con heparina. La sangre para la determinación de Cu en suero y ceruloplasmina (Cp) fue recogida en tubos Vacutainer sin heparina. Todas las muestras fueron refrigeradas y transportadas al laboratorio, dentro de las 4 h posteriores a su recogida, y el suero se obtuvo por centrifugación a 3.000 g durante 15 minutos. Se almacenaron submuestras por triplicado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis. Las muestras de tejido fueron recogidas en matadero cuando los animales tenían aproximadamente 9 meses de edad. Las muestras de al menos 200 g de hígado (lóbulo caudado), riñón, músculo (diafragma), el bazo y el cerebro (mesencéfalo) de cada animal se portaron en bolsas de plástico sobre hielo al laboratorio y se almacenaron a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

#### Análisis de muestras

Para la determinación de Cu, sangre entera (1 mL) y muestras de tejidos (1 g) fueron digeridas en 5 mL de ácido nítrico concentrado (Suprapur grade, Merck) y 3 mL de 30% w/v de peróxido de hidrógeno en un sistema de digestión por microondas (Ethos Plus; Milestone, Sorisole, Italia). Las muestras digeridas fueron transferidas a tubos de polipropileno y diluídas a 15 mL

con agua ultrapura. Las muestras de suero fueron analizadas directamente previa dilución (1:10 v: v) en agua desionizada. Los niveles de Cu se determinaron por ICP-AES.

El límite de detección en la digestión ácida fue 0,0304 mg / g. Las recuperaciones analíticas (%), determinadas a partir de materiales de referencia certificados fueron  $111 \pm 13$  para Pig kidney CRM 186 (BCR Materiales de Referencia en Geel, Bélgica) y  $97 \pm 10$  para Fish protein DORM-3 (National Research Council, Ottawa, Ontario, Canadá).

La sangre heparinizada, poco después de la recolección fue usada para la determinación de los parámetros hematológicos mediante un contador automático para veterinaria (MS9 Automatic Cell Counter, Melet Schloesing Laboratories). Las proteínas plasmáticas totales (PT) se determinaron mediante refractometría.

La ceruloplasmina sérica (Cp) se determinó en función de su actividad oxidasa p-fenilendiamina (Sunderman y Nomoto, 1970). La precisión del método, calculada como la desviación estándar relativa (RSD%) de la actividad enzimática de un plasma de referencia de la especie bovina, fue del 1.8%.

Las muestras de concentrado (n = 20) fueron analizadas mensualmente en un laboratorio de referencia (Laboratorio de Mouriscade, Lalin, España) (Tabla 1). Más detalles sobre la metodología para el análisis de la dieta en Miranda *et ál.* (2010).

#### Análisis estadístico

La normalidad de los datos fue analizada mediante la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. La prueba t de Student fue utilizada para analizar las diferencias entre los parámetros productivos y en la acumulación tisular de Cu entre los animales no suplementados y suplementados con Cu. Se realizó un análisis de varianza para los parámetros Cu en suero, en sangre entera y niveles séricos de Cp con el parámetro suplementación (S) como factor fijo y el día de muestreo (T) como factor de medidas repetidas, y la interacción con el T \* S fue también incluida en el modelo. En todos los casos el criterio de significación estadística fue de  $p < 0,05$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS para Windows v. 15.0.

## Resultados

La suplementación con Cu no afectó de manera estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) al Cu en suero y en sangre entera en los animales de nuestro estudio, aunque en general el grupo suplementado Cu mostró los mayores valores medios de estos parámetros a lo largo del experimento, y la actividad sérica de la Cp sólo fue estadísticamente significativa más alta en el día 112 en los animales del grupo suplementado (Figura 1). Existieron diferencias estadísticamente significativas para el Cu en sangre entera y la Cp en función del día de muestreo ( $p < 0,001$ ) y tendió a ser significativo para el Cu en suero ( $p = 0,066$ ). En general, el Cu en la sangre entera, suero y la actividad Cp disminuyó en los animales no suplementados y aumentó en el grupo suplementado con Cu al inicio del experimento, mostrando

posteriormente un patrón similar con un aumento en el día 112 del experimento. En ambos grupos tanto suplementados como no suplementados todos los animales mostraron concentraciones de Cu en suero y sangre entera por encima de los umbrales de deficiencia de Cu ( $> 0475$  y  $> 0667$  mg/L respectivamente; Suttle, 1993) a lo largo de todo el estudio. La actividad Cp también se encontró en ambos grupos dentro de los rangos normales descritos por Puls (1994), de 0,09-0,25 g/L, y sólo 8 de 104 muestras mostraron actividades de Cp dentro de los rangos marginales de 0,08 g/L.

En los tejidos, el Cu se acumuló principalmente en el hígado (niveles aproximadamente 100 veces superiores a los de otros tejidos), seguido por el riñón y el cerebro, y las concentraciones más bajas de Cu se encontraron en el bazo y el diafragma (Tabla 2). El hígado también fue el órgano que mostró el mayor incremento (89%) de las concentraciones de Cu en el grupo suplementado ( $p < 0,01$ ), a pesar de una disminución significativa en el bazo (un 9%,  $p < 0,05$ ) y un aumento casi significativa en el cerebro (25%,  $p < 0,1$ ) en los animales del grupo suplementado.

Todos los animales de nuestro estudio presentaron concentraciones hepáticas de Cu por encima del rango bajo de normalidad (25-100 mg/kg de peso fresco, Puls, 1994). Sin embargo, la mayoría (90%) de los animales suplementados mostraron concentraciones hepáticas de Cu que superan el rango de normalidad y el 50% de ellos mostraron concentraciones de Cu asociadas con la toxicidad en bovinos ( $> 150$  mg/kg de peso fresco; Perrin *et al*, 1990; Gummow, 1996). Para los otros tejidos analizados en nuestro estudio las concentraciones de Cu se encontraron dentro de los rangos normales establecidos por Puls (1994).

La suplementación con Cu no mostró un efecto estadísticamente significativo sobre los parámetros hematológicos (Tabla 3) que se encontraron dentro de los rangos normales para el ganado vacuno (Radostits, 2007), ni sobre los parámetros productivos (Tabla 4).

## **Discusión**

Basándose en los resultados de este estudio se puede sugerir que la dieta estándar sin suplementación con Cu recibido por los terneros de cría intensiva de nuestro estudio durante todo el ciclo productivo fue suficiente para cubrir las necesidades fisiológicas de Cu.

El efecto de la suplementación sobre los parámetros sanguíneos de Cu fue más evidente en la primera toma de muestras después de la suplementación de Cu: el Cu en suero y Cp, indicadores de exposición reciente a Cu (Miranda *et al*, 2010), aumentó en los terneros que recibieron Cu y disminuyó en los no suplementados. Por el contrario, el efecto de la suplementación de Cu sobre el Cu en sangre entera fue menos evidente al comienzo del experimento, posiblemente debido a que Cu se incorpora formando parte de la SOD en los glóbulos rojos durante la hematopoyesis y la vida de los eritrocitos es de aproximadamente unos 150 días (Suttle y McMurray, 1983). Posteriormente, la evolución de los indicadores de

Cu en sangre fue muy similar o paralela en ambos grupos a lo largo del estudio, y posiblemente relacionado con otros factores independientemente del contenido en Cu en la dieta. La actividad Cp, el principal componente del Cu en plasma, varía a lo largo de la vida del animal, independientemente del status del Cu (López-Alonso *et ál.*, 2006) y aumenta en respuesta a ejercicio intenso y varias enfermedades inflamatorias e infecciosas (Beshgetoor y Hambridge, 1998). Es posible que el aumento estadísticamente significativo de la actividad de Cp, y consecuentemente de Cu en sangre y suero, en el día 112 podría estar relacionado con cualquier proceso puntual de estrés, inflamatorio o infeccioso en el grupo suplementado con Cu.

A parte de los adecuados niveles de Cu sanguíneos, el hecho de que los parámetros hematológicos estuvieran dentro del rango adecuado en el grupo de animales no suplementados indican que la concentración de Cu en la dieta basal fue suficiente para mantener una hematopoyesis normal (Ward y Spears, 1997). Tampoco se apreció ningún efecto beneficioso de la suplementación con Cu sobre parámetros productivos evaluados en este estudio. Estudios previos destinados a evaluar la influencia de la suplementación de Cu en el rendimiento de los animales presentaron resultados poco consistentes, hecho posiblemente más relacionado con los niveles de antagonistas de la dieta que a los niveles de Cu (Ward y Spears, 1997). Por otra parte, la suplementación de cobre en dosis altas (20-40 ppm de CuSO<sub>4</sub>) se ha asociado con un menor aumento de peso y de consumo de alimento en el ganado alimentado a base de dietas ricas en concentrados (Engle y Spears, 2000). Esto podría estar asociado a una excesiva acumulación de Cu en el hígado (hecho que también se aprecia en los animales de nuestro estudio), ya que durante la etapa inicial de la intoxicación crónica por Cu en bovinos, el Cu se acumula en el hígado sin signos clínicos de la enfermedad (Howell y Gooneratne, 1987). De hecho, un estudio señaló que en rebaños con episodios clínicos de toxicidad de Cu, los casos clínicos representan sólo una pequeña proporción de los casos reales de la intoxicación por Cu, estando relacionada la suplementación de Cu con una hepatopatía subclínica como sugiere la fuerte elevación de las enzimas hepáticas (GLDH y AST) en los animales (Laven *et ál.*, 2004).

## Conclusiones

En las condiciones de este estudio, que son las condiciones del ganado de cría en muchos países europeos, la suplementación rutinaria con Cu no está justificada para mantener un adecuado status de Cu en los animales o para mejorar los parámetros productivos. Más información sobre el riesgo de la presencia de los antagonistas de Cu en la dieta a base de concentrados debe ser necesaria para justificar el uso de suplementos de Cu en el ganado vacuno de cría intensiva.

## ARTICLE IN PRESS

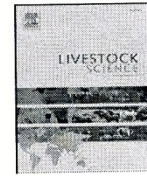
LIVSCI-01434; No of Pages 5

Livestock Science xxx (2010) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Livestock Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/livsci](http://www.elsevier.com/locate/livsci)

Short communication

## Evaluation of the need of copper supplementation in intensively reared beef cattle

M. García-Vaquero<sup>a</sup>, M. Miranda<sup>b,\*</sup>, M. López-Alonso<sup>a</sup>, C. Castillo<sup>a</sup>, J.L. Benedito<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Patoloxía Animal, Facultade de Veterinaria, 27002, Lugo, Spain

<sup>b</sup> Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Ciencia Clínicas Veterinarias, Facultade de Veterinaria, 27002, Lugo, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 September 2010  
 Received in revised form 18 October 2010  
 Accepted 1 November 2010  
 Available online xxx

## Keywords:

Copper supplementation  
 Intensive systems  
 Beef cattle  
 Productive parameters  
 Hematologic parameters  
 Caeruloplasmin

## ABSTRACT

The aim of this investigation was to evaluate whether, in the nutritional management of commercial feedlots of NW Spain based mainly on concentrate feed from international raw materials, copper (Cu) supplementation is justified to maintain the physiological requirements. This was done by evaluating blood Cu parameters (serum Cu, whole blood Cu and serum caeruloplasmin), haematological (red blood cells, microhematocrit, haemoglobin, white blood cells, and thrombocytes), productive parameters (initial and final live weight, feed intake, average daily gain, carcass weight and performance and internal organs weight) and organic Cu accumulation at slaughter (liver, kidney, muscle, spleen and brain) in intensive beef cattle that received a standard diet with 15 mg/kg of Cu sulphate (Cu supplemented group, n = 10) and without Cu (non-supplemented group, n = 10) during all the productive cycle (growing and finishing periods and animals aged 12 to 36 weeks). In general Cu supplementation did not statistically affect blood Cu indicators, productive and haematologic parameters, and the levels of these parameters were within their normal ranges during the whole study. There were significant statistic differences in tissue Cu accumulation, mainly in the liver, with 90% of the animals of the Cu supplemented group showing hepatic Cu levels exceeding the adequate range and 50% within the concentrations associated with Cu toxicity. Under the conditions of this study, which are the conditions of the cattle raised under intensive methods in many European countries, routinely Cu supplementation is not justified to maintain an adequate Cu status in the animals or to improve productive parameters. More information about the risk of presence of Cu antagonists in the concentrate diets should be necessary to justify routinely Cu supplementation in intensively reared beef cattle.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Traditionally, cattle were thought to be relatively tolerant to copper (Cu) accumulation and reports of Cu poisoning were, until recently, somewhat rare. In fact, Cu deficiency in cattle is a rather common disorder worldwide and cattle diets are regularly supplemented with high Cu concentrations (up to 35 mg/kg dry

matter (DM), the maximum level of Cu supplementation for cattle established by the European Union; Council Regulation (EC) No 1334/2003/EC), well above general physiological requirements (10 mg/kg DM; NRC, 2000). The relatively wide margin for Cu supplementation is because in cattle, and in ruminants in general, Cu nutritional requirements do not depend exclusively on dietary Cu concentrations, but are highly dependent on the Cu availability and elevated Cu supplementation is justified in view of the interference of Cu with its antagonists, mainly Mo, S, Fe and Zn (Kendall et al., 2001).

In recent years an increase in the number of episodes of Cu toxicity have been reported in cattle reared under intensive systems, mainly due to the fact that Cu from cereals in concentrate feeds is more available than from forage (NRC,

\* Corresponding author. Facultade de Veterinaria, Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Estrada da Granxa s/n, C.P. 27002, Lugo, Spain. Tel.: +34 982 822615; fax: +34 982 285940.

E-mail addresses: [garcia.vaquero@usc.es](mailto:garcia.vaquero@usc.es) (M. García-Vaquero), [marta.miranda@usc.es](mailto:marta.miranda@usc.es) (M. Miranda), [marta.lopez.alonso@usc.es](mailto:marta.lopez.alonso@usc.es) (M. López-Alonso), [crisrina.castillo@usc.es](mailto:crisrina.castillo@usc.es) (C. Castillo), [jose.luis.benedito@usc.es](mailto:jose.luis.benedito@usc.es) (J.L. Benedito).

1871-1413/\$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.  
 doi:10.1016/j.livsci.2010.11.002

Please cite this article as: García-Vaquero, M., et al., Evaluation of the need of copper supplementation in intensively reared beef cattle, Livestock Science (2010), doi:10.1016/j.livsci.2010.11.002

2000) and also associated with changes in the type and bioavailability of dietary Cu supplements (Laven et al., 2004). It has also been reported that dietary supplements leading to Cu accumulation in the liver at concentrations only slightly above normal (of around 125 mg/kg wet weight) showed negative effects on animal performance in terms of reduced feed intake and average daily gain (Engle and Spears, 2000).

The aim of this study was to evaluate if, with the nutritional management of commercial feedlots of NW Spain and also many countries (based mainly on concentrate feed from international raw materials), Cu supplementation is justified to maintain the physiological requirements. This was done by evaluating blood Cu parameters during the productive cycle and organic Cu accumulation at slaughter in animals that received a standard diet with and without Cu supplementation. Since hematologic and performance disorders, such as anaemia and retarded growth, are common signs of disturbances in Cu status in cattle, particularly in Cu deficient animals (NRC, 2000), some haematological and productive parameters were measured during the study.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental design

20 Galician Blond X Holstein–Friesian crossed beef cattle were acquired for this study. All animals were males, aged 8 weeks and weighing approximately 90–120 kg at acquisition. They were housed in covered feedlot pens with slotted floors and fed with milk replacer and a starter diet without Cu supplement until the age of 12 weeks (beginning of the study, day 0). More details on the sanitary treatments of the animals following purchase at Miranda et al. (2010).

Afterwards, the animals were randomly allotted in 2 groups: non-supplemented ( $n=10$ ) and Cu supplemented ( $n=10$ ) and were maintained in a typical commercial Spanish feedlot for the growing (from 12 to 24 weeks) and finishing periods (from 24 to 36 weeks). Both groups received exactly the same diet (Table 1) with the addition of 15 mg Cu sulphate/kg DM to the concentrate of the Cu supplemented group during all the study period. Diet analyses were performed monthly to ensure chemical composition of the concentrate before feeding the animals. Both groups of animals were allowed free access to concentrate, water and wheat straw. Diets were fed once daily (concentrate and straw) in the morning, daily intake was determined by weighing both, each day's ration and ords, which were removed before the fresh supply was served. The mean daily wheat straw intake during the study was 1.5 kg/animal. The animals were cared for and handled, and blood samples were taken, in accordance with Spanish Government guidelines (RD 1201/2005).

### 2.2. Sample collection

The animals were weighed, and jugular blood samples were then collected, between 08:00 and 10:00 h on days 0 (just before the first supplemented feed), 28, 56, 84 (the first day of the finishing period), 112 and 140 (prior to slaughter). For haematology and whole blood Cu concentrations samples were collected in heparinised Vacutainer tubes. Blood for serum Cu and caeruloplasmin (Cp) was collected in unheparinised

**Table 1**  
Ingredients and chemical composition of the concentrate fed to the beef cattle during the growing and finishing periods ( $n=20$ ).

	Period	
	Growing	Finishing
<i>Ingredients (% DM)</i>		
Corn	40	42
Barley	20.8	21.2
Soybean meal (44% CP)	16.8	15
Wheat bran	9	5.2
Corn gluten feed	6	5
Soya oil	1.3	1
Sugarcane molasses	1	1
Calcium carbonate	1.2	1
Sodium bicarbonate	1	0.7
Monocalcium phosphate	0.4	0.2
Vitamin premix <sup>a</sup>	0.5	0.5
<i>Chemical composition</i>		
Humidity (%)	12.6 ± 0.3	13.4 ± 0.6
Crude protein (% DM)	14.7 ± 1.1	13.7 ± 1.4
Crude fibre (% DM)	4 ± 0.2	4.4 ± 0.5
Neutral detergent fibre (%DM)	21.3 ± 0.2	20.8 ± 0.5
Acid detergent fibre (%DM)	10.8 ± 0.2	11.1 ± 0.3
Ash (% DM)	5 ± 0.7	6.1 ± 0.5
Starch (% DM)	40.8 ± 1.8	40.8 ± 2.5
Ether extract (% DM)	3.4 ± 0.3	3.5 ± 0.4
S (% DM)	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01
Ca (% DM)	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2
Na (% DM)	0.19 ± 0.09	0.31 ± 0.07
K (% DM)	0.73 ± 0.06	0.73 ± 0.08
Mg (% DM)	0.29 ± 0.03	0.26 ± 0.05
P (% DM)	0.48 ± 0.05	0.56 ± 0.06
Mn (mg/kg DM)	50.7 ± 17	71.3 ± 37.3
Mo (mg/kg DM)	1.8 ± 0.6	1.7 ± 0.6
Fe (mg/kg DM)	193 ± 54	265 ± 43
Zn (mg/kg DM)	59 ± 12	61.8 ± 26
Cu (mg/kg DM) NS	5 ± 1	8 ± 3
Cu:Mo NS	3:1	5:1
Cu (mg/kg DM) S	23 ± 8	26 ± 10
Cu:Mo S	13:1	15:1

NS: non-supplemented cattle and S: supplemented cattle.

<sup>a</sup> Contains per kg of premix: vitamin A, 10000 IU; vitamin D3, 2000 IU; vitamin E, 25 mg/kg.

Vacutainer tubes. All samples were refrigerated immediately and transported to the laboratory; within 4 h of collection, serum was obtained by centrifugation at 3000 g for 15 min. Triplicate subsamples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  pending analysis. Tissue samples were collected at slaughter when animals were approximately 9 months old. Samples of at least 200 g of liver (caudate lobe), kidney, muscle (diaphragm), spleen and brain (*mesencephalon*) of each animal were packed in plastic bags on ice to the laboratory and stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  until processing.

### 2.3. Sample analysis

For Cu determination, whole blood (1 mL) and tissues samples (1 g) were digested in 5 mL of concentrated nitric acid (Suprapur grade, Merck) and 3 mL of 30% w/v hydrogen peroxide in a microwave digestion system (Ethos Plus; Milestone, Sorisole, Italy). Digested samples were transferred to polypropylene sample tubes and diluted to 15 mL with ultrapure water. Serum samples were analyzed directly prior dilution (1:10 v:v) in deionised water. Cu concentrations

Please cite this article as: García-Vaquero, M., et al., Evaluation of the need of copper supplementation in intensively reared beef cattle, *Livestock Science* (2010), doi:10.1016/j.livsci.2010.11.002

## ARTICLE IN PRESS

M. García-Vaquero et al. / Livestock Science xxx (2010) xxx–xxx

3

were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES).

The limit of detection in the acid digest was 0.0304 µg/g. Analytical recoveries (%) determined from certified reference materials were 111±13 for pig kidney CRM 186 (BCR Reference Materials, Geel, Belgium) and 97±10 for fish protein DORM-3 (National Research Council, Ottawa, Ontario, Canada).

Heparinised blood was analyzed shortly after collection for haematological parameters by an automatic veterinary haematology cell counter (MS9 Automatic Cell Counter, Melet Schloesing Laboratories). Plasma total proteins (PT) were determined by refractometry.

Serum caeruloplasmin (Cp) was determined in terms of its p-phenylenediamine oxidase activity (Sunderman and Nomoto, 1970). The precision of the method, calculated as the relative standard deviation (% RSD) of the enzymatic activity of an in-house reference bovine plasma, was 1.8%.

Samples of concentrate (n=20) were composited monthly, and the nutrient composition was analysed in a reference laboratory (Laboratorio de Mouriscade, Lalin, Spain) (Table 1). More details on methodology for diet analyses in Miranda et al. (2010).

#### 2.4. Statistical analysis

Data were tested for normality using Kolmogorov-Smirnov test. T-student test was used to test for differences in productive parameters and in tissue Cu concentrations between non-supplemented and Cu supplemented animals. Analyses of variance of serum Cu, whole blood Cu and serum Cp levels were performed with supplementation (S) as a fixed effect factor and sampling day (T) as a repeated measures factor, and with the interaction T\*S included in the model. In all cases the criterion for statistical significance was p<0.05. All statistical analyses were performed using SPSS for Windows v. 15.0.

### 3. Results

Cu supplementation did not statistically affect (p>0.05) serum Cu and whole blood Cu concentrations in cattle in our study, even though in general the Cu supplemented group showed higher mean values of these parameters along the experiment, and serum Cp activity was only statistical significantly higher at day 112 on the animals from the Cu

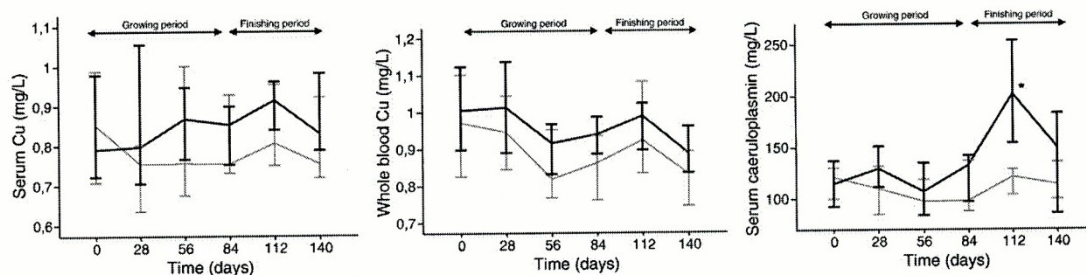
**Table 2**

Cu concentration (mg/kg wet weight), expressed as mean ± standard deviation, median, range and percentiles 25 and 75 in the liver (caudate lobe), kidney, spleen, brain (*mesencephalon*), and muscle (diaphragm) of the non-supplemented and Cu supplemented animals. Differences of metal accumulation in the same tissue between non-supplemented (NS) and supplemented (S) animals were indicated as follows: † 0.05<p<0.1, \* p<0.05, \*\* p<0.01.

		NS	S
Liver	Mean ± sd	82 ± 37**	155 ± 36
	Median	71	157
	Range	45–152	115–221
	p25–p75	56–117	122–188
Kidney	Mean ± sd	4.4 ± 0.4	4.3 ± 0.5
	Median	4.3	4.4
	Range	4–5.3	3.4–5
	p25–p75	4.1–4.66	3.76–4.6
Spleen	Mean ± sd	0.71 ± 0.07*	0.64 ± 0.038
	Median	0.71	0.65
	Range	0.60–0.82	0.57–0.69
	p25–p75	0.64–0.76	0.61–0.67
Brain	Mean ± sd	2.73 ± 0.63†	3.4 ± 0.77
	Median	2.64	3.51
	Range	2–4.3	2.1–4.7
	p25–p75	2.31–2.78	2.82–4.04
Diaphragm	Mean ± sd	1.9 ± 0.4	2 ± 0.24
	Median	2	2
	Range	0.97–2.3	1.6–2.4
	p25–p75	1.7–2.1	1.7–2.1

supplemented group (Fig. 1). The sampling day was a significant factor for whole blood Cu and Cp (p<0.001) and tended to be significant for serum Cu (p=0.066). In general, whole blood and serum Cu concentrations and Cp activity decreased in the non-supplemented group and increased in the Cu supplemented group at the beginning of the experiment and then showed a similar pattern with an increase on the 112 days of the experiment. For both Cu supplemented and non-supplemented groups, all animals showed serum and whole blood Cu concentrations above the thresholds for Cu deficiency (>0.475 and >0.667 mg/L respectively; Suttle, 1993) during the all study. Cp activities were also in both groups within the normal ranges described by Puls (1994) of 0.09–0.25 g/L, and only 8 of 104 samples showed marginal Cp activities of 0.08 g/L.

In the tissues, Cu mainly accumulated in the liver (approximately 100 folds higher than the other tissues), followed by the kidney and brain, and the lowest Cu concentrations were found in the spleen and diaphragm (Table 2). The liver was also the



**Fig. 1.** Serum Cu (mg/L), whole blood Cu (mg/L) and serum caeruloplasmin activity (mg/L) expressed as median and 1C 95% in non-supplemented (light lines) and Cu supplemented (dark lines) cattle during growing and finishing periods. \* Indicating statistical significant differences between non-supplemented and Cu supplemented groups.

Please cite this article as: García-Vaquero, M., et al., Evaluation of the need of copper supplementation in intensively reared beef cattle, Livestock Science (2010), doi:10.1016/j.livsci.2010.11.002

**Table 3**  
Hematologic parameters red blood cells (RBC), microhematocrit ( $\mu$ Ht), haemoglobin (Hb), white blood cells (WBC), thrombocytes (Tb), plasma total protein (PT) during the growing and finishing periods in non-supplemented (NS) and supplemented (S) animals.

	Growing period		Finishing period	
	NS	S	NS	S
RBC ( $10^6/\mu\text{L}$ )				
Mean $\pm$ sd	10 $\pm$ 0.6	9 $\pm$ 1.4	9.2 $\pm$ 0.6	9 $\pm$ 0.5
Median	10	9.5	9.3	9
Range	9–10.8	5–10.7	8–10	8.2–10
$\mu$ Ht (%)				
Mean $\pm$ sd	39 $\pm$ 3	36 $\pm$ 3	40 $\pm$ 2	40 $\pm$ 2
Median	39	36	40	39
Range	34–44	29–43	36–44	35–43
Hb (g/dL)				
Mean $\pm$ sd	12 $\pm$ 0.9	11 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1.2	11 $\pm$ 0.9
Median	11.6	11	11.7	10.8
Range	10–14	9–14	10–15	10–13
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )				
Mean $\pm$ sd	12 $\pm$ 5	12 $\pm$ 5	8 $\pm$ 2	9.5 $\pm$ 1
Median	10	11.6	8	9.4
Range	4–17	7–12	4–12	7–12
Tb ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )				
Mean $\pm$ sd	667 $\pm$ 110	681 $\pm$ 98	453 $\pm$ 127	457 $\pm$ 98
Median	703	711	462	446
Range	469–849	465–818	266–695	265–618
PT (g/dL)				
Mean $\pm$ sd	8.4 $\pm$ 0.3	8.3 $\pm$ 0.2	9.2 $\pm$ 0.3	9 $\pm$ 0.3
Median	8.4	8.2	9.2	9
Range	8–9	8–8.8	8.8–9.8	8.6–9.6

Normal ranges for cattle (Radostits et al., 2007) of  $5\text{--}10 \times 10^6/\mu\text{L}$  for RBC, 24–46% for  $\mu$ Ht, 8–15 g/dL for Hb,  $4\text{--}12 \times 10^3/\mu\text{L}$  for WBC,  $100\text{--}800 \times 10^3/\mu\text{L}$  for Tb and 7–8.5 g/dL for PT.

organ that showed the highest increase (89%) of Cu concentrations in the supplemented group ( $p < 0.01$ ), although a significant decrease was found in the spleen (9%,  $p < 0.05$ ) and a nearly significant increase in the brain (25%,  $p < 0.1$ ) of Cu supplemented animals.

All animals in our study showed hepatic Cu concentrations above the low range of normality (25–100 mg/kg wet weight, according to Puls, 1994). However, most (90%) of the Cu supplemented calves showed hepatic Cu concentrations that exceed the adequate range and 50% of them showed Cu concentrations associated with toxicity in cattle ( $> 150$  mg/kg wet weight; Perrin et al., 1990; Gummow, 1996). For the

other tissues analyzed in our study Cu concentrations were within the normal ranges established by Puls (1994).

Cu supplementation did not show a statistically significant effect on haematological parameters (Table 3) that were within the normal ranges for cattle (Radostits et al., 2007), and productive parameters (Table 4).

#### 4. Discussion

Based on the results of the current study it can be suggested that the standard diet without Cu supplementation received by our calves in intensive productive conditions during all the productive cycle was enough to fill Cu physiological requirements.

The effect of Cu supplementation on Cu blood parameters was more evident at the first sampling after Cu supplementation: serum Cu and Cp activity, both indicators of recent Cu exposure (Miranda et al., 2010), increased in the calves receiving Cu and decreased in those without supplementation. On the contrary, the effect of Cu supplementation on whole blood Cu concentration was less evident at the beginning of the experiment possibly because Cu is incorporated bearing SOD in the red cells during haematopoiesis and life span of erythrocytes which is about 150 days (Suttle and McMurray, 1983). After that, the evolution of blood Cu indicators was quite similar or parallel in both groups along the study, and possibly related to other factors independently of dietary Cu. Cp activity, the main component of plasma Cu, varies over the animal's life regardless of the status of Cu (López-Alonso et al., 2006) and increases in response to intense exercise and various inflammatory and infectious conditions (Beshgetoor and Hambridge, 1998). It is possible that the statistically significant increase of Cp activity, and consequently in the whole blood and serum Cu, at the 112 day could be related to any punctual stressful, inflammatory or infectious process specifically in the Cu supplemented group.

In addition to these adequate blood Cu concentrations, the fact that the hematologic parameters were within the adequate range in the non-supplemented calves indicate that the Cu concentration in the basal diet was enough to maintain a normal haematopoiesis (Ward and Spears, 1997). No significant beneficial effect of Cu supplementation was also appreciated for the productive parameters evaluated in this study. Previous studies evaluating the influence of Cu

**Table 4**

Zootecnical performance of non-supplemented (NS) and supplemented (S) animals.

	NS (n = 10)			S (n = 10)		
	Mean $\pm$ sd	Median	Range	Mean $\pm$ sd	Median	Range
Initial live weight (kg)	115 $\pm$ 9	116	97–128	129 $\pm$ 15	126	111–160
Final live weight	399 $\pm$ 43	387	331–469	422 $\pm$ 36	429	364–466
Daily intake (kg/day)	7.6			7.7		
Average daily gain (ADG) (kg)	1.7 $\pm$ 0.23	1.65	1.3–2	1.74 $\pm$ 0.23	1.8	1.3–1.9
Feed:gain ratio	4.9			4.9		
Carcass weight (kg)	220 $\pm$ 27	220	177–267	228 $\pm$ 24	229	167–259
Carcass performance (%)	55 $\pm$ 2	56	51–58	54 $\pm$ 1.5	54	51–56
Liver weight (Kg)	5 $\pm$ 0.72	4.9	3.9–6.5	5.6 $\pm$ 0.6	5.7	4.7–6.4
Kidney weight (Kg)	0.45 $\pm$ 0.11	0.45	0.3–0.6	0.52 $\pm$ 0.15	0.48	0.4–0.9
Heart weight (Kg)	1.6 $\pm$ 0.27	1.5	1.1–2.1	1.65 $\pm$ 0.15	1.6	1.4–1.9
Spleen weight (Kg)	0.78 $\pm$ 0.16	0.8	0.6–1.1	0.76 $\pm$ 0.11	0.8	0.6–0.9

sd: Standard deviation.

Please cite this article as: García-Vaquero, M., et al., Evaluation of the need of copper supplementation in intensively reared beef cattle, Livestock Science (2010), doi:10.1016/j.livsci.2010.11.002

## ARTICLE IN PRESS

M. García-Vaquero et al. / *Livestock Science xxx (2010) xxx–xxx*

5

supplementation on animal performance have yielded inconsistent results, possibly more related to the levels of other antagonist in the diet than to the levels of Cu (Ward and Spears, 1997). Moreover, Cu supplementation at high doses (20–40 ppm of CuSO<sub>4</sub>) has been associated with reduced weight gain and feed intake in finishing cattle fed high-concentrate diets (Engle and Spears, 2000). This could be associated with an excessive Cu accumulation in the liver (also appreciated in the Cu supplemented animals in this study), since during the initial stage of chronic Cu poisoning in cattle, Cu accumulates in the liver without clinical signs of disease (Howell and Gooneratne, 1987). In fact a study noted that herds with episodes of clinical Cu toxicity, the clinical cases represent only a small proportion of the actual cases of Cu poisoning, while Cu supplementation was related to a subclinical hepatopathy as suggested by the strong elevation of the hepatic enzymes (GLDH and AST) in the animals (Laven et al., 2004).

### 5. Conclusion

Under the conditions of this study, which are the conditions of the cattle raised under intensive system in many European countries, routinely Cu supplementation is not justified to maintain an adequate Cu status in the animals or to improve productive parameters. More information about the risk of presence of Cu antagonists in the concentrate diets should be necessary to justify routinely Cu supplementation in intensively reared beef cattle.

### Acknowledgements

This work was supported by the Xunta de Galicia (Spain) through contract 07MRU030261PR and by the research grant María Barbeito awarded to García-Vaquero M. by the Dirección Xeral de Investigación, Desenvolvemento e Innovación from Xunta de Galicia. The authors thank Betiana Andrea Gutiérrez and Isabel Blanco Penedo for samples collection and Lucía Iglesias Casanova for technical assistance.

### References

- Beshgetoor, D., Hambridge, M., 1998. Clinical conditions altering copper metabolism in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1017–1021.
- Council Regulation (EC) No 1334/2003/EC on amending the conditions for authorisation of a number of additives in feedingstuffs belonging to the group of trace elements. Off. J. Eur. Union.
- Engle, T.E., Spears, J.W., 2000. Effects of dietary copper concentration and source on performance and copper status of growing and finishing steers. *J. Anim. Sci.* 78, 2446–2451.
- Gummow, B., 1996. Experimentally induced chronic copper toxicity in cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 63, 277–288.
- Howell, J.M.C., Gooneratne, R.S., 1987. The pathology of copper toxicity in animals. In: Howell, J.M.C., Gawthorne, J.M. (Eds.), *Copper in Animals and Man*, Vol. CRC Press Boca Raton Florida, Il, pp. 53–78.
- Kendall, N.R., Illingworth, D.V., Telfer, S.B., 2001. Copper responsive infertility in British cattle: the use of a blood caeruloplasmin to copper ratio in determining a requirement for copper supplementation. In: Diskin, M.G. (Ed.), *Fertility in the High-Producing Dairy Cow*. British Society of Animal Science, vol. 26 (2). Occasional Publication, Edinburgh.
- Laven, R.A., Livesey, C.T., Offer, N.W., Fountain, D., 2004. Apparent subclinical hepatopathy due to excess copper intake in lactating Holstein cattle. *Vet. Rec.* 155, 120–121.
- López-Alonso, M., Crespo, A., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L., 2006. Assessment of some blood parameters as potential markers of hepatic copper accumulation in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 71–75.
- Miranda, M., Gutiérrez, B., Benedito, J.L., Blanco-Penedo, I., García-Vaquero, M., López-Alonso, M., 2010. Influence of breed on blood and tissue copper status in growing and finishing steers fed diets supplemented with copper. *Arch. Anim. Nutr.* 64, 98–110.
- NRC (National Research Council), 2000. *Nutrient Requirements of Beef Cattle* 7th ed. National Academy Press, Washington. Revised.
- Perrin, D.J., Schiefer, B., Blakley, B.R., 1990. Chronic copper toxicity in a dairy herd. *Can. Vet. J.* 31, 629–632.
- Puls, R., 1994. Mineral levels in animal health. *Clearbook*. Sherpa International, British Columbia.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D., 2007. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*, 10th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Sunderman, F.W., Nomoto, S., 1970. Measurement of human serum caeruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. *Clin. Chem.* 16, 903–910.
- Suttle, N., 1993. Overestimation of copper deficiency. *Vet. Rec.* 133, 123–124.
- 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.
- Ward, J.D., Spears, J.W., 1997. Long-term effects of consumption of low-copper diets with or without supplemental molybdenum on copper status, performance, and carcass characteristics of cattle. *J. Anim. Sci.* 75, 3057–3065.

Please cite this article as: García-Vaquero, M., et al., Evaluation of the need of copper supplementation in intensively reared beef cattle, *Livestock Science* (2010), doi:10.1016/j.livsci.2010.11.002

## **CAPÍTULO 2**

### *CHAPTER 2*

**Influencia de la suplementación con cobre sobre la concentración de elementos tóxicos y esenciales en terneros de carne de cría intensiva**

*Influence of Cu supplementation on toxic and essential trace element status in intensive reared beef cattle*



## Introducción

Aunque tradicionalmente el ganado vacuno se pensaba que era relativamente tolerante a la acumulación de cobre (Cu), en los últimos años un mayor número de episodios de toxicidad de Cu han sido descritos en la literatura (Bidewell *et ál.*, 2000; VLA, 2001), incluso a concentraciones hepáticas de Cu muy inferiores a las clásicamente consideradas como tóxicas (Perrin *et ál.*, 1990; Gummow, 1996). En la mayoría de los casos, la toxicidad en ganado vacuno se ha asociado a la ingesta excesiva de Cu en la ración, así como con los cambios en el tipo y la biodisponibilidad de los suplementos dietéticos Cu (Galey *et ál.*, 1991; Steffen *et ál.*, 1997; Laven *et ál.*, 2004). Altos niveles de suplementación con Cu (hasta 35 mg/kg de materia seca (MS), el nivel máximo de la suplementación de Cu para ganado bovino establecidos por la Unión Europea, Reglamento (CE) nº 1334/2003/EC), muy por encima de sus necesidades fisiológicas (10 mg/kg ; NRC, 2000) se ha justificado en la mayoría de casos debido a la interferencia de Cu con otros micronutrientes, principalmente molibdeno (Mo) y azufre (S), pero también (Fe) y zinc (Zn) (Kendall *et ál.*, 2001).

También se ha demostrado que suplementos dietéticos que conducen a una acumulación de Cu en el hígado sólo ligeramente superiores a lo normal (alrededor de 125 mg/kg de peso fresco) muestran efectos negativos en el rendimiento de los animales, en términos de menor consumo de pienso y ganancia media diaria (Engle y Spears, 2000). Los mecanismos patogénicos implicados en esta toxicidad crónica subclínica o fase silenciosa de acumulación crónica de Cu hepático no han sido aclarados. Es posible que estos efectos negativos del Cu pudieran deberse en parte a la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en los casos de sobrecarga de Cu. En ratas la toxicidad hepática debido a la sobrecarga de Cu se atribuyó a la formación de ROS que son altamente reactivos y capaces de dañar todas las macromoléculas biológicas (Britton, 1996; Luza y Speisky, 1996) y, finalmente, conducir a una apoptosis (Rana, 2008). Además, es posible que los efectos tóxicos del Cu estén relacionados con la interacción con otros micronutrientes. Por ejemplo, las interacciones del Cu con otros metales (principalmente Mn, Zn y Fe) se han relacionado recientemente con la patogénesis de un gran número de enfermedades neurológicas que afectan tanto a los animales como a seres humanos, como la enfermedad de Alzheimer (Maynard *et ál.*, 2005) y las enfermedades priónicas, como las encefalopatías espongiformes transmisibles en el ganado bovino (Tsenkova *et ál.*, 2004; Deloncle *et ál.*, 2006). Una alta suplementación dietética de Cu podría también conducir a una mayor acumulación de metales tóxicos en el organismo debido a la capacidad de este metal para aumentar la síntesis de metalotioneínas (Mercer, 1997); Rambeck *et ál.* (1991) encontraron que los animales que recibieron durante 3 meses una dieta suplementada con 200 mg Cu/kg presentaron unos niveles de cadmio (Cd) en el hígado y el riñón 2 veces más alta que en los animales control.

En un estudio reciente de nuestro grupo de investigación en ganado vacuno de carne de cría intensiva que reciben una dieta comercial típica de engorde suplementada con 15 mg de sulfato de Cu/kg de MS (mg Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/kg MS) durante todo el ciclo productivo (García-Vaquero

*et ál., in press*) se observó que una alta proporción de animales (41%) presentaron concentraciones de Cu hepático dentro del rango de toxicidad en vacuno (> 150 mg/kg de peso fresco: Perrin *et ál.*, 1990; Gummow, 1996), mientras que en animales no suplementados los parámetros sanguíneos y tisulares de Cu estuvieron dentro del rango de la normalidad. El objetivo de este estudio es evaluar si la alimentación suplementada con Cu que conduce a una acumulación hepática de Cu en el rango de la normalidad afecta a la acumulación de otros elementos esenciales y no esenciales pudiendo contribuir a la patogénesis de otros trastornos relacionados con el metabolismo de estos minerales.

## **Materiales y métodos**

### Diseño experimental y recogida de muestras

Las muestras de tejido (hígado, riñón, bazo, diafragma y cerebro) de terneros de carne, fueron de un experimento previo para evaluar el status de Cu en animales suplementados (15 Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mg/kg MS) y no suplementados que reciben una dieta comercial típica de engorde durante todo el ciclo productivo (n=30). Más datos sobre el diseño experimental y la recogida de muestras en matadero en García-Vaquero *et ál.* (*In press*).

### Análisis de muestras

Del hígado, diafragma, cerebro y bazo se extrajeron aproximadamente 1 g de sub-muestras a partir de tejidos semi-descongelados y fueron posteriormente sometidos a un proceso de digestión ácida. Más detalles en García-Vaquero *et ál.* (*In press*).

Las concentraciones de los elementos no esenciales (arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb) y estaño (Sn)) y esenciales (calcio (Ca), el cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), selenio (Se) y zinc (Zn)) se determinaron por espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS; VGEElemental SOption PlasmaQuad).

Se realizó un control de calidad analítico durante todo el estudio. Los valores de los blancos fueron leídos junto con las muestras y restados de las lecturas de las mismas antes de calcular los resultados. Los límites de detección en la digestión ácida se calcularon como tres veces la desviación estándar de los blancos (Tabla 1) y se basaron en el peso medio de la muestra analizada.

Las recuperaciones analíticas determinadas a partir de materiales de referencia certificados (CRM Pig kidney 186, BCR Materiales de Referencia en Geel, Bélgica, y Fish protein DORM-3 Consejo Nacional de Investigación, Ottawa, Ontario, Canadá). Hubo una buena concordancia entre los valores medidos y los certificados o indicativos (Tabla 1). Los 2 CRM empleados no presentan valores certificados para el Co y el Mo por lo que las recuperaciones analíticas de estos metales fueron determinadas a partir de muestras seleccionadas con valores de 2-10 veces superiores a los niveles normales. Los valores de recuperación media fueron 89 y 96%

respectivamente. La precisión del método analítico, calculado como la desviación estándar relativa (RSD) de las concentraciones de Co y Mo en 10 lecturas de la misma muestra, estuvo entre 5,8 y 9,3%.

#### Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS para Windows (v. 15.0). A las concentraciones no detectables se les asignó un valor de la mitad del límite de detección para el cálculo de las concentraciones medias del elemento. Los datos se analizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y por lo general no presentaban una distribución normal, incluso después de su transformación logarítmica. Por lo tanto, la prueba de Mann-Whitney se utilizó para apreciar diferencias en las concentraciones de elementos esenciales y no esenciales en el hígado, riñones, bazo, diafragma y cerebro entre los animales suplementados y no suplementados con Cu.

Se realizaron análisis de correlación de Spearman entre la concentración de Cu en el hígado y los niveles de los metales esenciales y no esenciales en el resto de los tejidos para determinar la influencia de la suplementación de Cu en la acumulación de estos elementos traza.

### Resultados

La concentración de metales no esenciales en el hígado, riñones, diafragma, bazo y cerebro en el ganado vacuno suplementado con Cu (15 mg Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Kg DM) y no suplementado en este estudio se presentan en la Figura 1. En general, los elementos no esenciales se acumularon principalmente en el riñón y en menor medida en el hígado, mientras los residuos de metales en otros tejidos eran muy bajos con una alta proporción de muestras por debajo del límite de cuantificación (en%, Cd: 66,7 (bazo), 63,3 (diafragma) y 56,7 (cerebro); Hg: 53,8 (hígado); Pb: 100 (diafragma), 76,7 (cerebro); Sn: 100 (bazo), 86,7 (diafragma), 83,3 (cerebro)) y no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí. A excepción del Sn, la suplementación con Cu influyó significativamente en la acumulación de metales no esenciales en los animales de nuestro estudio. Los residuos de As disminuyeron significativamente en el riñón (53%) y diafragma (41%), y se apreció una tendencia ( $p < 0,10$ ) a disminuir en el hígado (18%) y el cerebro (6%) en los terneros suplementados con Cu. El Hg en el hígado (52%) y riñón (19%), y el Pb en el hígado (65%), riñón (71%) y bazo (68%) fueron significativamente menores en el grupo suplementado con Cu. Por el contrario, los residuos de Cd fueron significativamente mayores en el hígado (87%) y riñón (111%) de los animales suplementados.

Las concentraciones de los elementos esenciales en los diferentes tejidos en los animales de este estudio se presentan en la Figura 2. En general las mayores concentraciones de elementos esenciales se encontraron en el hígado y/o riñón, excepto para el Fe y Zn en los que los niveles más altos se observaron en el bazo y diafragma respectivamente. La suplementación con Cu apenas afectó a la concentración de elementos esenciales en los terneros de nuestro estudio:

las concentraciones de Mn (13%) y Ni (54%) disminuyeron significativamente y las de Mo (83%) aumentaron en el cerebro, y las concentraciones de Se disminuyeron en el diafragma (15 %) del grupo de animales suplementados con Cu.

Las correlaciones de Spearman entre Cu en el hígado (como el órgano más representativo del estado de Cu en los animales) y la concentración de elementos esenciales y no esenciales en los diferentes tejidos se presentan en la Tabla 2. Las concentraciones de Cu hepático están negativamente correlacionadas con las de As (Figura 3) y Pb (Figura 4) en la mayoría de los tejidos. En relación a los elementos esenciales, la acumulación de Cu hepático se correlacionó negativamente con la concentración de Cr en el cerebro y bazo (Figura 5), Ni en el cerebro (Figura 6) y Se en el diafragma (Figura 7).

## Discusión

Los resultados de nuestro estudio han demostrado que la suplementación con Cu en el ganado vacuno de cría intensiva afecta significativamente a la acumulación de metales tóxicos. Los residuos de Cd fueron significativamente mayores en los animales que recibieron suplementos de Cu. Esto podría estar relacionado con una mayor exposición dietética al Cd en los animales suplementados, ya que los suplementos de minerales en general, contienen restos de otros metales tóxicos (As, Cd y Pb), considerándose los suplementos minerales como una de las principales fuentes de exposición a metales tóxicos en animales de granja en zonas relativamente libres de contaminación (Li *et ál.*, 2005; Mc Bride, 2001). Sin embargo, la contaminación por Cd del suplemento de Cu usado en este estudio no explica los altos niveles de Cd observados, ya que los otros metales no esenciales analizados (As, Hg y Pb) disminuyeron sus concentraciones en el grupo de animales suplementado, a menos Cd fue el único metal tóxico presente en el suplemento mineral.

Por el contrario, las interacciones químicas entre el Cd y el Cu químicas podrían explicar, al menos en parte, la mayor acumulación de Cd en el ganado vacuno suplementado. Las interacciones entre Cu y Cd han sido ampliamente estudiadas en los mamíferos a diferentes niveles de exposición al metal y se producen como consecuencia de la capacidad de ambos metales para inducir la síntesis y competir por los sitios de unión de las metalotioneínas (MT) (Bebe y Panemanglore, 1996; Coudray *et ál.*, 2006; Frank *et ál.*, 2000; Komarnicki, 2000; López-Alonso *et ál.*, 2002; Phillips *et ál.*, 2005; Reeves y Chaney, 2004; Taylor, 1996). En otros animales de granja, como la cría intensiva cerdos suplementados con 200 mg/Kg de Cu durante 3 meses, se apreciaron niveles de cadmio en el hígado y el riñón 2 veces superiores a los de los animales control no suplementados (Rambeck *et ál.*, 1991). Aunque no se dispone de información sobre la acumulación de Cd en ganado vacuno suplementado con Cu, numerosos ejemplos de la interacción natural entre el Cu-Cd han sido previamente publicados (Nriagu *et ál.*, 2009; Waegeneers *et ál.*, 2009), siendo descritos casos de hipocupremia en las zonas con

suelos contaminados Cd (Koh y Judson, 1986; Miranda *et ál.*, 2005; Prankel *et ál.*, 2005; Spierenburg *et ál.*, 1988; Wentink *et ál.*, 1988).

Las interacciones entre el Cu y otros metales tóxicos (As, Pb y Hg) son menos conocidas, y hasta donde sabemos, no hay información sobre el efecto de la suplementación con Cu sobre la acumulación de metales tóxicos en el ganado vacuno u otros animales de granja. Aunque hay ejemplos de interacción entre Cu y estos metales tóxicos en la literatura científica, estos estudios han sido realizados en condiciones de exposición en el campo (Blanco-Penedo *et ál.*, 2006; López-Alonso *et ál.*, 2002; Miranda *et ál.*, 2005; Nriagu *et ál.*, 2009) o en mamíferos de laboratorio expuestos a elevadas concentraciones de metales (Agarwal *et ál.*, 2010; Dhawan *et ál.*, 1995; Rambeck *et ál.*, 1991) muy superiores a las presentes en la dieta normal.

Hay algunos ejemplos de interacción Pb-Cu en la literatura. En estudios experimentales en ratones, la administración de una dieta rica en Pb dio lugar a una deficiencia en la absorción de Cu y por lo tanto disminución de los niveles de Cu en el hígado (Dhawan *et ál.*, 1995), si la interacción de Pb-Cu se da en el lugar de la absorción en el tracto gastrointestinal o en algún otro punto de su metabolismo o transporte no ha sido determinada. Se han obtenido resultados contradictorios con respecto a la interacción Cu-Pb en el ganado vacuno. Algunos estudios han informado de asociaciones negativas entre Cu y Pb en el hígado de animales expuestos a baja contaminación ambiental por Pb (Miranda, 1999; Spierenburg *et ál.*, 1988), mientras que otros no han encontrado una asociación estadísticamente significativa (López-Alonso *et ál.*, 2002) o una fuerte correlación positiva entre ambos elementos en el hígado (Blanco-Penedo *et ál.*, 2006; López-Alonso *et ál.*, 2004). Aunque los mecanismos de interacción Cu-Pb se desconocen, se ha sugerido que las asociaciones positivas entre Cu-Pb podrían estar relacionadas con una fuente común de exposición de los metales por la ingestión del suelo (Blanco-Penedo *et ál.*, 2006; López-Alonso *et ál.*, 2004).

Existe escasa bibliografía disponible sobre las interacciones entre Cu y As en el ganado vacuno. Se ha descrito una fuerte correlación negativa significativa entre las concentraciones de Cu y As en el hígado de bovinos que presentaban bajos niveles de Cu (Nriagu *et ál.*, 2009). En estudios previos en nuestra región las concentraciones de As en el ganado vacuno fueron muy bajas, con un gran número de animales con niveles no detectables en el hígado, riñones y diafragma (Blanco-Penedo *et ál.*, 2006, 2010; López-Alonso *et ál.*, 2000a, 2000b). En estos estudios los animales fueron criados en granjas con pastoreo al aire libre durante todo el año en zonas con altos contenidos de Cu en el suelo y forraje, tanto de origen natural (suelos de serpentinita) o debido a la utilización de los purines de cerdo altos en Cu como fertilizante (López-Alonso *et ál.*, 2000a; Miranda *et ál.*, 2009). En vista de los resultados del presente estudio, podría ser posible que la baja acumulación de As en el ganado vacuno de Galicia en estos estudios anteriores, a pesar de que las concentraciones de As son relativamente altas en algunos suelos en Galicia (López-Alonso *et ál.*, 2000a), podría estar relacionado con el alto nivel de exposición de Cu.

Por lo que sabemos, hay una falta de estudios que muestren la interacción entre Cu y Hg en vacuno. Por el contrario, ha sido bien documentado que el Hg y Se interactúan biológicamente, y la administración conjunta de ambos reduce la toxicidad de cada uno de ellos (Cuvin-Aralar y Furness, 1991), aunque el mecanismo subyacente a este efecto protector todavía está sin resolver. En los animales de este estudio se observó una disminución significativa de los residuos de Hg en el hígado y riñón de los animales del grupo suplementado con Cu, aunque no se encontraron correlaciones significativas entre las concentraciones hepáticas de Cu y Hg en los tejidos. Las concentraciones de Hg en el ganado bovino en nuestro estudio no presentaron una asociación con los niveles de Se (datos no mostrados), pero, curiosamente, se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los niveles hepáticos del ratio Se:Cu y las concentraciones de Hg en el riñón (Figura 8). La suplementación con Cu en los animales de nuestro estudio también se asoció con una disminución estadísticamente significativa ( $p=0,02$ ) del ratio Se:Cu hepático, lo que podría contribuir a una menor acumulación de Hg en los terneros del grupo suplementado. Se ha demostrado que el tratamiento con Se en ratas expuestas a Hg, en vez de tener un efecto protector restaurando los parámetros modificados por el estrés oxidativo, conduce a una acumulación superior Hg en los tejidos (Agarwal *et ál.*, 2010), que es una consecuencia de la inducción de la síntesis de MT por el Se, dando lugar a una menor excreción urinaria y fecal de Hg (Juresa *et ál.*, 2005) y a la formación de complejos Hg-Se con las proteínas plasmáticas que aumentan la tendencia a acumular Hg en lugar de eliminarlo del organismo (Gailer *et ál.*, 2000; Sasakura y Suzuki, 1998). Estos resultados indican que las interacciones entre metales pueden ser muy complejas, con más de dos metales involucrados, y sus efectos altamente dependientes de la concentración relativa de los metales en el organismo (López-Alonso *et ál.*, 2004).

Curiosamente, el ratio hepático Se:Cu presentó igual y/o mayores correlaciones con As (hígado, riñón, diafragma y cerebro) y Pb (hígado, riñón y bazo) (Figura 9) que los observados con las concentraciones hepáticas de Cu. Por lo tanto, podría ser posible que la modificación del ratio Se:Cu en los animales suplementados con Cu tuviera un papel en la disminución significativa de As y Pb en el organismo. Este hallazgo podría ser relevante, ya que ambos metales esenciales forman parte de importantes enzimas con propiedades antioxidantes como la Cu-Zn superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Underwood y Suttle, 2002) y la toxicidad de los metales está directamente relacionada con la formación de ROS en los animales (Agarwal *et ál.*, 2010).

Al evaluar las concentraciones de elementos esenciales en el ganado vacuno en este estudio se observó, que tanto los animales suplementados como no suplementados con Cu mostraron un status mineral adecuado, ya que las concentraciones de los elementos esenciales en el hígado y el riñón (los tejidos más comunes a la hora de evaluar el status mineral) estaban dentro de los rangos de normalidad (Puls, 1994; Underwood y Suttle, 2002). Estos resultados indican, en una primera instancia, que la dieta típica comercial para ganado de carne en sistemas intensivos cubre las necesidades fisiológicas, y los suplementos minerales utilizan

habitualmente en el ganado muy bien alimentadas, no está justificada para mantener las necesidades nutricionales. La suplementación con Cu mostró una influencia significativa sobre las concentraciones de elementos esenciales en los tejidos. Curiosamente, el cerebro fue el tejido en el que se observaron las mayores diferencias entre ambos grupos de animales: los animales suplementados con Cu mostraron una menor acumulación estadísticamente significativa de Mn, Mo y Ni en comparación con los terneros no suplementados.

Las concentraciones de Cu y Mn en el cerebro han adquirido gran relevancia en los últimos años debido al papel del Cu en los priones relacionados con las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), como la encefalopatía espongiforme bovina (EEB). La unión de los iones de Cu por la proteína priónica estabilizan la proteína que puede desempeñar un papel en la defensa antioxidante a través de la actividad superóxido dismutasa Cu-dependiente (Brown *et ál.*, 1997, 1999; Wong *et ál.*, 2000). Los desequilibrios en Cu y Mn que permitan a los iones de Mn reemplazar a los de Cu producen cambios bioquímicos en la proteína priónica (Deloncle *et ál.*, 2006; Tsenkova *et ál.*, 2004), disminuciones de Cu en el cerebro y aumentos de Mn se han asociado con las EET (Thackray *et ál.*, 2002; Wong *et ál.*, 2001). En el ganado vacuno deficiente en Cu, el status de Cu afectó a las concentraciones de Cu en el cerebro, pero no se apreciaron efectos en las concentraciones de Mn en el cerebro ni modificaciones en las características de la proteína del priónica (Legleiter *et ál.*, 2007). En el presente estudio la suplementación con Cu dio lugar a un aumento de las concentraciones de Cu en el cerebro junto con una disminución significativa en las concentraciones de Mn, este resultado podría atribuir a la suplementación con Cu un efecto beneficioso o protector en la prevención de la EEB, especialmente en los casos donde el equilibrio de Cu y Mn en la dieta no es adecuado.

Evidencias de una interacción competitiva entre Cu y Ni se habían descubierto previamente en ratas: Ni y Cu tienen componentes similares de unión en el suero y el mismo sitio de transporte específico en la albúmina (Nielsen, 1987) y en ratas deficientes en Cu, los signos clínicos de la deficiencia de Cu (como elevado colesterol plasmático y disminución de hemoglobina) se vieron exacerbadas por la suplementación Ni (Nielsen *et ál.*, 1979, 1981). En los rumiantes interacción Cu-Ni no está clara, y las concentraciones de Cu en el hígado, riñón, bazo, pulmón, corazón y músculo no se vieron afectadas en terneros suplementados con 5 mg Ni/kg en la dieta (Spears *et ál.*, 1986). Los resultados del presente estudio sobre la disminución de Ni en el cerebro de los animales suplementados con Cu podrían ser importantes ya que la información sobre los efectos de Ni en el sistema nervioso son todavía escasos (Senatori *et ál.*, 2009) y varios estudios en los últimos años se centraron en las uniones de Cu y Ni a péptidos ricos en histidina están implicados en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y las enfermedades priónicas (Zoroddu *et ál.*, 2004, 2008, 2009).

No hay información disponible en la literatura acerca de las interacciones entre Cu y Cr en el cerebro u otros tejidos que nos permitan explicar los mecanismos de la interacción negativa Cu-Cr en nuestro estudio. De todos modos, la correlación negativa entre el Cu y Cr en el bazo podría tener una implicación clínica en animales que reciban dietas altamente suplementadas

en Cu, ya que estudios recientes en animales han atribuido al Cr un papel importante tanto en la inmunidad humoral (Almeida y Barajas, 2001, 2002; Burton *et ál.*, 1994) como en la mediada por células (Burton *et ál.*, 1993) y el bazo posee un papel muy importante en la producción de linfocitos B y células plasmáticas (Fry y McGavin, 2007).

Por último, se observó una interacción negativa entre Cu y Se en el diafragma en los terneros de nuestro estudio, presentando los animales suplementados con Cu menores niveles estadísticamente significativos de Se en este músculo. Se ha demostrado que la alta ingesta de Cu reduce la absorción intestinal de Se en rumiantes debido a la formación en el rumen de compuestos de Cu selenuros muy insolubles (Koenig *et ál.*, 1991). Estudios experimentales en los rumiantes también han demostrado que después de la inyección de Se, la concentración de Cu en el hígado aumentó tanto en animales que recibieron dietas normales (Hussein *et ál.*, 1985) como deficientes en Cu (Thomson y Lawson, 1970) y que esto podría estar relacionado con la síntesis de metalotioneínas en el hígado después del tratamiento con Se (Chmielnicka *et ál.*, 1983). Estudios previos en ganado vacuno en el noroeste de España han encontrado correlaciones positivas estadísticamente significativas entre el Cu y Se en el hígado (López-Alonso *et ál.*, 2004) o en el riñón (Blanco-Penedo *et ál.*, 2006), pero no interacciones negativas en el músculo como las de este estudio. Estas diferencias entre los estudios en la interacción Cu-Se podrían estar relacionados, como se indicó anteriormente, con las concentraciones relativas o proporciones de ambos elementos en el organismo. El efecto de la suplementación de Cu en las concentraciones de Se en el músculo podría tener una relevancia clínica, ya que la falta de selenio se asocia con varias enfermedades musculares que afectan a los músculos cardíaco y esquelético en el ganado, como la enfermedad del músculo blanco, que se caracteriza por la calcificación extensa de las fibras cardíacas y esqueléticas ; la aparición de estas enfermedades está fuertemente influenciado por la dieta y los suplementos de Se son importantes para evitar estos trastornos (Rederstorff *et ál.*, 2006).

## **Conclusiones**

En las condiciones nutricionales de los terneros de este estudio, que son las típicas en los sistemas intensivos en muchos países europeos, la suplementación con Cu dio lugar a una mayor acumulación de Cd. Por el contrario, se observó una disminución de As, Pb y Hg en la mayoría de los tejidos, y aunque los mecanismos de estas interacciones se desconocen, podría estar relacionado, al menos en parte, con el ratio Se:Cu en el animal, así, este ratio podría ser una herramienta o estrategia para disminuir los residuos de metales tóxicos en animales que procedan de zonas altamente contaminadas. Sin embargo, debido al efecto negativo de la suplementación con Cu sobre los niveles de Se en el músculo en los animales de este estudio, se necesitan nuevas investigaciones sobre la suplementación con Cu-Se para entender mejor el riesgo de los animales a sufrir una deficiencia de Se. Por último, el posible papel de la

suplementación con Cu sobre el estado de ciertos metales asociados a enfermedades neurológicas (principalmente Mn y Ni) en el cerebro necesita ser más estudiado.

Elsevier Editorial System(™) for Livestock Science  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Influence of Cu supplementation on toxic and essential trace element status in intensive reared beef cattle

Article Type: Research Paper

Keywords: copper supplementation; intensive systems; cattle; toxic and essential metals; correlations; metal disorders.

Corresponding Author: DMV PhD Marta Miranda, DMV PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultade de Veterinaria, 27002, Lugo, Spain.

First Author: Marco García-Vaquero, PhD

Order of Authors: Marco García-Vaquero, PhD; Marta López-Alonso, DMV PhD; José L Benedito, DMV PhD; Joaquín Hernández, DMV PhD; Betiana Gutiérrez, DMV PhD; Marta Miranda, DMV PhD

Abstract: Abstract

Cu has been related with higher non-essential trace elements accumulation (Cd and Pb) and interactions with other essential metals (mainly Mn, Zn and Fe) have been recently related neurological diseases affecting both animals and humans. The aim of this study is to evaluate if dietary Cu supplementation that leads to a hepatic Cu accumulation over the normal range has an influence on non-essential trace element accumulation and essential trace element status that could contribute to the pathogenesis of other essential and non-essential element related disorders. Samples (liver, kidney, spleen, diaphragm and brain) of beef calves receiving typical commercial diets Cu supplemented (15 mg Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> /kg DM) and non-supplemented were tested for differences in non-essential (As, Cd, Hg, Pb and Sn) and essential (Ca, Co, Cr, Fe, Mn, Mo, Ni, Se and Zn) trace elements accumulation and correlations, using Mann-Whitney test and Spearman rank correlation analysis based on analytic data obtained by ICP-MS. As (kidney and diaphragm), Hg (liver and kidney), and Pb (liver, kidney and spleen) were significantly lower, while Cd residues (liver and kidney) were significantly higher in the Cu supplemented group. Mn and Ni significantly decreased and Mo increased in the brain, and Se (diaphragm) decreased in the Cu supplemented group. Hepatic Cu concentrations were negatively correlated with As and Pb (in most tissues), Cr (brain and spleen), Ni (brain) and Se (diaphragm). Although the mechanisms of these interactions are unknown, they could be related, at least in part, to the ratio Se:Cu in the animal, and so, this ratio be a tool or strategy to decrease toxic metal residues in animal from environmental polluted areas. However, due to the negative effect of Cu supplementation on Se muscular status in calves in this study, new research on Cu-Se supplementation is necessary to better understand the risk of the animals to suffer from Se deficiency. Finally, the possible role of Cu supplementation on the status of certain metals associated to neurological diseases (mainly Mn and Ni) in the brain deserves further investigation.

## ***Influence of Cu supplementation on toxic and essential trace element status in intensive reared beef cattle***

M. García-Vaquero <sup>a</sup>, M. López-Alonso <sup>a</sup>, J.L. Benedito <sup>a</sup>, J. Hernández <sup>a</sup>, B. Gutiérrez <sup>a</sup>, M. Miranda <sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> *Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Patoloxía Animal, Facultade de Veterinaria, 27002, Lugo, Spain.*

<sup>b</sup> *Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultade de Veterinaria, 27002, Lugo, Spain.*

### **Abstract**

*Cu has been related with higher non-essential trace elements accumulation (Cd and Pb) and interactions with other essential metals (mainly Mn, Zn and Fe) have been recently related neurological diseases affecting both animals and humans. The aim of this study is to evaluate if dietary Cu supplementation that leads to a hepatic Cu accumulation over the normal range has an influence on non-essential trace element accumulation and essential trace element status that could contribute to the pathogenesis of other essential and non-essential element related disorders. Samples (liver, kidney, spleen, diaphragm and brain) of beef calves receiving typical commercial diets Cu supplemented (15 mg Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/kg DM) and non-supplemented were tested for differences in non-essential (As, Cd, Hg, Pb and Sn) and essential (Ca, Co, Cr, Fe, Mn, Mo, Ni, Se and Zn) trace elements accumulation and correlations, using Mann-Whitney test and Spearman rank correlation analysis based on analytic data obtained by ICP-MS. As (kidney and diaphragm), Hg (liver and kidney), and Pb (liver, kidney and spleen) were significantly lower, while Cd residues (liver and kidney) were significantly higher in the Cu supplemented group. Mn and Ni significantly decreased and Mo increased in the brain, and Se (diaphragm) decreased in the Cu supplemented group. Hepatic Cu concentrations were negatively correlated with As and Pb (in most tissues), Cr (brain and spleen), Ni (brain) and Se (diaphragm). Although the mechanisms of these interactions are unknown, they could be related, at least in part, to the ratio Se:Cu in the animal, and so, this ratio be a tool or strategy to decrease toxic metal residues in animal from environmental polluted areas. However, due to the negative effect of Cu supplementation on Se muscular status in calves in this study, new research on Cu-Se supplementation is necessary to better understand the risk of the animals to suffer from Se deficiency. Finally, the possible role of Cu supplementation on the status of certain metals associated to neurological diseases (mainly Mn and Ni) in the brain deserves further investigation.*

*\* corresponding author. Marta Miranda. marta.miranda@usc.es*

## Introduction

Although traditionally cattle were thought to be relatively tolerant to copper (Cu) accumulation, in the last years an increased number of episodes of Cu toxicity have been reported in the literature (Bidewell et al., 2000; VLA, 2001), even at liver Cu concentrations well below those classically regarded as toxic (Perrin et al., 1990; Gummow, 1996). In most cases, cattle toxicity is associated with excessive Cu intake in the ration, as well as with changes in the type and bioavailability of dietary Cu supplements (Galey et al., 1991; Steffen et al., 1997; Laven et al., 2004). High Cu supplementation (up to 35 mg/kg dry matter, the maximum level of Cu supplementation for cattle established by the European Union; Commission Regulation (EC) No 1334/2003/EC), well above general physiological requirements (10 mg/kg; NRC, 2000) has been justified in most cases in view of the interference of Cu with other micronutrients, mainly molybdenum (Mo) and sulphur (S), but also iron (Fe) and zinc (Zn) (Kendall et al., 2001).

It has also been reported that dietary supplements leading to Cu accumulation in the liver at concentrations only slightly above normal (around 125 mg/kg wet weight) show negative effects on animal performance, in terms of reduced feed intake and average daily gain (Engle and Spears, 2000). The pathogenic mechanisms involved in this presumable subclinical chronic Cu toxicity during the chronic silent phase of hepatic Cu accumulation have not been elucidated. It is possibly that these negative effects of Cu could be attributed in part to reactive oxygen species (ROS) generation in cases of Cu overload. In rats hepatic toxicity due to Cu overload was attributed to ROS formation that are highly reactive and capable to damage all biological macromolecules (Britton, 1996; Luza and Speisky, 1996) and finally lead to apoptosis (Rana, 2008). In addition, it is possible that toxic effects of Cu could be related with the interaction with other micronutrients. In example, Cu interactions with other metals (mainly Mn, Zn and Fe) have been recently related with the pathogenesis of a great number of neurological diseases affecting both animals and humans, like for example Alzheimer' disease (Maynard et al., 2005) and prion related diseases like spongiform encephalopathies in cattle (Tsenkova et al., 2004; Deloncle et al., 2006). High Cu dietary supplementation could also lead to a higher accumulation of toxic metals in the organism due to the capacity of this metal to increase metallothionein synthesis (Mercer, 1997); Rambeck et al. (1991) found that animals receiving for 3 months a diet supplemented with 200 mg/kg Cu showed cadmium (Cd) levels in the liver and kidney more than 2-fold higher than in control animals.

In a recent study of our research group in intensive beef cattle receiving a typical diet for commercial feedlots in Spain supplemented with 15 mg Cu sulphate /kg dry matter (mg Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> /kg DM) during all the productive cycle (García-Vaquero et al., *in press*) it was observed that a high proportion of animals (41%) had hepatic Cu concentrations associated with toxicity in cattle (>150 mg/kg wet weight: Perrin et al., 1990; Gummow, 1996), whereas in non supplemented animals blood Cu parameters and tissue Cu concentrations were within the adequate range. The aim of this study is to evaluate if dietary Cu supplementation that leads

to a hepatic Cu accumulation over the normal range has an influence on non-essential trace element accumulation and essential trace element status that could contribute to the pathogenesis of other essential and non-essential element related disorders.

## Materials and methods

### Experimental design and sample collection

Tissue samples (liver, kidney, spleen, diaphragm and brain) of beef calves in which this study is based, were from a previous experiment to evaluate Cu status in supplemented (15 mg Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/kg DM) and non-supplemented beef cattle receiving a typical commercial spanish feedlot diet during all the productive cycle (n=30). Detailed data of the experimental design, sample collection at slaughter are presented in García-Vaquero et al. (in press).

### Sample analysis

For the liver, diaphragm, brain and spleen approximately 1 g of sub-samples were excised from semi-thawed tissues and acid digested. More details in García-Vaquero et al. (in press).

The concentrations of non-essential (arsenic (As), cadmium (Cd), mercury (Hg), lead (Pb) and tin (Sn)) and essential (calcium (Ca), cobalt (Co), chromium (Cr), copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mn), molibdenum (Mo), nickel (Ni), selenium (Se) and zinc (Zn)) trace elements were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; VGEElemental PlasmaQuad SOption).

An analytical quality control was applied throughout the study. Blank absorbance values were run alongside samples and these values were subtracted from the readings before the results were calculated. The limits of detection in the acid digest were calculated as three times the standard deviation of the reagent blanks (Table 1) and were based on the mean sample weight analysed.

Analytical recoveries were determined from certified reference materials (pig kidney CRM 186, BCR Reference Materials, Geel, Belgium; and fish protein DORM-3 National Research Council, Ottawa, Ontario, Canada) that were analysed alongside unknowns. There was good agreement between the measured and the certified or indicative values (Table 1). The two CRM used were not certified for Co and Mo and analytical recoveries were determined for these elements using samples spiked at a concentration that gave absorbance values 2-10 times greater than the normal levels. Mean recoveries were 89 and 96% respectively. The precision of the analytical method, calculated as the relative standard deviation (RSD) of Co and Mo concentrations in 10 digests of the same sample, were between 5,8 and 9,3%.

### Statistical analysis

All statistical analyses were done using the program SPSS for Windows (v. 15.0). Non-detectable concentrations were assigned a value half the detection limit when calculating the

mean element concentrations. Data were tested using Kolmogorov-Smirnov test and were generally not normally distributed, even after log-transformation. Therefore, Mann-Whitney test was used to test for differences in essential and non-essential trace element concentrations in liver, kidney, spleen, diaphragm and brain between Cu supplemented and un-supplemented animals.

Spearman rank correlation analyses were made between Cu concentration in the liver and essential and non-essential trace element residues in the rest of tissues to determine the influence of Cu supplementation in trace metal accumulation.

## Results

Non-essential trace element concentrations in liver, kidney, diaphragm, spleen and brain in beef cattle receiving a diet with (15 mg Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Kg DM) and without Cu supplementation in this study are presented in Fig. 1. Overall, non-essential trace metals accumulated mainly in the kidney and in a lesser extend in the liver, whereas in the other tissues metal residues were very low with a high proportion of samples below the quantification limit (in %, Cd: 66,7 (spleen), 63,3 (diaphragm) and 56,7 (brain); Hg: 53,8 (liver); Pb 100 (diaphragm), 76,7 (brain); Sn: 100 (spleen), 86,7 (diaphragm), 83,3 (brain)) and did not differ statistically between themselves. Except for Sn, Cu supplementation significantly affected non-essential trace element accumulation in calves in our study. As residues were significantly lower in the kidney (53%) and diaphragm (41%), and tended ( $p < 0.10$ ) to be lower in the liver (18%) and brain (6%) of Cu supplemented calves. Hg in the liver (52%) and kidney (19%), and Pb in the liver (65%), kidney (71%) and spleen (68%) were significantly lower in the Cu supplemented group. On the contrary, Cd residues were significantly higher in the liver (87%) and kidney (111%) of the Cu supplemented group.

Essential trace element concentrations in the different tissues of cattle in this study are presented in Fig. 2. In general the highest trace element concentrations were found in the liver and/or kidney, except for Fe and Zn in which the highest levels were observed in the spleen and diaphragm respectively. Cu supplementation hardly affected tissue essential trace element concentrations in calves in our study: Mn (13%) and Ni (54%) concentrations significantly decreased and Mo (83%) concentrations increased in the brain, and Se concentrations decreased in the diaphragm (15%) of the Cu supplemented group.

Spearman rank correlations between Cu in the liver (as the most representative organ of Cu status in the animals) and essential and no-essential trace element concentration in the different tissues are presented in Table 2. Hepatic Cu concentrations were negatively related with As (Fig. 3) and Pb (Fig. 4) residues in most tissues. In relation to the essential trace elements, hepatic Cu accumulation was negatively related with Cr concentration in the brain and spleen (Fig. 5), Ni in the brain (Fig. 6) and Se in the diaphragm (Fig. 7).

## Discussion

The results of our study have demonstrated that Cu supplementation in intensively reared beef cattle significantly affected toxic metal accumulation. Cd residues were significantly higher in animals receiving Cu supplementation. This could be related to a higher dietary Cd exposure in Cu supplemented animals, since mineral supplements generally contain significant concentrations of the main toxic metals (As, Cd and Pb); in fact mineral supplements are considered one of the main source of toxic metal exposure in farm animals from relatively unpolluted areas (Li et al., 2005; Mc Bride, 2001). However, Cd contamination in the Cu mineral supplement is not likely to explain the higher Cd levels observed in the supplemented animals in the current study since the other non-trace essential metal analyzed (As, Hg and Pb) decreased in the Cu supplemented animals, unless Cd was the only toxic metal present in the mineral supplement.

On the contrary, Cd and Cu chemical interactions could explain, at least in part, the higher Cd residues found in Cu supplemented cattle in this study. Interactions between Cu and Cd have been widely reported in mammals at different levels of metal exposure and are a consequence of the shared ability of these metals to induce synthesis and compete for the binding sites of metallothionein (MT) (Bebe and Panemanglore, 1996; Coudray et al., 2006; Frank et al., 2000; Komarnicki, 2000; Lopez-Alonso et al., 2002; Phillips et al., 2005; Reeves and Chaney, 2004; Taylor, 1996). In other farm species, intensively reared pigs supplemented with 200 mg/Kg Cu for 3 months showed Cd levels in the liver and kidney more than 2-fold higher than in control non-supplemented animals (Rambeck et al., 1991). Even though no information is available on tissue Cd accumulation in cattle receiving Cu supplementation, numerous examples of naturally occurring interactions between Cu- Cd have been reported (Nriagu et al., 2009; Waegeneers et al., 2009) and cattle hypocupraemia has been frequently described in areas with Cd polluted soils (Koh and Judson, 1986; Miranda et al., 2005; Prankel et al., 2005; Spierenburg et al., 1988; Wentink et al., 1988).

Interactions between Cu and the other main toxic metals (As, Pb and Hg) are less known, and as far we are aware, there is no information on the effect of Cu supplementation on toxic metal accumulation in cattle or other farm animals. Even though there are examples of interaction between Cu and these toxic metals in the scientific literature, these have been described in naturally exposed animals (Blanco-Penedo et al., 2006; López-Alonso et al., 2002; Miranda et al., 2005; Nriagu et al., 2009) or in laboratory mammals exposed to high metal concentrations (Agarwal et al., 2010; Dhawan et al., 1995; Rambeck et al., 1991) well above those found in normal diets.

There are some examples of Pb-Cu interactions in the literature. In experimental studies in mice, administration of a high Pb diet has been reported to lead to a deficiency in Cu absorption and thus decreased Cu levels in the liver (Dhawan et al., 1995); whether Pb-Cu interaction is at the site of absorption of Cu in the gastrointestinal tract or at some other

metabolic or transport site has not been determined. Conflicting results have been obtained regarding Cu-Pb interaction in cattle. Some studies have reported negative associations between Cu and Pb in the liver of animals exposed to low environmental Pb (Miranda, 1999; Spierenburg et al., 1988), while others have found no statistically significant association (López-Alonso et al., 2002) or a strong positive correlation between both elements in the liver (Blanco-Penedo et al., 2006; López-Alonso et al., 2004). Although the Cu-Pb interaction mechanisms are unknown, it has been suggested that the positive associations between Cu-Pb could be related to a common source of exposure of both metals by soil ingestion (Blanco-Penedo et al., 2006; López-Alonso et al., 2004).

Scarce information is available on interactions between Cu and As in cattle. A strong negative correlation was found between Cu and As concentrations in the liver of cattle with a very low Cu status (Nriagu et al., 2009). In previous studies in our region As concentrations in cattle were very low, with a large number of animals showing no-detectable As residues in the liver, kidney and diaphragm (Blanco-Penedo et al., 2006, 2010; López-Alonso et al., 2000a, 2000b). In these studies animals were raised in farms with outdoor grazing throughout the year in areas with high Cu contents in soil and forage, both from a natural origin (serpentine soils) or due to the use of high Cu pig slurry as fertilizer (Lopez Alonso et al., 2000a; Miranda et al., 2009). On the light of the results of the present study, it could be possible that the low As accumulation in Galician cattle in these previous studies, even though As concentrations are relatively high in some soils in Galicia (López-Alonso et al., 2000a), could be related to the high level of Cu exposure.

As far as we are aware, there is a lack of studies showing the interaction between Cu and Hg in cattle. On the contrary, it has been well documented that Hg and Se interact biologically, and the coadministration of both reduces the toxicity of each other (Civin-Aralar and Furness, 1991), although the mechanism underlying this protective effect is still unsolved. In the cattle in the present study there was a significant decrease in Hg residues in the liver and kidney of the Cu supplemented animals, although no significant correlations were found between hepatic Cu and tissue Hg concentrations. Hg concentrations in cattle in our study were neither associated with Se status (data not shown), but curiously, a statistical significant correlation was found between the hepatic Se:Cu ratio and kidney Hg concentrations (Fig. 8). Cu supplementation in cattle in our study was also associated with a statistically significant decrease ( $p=0,02$ ) of the hepatic Se:Cu ratio, which could contribute to a lower Hg accumulation in Cu supplemented calves. It has been demonstrated that treatment with Se to Hg-exposed rats, in spite of having a protective effect on restoration on altered oxidative stress parameters, leads to a higher tissue Hg accumulation (Agarwal et al., 2010) which is a consequence of a Se induction of MT synthesis, reduction of Hg urinary and fecal excretion (Juresa et al., 2005) and formation of Hg-Se complex with plasma protein that increase the tendency of Hg to accumulate rather than eliminate from the body (Gailer et al., 2000; Sasakura and Suzuki, 1998). These results indicate that metal interactions can be very complex,

with more than two metals involved, and their effects highly dependent of the relative concentration of metals in the organism (Lopez-Alonso et al., 2004).

Interestingly, the hepatic Se:Cu ratio showed equal and/or higher correlations with As (liver, kidney, diaphragm and brain) and Pb (liver, kidney and spleen) (Fig. 9) than those observed with liver Cu concentrations. Thus, it could be possible that the modification of the Se:Cu ratio in the Cu supplemented calves in our study had a role on the significant decrease of As and Pb organic accumulation. This finding could be relevant since both essential elements form part of important enzymes with antioxidant properties like Cu-Zn superoxide dismutase and glutathione peroxidase (Underwood and Suttle, 2002) and metal toxicity are directly related to ROS formation in animals (Agarwal et al., 2010).

When evaluating essential trace element concentrations in cattle in this study it was observed, that both Cu unsupplemented and supplemented animals showed an adequate mineral status, since essential trace elements concentrations in the liver and kidney (the tissues more common to evaluate the adequate mineral status) were within the ranges described as adequate (Puls, 1994; Underwood and Suttle, 2002). These results indicate, in a first instance, that the typical commercial diet for beef cattle in intensive systems covers the physiological requirements, and mineral supplementation routinely used in intensively fed cattle could not be justified to maintain nutritional requirements. Cu supplementation showed a significant influence on essential trace element tissue concentrations. Interestingly, the brain was the tissue that showed the highest differences between both groups of animals: Cu supplemented animals showed statistically significant lower Mn, Mo and Ni concentrations compared to the unsupplemented calves.

Cu and Mn concentrations in the brain have acquired great relevance in the later years due to the role of Cu in the biology of prions related with transmissible spongiform encephalopathies (TSE) like bovine spongiform encephalopathy (BSE). The binding of Cu ions by the prionic protein stabilize the protein that may play a role in the antioxidant defense via its Cu-dependent superoxide dismutase like activity (Brown et al., 1997, 1999; Wong et al., 2000). Imbalances in Cu and Mn that allow for Mn ions to replace Cu on the prionic protein result in changes in the biochemical characteristics of the molecule (Deloncle et al., 2006; Tsenkova et al., 2004), large decreases in brain Cu and increases in Mn have been associated with TSE (Thackray et al., 2002; Wong et al., 2001). In Cu deficient cattle, the Cu status affected bovine brain Cu concentrations but had not detectable effects on brain Mn concentrations or prion protein characteristics (Legleiter et al., 2007). In the present study Cu supplementation in beef cattle lead to an increase of Cu concentrations in the brain together with a significant decrease in Mn concentrations; this result could attribute to Cu supplementation a beneficial or protective effect on the prevention of the BSE, especially in cases where the balance of Cu and Mn in the diet is not appropriate.

Evidences of a competitive interaction between Cu and Ni were previously reported in rats: Ni and Cu have similar binding components in serum and the same specific transport site in albumin (Nielsen, 1987) and in Cu deficient rats, clinical signs of Cu deficiency (like elevated plasma cholesterol and depressed haemoglobin) were exacerbated by Ni supplementation (Nielsen et al., 1979, 1981). In ruminants Cu-Ni interaction is not clear, and Cu concentrations in the liver, kidney, spleen, lung, heart and muscle were not affected in calves supplemented with 5 mg Ni/kg in the diet (Spears et al., 1986). The results of the present study concerning the diminish of Ni in the brain of Cu supplemented animals could be relevant since the effects of Ni in the nervous system are still scarce (Senatori et al., 2009) and several studies in the recent years are focused on the Cu and Ni binding to histidine containing peptides involved in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and prion disease (Zoroddu et al., 2004, 2008, 2009).

As far we are concerned, no information is available in the literature about interactions between Cu and Cr in the brain or other tissues that allow us to explain the mechanisms of the Cu-Cr negative interaction in our study. Anyway, the negative correlation between Cu and Cr concentrations in the spleen could have a clinical implication in animals receiving high dietary Cu supplementation, since recent studies in cattle have attributed to Cr a major role in both humoral (Almeida and Barajas, 2001, 2002; Burton et al., 1994,) and cell-mediated immunity (Burton et al., 1993) having the spleen a mayor role in lymphocytes B and plasma cells production (Fry and McGavin, 2007).

Finally, a significant negative interaction between Cu and Se in the diaphragm was observed in calves in our study, animals receiving Cu supplementation showing significantly lower Se concentrations in this muscle. It has been demonstrated that high Cu intakes reduce intestinal absorption of Se in ruminants because highly insoluble Cu selenide compounds are formed in the rumen (Koenig et al., 1991). Experimental studies in ruminants have also demonstrated that after injection of Se, Cu concentration in the liver increased in animals receiving both normal (Hussein et al. 1985) or Cu deficient diets (Thomson and Lawson, 1970) and that this could be related to metallothionein synthesis in the liver after Se treatment (Chmielnicka et al., 1983). Previous studies in cattle in NW Spain have found significant positive correlations between Cu and Se in the liver (López-Alonso et al., 2004) or in the kidney (Blanco-Penedo et al., 2006) but not negative interactions in the muscle, as in this study. These differences in Cu-Se interactions between studies could be related, as indicated above, with the relative concentrations or ratios of both elements in the organism. The effect Cu supplementation on Se concentrations in the muscle could have a clinical relevance since a lack of Se was associated with several muscular diseases affecting both cardiac and skeletal muscles in cattle, like the white muscle disease, characterized by extensive calcification of cardiac and skeletal fibers; emergence of these diseases is strongly influenced by diet and Se supplementation is important to avoid these disorders (Rederstorff et al., 2006).

## Conclusions

Under the nutritional conditions of cattle in this study, which are the typical in intensive systems in many European countries, Cu supplementation was associated with a higher Cd accumulation. On the contrary, Cu supplementation lead to a lower As, Pb and Hg accumulation in most tissues, and although the mechanisms of these interactions are unknown, it could be related, at least in part, to the ratio Se:Cu in the animal, and so, this ratio be a tool or strategy to decrease toxic metal residues in animal from environmental polluted areas. However, due to the negative effect of Cu supplementation on Se muscular status in calves in this study, new research on Cu-Se supplementation is necessary to better understand the risk of the animals to suffer from Se deficiency. Finally, the possible role of Cu supplementation on the status of certain metals associated to neurological diseases (mainly Mn and Ni) in the brain deserves further investigation.

## Acknowledgments

This work was supported by the Xunta de Galicia (Spain) through contract 07MRU030261PR and by the research grant María Barbeito awarded to García-Vaquero M. by the Dirección Xeral de Investigación, Desenvolvemento e Innovación from Xunta de Galicia. The authors thank Betiana Andrea Gutiérrez and Isabel Blanco Penedo for samples collection and Lucia Iglesias Casanova for technical assistance.

**Bibliografía/References**

- Agarwal, R., Raisuddin, S., Tewari, S., Goel, S.K., Raizada, R.B., Behari, J.R., 2010. Evaluation of comparative effect of pre- and posttreatment of selenium on mercury-induced oxidative stress, histological alterations, and metallothionein mRNA expression in rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* DOI 10.1002/jbt.20320.
- Almeida, L., Barajas, R., 2001. Effect of Cr-methionine level supplementation on immune response of bull calves recently arrived to feedlot. *J. Anim. Sci.* 79, 390.
- Almeida, L., Barajas, R., 2002. Effect of Cr methionine and zinc methionine supplementation on blood concentrations of immunoglobulin G and M and inflammatory response to a phytohemagglutinin in stressed feedlot calves. *J. Anim. Sci.* 80, 363.
- Bebe, F.N., Panemangalore, M., 1996. Modulation of tissue trace metal concentrations in weaning rats fed different levels of zinc and exposed to oral lead and cadmium. *Nutr. Res.* 16, 1369–1380.
- Bidewell, C.A., David, G.P., Livesey, C.T., 2000. Copper toxicity in cattle. *Vet. Rec.* 147, 399-400.
- Blanco-Penedo, I., Cruz, J.M., López-Alonso, M., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Bedito, J.L., 2006. Influence of copper status on the accumulation of toxic and essential metals in cattle. *Environ. Int.* 32, 901-906.
- Blanco-Penedo, I., López-Alonso, M., Miranda, M., Hernández, J., Prieto, F., Shore, R.F., 2010. Non-essential and essential trace element concentrations in meat from cattle reared under organic, intensive or conventional production systems. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 27, 36-42.
- Britton, R.S., 1996. Metal-induced hepatotoxicity. *Semin. Liver Dis.* 16, 3–12.
- Brown, D.R., Schulz-Schaeffer, W.J., Schmidt, B., Kretzschmar, H.A., 1997. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol.* 146, 104-12.
- Brown, D.R., Wong, B.S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S.J., Jones, I.M., 1999. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem. J.* 344, 1-5.
- Burton, J.L., Mallard, B.A., Mowat, D.N., 1993. Effects of supplemental chromium on immune responses of periparturient and early lactation dairy cows. *J. Anim. Sci.* 71, 1532–1539.
- Burton, J.L., Mallard, B.A., Mowat, D.N., 1994. Effects of supplemental chromium on antibody responses of newly weaned feedlot calves to immunization with infectious bovine rhinotracheitis and parainfluenza 3 virus. *Can. J. Vet. Res.* 58, 148–151.
- Chimielnicka, 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.

Commission Regulation (EC) No 1334/2003/EC. Amending the conditions for authorisation of a number of additives in feedingstuffs belonging to the group of trace elements. Official J. Eur. Union.

Coudray, C., Feillet-Coudray, C., Rambeau, M., Tressol, J.C., Gueux, E., Mazur, A., Rayssiguier, Y., 2006. The effect of aging on intestinal absorption and status of calcium, magnesium, zinc and copper in rats. Stable isotope study. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 20, 73–81.

Cuvin-Aralar, M.L.A., Furness, R.W., 1991. Mercury and selenium interaction: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21, 348–364.

Deloncle, R., Guillard, O., Bind, J.L., Delaval, J., Fleury, N., Mauco, G., Lesage, G., 2006. Free radical generation of protease-resistant prion after substitution of manganese for copper in bovine brain homogenate. *Neurotoxicol.* 27, 437–444.

Dhawan, D., Singh, B., Chand, B., Singh, N., Mangal, P.C., 1995. X-ray fluorescence in the assessment of inter-elemental interactions in the rat liver following lead treatment. *Biometals.* 8, 105–110.

Engle, T.E., Spears, J.W., 2000. Effects of dietary copper concentration and source on performance and copper status of growing and finishing steers. *J. Anim. Sci.* 78, 2446–2451.

Frank, A., Danielsson, R., Jones, B., 2000. The mysterious disease in Swedish moose. Concentrations of trace elements in liver and kidneys and clinical chemistry. Comparison with experimental molybdenosis and copper deficiency in the goat. *Sci. Total Environ.* 249, 107–122.

Fry, M.M., McGavin, M.D., 2007. Bone marrow, blood cells, and lymphatic system, In: McGavin, M.D., Zavhary, J.F., *Pathologic basis of veterinary disease*. 4th edition Mosby Elsevier. St Louis, Missouri.

Gailer, J., George, G.N., Pickering, I.J., Madden, S., Prince, R.C., Yu, E.Y., Denton, M.B., Younis, H.S., Aposhian, H.V., 2000. Structural basis of the antagonism between inorganic mercury and selenium in mammals. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 1135–1142.

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.

García-Vaquero, M., Miranda, M., López-Alonso, M., Castillo, C., Benedito, J.L., 2010. Evaluation of the need of copper supplementation in intensively reared beef cattle. doi:10.1016/j.livsci.2010.11.002.

Gummow, B., 1996. Experimentally induced chronic copper toxicity in cattle. *Onderstepoort J. of Vet. Res.* 63, 277–288.

Hussein, K.S.M., Jones, B.E., Frank, A., 1985. Selenium copper interaction in goats. *Zbl. Vet. Med. A.* 32, 321–330.

Juresa, D., Blanusa, M., Kostial, K., 2005. Simultaneous administration of sodium selenite and mercuric chloride decreases efficacy of DMSA and DMPS in mercury elimination in rats. *Toxicol. Lett.* 155, 97–102.

Kendall, N.R., Illingworth, D.V., Telfer, S.B., 2001. Copper responsive infertility in British cattle: the use of a blood caeruloplasmin to copper ratio in determining a requirement for copper supplementation, in: Diskin, M.G. (Ed.), *Fertility in the High-Producing Dairy Cow*. Occasional Publication 26 (2), British Society of Animal Science. Edinburgh.

Koenig, K.M., Buckley, W.T., Shelford, J.A., 1991. True absorption of selenium in dairy cows: stable isotope tracer methodology and effect of dietary copper. *Can. J. Anim. Sci.* 71, 175-183.

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.

Komarnicki, G.J.K., 2000. Tissue, sex and age specific accumulation of heavy metals (Zn, Cu, Pb, Cd) by populations of the mole (*Talpa europaea* L.) in a central urban area. *Chemosphere.* 41, 1593–1602.

Laven, R.A., Livesey, C.T., Offer, N.W., Fountain, D., 2004. Apparent subclinical hepatopathy due to excess copper intake in lactating Holstein cattle. *Vet. Rec.* 155, 120-121.

Legleiter, L.R., Ahola, J.K., Engle, T.E., Spears, J.W., 2007. Decreased brain copper due to copper deficiency has no effect on bovine prion proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 884-888.

Li, Y., McCrory, D.F., Powell, J.M., Saam, H., Jackson-Smith, D., 2005. A survey of selected heavy metal concentrations in Wisconsin dairy feeds. *J. Dairy Sci.* 88, 2911-2922.

López-Alonso, M., Benedito, J.L., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Shore, R.F., 2000a. Toxic and trace elements in liver, kidney and meat from cattle slaughtered in Galicia (NW Spain). *Food Addit. Contam.* 17, 447-457.

López-Alonso, M., Benedito, J.L., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Shore, R.F., 2000b. 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.F., 2002. Contribution of cattle products to dietary intake of trace and toxic elements in Galicia, Spain. *Food Addit. Contam.* 19, 533-541.

López-Alonso, M., Prieto Montaña, F., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L., 2004. Interactions between toxic (As, Cd, Hg and Pb) and nutritional essential (Ca, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Zn) elements in the tissues of cattle from NW Spain. *Biometals.* 17, 389-397.

Luza, S.C., Speisky, H.C., 1996. Liver copper storage and transport during development: Implications for cytotoxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 812S–820S.

Maynard, C.J., Bush, A.I., Masters, C.L., Cappai, R., Li, Q.X., 2005. Metals and amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Int. J. Exp. Pathol.* 86, 147-159.

McBride, M.B., 2001. Cupric ion activity in peat soil as a toxicity indicator for maize. *J. Environ. Qual.* 30, 78-84.

Mercer, J.F., 1997. Gene regulation by copper and the basis for copper homeostasis. *Nutr.* 13, 48-49.

Miranda, M., Benedito, J.L., Blanco-Penedo, I., López-Lamas, C., Merino, A., López-Alonso, M., 2009. Metal accumulation in cattle raised in a serpentine-soil area: relationship between metal concentrations in soil, forage and animal tissues. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 23, 231-238.

Miranda, M., López-Alonso, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L., 2005. Effects of moderate pollution on toxic and trace metal levels in calves from a polluted area of northern Spain. *Environ. Int.* 31, 543-548.

Miranda, M., 1999 Estudio de los principales elementos contaminantes en ganado vacuno de Asturias. PhD thesis, University of Santiago de Compostela (Spain).

Nielsen, F.H., Zimmerman, T.J., Collings, M.E., Myon, D.R., 1979. Nickel deprivation in rats: nickel-iron interactions. *J. Nutr.* 109, 1623-1632

Nielsen, F.H., Zimmerman, T.J., 1981. Interactions among nickel, copper and iron in rats. *Biol. Trace Element. Res.* 3, 83-98.

Nielsen, F.H. 1987. Nickel, In: Mertz, W., Trace elements in human and animal nutrition. 5th ed. Academic Press, INC. San Diego, California.

NRC (National Research Council), 2000. Nutrient Requirements of Beef Cattle 7<sup>th</sup> ed. National Academy Press, Washington. Revised.

Nriagu, J., Boughanen, M., Linder, A., Howe, A., Grant, C., Rattray, R., Vutchkov, M., Lalor, G., 2009. Levels of As, Cd, Pb, Cu, Se and Zn in bovine kidneys and livers in Jamaica. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 564-571.

Perrin, D.J., Schiefer, B., Blakley, B.R., 1990. Chronic copper toxicity in a dairy herd. *Can. Vet. J.* 31, 629-632.

Phillips, C.J.C., Chiy, P.C., Zachou, E., 2005. Effects of cadmium in herbage on the apparent absorption of elements by sheep in comparison to inorganic cadmium added to their diets. *Environ. Res.* 99, 224-234.

Prankel, S.H., Nixon, R.M., Phillips, C.J.C., 2005. Implications for human food chain of models of cadmium accumulation in sheep. *Environ. Res.* 97, 348-358.

Puls, R., 1994. Mineral levels in Animal Health. Clearbrook. Sherpa International, British Columbia.

- Rambeck, W.A., Brehm, H.W., Kollmer, W.E., 1991. The effect of increased copper supplements in feed on the development of cadmium residues in swine. *Z. Ernährungswiss.* 30, 298-306.
- Rana, S.V., 2008. Metals and apoptosis: recent developments. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 22, 262-284.
- Rederstorff, M., Krol, A., Lescure, A., 2006. Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 52-59.
- Reeves, P.G., Chaney, R.L., 2004. Marginal nutritional status of zinc, iron and cadmium increases cadmium retention in the duodenum and other organs of rats fed rice-based diets. *Environ. Res.* 96, 311-322.
- Sasakura, C., Suzuki, K.T., 1998. Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. *J. Inorg. Biochem.* 71, 159-162.
- Senatori, O., Setini, A., Scirocco, A., Nicotra, A., 2009. Effect of short-time exposures to nickel and lead on brain monoamine oxidase from *Danio rerio* and *Poecilia reticulata*. *Environ. Toxicol.* 24, 309-313.
- Spears, J.W., Harvey, R.W., Samsell, L.J., 1986. Effects of dietary nickel and protein on growth, nitrogen metabolism and tissue concentrations of nickel, iron, zinc, manganese and copper in calves. *J. Nutr.* 116, 1873-1882.
- Spierenburg, T.J., De Graaf, G.J., 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. Assess.* 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. Diag. Invest.* 9, 443-446.
- Taylor, A., 1996. Detection and monitoring of disorders of essential trace elements. *Ann. Clin. Biochem.* 33, 486-510.
- Thackray, A.M., Knight, R., Haswell, S.J., Bujdoso, R., Brown, D.R., 2002. Metal imbalance and compromised antioxidant function are early changes in prion disease. *Biochem. J.* 362, 253-258.
- Thomson, G.G., Lawson, B.M., 1970. Copper and selenium interaction in sheep. *N. Z. Vet. J.* 18, 79-82.
- Tsenkova, R.N., Iordanova, I.K., Toyoda, K., Brown, D.R., 2004. Prion protein fate governed by metal binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 1005-1012.
- Underwood, E.J., Suttle, N.F., 2002. Los minerales en la nutrición del ganado. Editorial Acribia S.A., Zaragoza [in Spanish].

VLA Surveillance Report, 2001. July sees an increased incidence of copper poisoning in cattle. *Vet. Rec.* 149, 257-260.

Waegeneers, N., Pizzolon, J.C., Hoenig, M., De Temmerman, L., 2009. Accumulation of trace elements in cattle from rural and industrial areas in Belgium. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 26, 326-332.

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 biogeochemical measurements in heifers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 131-138.

Wong, B.S., Chen, S.G., Colucci, M., Xie, Z., Pan, T., Liu, T., Li, R., Gambetti, P., Sy, M.S., Brown, D.R., 2001. Aberrant metal binding by prion protein in human prion disease. *J. Neurochem.* 78, 1400-1408.

Wong, B.S., Pan, T., Liu, T., Li, R., Gambetti, P., Sy, M.S., 2000. Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 136-139.

Zoroddu, M.A., Kowalik-Jankowska, T., Medici, S., Peana, M., Kozlowski, H., 2008. Copper(II) binding to Cap43 protein fragments. *Dalton Trans.* 28, 6127-6134.

Zoroddu, M.A., Medici, S., Peana, M., 2009. Copper and nickel binding in multi-histidinic peptide fragments. *J. Inorg. Biochem.* 103, 1214-1220.

Zoroddu, M.A., Peana, M., Kowalik-Jankowska, T., Kozlowski, H., Costa, M., 2004. Nickel(II) binding to Cap43 protein fragments. *J. Inorg. Biochem.* 98, 931-939.

**Tabla 1.** Resultados del programa de calidad analítico empleado para la determinación de metales no esenciales y esenciales. Los números entre parentesis son valores indicativos.

**Table 1.** Results of the analytical quality control programme used in the determination of non-essential and essential trace elements. Numbers in parentheses are indicative values.

Element	Certified reference materials							
	Blank (n=10) Mean $\pm$ SD ( $\mu\text{g/l}$ )	Detection limit ( $\mu\text{g/g}$ )	CRM 186			DORM-3		
			Certified levels (mean $\pm$ SD; mg/kg)	Analysed levels (mean $\pm$ SD; mg/kg)	Certified levels (mean $\pm$ SD; mg/kg)	Analysed levels (mean $\pm$ SD; mg/kg)	Certified levels (mean $\pm$ SD; mg/kg)	Analysed levels (mean $\pm$ SD; mg/kg)
As	0,128 $\pm$ 0,006	0,0003	0,063 $\pm$ 0,009	0,0523 $\pm$ 0,0142	6,88 $\pm$ 0,300	6,07 $\pm$ 0,38		
Ca	183 $\pm$ 18	0,801	(295)	337 $\pm$ 45	-	-		
Cd	-0,005 $\pm$ 0,002	0,0001	2,71 $\pm$ 0,15	3,25 $\pm$ 0,63	0,290 $\pm$ 0,020	0,276 $\pm$ 0,031		
Co	0,025 $\pm$ 0,004	0,0002	-	0,109 $\pm$ 0,017	-	0,224 $\pm$ 0,033		
Cr	0,916 $\pm$ 0,034	0,0014	(0,058-0,142)	0,067 $\pm$ 0,142	1,89 $\pm$ 0,17	1,20 $\pm$ 0,24		
Cu	8,42 $\pm$ 0,71	0,0304	31,9 $\pm$ 0,4	39,9 $\pm$ 6,3	15,5 $\pm$ 0,63	15,5 $\pm$ 2,3		
Fe	-1,88 $\pm$ 3,06	0,136	299 $\pm$ 10	331 $\pm$ 36	347 $\pm$ 20	247 $\pm$ 31		
Hg	0,024 $\pm$ 0,004	0,0002	1,97 $\pm$ 0,04	1,91 $\pm$ 0,21	0,382 $\pm$ 0,060	0,281 $\pm$ 0,037		
Mn	0,229 $\pm$ 0,037	0,0016	8,5 $\pm$ 0,3	8,87 $\pm$ 1,51	-	2,06 $\pm$ 0,58		
Mo	0,282 $\pm$ 0,107	0,0048	-	4,39 $\pm$ 0,79	-	0,644 $\pm$ 0,359		
Ni	5,04 $\pm$ 0,06	0,0025	(0,420)	1,073 $\pm$ 0,940	1,28 $\pm$ 0,24	1,77 $\pm$ 0,35		
Pb	0,225 $\pm$ 0,030	0,0013	0,306 $\pm$ 0,011	0,263 $\pm$ 0,040	-	0,270 $\pm$ 0,048		
Se	0,186 $\pm$ 0,034	0,0015	10,3 $\pm$ 0,5	12,9 $\pm$ 1,8	-	3,81 $\pm$ 0,33		
Sn	-0,031 $\pm$ 0,003	0,0001	-	0,0068 $\pm$ 0,0405	-	0,0861 $\pm$ 0,0618		
Zn	18,3 $\pm$ 21,1	0,9	128 $\pm$ 3	141 $\pm$ 13	51,3 $\pm$ 3,1	46,8 $\pm$ 5,6		

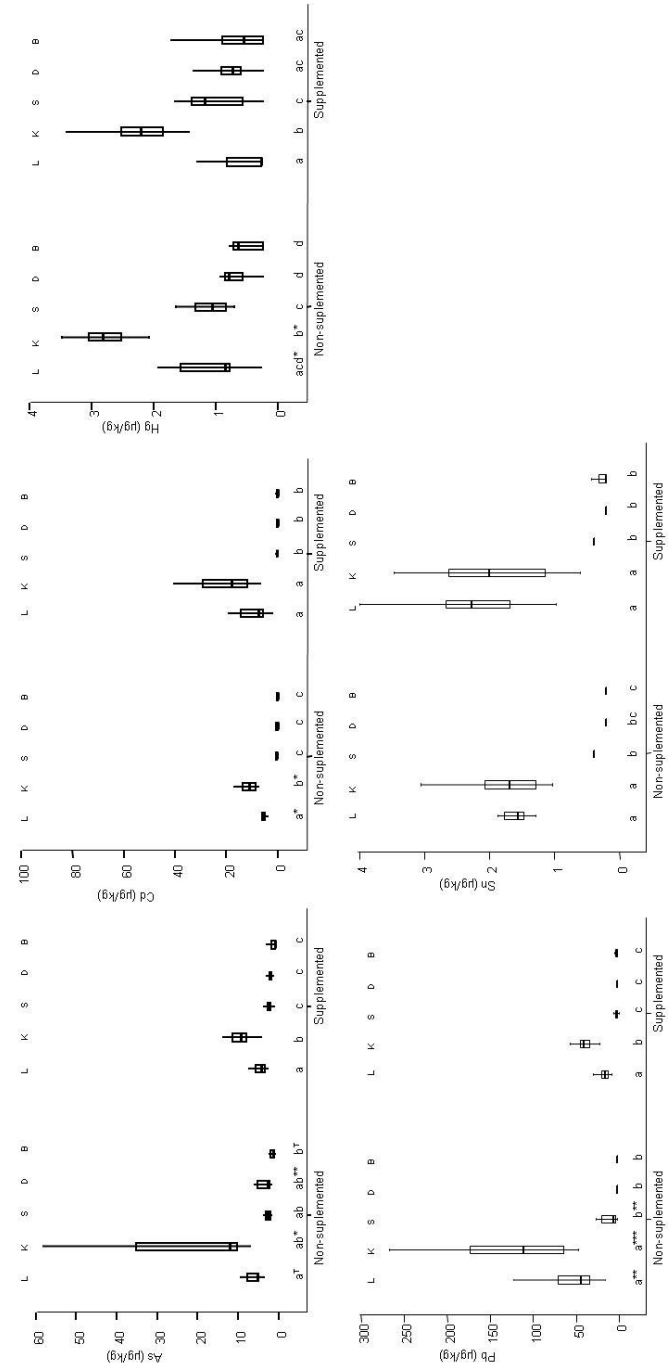
**Tabla 2.** Coeficiente y probabilidad de correlación de Spearman (\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ) entre las concentraciones hepáticas de Cu y los residuos de los diferentes elementos no esenciales y esenciales en el hígado, riñón, bazo, diafragma y cerebro. Las correlaciones en el caso del Sn y Pb en el diafragma no han sido calculadas debido a que la mayor parte de las muestras presentaron niveles no detectados.

**Table 2.** Spearman rank correlation coefficient and probability (\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ) between Cu liver concentrations and different essential and non-essential trace elements residues in liver, kidney, spleen, diaphragm and brain. Correlations for Sn in spleen and Pb in the diaphragm have been not calculated because most samples had undetectable concentrations.

	Liver (N=26)	Kidney (N=26)	Spleen (N=23)	Diaphragm (N=26)	Brain (N=26)
<b>As</b>	-,400*	-0,318	-,443*	-0,368	-,546**
<b>Ca</b>	0,054	-0,154	-0,355	0,267	-0,259
<b>Cd</b>	0,262	0,338	-0,169	-0,05	-0,372
<b>Co</b>	-0,297	-0,223	-0,034	0,281	-0,314
<b>Cr</b>	0,206	0,255	-,581**	-0,355	-,491*
<b>Fe</b>	-0,236	-0,05	-0,244	0,241	-0,015
<b>Hg</b>	-0,141	-0,277	0,027	0,114	0,059
<b>Mn</b>	-0,085	-0,219	-0,183	0,188	-0,166
<b>Mo</b>	0,059	0,054	-0,303	-0,234	0,221
<b>Ni</b>	-0,101	-0,077	-0,257	-0,116	-,446*
<b>Pb</b>	-,519**	-,685***	-,653**	.	-0,203
<b>Se</b>	-0,012	-0,156	-0,339	-,418*	-0,032
<b>Sn</b>	0,175	0,043	.	0,056	0,104
<b>Zn</b>	0,22	-0,245	0,135	0,084	0,188

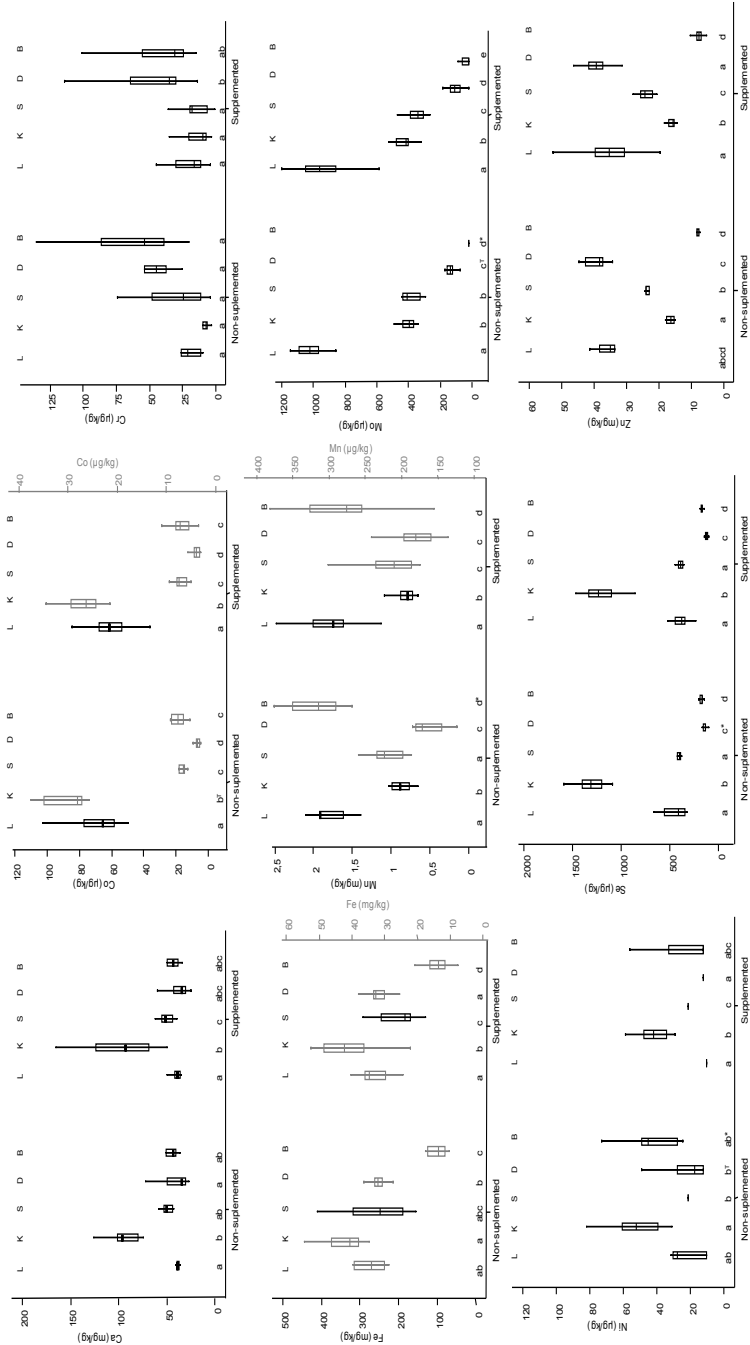
**Figura 1.** Gráficos de caja mostrando la concentración de elementos no esenciales ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso fresco) en diferentes tejidos de animales no suplementados y suplementados con Cu ( $15 \text{ mg Cu}_2\text{SO}_4/\text{kg MS}$ ). Las abreviaturas de los diferentes tejidos son: L: hígado, K: riñón, S: diafragma, D: cerebro. Letras diferentes indican diferencias de concentración estadísticamente significativas de elementos traza en los tejidos analizados dentro del mismo grupo de animales (control o suplementados). Las diferencias de concentración del mismo tejido entre los animales no suplementados y suplementados con Cu fueron indicadas mediante: <sup>T</sup>  $0,05 < p < 0,1$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Fig. 1.** Box plot showing non-essential trace element concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  wet weight) in different tissues from non-supplemented and Cu supplemented animals ( $15 \text{ mg Cu}_2\text{SO}_4/\text{kg DM}$ ). Abbreviations for tissue are as follows L: liver, K: kidney, S: diaphragm, D: brain. Different letters indicate statistically significant differences of trace element residues among the different tissues analysed within the same group of animals (control or supplemented). Differences of metal accumulation in the same tissue between non-supplemented and Cu supplemented animals were indicated as follows: <sup>T</sup>  $0,05 < p < 0,1$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



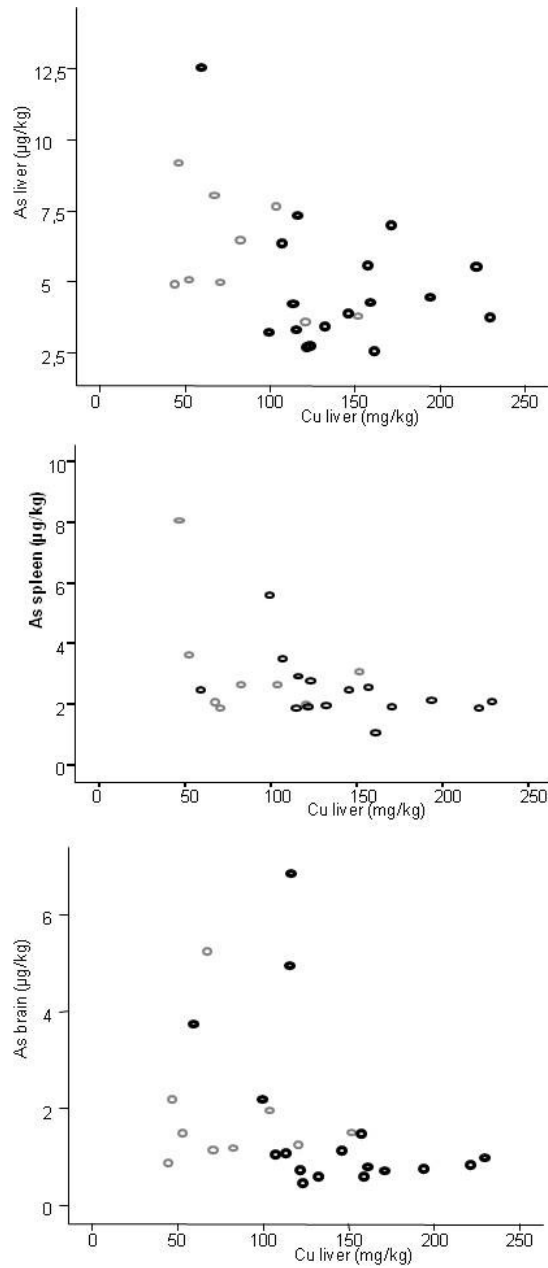
**Figura 2.** Gráficos de caja mostrando la concentración de elementos esenciales ( $\mu\text{g}\text{-mg/kg}$  peso fresco) en diferentes tejidos de animales no suplementados y suplementados con Cu ( $15 \text{ mg Cu}_2\text{SO}_4/\text{kg MS}$ ). Las abreviaturas de los diferentes tejidos son: L: hígado, K: riñón, D: diafragma, B: cerebro. Letras diferentes indican diferencias de concentración estadísticamente significativas de elementos traza en los tejidos analizados dentro del mismo grupo de animales (control o suplementados). Las diferencias de concentración del mismo tejido entre los animales no suplementados y suplementados con Cu fueron indicadas mediante: <sup>1</sup>  $0,05 < p < 0,1$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Fig. 2.** Box plot showing essential trace element concentration ( $\mu\text{g}\text{-mg/kg}$  wet weight) in different tissues from non-supplemented and Cu supplemented animals ( $15 \text{ mg Cu}_2\text{SO}_4/\text{kg DM}$ ). Abbreviations for tissue are as follows L: liver, K: kidney, D: diaphragm, B: brain. Different letters indicate statistically significant differences of trace element residues among the different tissues analysed within the same group of animals (control or supplemented). Differences of metal accumulation in the same tissue between non-supplemented and Cu supplemented animals were indicated as follows: <sup>1</sup>  $0,05 < p < 0,1$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



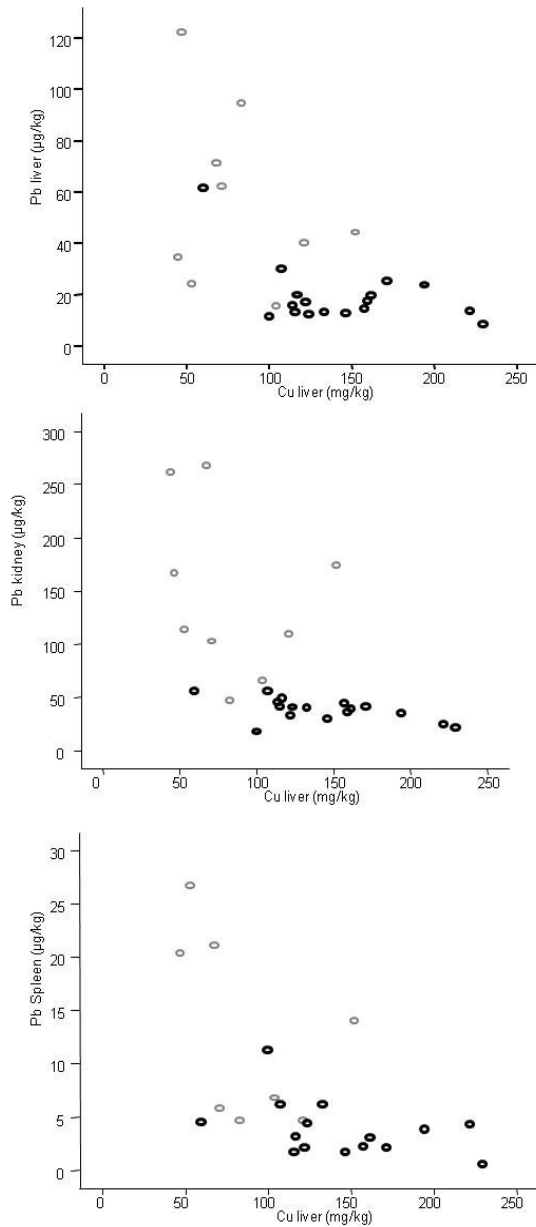
**Figura 3.** Gráficos de dispersión mostrando la relación entre las concentraciones de Cu en el hígado y las de As en el hígado, bazo y cerebro. Gris: animales del grupo suplementado, negro: animales del grupo no suplementado.

**Fig. 3.** Scatterplots showing the relationship between Cu concentrations in the liver and As in liver, spleen and brain. Grey: non-supplemented, Black: supplemented animals.



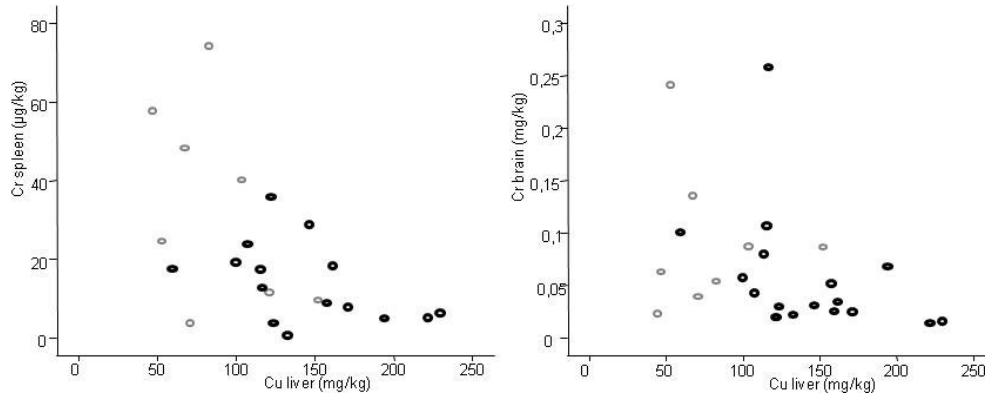
**Figura 4.** Gráficos de dispersión mostrando la relación entre las concentraciones de Cu en el hígado y las de Pb en el hígado, riñón y bazo. Gris: animales del grupo suplementado, negro: animales del grupo no suplementado.

**Fig. 4.** Scatterplots showing the relationship between Cu concentrations in the liver and Pb in liver, kidney and spleen. Grey: non-supplemented, Black: supplemented animals.



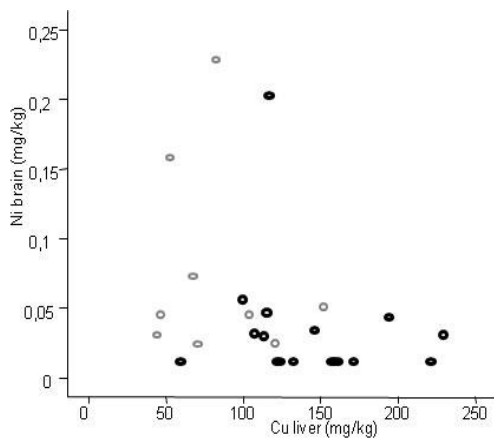
**Figura 5.** Gráficos de dispersión mostrando la relación entre las concentraciones de Cu en el hígado y las de Cr en el bazo y cerebro. Gris: animales del grupo suplementado, negro: animales del grupo suplementado.

**Fig. 5.** Scatterplots showing the relationship between Cu concentrations in the liver and Cr in spleen and brain. Grey: non-supplemented, Black: supplemented animals.



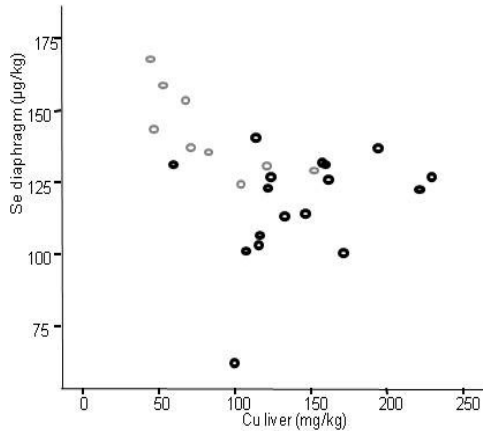
**Figura 6.** Gráficos de dispersión mostrando la relación entre las concentraciones de Cu en el hígado y las de Ni en cerebro. Gris: animales del grupo suplementado, negro: animales del grupo suplementado.

**Fig. 6.** Scatterplot showing the relationship between Cu concentrations in the liver and Ni in brain. Grey: non-supplemented, Black: supplemented animals.



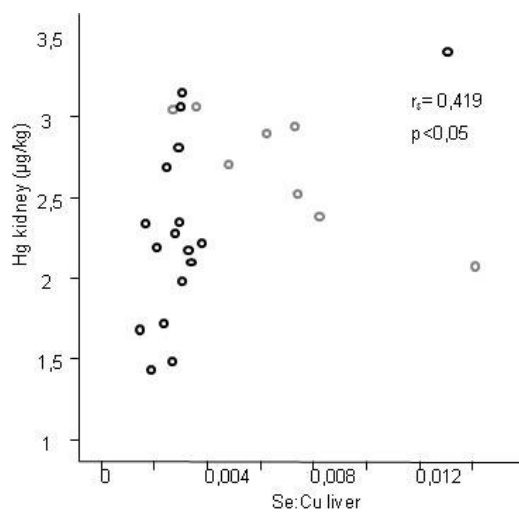
**Figura 7.** Gráficos de dispersión mostrando la relación entre las concentraciones de Cu en el hígado y las de Se en el diafragma. Gris: animales del grupo suplementado, negro: animales del grupo suplementado.

**Fig. 7.** Scatterplot showing the relationship between Cu concentrations in the liver and Se in diaphragm. Grey: non-supplemented, Black: supplemented animals.



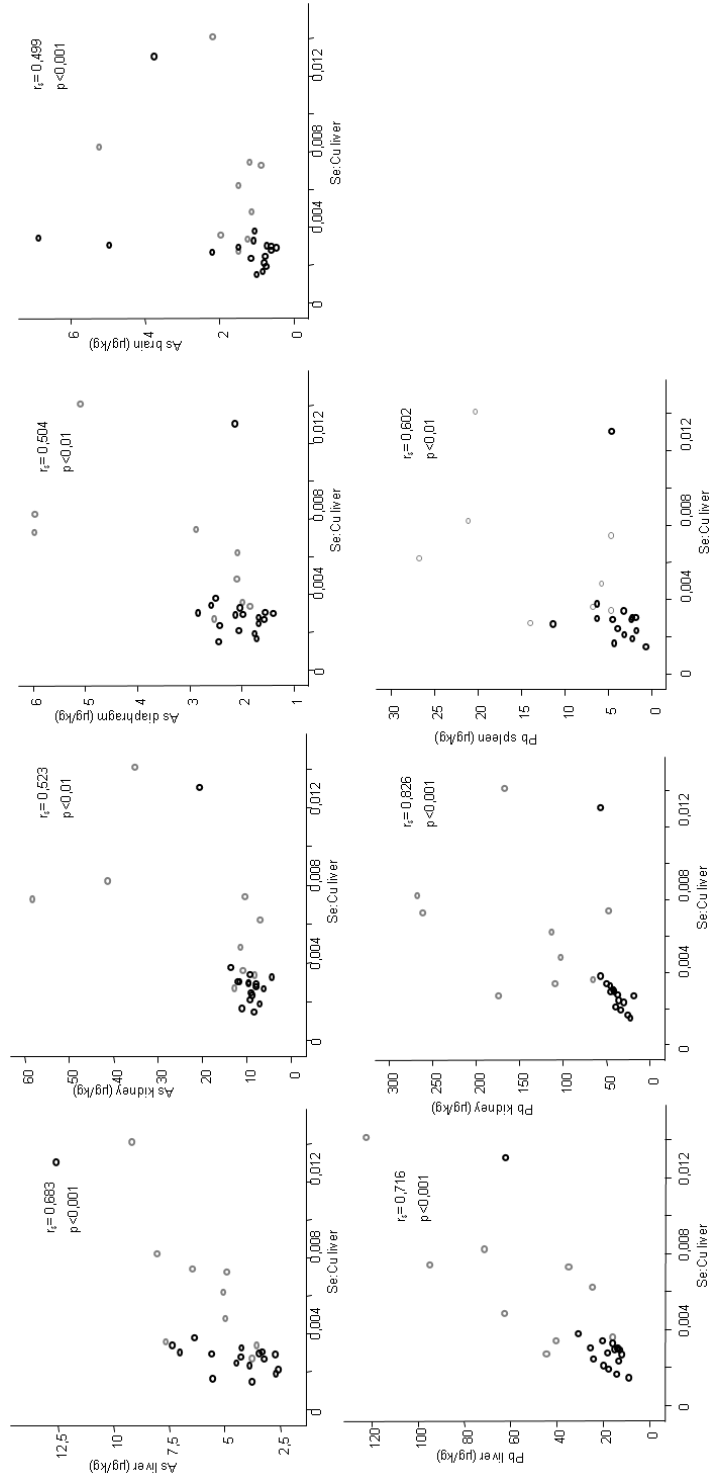
**Figura 8.** Gráficos de dispersión mostrando la relación entre las concentraciones del ratio Cu:Se en el hígado y las de Hg en riñón. rs: coeficiente de correlación de Spearman, p: probabilidad. Gris: animales del grupo suplementado, negro: animales del grupo suplementado.

**Fig. 8.** Scatterplot showing the relationship between Se:Cu ratio in the liver and Hg in kidney. rs: Spearman rank correlation coefficient, p: probability. Grey: non-supplemented, Black: supplemented animals.



**Figura 9.** Gráficos de dispersión mostrando la relación entre las concentraciones del ratio Cu:Se en el hígado y las de As (hígado, riñón, diafragma y cerebro) y Pb (hígado, riñón y bazo). rs: coeficiente de correlación de Spearman, p: probabilidad. Gris: animales del grupo suplementado, negro: animales del grupo no suplementado.

**Fig. 9.** Scatterplots showing the relationship between Se:Cu ratio in the liver and As (liver, kidney, diaphragm and brain) and Pb (liver, kidney and spleen). rs: Spearman rank correlation coefficient, p: probability. Grey: non-supplemented, Black: supplemented animals.



## **CAPÍTULO 3**

### *CHAPTER 3*

**Efecto del tipo de músculo y la suplementación con cobre sobre la concentración de metales tóxicos y esenciales en la carne de terneros**

*Effect of type of muscle and Cu supplementation on (non-essential and essential) trace element concentrations in cattle meat*



## Introducción

Comparando los datos publicados en todo el mundo acerca de la concentración de metales esenciales y no esenciales en el músculo de ganado vacuno se observa que las concentraciones de metales pueden variar del orden de 2-3 veces entre estudios (para una revisión ver Jorhem *et ál.*, 1989; López-Alonso *et ál.*, 2000a; Blanco Penedo *et ál.*, 2010) a pesar de que las concentraciones de estos mismos elementos en el hígado y riñón (los órganos utilizados más frecuentemente para evaluar el status mineral) son comparables y dentro de los rangos fisiológicos.

Es probable que las diferencias en las concentraciones de metales en la carne pudieran estar relacionadas, al menos en parte, al tipo de músculo analizado. Sin embargo, existe escasa información acerca de este hecho en los diferentes estudios y, cuando aparece, el tipo de músculo analizado no se especifica (Waegeneers *et ál.*, 2009), los análisis se han limitado a un músculo específico (por ejemplo músculo *longissimus dorsi*; en Rudy, 2009a) o cuando se han analizado múltiples tipos musculares los parámetros analizados se suelen centrar en aquellos relacionados con características de la canal (por ejemplo, las concentraciones totales de Fe en forma hemo relacionados con el color de la carne; en Patten *et ál.*, 2008). Sin embargo, estudios previos encontraron que el diafragma contenía casi el doble de Cu y Se que el músculo pectoral en ganado vacuno (López-Alonso *et ál.*, 2000a; Gutiérrez, 2009). Las diferencias en las concentraciones de metales esenciales entre los músculos podrían estar relacionadas con diferencias en su actividad metabólica, la composición (proporción de magro y grasa en el músculo) y/o la circulación de sangre entre los músculos (Langlands *et ál.*, 1987; Kauffman y Breidenstein, 1994; López-Alonso *et ál.*, 2000a). También es posible que esta variación metabólica o estructural entre los músculos pudiera dar lugar a diferencias en los residuos de elementos tóxicos entre los músculos. Aunque no hay información disponible en músculos, algunos autores describieron una mayor acumulación de Cd y Pb en el hígado del ganado vacuno lechero en comparación con el de carne, lo que podría atribuirse a un mayor metabolismo hepático y flujo sanguíneo a través del hígado asociadas a la producción de leche (López-Alonso *et ál.*, 2003).

Las diferencias de concentración de metales esenciales y no esenciales entre músculos también podrían estar relacionadas con la interacción con otros elementos de la dieta, especialmente en casos de ingesta excesiva o insuficiente de uno o más elementos. Aunque las interacciones entre elementos tóxicos y esenciales han sido estudiadas en los órganos internos (principalmente en hígado y riñón) en animales que recibieron dietas altamente contaminadas o con dosis experimentales de ciertos elementos (López-Alonso *et ál.*, 2004; Nriagu *et ál.*, 2009), se ha prestado poca atención al músculo, centrándose la investigación a nivel de este tejido únicamente en parámetros como el rendimiento de la canal o la composición nutricional (porcentaje de proteína y grasa). En un estudio reciente, realizado por nuestro grupo de investigación (García-Vaquero *et ál.*, *In press*) se observó que en el ganado vacuno de cría intensiva, la suplementación de la dieta con 15 mg de sulfato de Cu/kg de MS (nivel de

suplementación empleado de forma rutinaria en ganado vacuno de carne de cría intensiva) dio lugar a una disminución significativa de Pb y Hg en las vísceras (hígado y riñón), y también a una disminución significativa de las concentraciones de Se en el diafragma.

Teniendo en cuenta que la carne, componente esencial de la dieta humana, es una fuente importante de exposición a metales tóxicos para los seres humanos, y también una valiosa fuente de elementos esenciales (principalmente Cu, Fe, Zn y Se, López-Alonso *et ál.*, 2002) es importante explorar las concentraciones de estos elementos traza en diferentes tipos de músculos. Debido al efecto demostrado de la suplementación de Cu sobre el status mineral en el ganado bovino de carne de cría intensiva (García-Vaquero *et ál.*, *In press*), la influencia de la suplementación con Cu en la concentración de elementos traza en diferentes tipos de músculos también fue evaluado.

## **Materiales y métodos**

### Diseño experimental y recogida de muestras

Los músculos del ganado vacuno de carne de cría intensiva en los que se basa este estudio proceden de un experimento previo para evaluar el status de Cu en animales suplementados (15 mg de sulfato de Cu/kg MS) y no suplementados que reciben una típica dieta a base de concentrado durante todo el ciclo productivo. Los datos detallados del diseño experimental se presentan en García-Vaquero *et ál.* (*In press*).

Las muestras de 4 tipos de músculos (diafragma, músculo cardíaco, semitendinoso y pectoral, n = 120) de cada animal se recogieron en el matadero al final del periodo de acabado, cuando los animales tenían aproximadamente 9 meses de edad. Las muestras de diafragma (DI) y el músculo cardíaco (CA) fueron tomadas como ejemplos de los músculos activos metabólicamente, además, el DI es el músculo más comúnmente utilizado en el resto de estudios de acumulación de metales, y CA se utiliza para el consumo humano. Las muestras de los músculos semitendinoso (SE) y pectoral (PE) fueron seleccionadas por pertenecer a diferentes cortes de la canal, con una composición diferente y también más representativos de la carne que se consume; SE forma parte de la pieza 'redondo' de los cuartos traseros de los animales y su composición magra y grasa es de 27 y 13%, mientras que el PE forma parte del 'pecho', un corte del cuarto delantero de la canal con 52% y 34% de magro y grasa respectivamente (Kauffman y Breidenstein, 1994).

Todas las muestras fueron recogidas individualmente en bolsas de plástico, colocadas inmediatamente en hielo, transportadas al laboratorio y almacenadas a -18 ° C hasta su procesamiento.

### Análisis de muestras

Aproximadamente 1 g de sub-muestras fueron digeridas en 5 mL de ácido nítrico concentrado (Suprapur grade, Merck) y 3 mL de 30% w / v de peróxido de hidrógeno en un sistema de digestión por microondas (Ethos Plus; Milestone, Sorisole, Italia). Las muestras digeridas fueron transferidas a tubos de polipropileno y se diluidas a 15 mL con agua ultrapura.

Las concentraciones de los elementos no esenciales (arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb) y estaño (Sn)) y esenciales (cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), selenio (Se) y zinc (Zn)) se determinaron por espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS; VGElemental SOption PlasmaQuad).

### Analíticos de control de calidad

Se aplicó un control de calidad analítico durante todo el estudio. Los valores del blanco se leyeron junto con las muestras y fueron restados de las lecturas de las muestras antes de calcular los resultados. Los límites de detección en la digestión ácida se calcularon como tres veces la desviación estándar de los blancos (Tabla 1) y se basaron en el peso medio de la muestra analizada.

Se realizaron recuperaciones analíticas a partir de materiales de referencia certificados (CRM Pig kidney 186, BCR Materiales de Referencia, Geel, Bélgica, y Fish protein DORM-3, Consejo Nacional de Investigación, Ottawa, Ontario, Canadá) que se analizaron junto con muestras desconocidas. Hubo una buena concordancia entre los valores medidos y los certificados o indicativos (Tabla 1). Los 2 CRM usados no presentaban valores certificados para el Co, Mo y Sn y las recuperaciones analíticas de estos elementos se realizaron usando muestras adicionadas que presentaban valores 2-10 superiores a los niveles normales en el músculo. La recuperación media fue de 89, 96 y 85% respectivamente. La precisión del método analítico, calculado como la desviación estándar relativa (RSD) de las concentraciones de Co, Mo y Sn en 10 lecturas de la misma muestra estuvo entre 5,8 y 9,3%.

### Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS para Windows (v. 15.0). A las concentraciones no detectables se les asignó un valor de la mitad del límite de detección. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y por lo general no se distribuyeron normalmente, por lo que se transformaron logarítmicamente antes del análisis. Se realizó un ANOVA de dos vías para comprobar la influencia del tipo de músculo y de la suplementación con Cu en la concentración de oligoelementos en la carne. Las pruebas Post hoc de Tukey DHS se utilizaron para apreciar las diferencias en las concentraciones de metales entre los tipos de músculos. La mayoría de las muestras tenían concentraciones de Pb y Sn por debajo del límite de cuantificación, y el efecto del tipo de músculo y los suplementos de Cu en los residuos muscular fueron evaluados utilizando la

prueba exacta de Fisher para la proporción de muestras con residuos detectables. Las correlaciones entre los niveles de metales esenciales y no esenciales en las muestras de músculo (n=120) y entre las concentraciones de oligoelementos entre los distintos tipos de músculo y los de hígado y riñón (n=30) y entre los diferentes músculos entre sí (n=30) se calcularon mediante análisis de correlación de Spearman. Los datos de concentración de elementos esenciales y no esenciales en el hígado y riñón de estos animales fue previamente publicado en García-Vaquero *et ál.* (*In press*).

## Resultados y discusión

Las concentraciones de elementos tóxicos en los músculos de los terneros de este estudio aparecen reflejadas en la Figura 1 (As, Cd y Hg) y la Tabla 2 (Pb y Sn). En general, las concentraciones fueron bajas y una alta proporción de las muestras presentaron residuos no detectables (especialmente para el Pb y Sn, el 88% y 62% respectivamente) y el resto presentaron concentraciones muy cerca del límite de detección. En general, las concentraciones de elementos no esenciales en la carne del ganado vacuno en este estudio fueron similares o incluso inferiores (Cd y Pb) a los descritos en estudios previos en el ganado vacuno en nuestra región (López-Alonso *et ál.*, 2000a, 2000b, 2004; Blanco-Penedo *et ál.*, 2010) y en otros lugares (Jorhem *et ál.*, 1991; Niemi *et ál.*, 1991). Ninguna de las muestras analizadas en el estudio actual supera los niveles máximos admisibles de Cd y Pb (0,05 y 0,1 mg/kg de peso fresco respectivamente) establecidos por la Comisión Europea (European Commission, 2001, 2006). Para los restantes elementos tóxicos, la Unión Europea no ha establecido unos límites legales, pero todas nuestras muestras tenían niveles de Hg por debajo de los límites máximos establecidos en otros países como Polonia (30 g/kg de peso fresco; Zarski *et ál.*, 1997) o la República Checa (10 g/kg de peso fresco; Kottferová y Korèneková, 1995).

Las concentraciones de metales esenciales en los músculos de ganado vacuno de este estudio se presentan en la Figura 2. En general, las concentraciones de elementos traza en el DI fueron similares a las descritas para este tipo de músculo en estudios anteriores en el ganado vacuno de nuestra región (López-Alonso *et ál.*, 2004; Blanco-Penedo *et ál.*, 2010), que eran animales con un status mineral adecuado como en el presente estudio (García-Vaquero *et ál.*, *In press*) y eran comparables a los datos de otros estudios similares en otros países (para una revisión ver Jorhem *et ál.*, 1989; López-Alonso *et ál.*, 2000a). La comparación de las concentraciones de elementos esenciales para los otros tipos de músculos analizados en este estudio (CA, SE y PE) con otros previamente publicados no es posible debido a la escasa información disponible en la literatura, en la que por lo general no aparece especificado el tipo de músculo analizado (Waegeners *et ál.*, 2009), la información se refiere sólo a un músculo específico (*longissimus dorsi*, Rudy, 2009a) o datos de varios tipos de músculos en los que se estudian parámetros específicos relacionados con las características de la canal (concentraciones de Fe en forma

hemo relacionados con el color de la carne, Patten *et ál.*, 2008). Además, los rangos de normalidad para los elementos esenciales (como el Co y Mo) no están disponibles para los músculos en bovino, y cuando estos rangos se describen (Puls, 1994) no se consideran diferencias entre los distintos tipos de músculos. Por ejemplo, las concentraciones de Cu y Fe en el DI y CA en el ganado vacuno en este estudio estaban por encima del rango normal (1,2-1,5 mg Cu/kg de peso fresco; 7,5-17,5 mg Fe/kg peso fresco), mientras que en los niveles de Cu en los músculos SE y PE estaban por debajo de los niveles descritos como deficientes (1,2-1,3 mg/kg de peso fresco) por Puls (1994); las concentraciones de Se en CA estaban dentro del rango descrito como altas (0,25-0,5 mg Se/kg de peso fresco) y Cr, Mn y Ni en todos los tipos de músculos estaban por debajo de los rangos normales (0,1-0,2 mg/kg de Cr de peso fresco, 0,5-0,9 mg/kg Mn peso fresco y 0,35-0,4 mg Ni/kg).

Los resultados del ANOVA II para determinar el efecto del tipo de músculo y la suplementación con Cu sobre las concentraciones de oligoelementos en el ganado vacuno de este estudio se presentan en la Tabla 3. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de músculos para la mayoría de los elementos no esenciales y esenciales. Por el contrario, la suplementación con Cu mostró una escasa influencia sobre la concentración de oligoelementos en el tejido muscular, con diferencias estadísticamente significativas entre los animales no suplementados y suplementados con Cu sólo para las concentraciones de As, Ni y Se, si bien la ausencia de significación estadística del término suplementación\*tipo de músculo indica que las concentraciones de As, Ni y Se en los diferentes tipos de músculos mostró el mismo patrón de distribución independientemente de la concentración de Cu en la dieta.

Al analizar en detalle las concentraciones de metales en los diferentes músculos en los terneros de este estudio se observó que para la mayoría de los elementos esenciales (Co, Cu, Fe, Mn, Ni y Se) las concentraciones más altas (hasta 2-4 veces superiores) se encontraron en la CA, seguido por el DI, mientras que en SE y PE sus concentraciones fueron significativamente inferiores (Figura 2) y, en general, PE mostró las concentraciones más bajas. Por el contrario, para los demás elementos esenciales (Cr, Mo y Zn), así como los elementos tóxicos As, Cd y Hg (Figura 1) los niveles más bajos se encontraron en CA mientras que los restantes músculos mostraron concentraciones similares. No se observaron diferencias en la proporción de muestras con residuos detectables de Pb y Sn (excepto Sn en SE).

Las variaciones intermusculares en los animales de nuestro estudio son difíciles de interpretar debido a la falta de referencias bibliográficas que analicen una amplia gama de metales y tipos musculares como se mencionó anteriormente. Se ha sugerido que la mayor acumulación de Cu y Se en DI en comparación con PE en el ganado vacuno podría estar relacionado con una mayor actividad metabólica del primer músculo (López-Alonso *et ál.*, 2000a; Gutiérrez, 2009; Miranda *et ál.*, 2010). La concentración de Cu en el músculo también parece estar inversamente relacionada con el contenido de lípidos del mismo (Langlands *et ál.*, 1988) y la proporción de grasa de CA y DI es mucho menor que la de los músculos de la SE y PE (Kauffman y Breidenstein, 1994). Para comprender mejor los resultados del presente estudio

es necesaria información más detallada sobre el papel de los oligoelementos como cofactores enzimáticos en el metabolismo muscular, así como el contenido de oligoelementos en el tejido graso del ganado vacuno. Sin embargo, al evaluar las asociaciones entre los oligoelementos en las diferentes muestras de músculos de nuestro estudio (rango de Spearman ( $R_s$ ),  $n = 120$ ; Tabla 4) las fuertes correlaciones ( $R_s > 0,7$  en todos los casos) entre los principales elementos esenciales que han mostrado un patrón común de distribución intermuscular (especialmente Co, Cu, Fe, Mn y Se) podría reforzar la hipótesis de que, en situaciones de un status mineral adecuado como en este estudio, las concentraciones de elementos esenciales en el músculo dependen de su propio metabolismo interno. Para mantener la homeostasis mineral, en el músculo, así como en otros tejidos, el organismo ha desarrollado diferentes mecanismos como metalotioneínas, chaperones y otros transportadores de metales (Andrews, 2002); especial relevancia ha adquirido el transportador de metales divalentes 1 (DMT1), implicado en el transporte intracelular de metales divalentes como el Fe, Zn, Cd, Cu, Co, Ni y Pb (Gunshin *et ál.*, 1997; Mackenzie *et ál.*, 2007) y que se expresa de manera ubicua en todos los tejidos, incluyendo riñón, cerebro (Beaumont *et ál.*, 2000) y CA (Ke *et ál.*, 2003). El hecho de que algunos de los metales esenciales (Cr, Mo y Zn) no sigan el mismo patrón de distribución intermuscular podría estar relacionado con las interacciones o antagonismos para mantener un correcto equilibrio mineral. Un ejemplo bien documentado es la interacción Cu y Zn: los metales tienen propiedades químicas similares y compiten por los sitios de unión en las metalotioneínas en los tejidos, incluido el músculo (López-Alonso *et ál.*, 2004). Se ha demostrado que el desequilibrio Cu:Zn es un factor importante en la etiología de la enfermedad isquémica del CA, ya sea una deficiencia relativa o absoluta de Cu se caracteriza por una alta proporción de Zn frente al Cu, dando lugar a una hipercolesterolemia y daño miocárdico y arterial (Klevay, 1980) y un correcto manejo nutricional de Cu y Zn pueden inhibir la progresión de la hipertrofia cardíaca inducida por una restricción dietética de Cu en ratones (Kang *et ál.*, 2007). La fuerte interacción negativa Cu-Zn-Mo en los rumiantes (Underwood y Suttle, 1999) podría ayudar a explicar, al menos en parte, nuestros resultados.

No hay información disponible en la literatura científica sobre los mecanismos de eliminación de metales tóxicos en el músculo que nos permita interpretar las menores concentraciones de As y Hg en CA en comparación con los otros músculos de nuestro estudio. Sin embargo, la correlación negativa de ambos metales tóxicos con la mayor parte de metales esenciales (Tabla 4) podría sugerir que los músculos con mayor actividad metabólica podrían tener una mayor capacidad de detoxificación de metales tóxicos. En este sentido, es bien sabido que las metalotioneínas, además de estar implicadas en la regulación fisiológica de los metales (Cu y Zn), proporcionan una protección contra la toxicidad de los metales no esenciales (Nordbeg, 1998).

También hay escasa información que muestre la influencia de la suplementación con Cu sobre las concentraciones de minerales tóxicos y esenciales en el músculo del ganado vacuno u otras especies animales. La suplementación con Cu provocó una disminución estadísticamente

significativa de las concentraciones musculares de Se en los terneros de nuestro estudio, esta reducción es muy similar en todos los tipos musculares analizados (13, 14, 10 y 15% en DI, CA, SE y PE). Curiosamente, no se observó ningún efecto de la suplementación con Cu en el status de Se en el hígado y riñón, principales órganos en el metabolismo de mineral (García-Vaquero *et ál.*, *In press*). Aunque se desconocen los mecanismos de las interacciones Cu y Se, se ha demostrado que la alta ingesta de Cu reduce la absorción intestinal de Se en rumiantes, debido a la formación en el rumen de los compuestos altamente insolubles selenuro de Cu (Koenig *et ál.*, 1991), y que después de la inyección de Se, la concentración de Cu en el hígado aumentó en animales que recibieron tanto dietas normales (Hussein *et ál.*, 1985) como deficientes en Cu (Thomson y Lawson, 1970), lo que podría estar relacionado con la síntesis de metalotioneínas en el hígado después del tratamiento Se (Chmielnicka *et ál.*, 1983). El efecto de la suplementación con Cu sobre las concentraciones de Se en el músculo podría tener una relevancia clínica, ya que la falta de Se se asocia con varias enfermedades musculares que afectan tanto a CA como a los músculos esqueléticos en terneros, como la enfermedad del músculo blanco, que se caracteriza por la calcificación extensa de las fibras cardíacas y esqueléticas. La aparición de estas enfermedades está fuertemente influenciada por la dieta y la suplementación con Se es importante para evitar estos trastornos (Rederstorff *et ál.*, 2006). Por tanto, la adición de Se a la dieta cuando esta se suplementa adicionalmente con Cu o en animales que provienen de regiones en las que es probable una contaminación por Cu debido a las características del suelo o las prácticas agrícolas (López Alonso *et ál.*, 2000c; Miranda *et ál.*, 2009) podría ser relevante para el mantenimiento de la salud del animal.

Las concentraciones de Ni fueron estadística y significativamente inferiores en SE, y tendieron a disminuir ( $p < 0,1$ ) en DI de los animales del grupo suplementado con Cu (Figura 2), pero no se observaron efectos en CA o PE. A pesar de que las concentraciones de Ni disminuyeron significativamente en el cerebro de los terneros suplementados con Cu (García-Vaquero *et ál.*, *In press*), lo que podría tener algunas implicaciones en enfermedades neurodegenerativas relacionadas con priones (Zoroddu *et ál.*, 2004, 2008, 2009), las posibles repercusiones de la disminución de Ni en el músculo son completamente desconocidas.

En relación con los metales tóxicos, los residuos de As disminuyeron significativamente (26%, 28%, 36% y 36% en DI, CA, SE y PE) y los de Hg fueron en general inferiores (pero sin significación estadística) en el grupo suplementado con Cu. Las asociaciones negativas entre la suplementación con Cu y la acumulación de As y Hg que se describe también en el hígado y riñones de estos animales (García-Vaquero *et ál.*, *In press*) podría estar posiblemente relacionado con una disminución del ratio Se: Cu en los animales del grupo suplementado. Ambos metales tóxicos también presentaban correlaciones estadísticamente significativas con el ratio Se: Cu en las diferentes muestras en este estudio (datos no mostrados), lo que podría reforzar la importancia del status de ambos elementos esenciales para reducir los residuos de metales tóxicos en la carne.

Al analizar la relación entre las concentraciones de elementos no esenciales en el músculo y las del hígado y riñón (como indicadores principales de la exposición a metales) y entre los diferentes músculos sí (Tablas 5 y 6, respectivamente) se observó que los residuos de As y Hg en el hígado y riñón se relacionaron significativamente con los residuos de la mayor parte de tipos musculares, así como entre los diferentes músculos entre sí. Estos resultados indican que los residuos de metales tóxicos en el músculo, aunque bajos, son indicativos del nivel de exposición reciente en animales. Por el contrario, los residuos de Cd en el músculo no se relacionan con los del hígado y riñón que, a diferencia de otros metales tóxicos, tienen una fuerte capacidad de acumulación de Cd (Friberg *et ál.*, 1979). Aunque en general se acepta que los residuos de metales tóxicos en el músculo no están estrechamente relacionados con el nivel de exposición (López-Alonso *et ál.*, 2004; Blanco Penedo *et ál.*, 2010) algunos estudios experimentales han encontrado una fuerte correlación entre los niveles de Cd, Hg y Pb en el hígado y los músculos en ganado bovino (Rudy, 2009a) y ovino (Rudy, 2009b). Las diferencias entre los estudios podrían estar relacionados con el nivel de exposición, así como la homogeneidad de los animales (generalmente mayor en los estudios experimentales), lo que podría reducir el "ruido experimental" y así, permitir alcanzar una significación estadística.

Para los elementos esenciales, a excepción del Co en el riñón, no se encontraron asociaciones fuertes entre las concentraciones musculares y hepáticas o renales (Tabla 4). Se han observado anteriormente resultados similares en el ganado vacuno cuando se compararon las concentraciones de elementos esenciales en el hígado y el riñón con los de DI en animales procedentes de diferentes sistemas productivos (Blanco-Penedo *et ál.*, 2010), lo que indica que las concentraciones de elementos esenciales en el músculo no son indicativos del status mineral de los animales. Por el contrario, la mayoría de los elementos esenciales mostraron correlaciones significativas a nivel intermuscular (Tabla 6) y en especial de Se, que es uno de los principales micronutrientes en el metabolismo muscular. Estos resultados indican que el músculo, a diferencia del hígado y el riñón, no posee la capacidad de almacenamiento de elementos esenciales, y refuerza la hipótesis de que en casos de una ingesta dietética adecuada, las concentraciones de minerales en el músculo están más estrechamente relacionadas con la síntesis de proteínas y el tipo predominante de metabolismo en el músculo (Schricker *et ál.*, 1982).

## Conclusiones

Este estudio ha demostrado que en ganado vacuno las concentraciones de metales no esenciales y esenciales varían significativamente entre los diferentes tipos de músculos. Los músculos más activos y con menor contenido en grasa (CA y DI) mostraron, en general, mayores concentraciones de elementos esenciales y menores concentraciones de elementos no esenciales que los restantes músculos analizados (SE y PE). Los residuos de As y Hg musculares son indicativos de la exposición reciente de los animales, sin embargo, en situaciones de un adecuado status mineral, las concentraciones de elementos esenciales en el músculo son independientes del status mineral de los animales y podrían estar posiblemente relacionadas con su propio metabolismo muscular. La suplementación con Cu, a concentraciones generalmente usadas en el ganado de cría intensiva, reduce significativamente los residuos de As en el músculo, pero provocaron una disminución significativa de las concentraciones de Se, que podrían tener importancia para la salud animal.

## Accepted Manuscript

Effect of type of muscle and Cu supplementation on trace element concentrations in cattle meat

M. García-Vaquero, M. Miranda, J.L. Benedito, I. Blanco-Penedo, M. López-Alonso

PII: S0278-6915(11)00124-4

DOI: [10.1016/j.fct.2011.03.041](https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.041)

Reference: FCT 5856

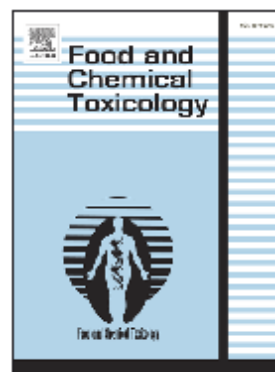
To appear in: *Food and Chemical Toxicology*

Received Date: 9 February 2011

Accepted Date: 20 March 2011

Please cite this article as: García-Vaquero, M., Miranda, M., Benedito, J.L., Blanco-Penedo, I., López-Alonso, M., Effect of type of muscle and Cu supplementation on trace element concentrations in cattle meat, *Food and Chemical Toxicology* (2011), doi: [10.1016/j.fct.2011.03.041](https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.041)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



## ***Effect of type of muscle and Cu supplementation on (non-essential and essential) trace element concentrations in cattle meat***

M. García-Vaquero<sup>a</sup>, M. Miranda<sup>b</sup>, J.L. Benedito<sup>a</sup>, I. Blanco-Penedo<sup>a</sup> and M. López-Alonso<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Patología Animal, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Spain; <sup>b</sup> Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Spain.

### **Abstract**

Considering that meat, as an essential component of the human diet, is an important source of toxic metal exposure to humans, but also a valuable source of some essential elements (mainly Cu, Fe, Zn and Se) it is important to explore trace element concentrations in different types of muscles. Because of the demonstrated effect of Cu supplementation on trace element status in intensive beef cattle, the influence of Cu supplementation on trace element concentration in different types of muscles was also evaluated. Samples of 4 different types of muscles (diaphragm, cardiac, semitendinous and pectoral muscle, n=120) from beef calves receiving typical commercial diets Cu supplemented (15 mg Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> DM) and non-supplemented were taken and acid digested. The levels of non-essential (As, Cd, Hg, Pb and Sn) and essential (Co, Cr, Fe, Mn, Mo, Ni, Se and Zn) trace elements were analysed by ICP-MS. Two way Anova tests were used to check for the influence of type of muscle and Cu supplementation on trace element concentration in meat. Post hoc DHS Tukey tests were used to test for differences in trace element concentrations among types of muscles. Spearman correlations were used to evaluate the correlations between non-essential and essential trace elements among the different types of muscle themselves and also with the liver and kidney. This study has demonstrated that in cattle non-essential and essential trace element concentrations significantly varied between muscles. The most active and less fat containing muscles (cardiac and diaphragm) showed in general the highest essential and the lowest non-essential trace element accumulation in comparison with the other muscles analyzed (semitendinous and pectoral). As and Hg muscular residues are indicative of recent animal exposure, however, in situations of an adequate mineral status, essential trace element concentrations in muscle are irrespective of the mineral status of the animal and could be possibly related to their own particular muscular metabolism. Cu supplementation, at concentrations generally used in intensive raised cattle, significantly reduced As residues in muscle but caused a significant decrease of Se concentrations, which could have significance for the animal's health.

*Keywords:* muscles; food quality; food safety; cattle; intensive system; essential and toxic metals; Cu supplementation.

\*Corresponding author. Email: marta.lopez.alonso@usc.es

## Introduction

Comparison of non-essential and essential trace element concentrations in cattle meat published in scientific literature throughout the world points out that metal concentrations can vary 2-3 fold between cattle from different studies (for review see Jorhem et al. 1989; Lopez-Alonso et al. 2000a; Blanco Penedo et al. 2010) even though essential trace element concentrations in liver and kidney (the organs most frequently used to evaluate mineral status) are comparable and within the adequate physiological ranges.

It is likely that these differences in trace element concentrations in meat could be related, at least in part, to the type of muscle analyzed. Scarce information is available in this literature and, when does appear, the type of muscle analyzed it is not specified (i.e. Waegeneers et al. 2009), the information is referred only to one specific muscle (i.e. muscle longissimus dorsi in Rudy 2009a) or data for multiple muscle types is focused on specific parameters related with carcass characteristics (i.e. total heme Fe concentrations related with meat color from Patten et al. 2008). However, previous studies found that cattle diaphragm contained nearly twice the Cu and Se concentrations than pectoral muscle (López-Alonso et al. 2000a; Gutierrez 2009). Differences in essential metal concentrations between muscles could be related to differences in metabolic activity, composition (proportion of lean and fat in the muscle) and/or blood circulation among muscles (Langlands et al. 1987; Kauffman and Breidenstein 1994; López-Alonso et al. 2000a). It is also possible that this metabolic or structural variation between muscles could lead to differences in toxic element residues between muscles. Although there is no information in meat, some authors reported a higher Cd and Pb accumulation in the liver of dairy cattle compared to beef cattle, which could be attributed to a higher hepatic metabolism and blood flow through the liver associated with milk production (López-Alonso et al. 2003).

Differences in non-essential and essential trace element concentrations in muscle could also be related to interactions with other elements of the diet, especially when an excessive or insufficient input of one or more elements is present. Although toxic and trace element interactions have been very well studied in internal organs (mainly liver and kidney) from animals receiving naturally high polluted or experimentally dosed diets (López-Alonso et al. 2004; Nriagu et al. 2009), little attention was paid to muscle, where most research effort has been focused on carcass performance or nutritional composition (i.e. protein and fat). In a very recent study carried out by our research group (García-Vaquero et al. in press) it was found that in intensively reared beef cattle, supplementation of 15 mg Cu sulphate kg<sup>-1</sup> DM in the diet (a routinely Cu supplementation in intensive beef cattle all over the world) led to a significant decrease in As, Pb and Hg residues in offal (liver and kidney) but also to a significant decrease of Se concentrations in the diaphragm.

Considering that meat, as an essential component of the human diet, is an important source of toxic metal exposure to humans , but also a valuable source of some essential elements

(mainly Cu, Fe, Zn and Se; López-Alonso et al. 2002) it is important to explore trace element concentrations in different types of muscles. Because of the demonstrated effect of Cu supplementation on trace element status in intensive beef cattle (García-Vaquero et al. in press), the influence of Cu supplementation on trace element concentration in different types of muscles was also evaluated.

## Materials and methods

### Experimental design and sample collection

Beef cattle muscle tissues on which this study is based were from a previous experiment to evaluate Cu status in supplemented (15 mg Cu sulphate kg<sup>-1</sup> DM) and non-supplemented beef cattle receiving a typical commercial Spanish feedlot diet during the whole productive cycle. Detailed data of the experimental design are presented in García-Vaquero et al. (in press).

Samples of 4 different types of muscles (diaphragm, cardiac, semitendinous and pectoral muscle, n=120) of each animal were collected at the time of slaughter at the end of the finishing period when animals were approximately 9 months old. Samples of diaphragm (DI) and cardiac muscle (CA) were taken as examples of metabolically active muscles; in addition, DI was the most common muscle used in monitoring studies, and CA is used for human consumption. Samples of semitendinous (SE) and pectoral (PE) muscles were collected belonging to different cuts of the carcass, with different composition and thus are more representative of the meat consumed; SE is part of the 'round' from the hindquarter of the animals and the lean and fat composition is of 27 and 13%, while PE is part of the 'brisket', a cut of the forequarter of the carcass with 52% and 34% of lean and fat respectively (Kauffman and Breidenstein 1994).

All samples were packed individually in plastic bags, immediately placed on ice, transported to the laboratory where they were stored at -18°C until processing.

### Sample analysis

Approximately 1 g of sub-samples were digested in 5 ml of concentrated nitric acid (Suprapur grade, Merck) and 3 ml of 30% w/v hydrogen peroxide in a microwave digestion system (Ethos Plus; Milestone, Sorisole, Italy). Digested samples were transferred to polypropylene sample tubes and diluted to 15 ml with ultrapure water.

The concentrations of non-essential (arsenic (As), cadmium (Cd), mercury (Hg), lead (Pb) and tin (Sn)) and essential (cobalt (Co), chromium (Cr), copper (Cu), iron (Fe), magnesium (Mg), manganese (Mn), molibdenum (Mo), nickel (Ni), selenium (Se) and zinc (Zn)) trace elements were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; VGEElemental PlasmaQuad SOption).

### Analytical quality control

An analytical quality control was applied throughout the study. Blank absorbance values were run alongside samples and these values were subtracted from the readings before the results were calculated. The limits of detection in the acid digest were calculated as three times the standard deviation of the reagent blanks (Table 1) and were based on the mean sample weight analysed.

Analytical recoveries were determined from certified reference materials (pig kidney CRM 186, BCR Reference Materials, Geel, Belgium; and fish protein DORM-3 National Research Council, Ottawa, Ontario, Canada) that were analysed alongside unknowns. There was a good agreement between the measured and the certified or indicative values (Table 1). The two CRM used were not certified for Co, Mo and Sn and analytical recoveries were determined for these elements using samples spiked at a concentration that gave absorbance values 2-10 times greater than the normal levels in muscle. Mean recoveries were 89, 96 and 85% respectively. The precision of the analytical method, calculated as the relative standard deviation (RSD) of Co, Mo and Sn concentrations in 10 digestions of the same sample, were between 5,8 and 9,3%.

### Statistical analysis

All statistical analyses were done using the program SPSS for Windows (v. 15.0). Non-detectable concentrations were assigned a value of half the detection limit. Data was tested using Kolmogorov-Smirnov test and were generally not normally distributed, therefore were log transformed before analysis. Two way Anova tests were used to check for the influence of type of muscle and Cu supplementation on trace element concentration in meat. Post hoc DHS Tukey tests were used to test for differences in trace element concentrations among types of muscles. Most samples had Pb and Sn concentrations below the quantification limit, and the effect of type of muscle and Cu supplementation on muscle residues were evaluated by using a Fisher's exact test for the proportion of samples with detectable residues. The significance of correlations between the levels of non-essential and essential trace elements in the whole muscle samples (n=120) and between trace element concentrations in the different types of muscle and those of liver and kidney (n=30) and between different muscles themselves (n=30) were calculated using Spearman rank correlation analysis. Data of liver and kidney trace element concentrations have been published in García-Vaquero et al. (*In press*).

## Results and discussion

Non-essential trace element concentrations in cattle muscles in this study are presented in Figure 1 (As, Cd and Hg) and Table 2 (Pb and Sn). Overall, metal concentrations were low and a high proportion of samples had undetectable residues (especially for Pb and Sn, 88% and 62% respectively) and the remainder had concentrations very close to the detection limit. In

general, non essential trace element concentrations in cattle meat in this study were similar or even lower (Cd and Pb) to those described in previous studies in cattle in our region (López-Alonso et al. 2000a, 2000b, 2004; Blanco-Penedo et al. 2010) and elsewhere (Jorhem et al. 1991; Niemi et al. 1991). None of the samples analyzed in the current study exceeded the maximum admissible levels of Cd and Pb (0,05 and 0,1 mg kg<sup>-1</sup> wet weight respectively) established by the European Commission (European Commission 2001; European Commission 2006). For the other toxic elements, no statutory limits have been established by the EC, but all our samples have Hg residues below the maximum limits established by Poland (30 µg kg<sup>-1</sup> wet weight; Zarski et al. 1997) or the Slovak Republic (10 µg kg<sup>-1</sup> wet weight; Kottferová and Korèneková 1995).

Essential trace element concentrations in cattle muscles in this study are presented in Figure 2. In general, trace element concentrations in the DI were similar to those described for this type of muscle in previous studies in cattle in our region (López-Alonso et al. 2004; Blanco-Penedo et al. 2010), which were animals with an adequate mineral status, as in this study (García-Vaquero et al. in press) and had close results compared with data from other similar studies in other countries (for review see Jorhem et al. 1989; López-Alonso et al. 2000a). A comprehensive comparison of trace element concentrations in the other types of muscles analyzed in this study (CA, SE and PE muscles) with published data is not possible since scarce information is available in the literature and, when it does appear, the type of muscle analyzed it is not specified (i.e. Waegeners et al. 2009), the information is referred only to one specific muscle (i.e. muscle longissimus dorsi in Rudy 2009a) or data for multiple muscle types is focused on specific parameters related with carcass characteristics (i.e. total heme Fe concentrations related with meat color from Patten et al. 2008). In addition, adequate essential trace element (Co, Mo) concentrations are not available in literature for cattle muscles, and when described (Puls 1994) no differences between types of muscles are considered. For example, Cu and Fe concentrations in the DI and CA in cattle in this study were above the normal range (1,2-1,5 mg Cu kg<sup>-1</sup> wet weight; 7,5-17,5 mg Fe kg<sup>-1</sup> wet weight), whereas in Cu levels in SE and PE muscles were below the levels described as deficient (1,2-1,3 mg kg<sup>-1</sup> wet weight) by Puls (1994); CA Se concentrations were within the range described as high (0,25-0,5 mg Se kg<sup>-1</sup> wet weight) and Cr, Mn and Ni concentrations in all muscle types were below the normal ranges (0,1-0,2 mg Cr kg<sup>-1</sup> wet weight, 0,5-0,9 mg Mn kg<sup>-1</sup> wet weight and 0,35-0,4 mg Ni kg<sup>-1</sup>).

The results of the two way ANOVA to determine the effect of the type of muscle and Cu supplementation on trace element concentrations in cattle muscle in this study are presented in Table 3. There were statistically significant differences between types of muscles for most non essential and essential trace elements. On the contrary, Cu supplementation showed a low influence on trace element concentration in the muscular tissue, statistically significant differences between non supplemented and Cu supplemented calves were only found for As, Ni and Se concentrations, even though the absence of statistical significance of the term type

of muscle\*Cu supplementation in the analysis indicates that As, Ni and Se concentrations in the different types of muscles showed the same distribution pattern independently of the Cu concentration in the diet.

When analyzing in detail trace metal concentrations in the different muscles in cattle during this study it was observed that for most of the essential elements (Co, Cu, Fe, Mn, Ni and Se) the higher concentrations (up to 2 and 4 times) were found in the CA, followed by the DI, whereas in the SE and PE muscles metal concentrations were significantly lower (Figure 2) and in general, the PE muscle showing the lowest metal concentrations. On the contrary, for the other essential elements (Cr, Mo and Zn), as well as the toxic elements As, Cd and Hg (Figure 1) the lowest levels were found in the CA whereas the other muscles showed similar trace element concentrations. No differences in the proportion of samples with detectable residues of Pb and Sn (except Sn in the SE) were found.

The intermuscular variations in trace element content in our cattle are difficult to interpret due to the lack of studies involving various metals and types of muscle, as previously mentioned. It has been suggested that the higher Cu and Se concentrations of the DI compared to the PE muscle in cattle could be related to a higher metabolic activity of the former (López-Alonso et al. 2000a; Gutiérrez 2009; Miranda et al. 2010). Cu concentrations in muscle also appeared to be inversely related to muscle lipid content (Langlands et al. 1988) and the fat proportion of CA and DI is much lower than that for the SE and PE muscles (Kauffman and Breidenstein 1994). More detailed information on the role of the trace elements as enzymatic co-factors in the intermediate muscle metabolism, as well as the trace element content of cattle fat should be necessary to better understand/discuss our results. However, when evaluating the associations between trace elements in the different muscle samples in our study (by using the Spearman Rank coefficient ( $R_s$ ),  $n=120$ ; Table 4) the strong relationships ( $R_s > 0.7$  in all cases) between the main essential elements that have shown a common intermuscular distribution pattern (especially Co, Cu, Fe, Mn and Se) could reinforce the hypothesis that, in situations of an adequate mineral status as in this study, trace element concentrations in the muscle are dependent of its own internal metabolism. To maintain the mineral homeostasis, in the muscle as well as in other tissues, the organism have developed different mechanisms as metallothioneins, chaperones and other metal transporters (Andrews 2002); special relevance has acquired the divalent metal transporter 1 (DMT1), involved in the traffic into the cells of divalent metals such as Fe, Zn, Cd, Cu, Co, Ni and Pb (Gunshin et al. 1997; Mackenzie et al. 2007) and that is ubiquitously expressed in all tissues including kidney, brain (Beaumont et al. 2000) and CA (Ke et al. 2003). The fact that some of the essential metals (Cr, Mo and Zn) do not follow the same intermuscular distribution pattern could be related to metal interactions or antagonisms to maintain a correct mineral balance. One well documented example is the Cu and Zn interaction: both metals have similar chemical properties and compete for the binding sites of metallothionein in the tissues, included the muscle (López-Alonso et al. 2004). It has been demonstrated that a Cu:Zn imbalance is a major

factor in the etiology of ischemic CA disease, either a relative or absolute Cu deficiency characterized by a high ratio of Zn to Cu, results in hypercholesterolemia and myocardial and arterial damage (Klevay 1980) and a correct Cu and Zn nutritional management can inhibit progression on dietary copper restriction-induced cardiac hypertrophy in mice (Kang et al. 2007). The Cu-Zn-Mo strong negative interactions in ruminants (Underwood and Suttle 1999) could help to explain, at least in part, our results.

No information is available in scientific literature about the mechanisms of toxic metal detoxification in the muscle that allows us to discuss/interpret the lower As and Hg metal residues in the CA muscle compared to the other muscles in our study. However, the negative correlations of both toxic metals with most essential trace elements (Table 4) could suggest that muscles with more metabolic activity could have a greater capacity to toxic metal detoxification. In this sense, it is well known that metallothionein, as well as being involved in the regulation of physiological metals (Cu and Zn), provide essential protection against metal toxicity (Nordbeg 1998).

As far as we are aware there also appears to be a lack of studies showing the influence of Cu supplementation on non-essential and essential trace mineral concentrations in muscle in cattle or other livestock species. Cu supplementation significantly decreased muscular Se concentrations in cattle in our study, this reduction being very similar in all types of muscles analyzed (13, 14, 10 and 15% in DI, CA, SE and PE). Interestingly, no effect of Cu supplementation was observed on the Se status in the liver and kidney, the main organs for mineral metabolism (Garcia Vaquero et al. in press). Although the mechanisms of Cu and Se interactions are unknown, it has been demonstrated that high Cu intakes reduce intestinal absorption of Se in ruminants, due to the formation in the rumen of highly insoluble Cu selenide compounds (Koenig et al. 1991), and that after the injection of Se, Cu concentration in the liver increased in animals receiving both normal (Hussein et al. 1985) or Cu deficient diets (Thomson and Lawson 1970), which could be related to metallothionein synthesis in the liver after Se treatment (Chmielnicka et al. 1983). The effect of Cu supplementation on Se concentrations in muscle could have a clinical relevance, since a lack of Se was associated with several muscular diseases affecting both CA and skeletal muscles in cattle, like the white muscle disease, characterized by extensive calcification of cardiac and skeletal fibers. The emergence of these diseases is strongly influenced by diet and Se supplementation is important to avoid these disorders (Rederstorff et al. 2006). Thus, the addition of Se to the diet when Cu is supplemented in the feed or in regions in which a Cu contamination is likely to occur due to soil characteristics or agricultural practices (Lopez Alonso et al. 2000c; Miranda et al. 2009) could be relevant for the maintenance of the animal's health.

Ni concentrations were statistically significantly lower in the SE muscle, and tend to decrease ( $p < 0.1$ ) in the DI of Cu supplemented animals (Figure 2), but no effects were observed in the CA or PE. Even though Ni concentrations significantly decreased in the brain of the Cu supplemented calves (García-Vaquero et al. in press), which could have some implications in

neurodegenerative disorders related to prions (Zoroddu et al. 2004, 2008, 2009), the possible repercussions of Ni concentrations in the muscle are completely unknown.

In relation to the toxic metals, As residues significantly decreased (26%, 28%, 36% and 36% in DI, CA, SE and PE) and Hg were in general lower (but without statistical significance) in the Cu supplemented group. Negative associations between Cu supplementation and As and Hg accumulation were also described in liver and kidney of these animals (García-Vaquero et al. in press) and could be possibly related to a decrease in the Se:Cu ratio in the Cu supplemented animals. Both toxic metals were also significantly associated with the Se:Cu ratio in the different samples in this study (data not shown), which could reinforce the importance of both essential element status to reduce the toxic metal residues in meat.

When analyzing the relationship between non-essential trace elements residues in the muscle and those in the liver and kidney (as main indicators of metal exposure) and between the different muscles themselves (Tables 5 and 6, respectively) it was observed that As and Hg residues in the liver and kidney were significantly related with those in most muscle types, as well as between the different muscles. These results indicate that toxic metal residues in muscle, although low, are indicative of the level of recent animal exposure. On the contrary, Cd residues in the muscle are not related to those in the liver and kidney which, on the contrary to the other toxic metals, have a strong Cd accumulation capacity (Friberg et al. 1979). Although it is generally accepted that toxic element residues in muscle are not closely related to the level of exposure (López-Alonso et al. 2004; Blanco-Penedo et al. 2010) some experimental studies have found a strong correlation between Cd, Hg and Pb concentrations in the liver and muscle in cattle (Rudy 2009a) and sheep (Rudy 2009b). Differences between studies could be related to the level of exposure as well as the homogeneity of the animals (generally higher in experimental studies), which could reduce the “experimental noise” and so, allow the statistical analysis to reach significance.

For the essential trace elements, with the exception of Co in the kidney, no strong associations between muscular and hepatic or renal concentrations were found (Table 4). Similar results have been previously observed in cattle when comparing essential trace element concentrations in the liver and kidney with those in the DI in animals from different production systems (Blanco-Penedo et al. 2010), indicating that essential trace element concentrations in muscle are not indicative of mineral status. On the contrary, most essential elements showed significant inter-muscular correlations (Table 6) and in special Se, which is one of the main micronutrients in the muscular metabolism. These results indicate that muscle, unlike the liver and kidney, does not have essential trace element storage capacity, and reinforce the hypothesis that at adequate dietary intakes, mineral concentrations in muscle may be most closely related to protein synthesis and the predominant type of metabolism in the muscle (Schricker et al. 1982).

## **Conclusions**

This study has demonstrated that in cattle non-essential and essential trace element concentrations significantly varied between muscles. The most active and less fat content muscles (CA and DI) showed in general the highest essential and the lowest non-essential trace element accumulation in comparison with the other muscles analyzed (SE and PE). As and Hg muscular residues are indicative of recent animal exposure, however, in situations of an adequate mineral status, essential trace element concentrations in muscle are irrespective of the mineral status of the animal and could be possibly related to their own particular muscular metabolism. Cu supplementation, at concentrations generally used in intensively raised cattle, significantly reduced As residues in muscle but caused a significant decrease of Se concentrations, which could have significance for the animal health.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the Xunta de Galicia (Spain) through contract 07MRU030261PR and by the research grant María Barbeito awarded to García-Vaquero M. by the Dirección Xeral de Investigación, Desenvolvemento e Innovación from Xunta de Galicia. The authors thank Betiana Andrea Gutiérrez and Isabel Blanco Penedo for samples collection and Lucia Iglesias Casanova for technical assistance.

**Bibliografía/References**

- Andrews NC. 2002. Metal transporters and disease. *Curr Opin Chem Biol.* 6(2):181-186.
- Beaumont C, Bourgeois M, Martin ME, Tchernitchko D. 2000. Expression of the two isoforms of the iron transporter Nramp2/DMT1. *Blood.* 96:227a.
- Blanco-Penedo I, López-Alonso M, Miranda M, Hernández J, Prieto F, Shore RF. 2010. Non-essential and essential trace element concentrations in meat from cattle reared under organic, intensive or conventional production systems. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 27(1):36-42.
- Chmielnicka J, Bem EM, Kaszubski P. 1983. Organ and subcellular distribution of selenium in rats exposed to cadmium, mercury, and selenium. *Environ Res.* 1(2):273-278.
- European Commission 2001. Commission Regulation of 8 March 2001. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (EC No 466/2001).
- European Commission 2006. Commission Regulation of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (EC No 1881/2006).
- Friberg L, Kjelltröm T, Nordberg GF, Piscator M. 1979. Handbook on the toxicology of metals. Cadmium. Amsterdam. Elsevier. Friberg L, Nordberg GF, Vouk VB. Chapter 23, Cadmium; p. 355-381.
- García-Vaquero, M., Miranda, M., López-Alonso, M., Castillo, C., Benedito, J.L., 2010. In press. Evaluation of the need of copper supplementation in intensively reared beef cattle. doi:10.1016/j.livsci.2010.11.002.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 388(6641):482-488.
- Gutiérrez B. 2009. Efecto de la raza sobre la acumulación de Cu en terneros de cebo. [Dissertation]. Universidade de Santiago de Compostela (USC).
- Hussein KSM, Jones BE, Frank A. 1985. Selenium copper interaction in goats. *Zbl Vet Med A.* 32:321-330.
- Jorhem L, Slorach S, Sundström B, Ohlin B. 1991. Lead, cadmium, arsenic and mercury in meat, liver and kidney of Swedish pigs and cattle in 1984-88. *Food Addit Contam.* 8(2):201-211.
- Jorhem L, Sundstrom B, Astrand C, Haegglund G. 1989. The levels of zinc, copper, manganese, selenium, chromium, nickel, cobalt, and aluminium in the meat, liver and kidney of Swedish pigs and cattle. *Z Lebensm Unters Forsch.* 188:39-44.
- Kang YJ, Jiang Y, Saari JT. 2007. Changes in copper and zinc status and response to dietary copper deficiency in metallothionein-overexpressing transgenic mouse heart. *J Nutr Biochem.* 18(11):714-718.

Kauffman RG, Breidenstein BC. 1994. Muscle foods : meat, poultry and seafood technology. London: Chapman & Hall. Chapter, Meat animal composition and its measurements; p. 224-247.

Ke Y, Chen YY, Chang YZ, Duan XL, Ho KP, Jiang DH, Wang K, Qian ZM. 2003. Post-transcriptional expression of DMT1 in the heart of rat. *J Cell Physiol.* 196(1):124-130.

Klevay LM. 1980. Interactions of copper and zinc in cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci.* 355:140-151.

Koenig KM, Buckley WT, Shelford JA. 1991. True absorption of selenium in dairy cows: stable isotope tracer methodology and effect of dietary copper. *Can J Anim Sci.* 71:175-183.

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(3):400-405.

Langlands JP, Donald GE, Bowles JE. 1988. Cadmium concentrations in liver, kidney and muscle in Australian sheep and cattle. *Aust J Exp Agric.* 28:291-297.

Langlands JP, Donald GE, Smith AJ. 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.

López-Alonso M, Benedito JL, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Shore RF. 2000 a. Arsenic, cadmium, lead, copper and zinc in cattle from Galicia, NW Spain. *Sci Total Environ.* 246(2-3):237-248.

López-Alonso M, Benedito JL, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Shore RF. 2000 b. The effect of pig farming on copper and zinc accumulation in cattle in Galicia (north-western Spain). *Vet J.* 160(3):259-266.

López-Alonso M, Benedito JL, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Shore RF. 2000 c. Toxic and trace elements in liver, kidney and meat from cattle slaughtered in Galicia (NW Spain). *Food Addit Contam.* 17(6):447-457.

López-Alonso M, Benedito JL, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Shore RF. 2002. Contribution of cattle products to dietary intake of trace and toxic elements in Galicia, Spain. *Food Addit Contam.* 19(6):533-541.

López-Alonso M, Prieto Montaña F, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Benedito JL. 2003. Cadmium and lead accumulation in cattle in NW Spain. *Vet Hum Toxicol.* 45(3):128-130.

López-Alonso M, Prieto Montaña F, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Luis Benedito J. 2004. Interactions between toxic (As, Cd, Hg and Pb) and nutritional essential (Ca, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Zn) elements in the tissues of cattle from NW Spain. *Biometals.* 17(4):389-397.

- Mackenzie B, Takanaga H, Hubert N, Rolfs A, Hediger MA. 2007. Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1). *Biochem J.* 403(1):59-69.
- Miranda M, Benedito JL, Blanco-Penedo I, López-Lamas C, Merino A, López-Alonso M. 2009. Metal accumulation in cattle raised in a serpentine-soil area: relationship between metal concentrations in soil, forage and animal tissues. *J Trace Elem Med Biol.* 23(3):231-238.
- Miranda M, Gutiérrez B, Benedito JL, Blanco-Penedo I, García-Vaquero M, López-Alonso M. 2010. Influence of breed on blood and tissue copper status in growing and finishing steers fed diets supplemented with copper. *Arch Anim Nutr.* 64(2):98-110.
- Niemi A, Venäläinen ER, Hirvi T, Hirn J, Karppanen E. 1991. The lead, cadmium and mercury concentrations in muscle, liver and kidney from Finnish pigs and cattle during 1987-1988. *Z Lebensm Unters Forsch.* 192(5):427-429.
- Nordbeg M. 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta.* 46(2):243-254.
- Nriagu J, Boughanen M, Linder A, Howe A, Grant C, Rattray R, Vutchkov M, Lalor G. 2009. Levels of As, Cd, Pb, Cu, Se and Zn in bovine kidneys and livers in Jamaica. *Ecotoxicol Environ Saf.* 72(2):564-571.
- Patten LE, Hodgen JM, Stelzleni AM, Calkins CR, Johnson DD, Gwartney BL. 2008. Chemical properties of cow and beef muscles: benchmarking the differences and similarities. *J Anim Sci.* 86(8):1904-1916.
- Puls R. 1994. *Mineral levels in Animal Health.* Clearbrook: Sherpa International.
- Rederstorff M, Krol A, Lescure A. 2006. Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function. *Cell Mol Life Sci.* 63(1):52-69.
- Rudy M. 2009a. Correlation of lead, cadmium and mercury levels in tissue and liver samples with age in cattle. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 26(6):847-853.
- Rudy M. 2009b. The analysis of correlations between the age and the level of bioaccumulation of heavy metals in tissues and the chemical composition of sheep meat from the region in SE Poland. *Food Chem Toxicol.* 47(6):1117-1122.
- Schricker BR. 1982. Content of Zinc in selected muscles from beef, pork and lamb. *J Food Sci.* 47:1020.
- Thomson GG, Lawson BM. 1970. Copper and selenium interaction in sheep. *N Z Vet J.* 18:79-82.
- Underwood EJ, Suttle NF. 1999. *The Mineral Nutrition of Livestock.* 3rd ed. Wallingford (UK): CAB International.

Waegeneers N, Pizzolon JC, Hoenig M, De Temmerman L. 2009. Accumulation of trace elements in cattle from rural and industrial areas in Belgium. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 26(3):326-332.

Zarski TP, Zarska H, Samek M, Siluk I. 1997. Mercury contamination of the tissues of cattle from various regions of Poland. *Vet Med.* 20:107-111.

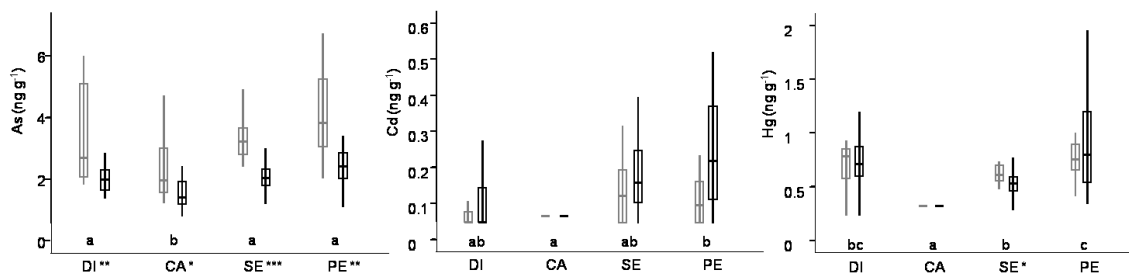
Zoroddu MA, Kowalik-Jankowska T, Medici S, Peana M, Kozlowski H. 2008. Copper(II) binding to Cap43 protein fragments. *Dalton Trans.* 28(44):6127-6134.

Zoroddu MA, Medici S, Peana M. 2009. Copper and nickel binding in multi-histidinic peptide fragments. *J Inorg Biochem.* 103(9):1214-1220.

Zoroddu MA, Peana M, Kowalik-Jankowska T, Kozlowski H, Costa M. 2004. Nickel(II) binding to Cap43 protein fragments. *J Inorg Biochem.* 98(6):931-939.

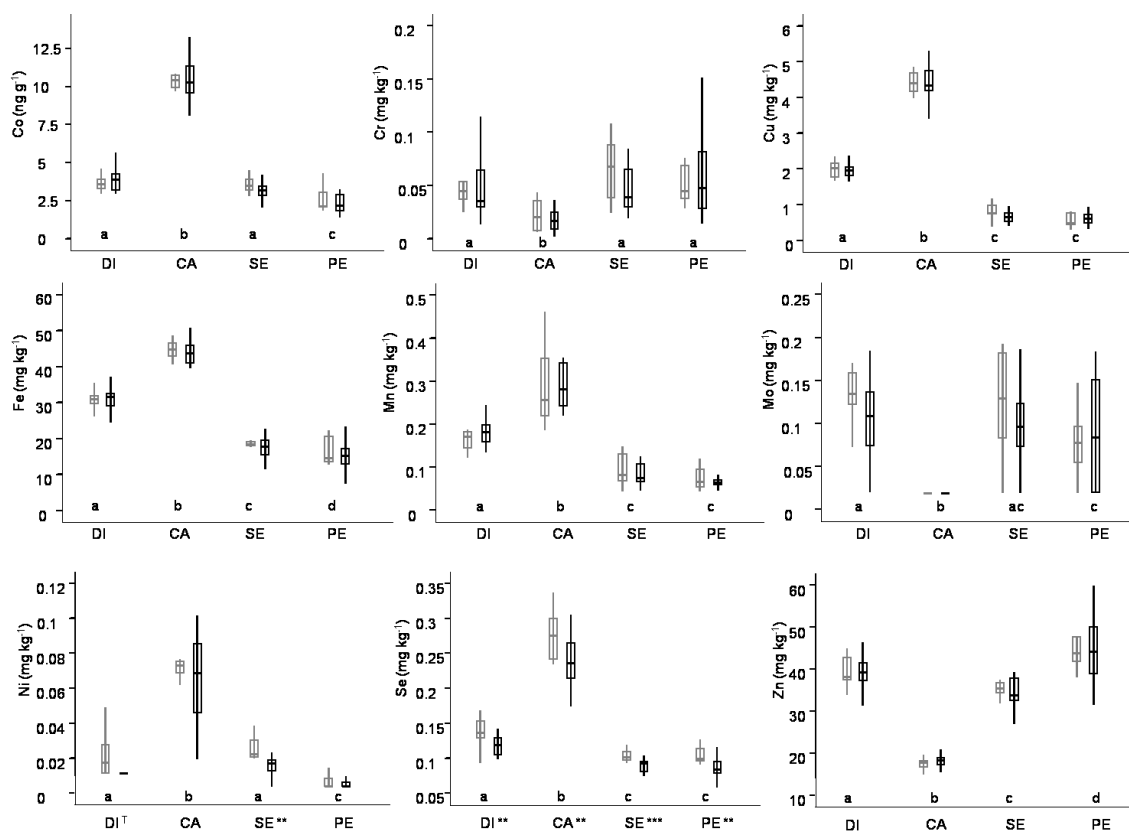
**Figura 1.** Diagramas de cajas mostrando las concentraciones de As, Cd y Hg en músculos de animales no suplementados y suplementados con Cu. Las abreviaturas de los diferentes músculos son: DI: Diafragma, CA: músculo cardíaco, SE: músculo semitendinoso, PE: músculo pectoral. Letras diferentes indican diferencias de concentración estadísticamente significativas de concentración de metales entre músculos. Las diferencias de acumulación de metales dentro del mismo tipo de músculo entre animales del grupo control (gris) y suplementado (negro) fueron indicadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Fig. 1.** Box plot showing As, Cd and Hg concentrations in muscles from non-supplemented and Cu supplemented animals. Abbreviations for muscles are as follows DI: Diaphragm, CA: cardiac muscle, SE: semitendinous muscle, PE: pectoral muscle. Different letters indicate statistically significant differences of trace element residues among muscles. Differences of metal accumulation in the same tissue between non-supplemented (grey colour) and Cu supplemented (black colour) animals were indicated as follows: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura 2.** Diagramas de cajas mostrando las concentraciones de elementos esenciales en músculos de animales no suplementados y suplementados con Cu. Las abreviaturas de los diferentes músculos son: DI: Diafragma, CA: músculo cardíaco, SE: músculo semitendinoso, PE: músculo pectoral. Letras diferentes indican diferencias de concentración estadísticamente significativas de concentración de metales entre músculos. Las diferencias de acumulación de metales dentro del mismo tipo de músculo entre animales del grupo control (gris) y suplementado (negro) fueron indicadas como T 0,05<p<0,1, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

**Fig. 2.** Box plot showing essential trace element concentration in muscles from non supplemented and Cu supplemented animals. Abbreviations for muscles are as follows DI: Diaphragm, CA: cardiac muscle, SE: semitendinous muscle, PE: pectoral muscle. Different letters indicate statistically significant differences of trace element residues among muscles. Differences of metal accumulation in the same tissue between non-supplemented (grey colour) and Cu supplemented (black colour) animals were indicated as follows: T 0,05<p<0,1, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.



**Tabla 1.** Resultados del programa de calidad analítico empleado para la determinación de metales no esenciales y esenciales. Los números entre paréntesis son valores indicativos.

**Table 1.** Results of the analytical quality control programme (expressed mean  $\pm$  SD) as used in the determination of non-essential and essential trace elements. Numbers in brackets are indicative values.

	Certified reference materials					
	Blank (n=10)	Detection limit	CRM 186		DORM-3	
			Certified levels	Analysed levels	Certified levels	Analysed levels
( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	( $\text{mg kg}^{-1}$ )	( $\text{mg kg}^{-1}$ )	( $\text{mg kg}^{-1}$ )	( $\text{mg kg}^{-1}$ )	
As	0,128 $\pm$ 0,006	0,0003	0,063 $\pm$ 0,009	0,0523 $\pm$ 0,0142	6,88 $\pm$ 0,300	6,07 $\pm$ 0,38
Cd	-0,005 $\pm$ 0,002	0,0001	2,71 $\pm$ 0,15	3,25 $\pm$ 0,63	0,290 $\pm$ 0,020	0,276 $\pm$ 0,031
Co	0,025 $\pm$ 0,004	0,0002	-	0,109 $\pm$ 0,017	-	0,224 $\pm$ 0,033
Cr	0,916 $\pm$ 0,034	0,0014	(0,058-0,142)	0,067 $\pm$ 0,142	1,89 $\pm$ 0,17	1,20 $\pm$ 0,24
Cu	8,42 $\pm$ 0,71	0,0304	31,9 $\pm$ 0,4	39,9 $\pm$ 6,3	15,5 $\pm$ 0,63	15,5 $\pm$ 2,3
Fe	-1,88 $\pm$ 3,06	0,136	299 $\pm$ 10	331 $\pm$ 36	347 $\pm$ 20	247 $\pm$ 31
Hg	0,024 $\pm$ 0,004	0,0002	1,97 $\pm$ 0,04	1,91 $\pm$ 0,21	0,382 $\pm$ 0,060	0,281 $\pm$ 0,037
Mn	0,229 $\pm$ 0,037	0,0016	8,5 $\pm$ 0,3	8,87 $\pm$ 1,51	-	2,06 $\pm$ 0,58
Mo	0,282 $\pm$ 0,107	0,0048	-	4,39 $\pm$ 0,79	-	0,644 $\pm$ 0,359
Ni	5,04 $\pm$ 0,06	0,0025	(0,420)	1,073 $\pm$ 0,940	1,28 $\pm$ 0,24	1,77 $\pm$ 0,35
Pb	0,225 $\pm$ 0,030	0,0013	0,306 $\pm$ 0,011	0,263 $\pm$ 0,040	-	0,270 $\pm$ 0,048
Se	0,186 $\pm$ 0,034	0,0015	10,3 $\pm$ 0,5	12,9 $\pm$ 1,8	-	3,81 $\pm$ 0,33
Sn	-0,031 $\pm$ 0,003	0,0001	-	0,0068 $\pm$ 0,0405	-	0,0861 $\pm$ 0,0618
Zn	18,3 $\pm$ 21,1	0,9	128 $\pm$ 3	141 $\pm$ 13	51,3 $\pm$ 3,1	46,8 $\pm$ 5,6

**Tabla 2.** Concentraciones de Pb y Sn en músculo ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso fresco) en animales del grupo no suplementado y suplementado con Cu. Las abreviaturas para los músculos son: DI: Diafragma, CA: músculo cardíaco, SE: músculo semitendinoso, PE: músculo pectoral. N: número de muestras; (<LD): número de muestras por debajo del límite de detección. Letras diferentes indican diferencias en la proporción de muestras con concentraciones detectables entre los músculos dentro del mismo grupo de animales (suplementado y no suplementado con Cu).

**Table 2.** Pb and Sn concentrations in muscle ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  wet weight) in non supplemented and Cu supplemented animals. Abbreviations for muscles are as follows DI: Diaphragm, CA: cardiac muscle, SE: semitendinous muscle, PE: pectoral muscle. N: number of samples; (<LD): number of samples below the limit of detection; ND: not detected. Different letters indicate statistically significant differences in the proportion of samples with detectable residues among muscles within the same group of animals (non-supplemented or Cu supplemented).

		Non-supplemented				Cu Supplemented			
		DI	CA	SE	PE	DI	CA	SE	PE
Pb	N (<LD)	10 (10)	10 (9)	9 (7)	10 (9)	20 (20)	20 (19)	19 (14)	20 (16)
	median	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Range	ND-ND	ND-13,9	ND-9,08	ND-2,98	ND-ND	ND-6,5	ND-5,38	ND-5,8
Sn	N (<LD)	10 (8) <sup>a</sup>	10 (9) <sup>a</sup>	9 <sup>b</sup>	10 (8) <sup>a</sup>	20 (18) <sup>a</sup>	20 (20) <sup>a</sup>	19 (2) <sup>b</sup>	20 (8) <sup>a</sup>
	median	ND	ND	0,456	ND	ND	ND	0,439	0,255
	Range	ND-1,33	ND-1,12	0,231-4,95	ND-0,847	ND-1,45	ND-ND	ND-1,27	ND-0,961

**Tabla 3.** Resultados del ANOVA II de la concentración de metales no esenciales y esenciales en el músculo de ganado vacuno con la suplementación con Cu y el tipo de músculo como factores. Este análisis no fue realizado para el Pb y el Sn debido a la elevada proporción de muestras con concentraciones no detectables.

**Table 3.** Results of the two way ANOVA of non essential and essential trace element concentrations in cattle muscle with factors Cu supplementation and type of muscle. The analysis was not run for Pb and Sn because of the high proportion of samples with undetectable residues.

Element	Effect		
	Cu supplementation	Type of muscle	Cu suppl * type muscle
As	F1,118=57,019, p=0,000	F3,118=12,789, p=0,000	F3,118=0,206, p=0,892
Cd	F1,118=0,000, p=0,987	F3,118=2,26, p= 0,085	F3,118=1,533, p= 0,210
Hg	F1,118=0,369, p=0,545	F3,118=19,589, p=0,000	F3,118=0,779, p=0,508
Co	F1,118=1,529, p=0,219	F3,118=211,897, p=0,000	F3,118=0,513, p=0,674
Cr	F1,118=1,200, p=0,276	F3,118=20,175, p=0,000	F3,118=0,238, p=0,870
Cu	F1,118=0,144, p=0,705	F3,118=282,298, p=0,000	F3,118=0,628, p=0,598
Fe	F1,118=0,990, p=0,322	F3,118=218,848, p=0,000	F3,118=0,968, p=0,411
Mn	F1,118=0,173, p=0,679	F3,118=144,988, p=0,000	F3,118=0,659, p=0,579
Mo	F1,118=1,877, p=0,173	F3,118=42,493, p=0,000	F3,118=0,352, p=0,788
Ni	F1,118=6,342, p=0,013	F3,118=111,747, p=0,000	F3,118=0,540, p=0,656
Se	F1,118=36, p=0,000	F3,118=273,578, p=0,000	F3,118=0,146, p=0,932
Zn	F1,118=0,347, p=0,557	F3,118=340,443, p=0,000	F3,118=0,247, p=0,863

**Tabla 4.** Correlaciones entre las concentraciones de elementos esenciales y no esenciales en todos los músculos ( $n=120$ ). Los resultados se expresan como coeficiente y probabilidad (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ ) de correlación de Spearman. Las correlaciones no han sido calculadas para el Pb y Sn porque la mayor parte de las muestras presentaron concentraciones no detectables.

**Table 4.** Rank correlations between non-essential and essential trace element concentrations in the whole muscle samples ( $n=120$ ). Results are expressed as Spearman rank correlations coefficient and probability (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ ). Correlations have not been calculated for Pb and Sn because most of the samples had undetectable concentrations.

	As	Cd	Hg	Pb	Sn	Co	Cu	Fe	Mn	Ni	Se	Cr	Mo
Cd	0,044												
Hg	0,235 *	0,120											
Pb	-0,295 ***	0,045	-0,208 *										
Sn	-0,163	0,174	-0,237 **	0,441 ***									
Co	-0,297 ***	-0,029	-0,509 ***	0,603 ***	0,393 ***								
Cu	-0,417 ***	-0,079	-0,485 ***	0,558 ***	0,300 ***	0,837 ***							
Fe	-0,421 ***	-0,131	-0,447 ***	0,575 ***	0,261 **	0,855 ***	0,929 ***						
Mn	-0,459 ***	-0,082	-0,432 ***	0,581 ***	0,278 **	0,862 ***	0,924 ***	0,917 ***					
Ni	-0,316 ***	-0,154	-0,603 ***	0,470 ***	0,461 ***	0,764 ***	0,729 ***	0,700 ***	0,703 ***				
Se	-0,252 **	-0,169	-0,421 ***	0,550 ***	0,265 **	0,793 ***	0,857 ***	0,887 ***	0,815 ***	0,657 ***			
Cr	0,328 ***	0,158	0,339 ***	-0,455 ***	-0,266 **	-0,429 ***	-0,460 ***	-0,441 ***	-0,432 ***	-0,345 ***	-0,476 ***		
Mo	0,338 ***	0,052	0,183 *	-0,517 ***	-0,326 ***	-0,538 ***	-0,427 ***	-0,544 ***	-0,496 ***	-0,367 ***	-0,542 ***	0,446 ***	
Zn	0,454 ***	0,153	0,653 ***	-0,426 ***	-0,358 ***	-0,611 ***	-0,597 ***	-0,542 ***	-0,553 ***	-0,727 ***	-0,537 ***	0,425 ***	0,452 ***

**Tabla 5.** Correlaciones entre las concentraciones de elementos esenciales y no esenciales en el hígado y riñón y las de diafragma (DI), músculo cardíaco (CA), músculo semitendinoso (SE) y músculo pectoral (PE) (n=30). Los resultados se expresan como coeficiente y probabilidad (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001) de Spearman. Las correlaciones no han sido calculadas para el Pb y Sn porque la mayor parte de las muestras presentaron concentraciones no detectables.

**Table 5.** Rank correlations between liver and kidney and diaphragm (DI), cardiac muscle (CA), semitendinous muscle (SE) and pectoral muscle (PE) non-essential and essential trace element concentrations (n=30). Results are expressed as Spearman rank correlations coefficient and probability (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001). Correlations have not been calculated for Pb and Sn because most of the samples had undetectable concentrations.

	Liver				Kidney			
	DI (n=26)	CA (n=26)	SE (n=24)	PE (n=26)	DI (N=26)	CA (N=26)	SE (N=24)	PE (N=26)
As	0,534 **	0,061	0,477 *	0,432 *	0,603 **	0,399 *	0,415 *	0,437 *
Cd	-0,124	-0,385	0,291	0,485 *	-0,172	-0,137	0,185	0,297
Hg	0,328	0,423 *	0,691 ***	0,436 *	0,466 *	0,164	0,714 ***	0,603 **
Co	0,054	0,128	-0,053	0,153	0,533 **	0,655 ***	0,281	0,496 **
Cr	-0,168	-0,296	-0,100	-0,022	0,304	-0,036	0,037	0,254
Cu	0,011	0,080	-0,057	0,124	0,098	-0,180	-0,083	0,013
Fe	-0,051	-0,075	-0,044	-0,142	-0,096	0,285	0,002	-0,071
Mn	-0,080	0,195	0,001	-0,196	0,364	0,510 **	0,211	0,391 *
Mo	-0,074		0,054	-0,176	0,067		-0,057	-0,109
Ni	0,221	-0,134	0,268	-0,353	0,405 *	-0,024	0,189	0,102
Se	0,186	-0,027	0,053	0,048	0,017	0,084	0,065	0,129
Zn	0,132	-0,400*	0,532 **	0,242	0,181	-0,171	0,294	-0,141

**Tabla 6.** Correlaciones intermusculares de elementos esenciales y no esenciales entre diafragma (DI), músculo cardíaco (CA), músculo semitendinoso (SE) y músculo pectoral (PE) (n=30). Los resultados se expresan como coeficiente y probabilidad (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001) de Spearman. Las correlaciones no han sido calculadas para el Pb y Sn porque la mayor parte de las muestras presentaron concentraciones no detectables.

**Table 6.** Inter-muscular rank correlations among diaphragm (DI), cardiac muscle (CA), semitendinous muscle (SE) and pectoral muscle (PE) non-essential and essential trace element accumulation (n=30). Results are expressed as Spearman rank correlations coefficient and probability (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001). Correlations have not been calculated for Pb and Sn because most of the samples had undetectable concentrations.

	DI-CA n=30	DI-SE n=28	DI-PE n=30	CA-PE n=30	CA-SE n=28	SE-PE n=28
As	0,501 **	0,629 **	0,559 **	0,390 *	0,327	0,755 ***
Cd	0,238	-0,270	-0,064	-0,153	-0,006	0,080
Hg	0,148	0,590 **	0,658 ***	0,143	0,328	0,603 **
Co	0,499 **	0,406 *	0,200	0,420 *	0,116	0,265
Cr	0,351	0,020	0,358	0,119	0,197	-0,032
Cu	0,295	0,319	0,072	0,375 *	0,500 **	0,385 *
Fe	0,111	0,203	0,182	0,183	0,259	-0,095
Mn	0,384 *	0,166	0,287	0,242	0,028	0,137
Mo		0,583 **	0,581 **			0,736 ***
Ni	0,111	0,237	0,408 *	0,279	0,470 *	0,205
Se	0,572 **	0,596 **	0,551 **	0,606 ***	0,705 ***	0,709 ***
Zn	-0,354	0,436 *	-0,093	-0,355	-0,516 **	0,162



## **CAPÍTULO 4**

### *CHAPTER 4*

#### **Efecto de una suplementación moderada de cobre sobre el metabolismo y el estrés oxidativo en terneros de cebo**

*Effect of moderate Cu supplementation on metabolism and oxidative  
stress in feedlot calves*

## Introducción

El Cobre (Cu) es un elemento esencial para la vida debido a su papel como cofactor en numerosas enzimas (citocromo oxidasa, ceruloplasmina, lysil oxidasa o la superóxido dismutasa). Además la suplementación con Cu se ha sugerido que puede promover el crecimiento mediante la reducción de la fermentación intestinal (Piva y Rossi, 1999) y/o favorecimiento de la digestión ruminal del forraje de baja calidad forraje (López-Guisa y Satter, 1992).

Sin embargo, el Cu en exceso es tóxico, y aunque el contenido en Cu de la alimentación animal está sujeto a límites legales, no está claro si los límites actuales establecidos para la especie bovina (35 mg/kg de materia seca (MS) en la Unión Europea; European Comisión, 2003) pueden dar lugar a una intoxicación subclínica por Cu: se ha observado que hasta el 89% de los terneros de la raza Holstein-Friesian alimentados a base de concentrado suplementado con 35 mg de Cu/kg MS presentaron concentraciones hepáticas de este elemento superiores a los límites de toxicidad (150 mg/kg peso fresco) que podrían estar asociados a episodios de toxicidad subclínica de Cu (Miranda *et ál.*, 2010). De hecho, un estudio reciente (García Vaquero *et ál.*, *In press*) se observó que la suplementación rutinaria con Cu no está justificada para mantener un adecuado status de Cu en los animales o para mejorar sus parámetros productivos. Muchos de los efectos patológicos de la intoxicación por cobre probablemente se deban a un daño oxidativo (Ozcelik *et al*, 2003), es decir, daños en las macromoléculas celulares debido a la pérdida del control sobre las especies reactivas del oxígeno (ROS) que es normalmente se proporcionado por los antioxidantes fisiológicos (Lykkesfeldt y Svendsen, 2007). Teniendo en cuenta los resultados antes mencionados relacionados con la conveniencia de la suplementación con Cu en los sistemas de cría intensiva en terneros de carne, y su riesgo de toxicidad de Cu, el presente estudio describe los principales efectos metabólicos y el balance oxidante-antioxidante en los animales con este protocolo nutricional.

## Material y Métodos

### Animales y diseño experimental

A la edad de 8 semanas, 30 terneros machos rubia gallega x Holstein-Friesia (con un peso aproximado de 90 a 120 kg) fueron llevados a la granja comercial en la que se llevó a cabo el estudio. Los animales fueron alojados hasta el inicio del estudio en corrales cubiertos con suelos de ranurados, y se adaptaron a una dieta alta en grano durante 4 semanas mediante un lactoreemplazante (1 L/20 kg de peso corporal) en combinación con un dieta de inicio compuesta por harina de soja y granos de cereales (trigo, maíz y cebada), con agua y paja de trigo (contenido medio de Cu de 4 mg/kg MS; Blas *et ál.*, 2003) *ad libitum*.

El estudio se desarrolló de las 12 a 36 semanas de edad, lo que abarca tanto el período de crecimiento (12 a 24 semanas) y de acabado (24 a 36 semanas). A la edad de 12 semanas los

animales fueron asignados al azar a uno de los dos grupos experimentales que se mantuvieron en diferentes lotes: no suplementado (o control, CTRL n=10), y el grupo suplementado (Cu-S, n=20).

Ambos grupos fueron alimentados con concentrados suministrados por un proveedor comercial con un contenido de Cu basal de 5-8 mg/kg de MS en crecimiento y cebo, respectivamente) con la adición de 15 mg Cu/kg MS (como sulfato de cobre pentahidratado,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) al concentrado del grupo Cu-S en todas las etapas del estudio. El concentrado es el típico de las granjas de engorde comerciales, que consiste principalmente en maíz y cebada, con otros componentes en proporciones que difieren entre los períodos de crecimiento y acabado. El suplemento de Cu fue mezclado directamente con el concentrado en el momento de alimentar a los animales. Los animales de ambos grupos presentaron libre acceso al alimento, agua y paja de trigo. Se suministró a los animales pienso y paja frescos todos los días a las 08:00 h. después de la retirada de los restos del día anterior.

Los cuidados, manejo y protocolos para la toma de muestras de sangre fueron aprobados por la Universidad de Santiago de Compostela.

#### Mediciones y análisis

Tanto el concentrado nuevo suministrado a cada grupo y los restos del concentrado, se pesaron diariamente para el cálculo de la ganancia media diaria (ADG). El mismo procedimiento se aplica a la paja, en general, la ingesta media diaria de paja durante el estudio fue de 1,5 kg/animal. Cada animal fue pesado al comienzo del estudio (12 semanas de edad) y en el matadero (3-5 días después de la última muestra de sangre tomada a la edad de 36 semanas). Para cada grupo, el índice de conversión del concentrado se calculó como  $[\text{concentrado consumido (kg)}]/[\text{aumento de peso medio (kg)}]$ .

Antes de cada toma de sangre, los terneros fueron examinados para los signos clínicos de deficiencia (debilidad, diarrea, cojera, los cambios en la coloración del pelo) o intoxicación por Cu (diarrea, inapetencia, apatía, coloración de mucosas, disminución de la ingesta) (Underwood y Suttle, 2003; Minervino *et ál.*, 2009), y también para los signos de alteraciones metabólicas asociados con el alto consumo de cereales (cambios de postura o comportamiento, alteración del reflejo palpebral, o signos de deshidratación como alteraciones en la boca o temperatura de las extremidades o posición del globo ocular; Lorenz, 2004). Las muestras de sangre fueron recogida por punción yugular 08:00-10:00 horas justo antes de la primera dieta suplementada (a la edad de 12 semanas, T1), el último día del período de crecimiento (24 semanas de edad, T2), y el último día del período de cebo antes del matadero (36 semanas de edad, T3). La sangre fue recolectada en tubos separados para la medición de los parámetros en los diferentes grupos. Todos los tubos fueron inmediatamente colocados en hielo y, dentro de las 2 h posteriores al sangrado, se centrifugaron a 2500 g durante 10 min a 4°C, tras lo cual se eliminó el suero sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta el momento de su análisis.

La glucosa sérica, colesterol, SUN, creatinina, TSP, albúmina, AST y GGT se midieron utilizando los kits de diagnóstico estandarizados Gernon de RAL (Laboratory Diagnostics). NEFA se realizó mediante un kit de los Laboratorios Randox. En todos los casos, se utilizaron los controles adecuados.

SAC se midió según lo descrito por Trotti *et ál.* (2001) con un kit OXY-adsorbente (de Diacron Internacional), que explota la capacidad de una dosis masiva de ácido hipocloroso (HClO) para oxidar la reserva completa de antioxidantes en el suero (ácido úrico, los grupos tiol, vitaminas, glutatión, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, etc), los resultados son expresados en  $\mu\text{mol HClO/mL}$ . ROS se realizaron según lo descrito por Trotti *et ál.* (2002) usando el test de espectrofotometría de d-ROM (Diacron Internacional), que determina hidroperóxidos (generados por el ataque oxidativo de ROS) a través de su reacción con el cromógeno N, N-dietilparafenilenodiamina, los resultados son expresados en "unidades Carratelli" (CARR U), 1 U CARR se corresponde a 0,08 mg por 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Las muestras de concentrado se recogieron al principio del crecimiento y acabado y se analizaron en el laboratorio de referencia de Mouriscade (Pontevedra, España). La proteína cruda (PC), fibra cruda (FC), cenizas, carbohidratos no fibrosos (NFC) y extracto etéreo (EE) se determinó según las normas internacionales (UNE-EN ISO/IEC 17025; Entidad Nacional de Acreditación 2005). El contenido de materia seca de la ración total mezclada (TMR) fueron 874 y 866 g/kg en los períodos de crecimiento y acabado, respectivamente. Más detalles en la Tabla 1.

#### Análisis estadísticos

La significación estadística de las diferencias entre los grupos para el peso corporal y la ADG mediante un ANOVA con corrección de Bonferroni. Los parámetros sanguíneos fueron sometidos a un ANOVA con el grupo (CTRL y Cu-S) como efecto principal fijo y el muestreo como factor repetido, y con la interacción tiempo  $\times$  grupo incluida en el modelo. El criterio de significación estadística fue de  $p \leq 0.05$ , los valores p entre 0,05 y 0,1 fueron tratados como casi significativos.

### Resultados

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, en peso o en ADG, la ingesta media diaria fue similar, y el ratio concentrado:ganancia fue idéntico en los dos grupos (Tabla 2). Teniendo en cuenta el consumo medio diario de pienso y paja en los dos grupos en el momento del matadero, y sus contenido de Cu (de Blas *et ál.*, 2003), la dosis de Cu recibida por los animales fue equivalente a 66 mg/kg de MS y 183 mg/kg de MS para CTRL y Cu-S respectivamente.

En la tabla 3 se resumen los datos de los parámetros sanguíneos de cada grupo y fecha de muestreo. En relación con los rangos fisiológicos de normalidad establecidos (Radostits *et ál.*,

2006; Kaneko *et ál.*, 2008) NEFA, colesterol, creatinina y TSP siempre se mantuvieron dentro de límites (NEFA <0,6 mmol/L, colesterol entre 80-120 mg/dl, creatinina <2 mg/g dL, TSP entre 5,7-8,1 g/dl); SUN estuvieron por encima de sus límites superiores (30 mg/dl) durante el período de crecimiento, pero más tarde disminuyó en el grupo Cu-S, mientras que la glucosa y la albúmina casi siempre se encontraron superando sus límites superiores (74 mg/dl para la glucosa y 3,6 g/dl para la albúmina). AST y GGT fueron igualmente siempre superiores a los valores máximos de alrededor de 50 y 10 UI / L respectivamente, que también han sido descritos en estudios previos de terneros con dietas y condiciones similares aunque con diferentes razas (Castillo et al, 2009).

Las mediciones de ROS, NEFA, SUN, creatinina y TSP sólo fueron significativamente influenciados por la fecha de muestreo, incrementándose en cada caso a lo largo del estudio. El aumento fue progresivo durante todo el estudio en ambos grupos para ROS, NEFA y creatinina, así como para TSP en el grupo Cu-S. En el grupo control, la TSP aumentó sólo en la fase de acabado, mientras que en los dos grupos aumentado únicamente en la etapa de crecimiento, cayendo ligeramente en la fase de acabado en el grupo Cu-S.

Los niveles de colesterol fueron significativamente superiores en el grupo Cu-S que en los controles, pero no fueron influenciados ni por el parámetro tiempo ni por la interacción tiempoxgrupo. LA interacción tiempoxgrupo fue estadísticamente significativa para SAC, glucosa y albúmina. En los controles, un aumento de la SAC durante el período de crecimiento fue seguido por una ligera disminución, mientras que la secuencia contraria se observó en el grupo Cu-S. Los niveles de glucosa se mantuvieron bastante estables en los controles, pero en el grupo Cu-S los valores aumentaron progresivamente hasta los valores del control partiendo de unos niveles mucho más bajos en su inicio. Los niveles de albúmina aumentaron durante el período de crecimiento en ambos grupos, y posteriormente se redujeron, especialmente en el grupo Cu-S, que terminó con niveles considerablemente más bajos que el grupo control.

Los valores de AST y GGT no fueron influenciados por los parámetros tiempo o grupo, a pesar de que AST y GGT fueron superiores en el grupo suplementado al final de los períodos de crecimiento y acabado.

## **Discusión**

### **Productividad**

En este estudio, la ADG no se modificó significativamente, y el ratio alimento:ganancia fue idéntico en ambos grupos, lo que indica que la basal el contenido de cobre en concentrados y paja fueron suficientes para mantener el rendimiento. Además, estos resultados no parecen haber sido influenciados por la ingesta de Fe, Zn y S, que juegan un papel importante en la absorción de Cu y metabolismo: Fe y Zn se encuentran dentro de los límites de normalidad en la ración (NRC, 2001), y la ingesta de S (cuyos requisitos no se han establecido) fue de

alrededor de cuatro veces inferior al límite superior permitido para las ovejas (NRC, 2001), que son los rumiantes más susceptibles a padecer alteraciones relacionadas con el Cu.

Estudios previos evaluar la influencia de la suplementación con Cu en los parámetros productivos han arrojado resultados dispares. Entre los factores que parecen influir en el efecto de los suplementos de Cu en los terneros se incluyen el status inicial de Cu de los animales, las concentraciones de Cu y de sus antagonistas (Fe, S y Mo) en la dieta basal, la raza, y la etapa productiva. Al igual que en el presente estudio, Ward *et ál.* (1993) y Gengelbach *et ál.* (1994) observaron que la adición de 5 y 10 mg Cu/kg MS de a una dieta intensiva equilibrada que contiene 6,2 y 4 mg Cu/kg MS, respectivamente, no afectaron a la ADG o al peso del animal, mientras que Ward y Spears (1997) observaron que la adición de 5 mg Cu/kg MS a una dieta a base de concentrados con un contenido en Cu de 3 mg/kg MS dio lugar a un aumento relativo de la ADG respecto a los animales no suplementados.

En conjunto, nuestros resultados muestran que en las condiciones de cría intensiva la suplementación con Cu en la dieta de terneros no ofrece ventajas significativas en cuanto al rendimiento productivo.

#### Metabolitos y enzimas

En este estudio, ningún animal mostró signos clínicos de acidosis metabólica o desequilibrios de cobre. De hecho, los niveles de Cu en sangre de estos animales publicados en un estudio previo mostraron concentraciones plasmáticas de Cu en ambos grupos entre 0,7-1,0 mg/l (García Vaquero *et ál.*, *In press*) lo que indica que ambos grupos mostraron un adecuado status de Cu durante todo el ciclo productivo, independientemente de la suplementación y por encima de los umbrales para la deficiencia de Cu (Suttle, 1993).

El aumento en los niveles de NEFA, que fue especialmente pronunciado durante la última mitad del periodo de estudio, está probablemente relacionado con la acumulación de grasa en los animales alimentados una dieta alto en grano (Vernon, 2002); que los niveles de NEFA no se vean afectados significativamente por la suplementación de Cu está de acuerdo con los resultados de Engle *et ál.* (2000a, 2000b), si bien Engle *et ál.* (2000b) también informó resultados que sugieren que el Cu puede afectar a los niveles de NEFA indirectamente por cambios en los niveles de norepinefrina. El aumento de la creatinina era de esperar en vista de la relación entre esta variable y la masa muscular (Schroeder *et ál.*, 1990), y su falta de relación con la ingesta de Cu (lo que implica que la suplementación con Cu no causó una disfunción renal importante) también era esperable teniendo en cuenta que este parámetro permanece inalterado a niveles mucho más elevados de suplementación con Cu (Minervino *et ál.*, 2009). Aunque en este estudio la ingesta individual no fue controlada, el aumento de TSP se puede atribuir al aumento del consumo de proteína cruda (Khan *et ál.*, 2007).

Junto con el aumento en la degeneración de proteína muscular a medida que aumenta el peso corporal (Rossi *et ál.*, 2001), y una disminución relativa de la acumulación de proteínas, el aumento de la ingesta de proteína cruda también puede haber sido la causa del aumento de

SUN durante el período de crecimiento (Gleghorn *et ál.*, 2004), aunque nunca excedió el límite fisiológico superior descrito por Kaneko *et ál.* (2008).

Sorprendentemente, los niveles de colesterol fueron superiores en los animales del grupo Cu-S que en los no suplementados, a diferencia de los estudios en los que el aumento de 5 a 25 mg Cu/kg MS dio lugar a aumentos del colesterol sérico en el período de acabado en terneros Angus (Engle *et ál.*, 2000a; Engle y Spears, 2000). Dado que también se ha publicado que el aumento de Cu en la dieta incrementó los niveles de colesterol sérico en vacas lecheras Holstein (Engle *et ál.*, 2001), es posible que la discrepancia de resultados pueda deberse a una diferencia genética entre las razas Angus y Holstein.

Los altos niveles de albúmina en ambos grupos, posiblemente, pueden ser debido a la dieta alta en CP en el starter con el que se alimentaron los animales en la etapa previa al estudio y al contenido de maíz de 40- 42% del concentrado; Khan *et ál.* (2007) observó que las dietas starter a base de maíz dieron lugar a niveles superiores de albúmina que en las dietas basadas en avena o cebada en terneros Holstein de 10-12 semanas de edad. El marcado descenso en los niveles de albúmina en el grupo de Cu- S durante la fase de acabado puede estar relacionado con el hecho de que esta proteína se une al Cu en su camino hacia el hígado (Quiroz y Bouda, 2001).

Los altos niveles de glucosa de ambos grupos eran esperables debido a que la dieta de los terneros era base de maíz rico en precursores glucogénicos. Dado que el cobre juega un papel clave en muchas funciones vitales relacionadas con la liberación de insulina y la utilización de glucosa por los tejidos periféricos (Cohen *et ál.*, 1982; Fields *et ál.*, 1983), el aumento de los niveles de glucosa en el grupo Cu-S puede haber estado relacionado con la suplementación con Cu.

Es bien sabido que la AST es un marcador inespecífico de lesión hepática aguda causada por las dietas altas en grano y la producción de lactato ruminal asociada (Mori *et ál.*, 2007), y la GGT es un marcador sensible de enfermedad hepatobiliar (Russell y Roussel, 2007), por lo que, aunque no es estadísticamente significativo, la mayor actividad enzimática en los animales suplementados concuerdan con la idea de que en este grupo se está produciendo un estrés hepático subclínico por la acumulación de Cu. De hecho, aunque en sangre los niveles de Cu fueron adecuados en ambos grupos, en el citado estudio de García Vaquero *et ál.* (*In press*), se observó que después del sacrificio, los animales suplementados presentaban una excesiva acumulación hepática de Cu, con concentraciones por encima del rango adecuado (Puls, 1994) y aproximadamente la mitad de ellos mostraron concentraciones de Cu asociadas con la toxicidad en el ganado (Gummow, 1996).

#### ROS y SAC

Los mecanismos de la toxicidad celular de Cu se encuentran relacionados con la inducción de ROS por los iones de cobre libre (Gaetke y Chow, 2003). En este estudio, a pesar del daño hepático subclínico sugerido por la AST y GGT, la suplementación de cobre parece no haber

tenido ninguna influencia en los niveles de ROS en suero, que no eran más elevados en el grupo Cu-S. Los niveles de ROS eran de hecho, en ambos grupos, mucho más bajo que la media de 385 UCARR observada en terneros por Carletti *et ál.* (2007). ROS sin embargo, aumentó progresivamente a lo largo del estudio en el grupo suplementado, y durante la fase de acabado en el grupo CTRL. Ya que ROS se generan no sólo como parte de los efectos de, o en respuesta a la agresión exógena, sino también como parte del metabolismo normal en relación con, entre otros factores, el crecimiento o una dieta de alta energía (Castillo *et ál.*, 2001; Castillo *et ál.*, 2003), este aumento parece probable que haya sido debido a estos últimos factores.

La cuestión, que se plantea es si el aumento de ROS indica insuficiente actividad antioxidante (Castillo *et ál.*, 2006). Los valores de SAC fueron generalmente cercanos a los 303  $\mu\text{mol}$  HClO/mL observados en el estudio previo de Carletti *et ál.* (2007). Suponiendo que la producción de SAC aumenta en respuesta a ROS, nuestros resultados (ver Figura 1.) sugieren que mientras que en el grupo CTRL la respuesta antioxidante frente a ROS no se hizo esperar y fue más de suficiente para estabilizar los niveles de ROS durante la etapa de crecimiento, éstos fueron insuficientes durante la fase de acabado, en el grupo Cu-S, la respuesta de SAC fue insuficiente durante la etapa de crecimiento (posiblemente debido a que la mayor ingesta de Cu conduce a un aumento de ROS y/o retraso de la respuesta SAC), pero aumentó durante la fase de acabado. Este aumento tardó en los niveles de SAC en el grupo Cu-S, tal vez pueda ser debido a la acumulación gradual de Cu en el hígado de los animales de este grupo, que posiblemente pueda haber favorecido la producción de las enzimas dependientes de Cu que contribuyen a la SAC (Taylor *et ál.*, 1988). En cualquier caso, el comportamiento de ROS y SAC en los dos grupos es compatible con que el suplemento de Cu pueda al mismo tiempo, y a través de diferentes vías, tener efectos tanto positivos como negativos sobre el estrés oxidativo; si bien serían necesarios nuevos estudios para confirmarlo.

## Conclusión

En las condiciones de este estudio, la suplementación rutinaria con Cu (15 mg/kg MS) a terneros alimentados a base de concentrado durante el crecimiento y acabado no tuvo un efecto significativo los parámetros productivos ni sobre los niveles de ROS, pero dio lugar a una marcada diferencia en la evolución temporal de la defensa antioxidante, lo que sugiere el papel potencial antioxidante de Cu contra la producción de ROS asociada a una dieta de engorde. Aunque no hay síntomas clínicos de intoxicación por Cu se han apreciado actividades numéricamente mayores de AST y GGT en los animales suplementados como consecuencia de una mayor acumulación de Cu hepático. Se necesitan estudios adicionales para evaluar la conveniencia de la suplementación de cobre en los sistemas de engorde, debido a sus efectos positivos y negativos a través de diferentes vías.

---

Elsevier Editorial System(tm) for Research in Veterinary Science  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: EFFECT OF MODERATE Cu SUPPLEMENTATION ON METABOLISM AND OXIDATIVE STRESS IN FEEDLOT CALVES

Article Type: Research Paper

Section/Category: Nutrition

Keywords: Keywords: oxidative stress; productive performance; metabolic profile; veal calves.

Corresponding Author: Dr. Cristina Castillo, DVM, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Santiago de Compostela

First Author: Cristina Castillo, DVM, PhD

Order of Authors: Cristina Castillo, DVM, PhD; Joaquín R Hernandez, DVM, PhD; Marco G Vaquero, DVM; Marta L Alonso, DVM, PhD; Victor Pereira, DVM, PhD; Marta Miranda, DVM, PhD; Isabel Blanco, DVM, PhD; Jose L Benedito, DVM, PhD

**Abstract:** The aim of this investigation was to evaluate whether, in the nutritional management of commercial feedlots, copper (Cu) supplementation is justified to maintain the physiological requirements. This study compared beef calves fed concentrates with an average Cu basal content of 5 and 8 mg/kg in growing and finishing periods (10 animals) or supplemented with 15 mg/kg for each phase (20 animals) as regards production indices, metabolic parameters [glucose, nonesterified fatty acids (NEFA), cholesterol, serum urea nitrogen (SUN), creatinine, total serum protein (TSP), albumin, aspartate transaminase (AST) and  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT)] and markers of oxidative stress [reactive oxygen species (ROS) and serum antioxidant capacity (SAC)]. Data were recorded at ages 12, 24 and 36 weeks. It seems that Cu supplementation may, through different routes, simultaneously have both positive and negative effects on oxidative stress, some of which may be related to subclinical hepatotoxicity; in spite of this, it should be considered in further studies the potential antioxidant role of Cu against ROS production associated to a fattening diet.

## ***Effect of moderate Cu supplementation on metabolism and oxidative stress in feedlot calves***

C. Castillo<sup>a\*</sup>, J. Hernández<sup>a</sup>, M. García Vaquero<sup>a</sup>, M. López Alonso<sup>a</sup>, V. Pereira<sup>a</sup>, M. Miranda<sup>b</sup>, I. Blanco<sup>a</sup> and J.L. Benedito<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario s/n, 27002 Lugo, Spain

<sup>b</sup>Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

\* Corresponding author. Tel.: +34 982 8 22618; fax: +34 982 28 59 40 E-mail address: cristina.castillo@usc.es

### **Abstract**

*The aim of this investigation was to evaluate whether, in the nutritional management of commercial feedlots, copper (Cu) supplementation is justified to maintain the physiological requirements. This study compared beef calves fed concentrates with an average Cu basal content of 5 and 8 mg/kg in growing and finishing periods (10 animals) or supplemented with 15 mg/kg for each phase (20 animals) as regards production indices, metabolic parameters [glucose, nonesterified fatty acids (NEFA), cholesterol, serum urea nitrogen (SUN), creatinine, total serum protein (TSP), albumin, aspartate transaminase (AST) and  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT)] and markers of oxidative stress [reactive oxygen species (ROS) and serum antioxidant capacity (SAC)]. Data were recorded at ages 12, 24 and 36 weeks. It seems that Cu supplementation may, through different routes, simultaneously have both positive and negative effects on oxidative stress, some of which may be related to subclinical hepatotoxicity; in spite of this, it should be considered in further studies the potential antioxidant role of Cu against ROS production associated to a fattening diet.*

*Keywords: oxidative stress; productive performance; metabolic profile; veal calves.*

## Introduction

Copper (Cu) is a trace element essential for life processes due to its role as cofactor in many enzymes (i.e. cytochrome oxidase, caeruloplasmin, lysil oxidase or superoxide dismutase). Cu supplementation has been further prompted by suggestions that it may promote growth by reducing intestinal fermentation (Piva and Rossi, 1999) and/or favouring ruminal digestion of low-quality forage (López-Guisa and Satter, 1992).

However, excessive copper is toxic, and although the copper content of animal feed is subject to legal limits, it is not clear whether current limits for weaned bovine livestock (35 mg/kg diet DM in the European Union (European Commission, 2003) are sufficiently low to prevent subclinical chronic copper poisoning: it has been reported that as many as 89% of Holstein-Friesian calves fed concentrate with a Cu concentration of 35 mg/kg have liver Cu contents higher than the toxic limit (150 mg/kg wet weight) at the end of the finishing stage that could be associated to subclinical Cu toxicity (Miranda et al, 2010). In fact, a recent study (García Vaquero et al, unpublished data) concluded that routinely Cu supplementation is not justified to maintain an adequate Cu status in the animals or to improve productive parameters.

Many of the pathological effects of copper poisoning are suggestive of oxidative damage (Ozcelik et al, 2003), i.e. damage to cell macromolecules due to loss of the control over reactive oxygen species (ROS) that is normally provided by physiological antioxidants (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). Taking into account the above-mentioned preliminary results related with the convenience of Cu supplementation in beef feedlot systems, and their risk of Cu toxicity, the study described here investigated the effects on metabolic parameters and oxidant-antioxidant balance of this nutritional protocol.

## Material and Methods

### Animals and experimental design

At age 8 weeks, 30 male Galician Blond x Holstein-Friesian bull calves (weighing approximately 90-120 kg) were brought to the commercial farm on which the study was carried out. Animals were housed until the start of the study in covered feedlot pens with slotted floors, and were adapted to a high-grain diet over 4 weeks using milk replacer (1L per 20 kg BW) combined with a starter diet made up of soybean meal and cereal grains (corn, wheat and barley), with water and wheat straw (with a mean Cu content of 4 mg/kg DM; de Blas et al, 2003) ad libitum.

The study ran from age 12 weeks to age 36 weeks, thus covering both the growing period (age 12-24 weeks) and the finishing period (age 24-36 weeks) in the typical Spanish feedlot. At age 12 weeks the animals were allotted randomly to one of two experimental groups that were maintained in different pens: the non supplemented (or control) group (CTRL, n=10 animals), and the supplemented group (Cu-S, n=20 animals).

Both groups were fed concentrates provided by a commercial supplier with a basal Cu content of 5 and 8 mg/kg DM in growing and finishing stages, respectively) with the addition of 15 mg Cu /kg DM (as copper sulphate pentahydrate,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) to the same concentrate of the Cu-S group during all the study period. The concentrate was typical of commercial feedlots, consisting mainly of maize and barley, with other components in proportions that differed between the growing and finishing periods. The supplement was mixed directly with the concentrate at the time of feeding. The animals had free access to feed, water and wheat straw. Fresh concentrate and straw were provided daily at 08:00 h. following withdrawal of refusals.

Care, handling and blood sampling protocols were approved by the University of Santiago de Compostela's Institutional Animal Care and Use Committee.

#### Measurements and analyses

Both the concentrate supplied to each group and the concentrate refused, were weighed daily to allow calculation of average daily intake (ADG) in the group. The same procedure was applied to straw; overall, mean daily straw intake during the study was 1.5 kg/animal. Each animal was weighed at the start of the study (age 12 weeks) and in the slaughterhouse (3-5 days after the last blood sample was taken at age 36 weeks). For each group, average feed-to-gain ratio for concentrate was calculated as [concentrate consumed (kg)]/[average weight gain (kg)].

Before each blood sample was taken, the calves were examined for clinical signs of copper deficiency (unthriftiness, diarrhoea, lameness, changes in hair colour) or copper poisoning (diarrhoea, inappetence, apathy, changes in mucous membranes, shock, poor nutritional state) (Underwood and Suttle, 2003; Minervino et al., 2009), and also for signs of metabolic alterations associated with high grain consumption (changes in posture or behaviour, altered palpebral reflex, or signs of dehydration such as anomalous mouth or limb temperature or eyeball position; Lorenz, 2004). Blood samples were collected by jugular puncture between 8:00 and 10:00 hours just before the first supplemented feed (at age 12 weeks, T1), on the last day of the growing period (age 24 weeks, T2), and on the last day of the finishing period prior to slaughter (age 36 weeks, T3). Blood was collected in separate tubes for measurement of different groups of parameters. All tubes were immediately placed on ice and, within 2 h of bleeding, were centrifuged at 2500g for 10 min at 4°C, after which the supernatant serum was removed and stored at -80°C pending analysis.

Serum glucose, cholesterol, SUN, creatinine, TSP, albumin, AST, and GGT were measured using Gernon standardized diagnostic kits from RAL (Laboratory Diagnostics). NEFA was assayed with a kit from Randox Laboratories. In all cases, appropriate controls were used.

SAC was measured as described by Trotti et al (2001) with an OXY-Adsorbent test kit (from Diacron International), which exploits the capacity of a massive dose of hypochlorous acid (HClO) to oxidize the complete pool of antioxidants in serum (uric acid, thiol groups, vitamins,

glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase, etc.); results are expressed as  $\mu\text{mol HClO ml}^{-1}$ . ROS was assayed as described by Trotti et al (2002) using the spectrophotometric d-ROM test (Diacron International), which determines hydroperoxides (generated by the oxidative attack of ROS) through their reaction with the chromogen N,N-diethylparaphenylenediamine; results are expressed in arbitrary "Carratelli units" (CARR U), 1 CARR U corresponding to 0.08 mg per 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Samples of concentrate were collected at the beginning of the growing and finishing periods and analysed in the officially endorsed provincial agricultural analysis service at Mouriscade (Pontevedra, Spain). Crude protein (CP), crude fibre (CF), ash, non-fibre carbohydrate (NFC) and ether extract (EE) were determined in accordance with international standards (UNE-EN ISO/IEC 17025; Entidad Nacional de Acreditación 2005). The dry matter contents of the total mixed ration (TMR) were 874 and 866 g/kg in the growing and finishing periods, respectively. More details are exposed in Table 1.

#### Statistical analyses

The statistical significance of between-group differences in body weight and ADG was estimated by ANOVA with Bonferroni corrections. Blood parameter data were subjected to ANOVA with group (CTRL and Cu-S) as fixed main effect and sampling time as repeat factor, and with the time  $\times$  group interaction included in the model. The criterion for statistical significance was  $P \leq 0.05$ ; P values between 0.05 and 0.1 were treated as near-significant.

## Results

There were no statistically significant between-group differences in either weight or ADG; average daily intakes were similar, and the concentrate feed:gain ratio was identical in the two groups (Table 2). Given the mean daily intake of concentrate and straw in both groups at slaughter, and their Cu content (de Blas et al, 2003), the dose of copper fed by the animals was equivalent to 66 mg/Kg DM and 183 mg/Kg DM for CTRL and Cu-S animals, respectively.

Table 3 summarizes the blood parameter data for each group and sampling date. In relation to established physiological ranges (Radostits et al, 2006; Kaneko et al, 2008) NEFA, cholesterol, creatinine and TSP always remained within limits (NEFA  $< 0.6$  mmol/L, cholesterol between 80 and 120 mg/dL, creatinine  $< 2$  mg/dL, TSP between 5.7 and 8.1 g/dL); SUN rose to its upper limit (30 mg/dL) during the growing period but later fell somewhat in group Cu-S; while glucose and albumin almost always exceeded their upper limits (74 mg/dL for glucose, 3.6 g/dL for albumin). AST and GGT were likewise invariably greater than the maximum values of around 50 and 10 IU/L, respectively, that we have observed in previous studies of bull calves maintained on similar diets under similar conditions although with different breed (Castillo et al, 2009).

ROS, NEFA, SUN, creatinine and TSP measurements were only significantly influenced by sampling date, increasing in each case in the study group as a whole. The rise was progressive throughout the study in both groups for ROS, NEFA and creatinine, and for TSP in group Cu-S. In the control group, TSP rose only in the finishing stage; while in both groups SUN increased only in the growing stage, falling slightly in the finishing stage in group Cu-S.

Cholesterol levels were significantly higher in group Cu-S than in controls, but were not influenced by either time or time x group. The time x group interaction was statistically significant for SAC, glucose and albumin. In controls, a rise in SAC during the growing period was followed by a slight fall, while the opposite sequence was observed in group Cu-S. Glucose levels remained quite steady among controls, but in Cu-S calves rose progressively to control values from much lower initial levels. Albumin levels rose during the growing period in both groups; and thereafter fell, especially in group Cu-S, which finished with considerably lower levels than the control group.

Neither AST nor GGT was influenced by either time or group, although AST and GGT were higher in the supplemented group at the end of the growing and finishing periods.

## Discussion

### Productivity

In this study, ADG was not significantly altered by supplementing concentrate and feed:gain ratio was identical in the two groups, indicating that the basal Cu content in concentrate and straw was enough to maintain performance. In addition, these results would not seem to have been influenced by intake of Fe, Zn and S, which play major roles in Cu absorption and metabolism: Fe and Zn intakes met requirements (NRC, 2001), and S intake (for which no requirement has been established) was around four times lower than the upper limit allowed for sheep (NRC, 2001), which are the ruminants most susceptible to Cu imbalance.

Previous studies evaluating the influence of Cu supplementation on animal performance have yielded inconsistent results. Factors influencing the effect of dietary copper supplementation on calves appear to include the initial Cu status of the animals, the concentrations of Cu and of Cu antagonists (Fe, S and Mo) in their basal diet, breed, and productive stage. In agreement with the present study, Ward et al (1993) and Gengelbach et al (1994) reported that the addition of 5 and 10 mg Cu/kg DM to mineral balanced intensive diets containing 6,2 and 4 mg Cu/kg DM respectively, did not affect ADG or body weight, in contrast to Ward and Spears (1997) that found that the addition of 5 mg Cu/kg DM to a high concentrate diet containing 3 mg Cu/kg DM increased ADG relative to non-supplemented steers.

On the whole, our results shown that under the intensive feedlot conditions Cu supplementation of calf diet does not afford significant performance benefit.

### Metabolites and enzymes

In this study, no animal ever showed clinical signs of acidosis-related metabolic disorder or copper imbalance. In fact, mean blood Cu levels in these animals recorded in a previous study showed mean plasma Cu concentrations for both groups between 0.7-1.0 mg/L (García Vaquero et al, unpublished data) indicating that both groups showed an adequate Cu status during all the productive cycle, independently of supplementation and above the thresholds for Cu deficiency (Suttle, 1993).

The increase in NEFA levels, which was especially pronounced during the latter half of the study, is probability related to fat accumulation in animals fed an abundant high-grain diet (Vernon, 2002); that NEFA levels were not significantly affected by Cu supplementation is in agreement with the findings of Engle et al (2000a, 2000b), although Engle et al (2000b) also reported findings suggesting that Cu can affect NEFA levels indirectly by causing changes in norepinephrine levels. The rise in creatinine was expected in view of the relationship between this variable and muscle mass (Schroeder et al, 1990); and its indifference to Cu intake (which implies that Cu supplementation caused no significant renal dysfunction) was likewise expected given that it is in fact unaltered by much higher Cu intake (Minervino et al, 2009). Although in this study individual feed intakes were not monitored, the rise in TSP may be attributable to increased crude protein consumption (Khan et al, 2007).

Together with an increase in muscle protein degeneration as body weight increased (Rossi et al, 2001), and a relative decrease in protein accumulation, increased crude protein intake may also have been the cause of SUN rising during the growing period (Gleghorn et al, 2004), although never exceeded the upper physiological limit stated by Kaneko et al (2008).

Surprisingly, cholesterol levels became increasingly higher in group Cu-S than in the non supplemented group, in contrast with reports that increasing dietary Cu from 5 to 25 mg/kg DM counters the rise in serum cholesterol in finishing-stage Angus steers (Engle et al, 2000a; Engle and Spears, 2000). Since it has also been reported that increasing dietary Cu increases serum cholesterol in Holstein dairy cows (Engle et al, 2001), it is possible that the discrepancy may be due to a genetic difference between Angus and Holstein cattle.

The high albumin levels in both groups may possibly be due to the high-CP starter diet that preceded the study, and to the 40-42% maize content of the concentrate; Khan et al (2007) observed that starter diets based on maize were associated with higher albumin levels than those based on oats or barley in 10-12-week-old Holstein calves. The marked drop in albumin levels in group Cu-S during the finishing stage may be related to this being the protein to which Cu binds en route to the liver (Quiroz and Bouda, 2001).

The high glucose levels of both groups were likewise expected in calves on a maize-based diet rich in glucogenic precursors. Since copper plays a key role in many vital functions related to insulin release and the utilization of glucose by peripheral tissues (Cohen et al, 1982; Fields et al, 1983), the increase in glucose levels in group Cu-S may have been related to Cu supplementation.

It is well known that AST is a nonspecific marker of acute liver damage caused by high-grain diets and associated ruminal lactate production (Mori et al, 2007), and GGT is a sensitive marker of hepatobiliary disorder (Russell and Roussel, 2007); thus, although not statistically relevant, the higher enzyme activities found in supplemented animals are consistent with the idea that in this group subclinical hepatic stress could be caused by accumulation of Cu. In fact, although adequate blood Cu levels were observed in both groups, in the above mentioned study of García Vaquero et al, we observed that after slaughter, supplemented animals shown an excessive hepatic Cu accumulation, with Cu concentrations above the adequate range (Puls, 1994) and approximately half of them showed Cu concentrations associated with Cu toxicity in cattle (Gummow, 1996).

#### ROS and SAC

The hypothesized mechanisms of the cellular toxicity of copper generally involve the induction of ROS by free copper ions (Gaetke and Chow, 2003). In this study, in spite of the subclinical hepatic stress suggested by the AST and GGT results, copper supplementation seems to have had no net influence on ROS levels in serum, which were no higher in group Cu-S than in the non-supplemented group. ROS levels were indeed, in both groups, much lower than the average 385 CARR U observed by Carletti et al (2007) in calves. ROS nevertheless rose progressively throughout the study in the supplemented group, and during the finishing stage in group CTRL. Since ROS are generated not only as part of the effects of, or response to, exogenous aggression, but also as part of normal metabolism in relation to, among other factors, growth or a high-energy diet (Castillo et al, 2001; Castillo et al, 2003), this rise seems likely to have been due to these latter factors.

The question nevertheless arises whether the rise in ROS indicates antioxidant insufficiency (Castillo et al, 2006). SAC values were generally close to the mean of 303  $\mu\text{mol HClO}/\text{mL}$  observed in the above-mentioned study of Carletti et al (2007). Assuming that SAC production increases in response to a ROS challenge, our results (see Fig. 1) suggest that whereas in the CTRL group the response of antioxidants to a ROS challenge was immediate and more than sufficient to stabilize ROS levels during the growing stage but was insufficient during the finishing stage, in group Cu-S the SAC response was insufficient during the growing stage (possibly because higher Cu intake increased the ROS challenge and/or caused a delay in the SAC response), but increased during the finishing stage. This late increase in SAC levels in group Cu-S may perhaps be due to the presumable gradual accumulation of hepatic Cu in this group, which may possibly have favoured the production of the Cu-dependent enzymes that contribute to SAC (Taylor et al, 1988). Be that as it may, the behaviour of ROS and SAC in the two groups is compatible with the possibility that Cu supplementation may, through different routes, simultaneously have both positive and negative effects on oxidative stress; further research will be necessary to elucidate this issue.

## **Conclusion**

Under the conditions of this study, routinely Cu supplementation (15 mg/kg DM) of the concentrate fed to growing and finishing calves had no significant effect on either productive performance or ROS levels, but was associated with a marked difference in the time course of antioxidant defence, suggesting the potential antioxidant role of Cu against ROS production associated to a fattening diet. Although no clinical symptoms of Cu toxicosis were observed, the numerically higher AST and GGT activities in supplemented animals are consequent to higher Cu hepatic accumulation. Further studies are required to evaluate the convenience of Cu supplementation in feedlot systems, due to their positive and negative effects through different routes.

## **Acknowledgements**

This research was supported by the Xunta de Galicia (Spain) through grant 07MRU030261PR, and through a PhD research grant awarded to M. García-Vaquero by the Xunta de Galicia. The authors thank Lucía Iglesias Casanova for expert technical assistance.

## **Conflict of interest statement**

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence the content of the paper.

**Bibliografía/References**

- Carletti, M., Cantiello, M., Giantin, M., Nebbia, C., Cannizzo, F.T., Bollo, E., Dacasto, M., 2007. Serum antioxidant enzyme activities and oxidative stress parameters as possible biomarkers of exposure in veal calves illegally treated with dexamethasone. *Toxicology in Vitro* 21, 277-283.
- Castillo, C., Benedito, J.L., Lopez-Alonso, M., Miranda, M., Hernandez, J., 2001. Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Archivos de Medicina Veterinaria* 33, 5-20.
- Castillo, C., Hernández, J., López Alonso, M., Miranda, M., Benedito, J.L., 2003. Values of plasma lipid hydroperoxides and total antioxidant status in healthy dairy cows: preliminary observations. *Archives of Animal Breeding* 46 (3), 227-233.
- Castillo, C., Hernández, J., Pereira, V., Méndez, J., Vázquez, P., Miranda, M., Benedito, J.L., 2009. Serum metabolites and enzyme activities as biomarkers of high-grain diet consumption in finishing bull calves. In: *Proceedings of the 60th annual meeting of the European Association for Animal Production (EAAP)*, Barcelona, Spain, pp. 618.
- Castillo, C., Hernandez, J., Valverde, I., Pereira, V., Sotillo, J., Lopez-Alonso, M., Benedito, J.L., 2006. Plasma malondialdehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Research in Veterinary Science* 80, 133-139.
- Cohen, A.M., Teitelbaum, A., Miller, E., Ben-Tor, V., Hirt, R., Fields, M., 1982. Effect of copper on carbohydrate metabolism in rats. *Israel Journal of Medical Sciences* 18 (8), 840-844.
- Engle, T.E., Fellner, V., Spears, W.J., 2001. Copper status, serum cholesterol, and milk fatty acid profile in holstein cows fed varying concentrations of copper. *Journal of Dairy Science* 84, 2308-2313.
- Engle, T.E., Spears, J.W., 2000. Dietary copper effects on lipid metabolism, performance, and ruminal fermentation in finishing steers. *Journal of Animal Science* 78, 2452-2458.
- Engle, T.E., Spears, J.W., Armstrong, T.A., Wright, C.L., Odle, J., 2000a. Effects of dietary copper source and concentration on carcass characteristics and lipid and cholesterol metabolism in growing and finishing steers. *Journal of Animal Science* 78, 1053–1059.
- Engle, T.E., Spears, J.W., Edens, F.W., 2000b. Dietary copper effects on lipid metabolism and circulating catecholamine concentrations in finishing steers. *Journal of Animal Science* 78, 2737–2744.
- Entidad Nacional de Acreditación, 2005. CGA-ENAC-LEC Rev. 5: Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según norma UNE-EN ISO/IEC 17025. <http://www.enac.es>. Accessed 15 May 2009.
- European Commission, 2003. Commission Regulation (EC) No 1334/2003 of 25 July 2003 amending the conditions for authorisation of a number of additives in feedingstuffs belonging to the group of trace elements. *Official Journal of the European Union* L187, 11-15.

de Blas, C., Mateos, C.C., Rebollar, P., 2003. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos, 2ª ed., Madrid (Spain); Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.

Fields, M., Reiser, S., Smith, J.C., 1983. Effect of copper or insulin in diabetic copper-deficient rats. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 173 (1), 137-139.

Gaetke, L.K., Chow, C.K., 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 147-163.

Gengelbach, G.P., Ward, J.D., Spears, J.W., 1994. Effect of dietary copper, iron, and molybdenum on growth and copper status of beef cows and calves. *Journal of Animal Science* 72, 2722-2727

Gleghorn, J.F., Elam, N.A., Galyean, M.L., Duff, G.C., Cole, N.A., Rivera, J.D., 2004. Effects of crude protein concentration and degradability on performance, carcass characteristics, and serum urea nitrogen concentrations in finishing beef steers. *Journal of Animal Science* 82, 2705–2717.

Gummow, B., 1996. Experimentally induced chronic copper toxicity in cattle. *Onderstepoort Journal Veterinary Research* 63, 277–288.

Kaneko, J.J., Harvey, J.W. Bruss, M.L., 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals*, 6th ed., Orlando (USA), Academic Press.

Khan, M.A., Lee, H.J., Lee, W.S., Kim, H.S., Ki, K.S., Park, S.J., Ha, J.K., Choi, Y.J., 2007. Starch source evaluation in calf starter: I. Feed consumption, body weight gain, structural growth and blood metabolites in Holstein calves. *Journal of Dairy Science* 90, 5259-5268.

Lopez-Guisa, J.M., Satter, L.D., 1992. Effect of copper and cobalt addition on digestion and growth in heifers fed diets containing alfalfa silage or corn crop residue. *Journal of Dairy Science* 75, 247-256.

Lorenz, I., 2004. Investigations on the influence of serum D-lactate levels on clinical signs in calves with metabolic acidosis. *The Veterinary Journal* 168, 323-327.

Lykkesfeldt, J., Svendsen, O., 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal* 173, 502-511.

Minervino, A.H.H., Barreto, R.A., Ferreira, R.N.F., Rodrigues, F.A.M.L., Headley, S.A. Mori, C.S., Ortolani, E.L., 2009. Clinical observations of cattle and buffalos with experimentally induced chronic copper poisoning. *Research in Veterinary Science* 87, 473-478.

Miranda, M., Gutiérrez, B., Benedito, J.L., Blanco-Penedo, I., García-Vaquero, M., López-Alonso, M., 2010. Influence of breed on blood and tissue copper status in growing and finishing steers fed diets supplemented with copper. *Archives of Animal Nutrition* 64 (2), 98-110.

Mori, A., Urabe, S., Asada, M., Tanaka, Y., Tazaki, H., Yamamoto, I., Kimura, N., Ozawa, T., Morris, S.T., Hickson, R., Kenyon, P.R., Blair, H., Choi, C.B., Arai, T., 2007. Comparison of plasma metabolite concentrations and enzyme activities in beef cattle raised by different feeding systems in Korea, Japan and New Zealand. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 54, 342-345.

NRC (National Research Council), 2001. *Nutrient requirements of dairy cattle*, 7th ed., Washington, National Academic Press.

Ozcelik, D., Ozaras, R., Gurel, Z., Uzun, H., Aydin, S., 2003. Copper-mediated oxidative stress in rat liver. *Biological Trace Element Research*, Volume 96 (1-3), 209-216.

Piva, G., Rossi, F., 1999. Possible alternatives to the use of antibiotics as growth promoters. New additives. In *Feed Manufacturing in the Mediterranean Region*. CIHEAM-Options Mediterraneennes 37, 83–106.

Puls, R., 1994. *Mineral Levels in Animal Health: Diagnostic Data*. 2nd ed., Clearbrook (Canada), Sherpa International.

Quiroz, G.F., Bouda, J., 2001. Fisiopatología de las deficiencias de cobre en rumiantes y su diagnóstico. *Veterinaria Mexico* 32 (4), 289-296.

Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W., Constable, P.D., 2006. *Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th ed., Philadelphia (USA), WB Saunders.

Rossi, J.E., Loerch, S.C., Keller, H.L., Willett, L.B., 2001. Effects of dietary crude protein concentration during periods of feed restriction on performance, carcass characteristics, and skeletal muscle protein turnover in feedlot steers. *Journal of Animal Science* 79, 3148-3157.

Russell, K.E., Roussel, A.J., 2007. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. *Veterinary Clinics: Food Animal* 23, 403-426.

Schroeder, A.L., Bergen, W.G., Merkel, R.A., 1990. Estimation of lean body mass (LBM), empty body protein (EBP) and skeletal muscle protein (SMP) from urinary creatinine excretion (UCE) in beef steers. *Journal of Animal Science* 68 (Suppl. 1), 311 (Abstr.).

Suttle, N., 1993. Overestimation of copper deficiency. *The Veterinary Record* 133, 123-124.

Taylor, G.G., Bettger, W.J., Bray, T.M., 1988. Effect of dietary zinc or copper deficiency in the primary free radical defence system in rats. *Journal of Nutrition* 118, 613-621.

Trotti, R., Caratelli, M., Barbieri, M., 2002. Performance and clinical application of a new, fast method for the detection of hydroperoxides in serum. *Panminerva Medica* 44, 37–40.

Trotti, R., Caratelli, M., Barbieri, M., Micieli, G., Bosone, D., Rondanelli, M., Bo, P., 2001. Oxidative stress and a thrombophilic condition in alcoholics without severe liver disease. *Haematologica* 86, 85–91.

Underwood, E.J., Suttle, N.F., 2003. Los minerales en la nutrición del ganado. 3ª ed., Zaragoza (Spain), Editorial Acribia S.A.

Vernon, R.G., 2002. Nutrient partitioning, lipid metabolism and relevant imbalances. In: Kaske. M., Scholz, H., Holtersshinken, M. (Eds), Recent developments and perspectives in bovine medicine, Klinik fur Rinderkrankheiten, Hannover, Germany, pp. 210-223.

Ward, J. D., Spears, J.W., 1997. Long-term effects of consumption of low-copper diets with or without supplemental molybdenum on copper status, performance, and carcass characteristics of cattle. *Journal of Animal Science* 75, 3057-3065.

Ward, J.D., Spears, J.W., Kegley, E.B., 1993. Effect of copper level and source (copper lysine vs copper sulfate) on copper status, performance, and immune response in growing steers fed diets with or without supplemental molybdenum and sulfur. *Journal of Animal Science* 71, 2748-2755.

**Tabla 1.** Ingredientes y composición química del concentrado usado en el presente estudio.**Table 1.** *Ingredients and chemical composition of the concentrate supplied in the present study.*

	<i>Growing</i>	<i>Finishing</i>
<i>Ingredient (g/kg DM)</i>		
Corn	400	420
Barley	208	212
Soybean meal (44% CP)	168	150
Wheat bran	90	52
Corn gluten feed	60	50
Soya oil	13	10
Molasses	10	10
Sodium carbonate	12	10
Sodium bicarbonate	10	7
Monocalcium phosphate	4	2
Vitamin premix <sup>a</sup>	5	5
<i>Chemical composition (g/kg DM)</i>		
CP	147	137
CF	40	44
NDF	213	208
ADF	108	111
EE <sup>b</sup>	34	35
NFC <sup>c</sup>	556	559
Starch	408	408
Ash	50	61
<i>Mineral content (g/kg DM)</i>		
Sulfur (S)	0.9	0.9
Calcium (Ca)	9	9
Sodium (Na)	1.9	3.1
Potassium (K)	7.3	7.3
Magnesium (Mg)	2.9	2.6
Phosphorus (P)	4.8	5.6
Manganese (Mn)	0.05	0.07
Molibdenum (Mo)	0.018	0.017
Iron (Fe)	0.193	0.265
Zinc (Zn)	0.06	0.062
Copper (Cu, mg/kg DM)	5	8

<sup>a</sup> Vitamin premix contained per kg DM premix: 10.000 IU vitamin A, 2.000 IU vitamin D, 25 mg/kg vitamin EL; <sup>b</sup> EE: ether extract content; <sup>c</sup> NFC: non-fiber carbohydrates calculated as 100 – (CP + ash + NDF + EE, in %DM).

**Tabla 2.** Parámetros productivos evaluados al matadero a la edad de 36 semanas (media±desviación estándar).

**Table 2.** Productive performance evaluated at slaughter at age 36 weeks (means±SEMs).

Variable	Group <sup>a</sup>		P
	CTRL	Cu-S	
Initial weight (kg)	115.4±9	129±15	0.454
Final weight (kg)	399.3±43	422±36	0.567
ADG (kg)	1.7±0.2	1.8±0.2	0.428
Daily intake <sup>b</sup> (kg/day)	7.6	7.7	----
Feed <sup>b</sup> :gain ratio	4.9	4.9	----

<sup>a</sup>Cu-S with, and CTRL without, dietary Cu supplement (15 mg/kg DM); <sup>b</sup>Concentrate.

**Tabla 3.** Parámetros determinados en los grupos Cu-S y CTRL (media±desviación estándar), junto con los resultados del ANOVA correspondientes.

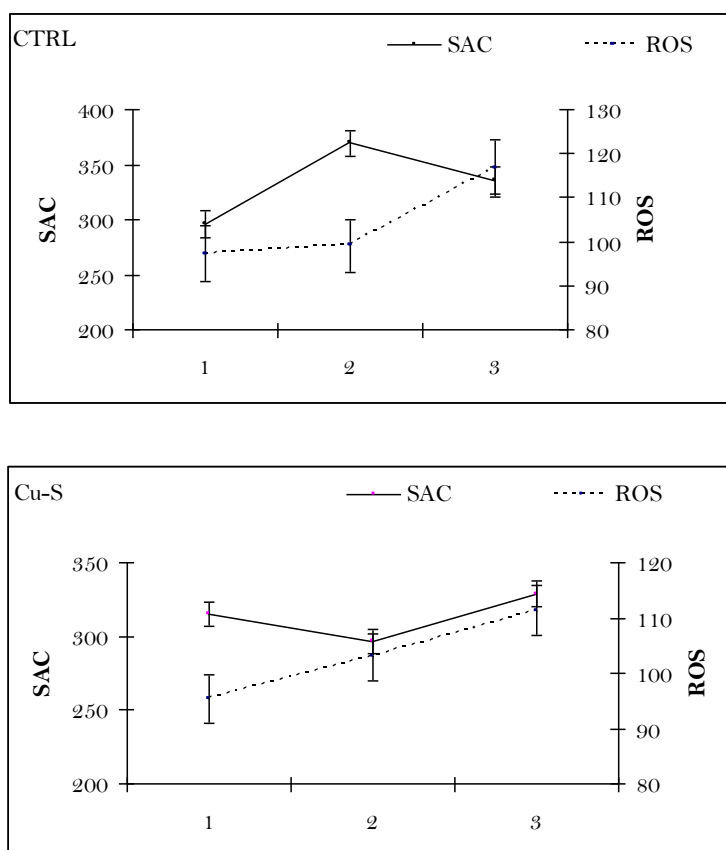
**Table 3.** Parameters determined in the blood of groups Cu-S and CTRL (means±SEMs), together with the corresponding ANOVA results.

Parameter	Group <sup>1</sup>	Sampling date			Effect		
		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T	T×TR	TR
ROS (CARR U)	CTRL	97.23±6.4	99.11±6.0	116.67±6.4	0.005	0.691	0.793
	Cu-S	95.36±4.3	102.88±4.3	111.30±4.5			
SAC (μmol HClO/mL)	CTRL	296.31±12.5	369.23±11.8	336.02±12.5	0.016	<0.001	0.022
	Cu-S	315.24±8.4	296.9±8.4	328.92±8.8			
Glucose (mg/dL)	CTRL	95.46±3.3	91.41±3.3	96.86±3.5	0.001	0.004	<0.001
	Cu-S	74.52±2.4	90.58±2.4	97.23±2.4			
NEFA (mmol/L)	CTRL	0.158±0.03	0.209±0.03	0.331±0.03	<0.001	0.432	0.255
	Cu-S	0.172±0.02	0.187±0.02	0.275±0.02			
Cholesterol (mg/dL)	CTRL	92.92±6.3	101.66±2.3	82.56±6.6	0.087	0.233	0.046
	Cu-S	95.39±4.4	106.42±4.4	102.79±4.6			
SUN (mg/dL)	CTRL	17.05±2.17	31.36±2.17	30.18±2.29	<0.001	0.175	0.127
	Cu-S	17.9±1.5	29.63±1.5	23.84±1.6			
Creatinine (mg/dL)	CTRL	1.17±0.04	1.38±0.04	1.55±0.04	<0.001	0.133	0.154
	Cu-S	1.19±0.03	1.36±0.03	1.42±0.03			
TSP (g/dL)	CTRL	6.54±0.2	6.38±0.2	6.84±0.2	0.025	0.177	0.715
	Cu-S	6.29±0.1	6.62±0.1	6.73±0.1			
Albumin (g/dL)	CTRL	3.57±0.1	4.41±0.1	4.29±0.1	<0.001	0.001	0.879
	Cu-S	3.90±0.1	4.53±0.1	3.87±0.1			
AST (IU/L)	CTRL	59.46±8.0	67.62±8.0	59.77±8.4	0.680	0.769	0.075
	Cu-S	75.22±5.6	73.53±5.6	68.0±5.8			
GGT (IU/L)	CTRL	23.44±2.5	25.50±2.5	23.19±2.6	0.187	0.144	0.194
	Cu-S	22.47±1.8	26.14±1.8	30.58±1.8			

<sup>1</sup>Cu-S with, and CTRL without, dietary Cu supplement at an average 15 mg/kg DM.

**Figura 1.** Representación temporal de la capacidad antioxidante total (SAC,  $\mu\text{mol HClO/mL}$ ) y especies reactivas de oxígeno (ROS, unidades CARR) en terneros con (gráfico inferior) y sin (gráfico superior) suplemento dietético de Cu de 15 mg/kg MS. 1, 2, 3: muestras extraídas a 12, 24 y 36 semanas de edad.

**Fig. 1.** Time course of total antioxidant capacity (SAC,  $\mu\text{mol HClO/mL}$ ) and reactive oxygen species (ROS, CARR units) in calves with (bottom panel) and without (top panel) dietary Cu supplement at an average 15 mg/kg DM. 1, 2, 3: samples taken at ages 12, 24 and 36 weeks.



## **CAPÍTULO 5**

### *CHAPTER 5*

**Estudio histopatológico sobre los efectos de la suplementación con Cu en la defensa antioxidante y daño oxidativo en el hígado de ganado vacuno**

*Histopathological study on the effects of Cu supplementation on antioxidant defense and oxidative damage in the liver of cattle*



## Introducción

El cobre (Cu) es un metal esencial asociado con varias enzimas (ya sea como cofactor o como un componente alostérico) actuando en las reacciones intermediarias de transferencia de electrones en las reacciones redox (Uauy *et ál.*, 1998) y por tanto es vital para la función normal de los organismos. El Cu en el hígado se acumula ligado a metalotioneínas (MT), proteínas implicadas en la detoxificación de metales esencial y no esenciales, el almacenamiento de metales esenciales y la absorción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (López-Alonso *et ál.*, 2005; Yoshida *et ál.*, 2005; Formigari *et ál.*, 2007). El Cu también forma parte del sistema de defensa antioxidante de las células debido a su papel esencial en la Cu-Zn superóxido dismutasa (SOD) y ceruloplasmina (Pan y Loo, 2000). Por lo tanto, la deficiencia de Cu en el ganado bovino se asocia con un aumento de los daños oxidativos (Ward y Spears, 1997; Gengelbach y Spears, 1998; Ceron *et ál.*, 2000 a-b).

Sin embargo, las mismas propiedades que hacen del Cu esencial, cuando el metal se presenta en exceso también generan radicales libres que pueden ser seriamente perjudiciales para las células (Rana, 2008). La toxicidad hepática, causada por la sobrecarga de Cu, se relaciona con las propiedades redox del Cu y con la formación de ROS (Britton, 1996; Luza y Speisky, 1996). ROS son altamente reactivos y son capaces de dañar todas las macromoléculas biológicas como las proteínas, los lípidos y el ADN (al Grune *et ál.*, 1995) pudiendo conducir a la apoptosis (Lin *et ál.*, 2003; Wätjen y Beyersmann, 2004; Banasik *et ál.*, 2005; Xu *et ál.*, 2006). Tradicionalmente, el ganado vacuno se pensaba que era relativamente tolerante a la acumulación de Cu y ya que la deficiencia de Cu es considerada como uno de los principales trastornos nutricionales en el ganado de pastoreo (Ramírez *et ál.*, 1998), las dietas del ganado vacuno se suplementan regularmente con altas concentraciones de Cu (hasta 35 mg/kg de materia seca (MS), el nivel máximo de los suplementos de Cu para el ganado bovino establecidos por la Unión Europea, la Comisión Reglamento 1334/2003/EC), muy por encima de los requisitos fisiológicos de esta especie (10 mg/kg MS; NRC, 2000). Sin embargo, en los últimos años se ha observado un aumento en el número de episodios de toxicidad de Cu en bovinos criados en sistemas de producción intensivos (Biderbost *et ál.*, 2000; VLA, 2001) y la suplementación excesiva con Cu ha sido asociada con una hepatopatía subclínica y el aumento de las enzimas hepáticas sin signos clínicos de toxicidad (Laven *et ál.*, 2004). Es ampliamente aceptado que diagnóstico de la toxicidad crónica de Cu es complicado y que la evaluación de su riesgo sanitario no se debe basar únicamente en los análisis químicos (Walker, 1998; Kakkar y Jaffery, 2005), sin embargo, hasta el momento muy pocos estudios han prestado atención al hígado desde el punto de vista histológico y cuando lo hacen generalmente se centran en tejidos de ratas/ratones o rumiantes a los que se les ha inducido experimentalmente una intoxicación clínica por Cu (Kumaratilake y Howell, 1987; Alexandrova *et ál.*, 2008).

En un estudio reciente realizado por nuestro grupo de investigación se observó que la adición de 15 mg Cu/kg a un alimento concentrado estándar, que es el nivel de suplementación más frecuentemente empleado en los sistemas de cría intensiva en el noroeste de España y

también en muchos países europeos, no era necesario para mantener un adecuado status de Cu en los animales o para mejorar los parámetros productivos, por el contrario, un alto porcentaje de animales alimentados con esta dieta presentaron concentraciones de Cu hepático que podrían estar asociadas a toxicidad subclínica (García-Vaquero *et ál.*, 2010).

El objetivo de este trabajo es evaluar a nivel histopatológico el efecto de este suplemento de Cu en (i) la capacidad antioxidante, mediante la determinación de MT y la expresión de SOD en el hígado, así como (ii) la posible inducción de daño oxidativo por la determinación de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) como marcador de la producción de óxido nítrico, nitrotirosina (NITT) como marcador de daño oxidativo en proteínas, malondialdehído (MDA) como marcador de daño oxidativo en los lípidos y 8-oxoguanina (8-oxo) como marcador de daño oxidativo en el ADN - que (iii) podrían provocar un aumento de muerte celular por apoptosis - determinado por el citocromo c (cito-c), caspasa 1 (casp1) y Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL).

## **Material y métodos**

### **Animales**

Se seleccionaron 10 animales al azar (grupo no suplementado, n=5; grupo suplementado con Cu, n=5) de un experimento previo para evaluar la necesidad del empleo de los suplementos de Cu más frecuentes (15 mg de sulfato de Cu/kg MS) en ganado vacuno de carne de cría intensiva alimentado a base de alimentos concentrados durante todo el ciclo productivo para mantener los requisitos fisiológicos. Más detalles sobre el cuidado, manipulación y evaluación clínica de los animales, y la composición mineral, química y equilibrada de la dieta disponible en García-Vaquero *et ál.*, 2010).

La toma de muestras y procesamiento del tejido hepático procedente del lóbulo derecho externo se recogieron en el matadero al final del periodo de acabado, cuando los animales contaban con aproximadamente 9 meses de edad. Las muestras se almacenaron en formol, fueron deshidratadas e parafinados en un procesador automático Shandon Excelsior Tissue Processor Histokinette y posteriormente se procedió a la realización de cortes seriados del tejido de 6 µm de espesor para inmunohistoquímica.

Las secciones fueron rehidratadas y sometidas a proceso de recuperación de antígenos por calor en un microondas en tampón citrato a pH 6,0 durante 10 minutos (min) en el caso de casp1 y 30 min para MT o en tampón TEG a pH 9,1 durante 10 min para la iNOS y 30 min para NITT. Posteriormente las secciones fueron incubadas en 1,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en TBS Nonidet P-40 para bloquear la actividad peroxidasa endógena (TBS: 0,05 M Tris, pH 7,4, NaCl 0,15 M, con 0,01% Nonidet P-40) (Sigma-Aldrich, código N6507). A continuación las secciones se incubaron con suero de cabra al 10% (In Vitro, Fredensburg, Denmark, 04009-1A) en TBS/Nonidet P-40 durante 30 min a temperatura ambiente con el fin de bloquear la unión no específica de los anticuerpos.

### Inmunohistoquímica

Las secciones fueron incubadas durante la noche a 4°C con una de los siguientes anticuerpos primarios: ratón anti metalotioneína de caballo (MT-I+II) 1:50 (Dako, código M0639), ratón anti Cu-Zn superóxido dismutasa humana (Cu/Zn-SOD) 1:50 (Biogénesis, Reino Unido, código 8474-9702); conejo anti óxido nítrico inducible sintasa de ratón (iNOS) 1:100 (Alexis Biochemicals, San Diego, California, EE.UU., código 210-503-R050, como marcador de la producción de óxido nítrico); conejo anti-nitrotirosina (NITT) 1:200 (Alpha Diagnostics Int.; NITT código 12-A, como un marcador de nitración de los residuos de tirosina inducido por peroxinitrito); conejo anti malondialdehído de ratón (MDA) 1:100 (Alpha Diagnostics Int.; código MDA 11-S, como marcador de subproductos de la peroxidación de los ácidos grasos); ratón anti-8-oxoguanine (8-oxo) 1:100 (Chemicon, código 3560MAB, como marcador de los radicales libres inducidos por modificación en el ADN); conejo anti-citocromo c de caballo (cito-c) 1:100 (Cell Signaling Technology, código 4272, como un marcador de apoptosis), y conejo anti ICE/Caspase-1 de ratón (casp1) 1:100 (Santa Cruz, código sc-1218R, como marcador de apoptosis).

Los anticuerpos primarios fueron detectados mediante el uso de ratón biotinilado anti-conejo IgG 1:400 (Sigma-Aldrich, B3275) o cabra anti-ratón biotinilado IgM 1:10 (Jackson ImmunoResearch Lab. West Baltimore Pike, West Grove, PA, EE.UU., código 115-065-020) o cabra biotinilado anti-ratón IgG 1:200 (Sigma-Aldrich, código B8774) durante 30 min a temperatura ambiente. Estos anticuerpos secundarios fueron detectados por el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (StreptABComplex/HRP, Dako, código K377 y Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, código NEL 750001EA) durante 30 min a temperatura ambiente y la amplificación de la señal mediante tiramida (TSA)-kit (NEN, Life Science Products, EE.UU., código NEL700A), preparado de acuerdo con la recomendaciones del fabricante. La inmunoreacción se visualizó mediante 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en DAB/TBS (TBS: 0,05 M Tris, pH 7,4, 0,15 M NaCl) durante 10 min a temperatura ambiente. Con el fin de evaluar el grado de unión no específica en los experimentos de inmunohistoquímica, las secciones de control se incubaron en ausencia de anticuerpo primario, ausencia de anticuerpo secundario y la ausencia de DAB. Los resultados fueron considerados solamente si estos controles fueron negativos.

### Detección in situ de la fragmentación de ADN (TUNEL)

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end labeling (TUNEL) se realizó mediante Fragment End Labeling (FragEL) Detection Kit (Calbiochem, USA, code QIA33). El kit FragEL contiene todos los materiales utilizados y cada paso se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las secciones rehidratadas fueron incubadas con 20 µg/mL de proteinasa K durante 20 min para romper las proteínas nucleares. Después de la incubación en un tampón de equilibrado durante 20 min, las secciones se incubaron con TDT y biotina marcado con deoxinucleótidos (dNTP-biotina) en una cámara humificada a 37°C durante 1,5 h. A continuación se aplicó un tampón de lavado y una solución de parada durante 5 min a temperatura ambiente para detener la reacción. Después de lavar con TBS y la incubación en tampón de bloqueo durante 10 min, las secciones se incubaron con estreptavidina peroxidasa durante 30 min y se utilizó DAB como cromógeno. En

las secciones fueron contrastados con verde de metilo. Las secciones de control negativo fueron tratadas de manera similar, pero se incubaron en ausencia de la enzima TdT o dNTP biotina o peroxidasa-estreptavidina. Las secciones de TUNEL se compararon con otras tinciones para otros marcadores de apoptosis como los nombrados cito-c y casp1. Además, los criterios morfológicos de la apoptosis (por ejemplo, la contracción de células, la formación de cuerpos apoptóticos, vesiculación de la membrana, núcleos picnóticos) fueron evaluados a la hora de realizar el recuento celular.

#### Recuento celular

Los recuentos de células se llevaron a cabo en el 0,39 mm<sup>2</sup> áreas próximas a las venas centrales y tríadas portales (0,78 mm<sup>2</sup> para cada animal) en 6 secciones  $\mu$ m, permitiendo su análisis estadístico. Las células teñidas positivamente, que se definen como células con una tinción de su soma (citoplasma), o en el caso de 8-oxo y TUNEL con tinción nuclear, fueron contadas. Los recuentos de células se realizaron de manera ciega y aleatoria por la misma persona a la que no se le fue revelada la identidad de los animales.

#### Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS para Windows v. 15.0. La resultados fueron evaluados por un análisis de varianza (ANOVA) para comprobar la influencia de la región en el hígado (venas centrales y espacios porta) y los suplementos de Cu (animales suplementados con Cu frente a los no suplementados) sobre la diferente distribución de las células positivas. En todos los casos el criterio para la significación estadística fue de  $p < 0,05$ .

## Resultados

#### Expresión de MT y SOD

En todas las secciones del hígado de ambos animales no suplementados y suplementados con Cu, la expresión de MT fue muy difusa por todo el parénquima hepático, sin la existencia de unas claras células positivas (+), por lo que no fue posible hacer el recuento celular (Figura 1). Los animales del grupo no suplementado mostraron significativamente más células SOD + alrededor de las tríadas portales que en las venas centrales, sin embargo esta diferencia no fue apreciada en los animales del grupo suplementado con Cu (Tabla 1). En todos los animales las células + para la SOD se distribuyeron por todo el parénquima hepático, sin ningún tipo de asociación especial en el hígado alrededor de cualquier estructura, tales como vasos o tejido conectivo en las venas centrales o tríadas portales, lo que da lugar a una imagen histológica idéntica en ambos grupos de animales (Figura 2).

#### Estrés oxidativo

Los animales del grupo no suplementado mostraron significativamente mayor cantidad de células + para iNOS y NIT2 en los espacios porta que en las venas centrales, sin embargo, en los animales del grupo suplementado con Cu las diferencias en el contaje celular entre ambas regiones ya no apreciaban ya que el número de células + aumenta significativamente en ambas regiones, aunque este aumento fue mayor alrededor de las venas centrales (71% para tanto

iNOS y NITT) que en los espacios porta (32 y 42% para la iNOS y NITT respectivamente) (Tabla 1). Las células + para iNOS (Figura 3) y NITT (Figura 4) en los animales del grupo no suplementado fueron hepatocitos, células de Kupffer y macrófagos localizados inmediatamente alrededor del vaso central de la región de la vena central, y a medida que la carga de Cu se incrementó en el grupo suplementado, el número y inmunorreactividad de las células aumentó en esta misma localización. Sin embargo, en la espacios porta las células + se localizaban de modo más disperso por todo el campo alrededor de la tríada portal, mientras que en los animales suplementados las células se presentaban de una manera más compacta alrededor del tejido conectivo de las tríadas portales.

No hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de células + para 8-oxo y MDA entre las venas centrales y los espacios porta entre ambos grupos de animales y tampoco diferencias con la suplementación de Cu (Tabla 1). En el caso de los 8-oxo (Figura 5) y MDA (Figura 6), las células + se distribuyeron por todo el parénquima, sin ningún tipo de asociación especial a cualquier estructura del hígado en las venas centrales y la región de las triadas portales de los animales no suplementados y suplementados con Cu.

#### Muerte celular por apoptosis

No hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de células + para TUNEL, cito-c y casp1 entre las venas centrales y espacios porta o animales no suplementados y suplementados con Cu, así como entre ambos grupos de animales en cada una de las zonas en el hígado (Tabla 1). Las células + para todos estos marcadores fueron básicamente indetectables, y la inmunorreactividad para cito-c y casp1 como un punteado citoplasmático sugiere la localización mitocondrial de la proteína (Woo *et ál.*, 1999), mientras que el número de células casp1 y cito-c + considerados como las células con patrón de tinción citosólico difuso fueron poco frecuentes y estuvieron en concordancia con el reducido número de células TUNEL + (Figura 7).

### Discusión

Los resultados de nuestro estudio, con niveles significativamente mayores de células + de SOD, iNOS y NITT alrededor de las tríadas portales en comparación con las venas centrales en el grupo de animales no suplementado destaca el papel antioxidante del Cu en el células hepáticas. Dado a que estos animales que tienen un adecuado status de Cu- la concentración de Cu en los tejidos y los parámetros hematológicos dentro de los rangos normales descritos para el ganado vacuno (ver más en García-Vaquero *et ál.*, 2010)-la mayor actividad SOD, así como el daño oxidativo mayor medido por la inmunorreactividad a iNOS y NITT en las tríadas portales podrían indicar una mayor actividad metabólica en esta región en un hígado normal. Debido al característico flujo de sangre en el que la sangre oxigenada, nutrientes y toxinas llegan por primera vez a los lóbulos hepáticos través de los vasos de la tríada portal (Ross y Pawlina, 2006) las células de esta región actuarían como la primera defensa línea contra las toxinas que entran en el hígado. A mayores cargas de Cu hepático en los animales del grupo suplementado (50% de los terneros mostraron concentraciones hepáticas de Cu dentro del

rango de toxicidad; García-Vaquero *et ál.*, 2010) un aumento del daño oxidativo, medido como mayor iNOS y NIT2, se observó en los espacios porta, pero especialmente alrededor de las venas centrales. Esta distribución de las células + para iNOS y NIT2 concuerda con los estudios histológicos en ganado ovino en el que en las primeras etapas de acumulación de Cu en el hígado se produce un aumento de los gránulos de Cu en las células de las zonas centrolobulillares, en particular junto a las venas centrales, y a medida que aumenta la carga de Cu se incrementaron el número y tamaño de los gránulos de Cu, extendiéndose este proceso centrifugamente hacia los espacios porta (Kumaratilake y Howell, 1987). El hecho de que tanto iNOS y NIT2 presentaran la misma distribución en el hígado concuerda con algunos estudios que demostraron que la nitración de tirosina es un proceso localizado en las proximidades de iNOS y otras enzimas capaces de reacciones peroxidativas y de producción de ROS (Druzhyna *et ál.*, 2005; Heijnen *et ál.*, 2006).

A pesar del aumento de iNOS y NIT2, no se apreció un efecto significativo de la suplementación con Cu sobre MDA, 8-oxo, cito-c, casp1 y TUNEL. Estudios en el hígado de ratas observaron un aumento en el daño oxidativo de las proteínas y la degeneración de las mismas causada por el Cu (Alexandrova *et ál.*, 2007; Alexandrova *et ál.*, 2008), peroxidación lipídica expresado como inmunorreactividad a MDA (Ohhira *et ál.*, 1995; Britton, 1996; Sansinanea *et ál.*, 1998; Zhang *et ál.*, 2000; Ozcelik y Uzun, 2009) y daño en el ADN (Halliwell y Gutteridge, 1990; Britton, 1996; Gaetke y Chow, 2003; Alexandrova *et ál.*, 2007) que finalmente podría conducir a la muerte celular por apoptosis (Logan y Sternlieb, 1996; Rana, 2008). De hecho, la peroxidación de los lípidos producida por ROS es considerada como el mecanismo más probable de daño a las proteínas, en lugar de una acción directa de los ROS generados por el Cu o la sobrecarga de otros metales (Yamada *et ál.*, 1992; Ogihara *et ál.*, 1995). Sin embargo, estos estudios fueron realizados con animales o células tratados con altas dosis de Cu. Así, a pesar de que el daño oxidativo se aprecia en las proteínas en los animales de este estudio, la sobrecarga de Cu del hígado no es suficiente para causar daño celular y tisular, hecho reflejado en los niveles prácticamente no detectables de muerte celular por apoptosis.

A pesar de que los animales suplementados de nuestro estudio presentaron mayor daño oxidativo hepático su protección antioxidante no mejoró, ya que la actividad SOD en los animales suplementados con Cu no difirió de la del grupo de animales control. Se han publicado resultados controvertidos en animales expuestos a altas dosis de Cu y otras sustancias tóxicas oxidantes. Se ha apreciado una disminución de la actividad SOD en el hígado y/o suero de ratas sometidas a altos niveles de Cu (Zhang *et ál.*, 2000; Gaetke *et ál.*, 2003; Roy *et ál.*, 2009) que podrían deberse a un aumento de la degradación proteica (Steinkühler *et ál.*, 1994; Kwon *et ál.*, 1998.) o a daños nucleares causados por la toxicidad de Cu que pueden afectar la expresión génica y, por tanto, a una disminución de actividad de la SOD (Mauriz *et ál.*, 2007; Yu *et ál.*, 2008). Sin embargo, se han apreciado elevadas concentraciones de SOD hepática en el hígado de ganado vacuno debido a un aumento de los niveles de ROS producido por sustancias tóxicas como etionina (Abd Ellah *et ál.*, 2009).

El incipiente daño oxidativo en el hígado de los animales suplementados con Cu en nuestro estudio podría explicarse por la baja capacidad del ganado vacuno para acumular Cu de modo seguro unido a las MT. La pobre inmunorreactividad para MT y la falta de diferencias entre los animales no suplementados y suplementados con Cu en los terneros de nuestro estudio están en concordancia con anteriores estudios toxicológicos en ganado vacuno en los que se muestra que el Cu es un pobre inductor de la síntesis de MT. Aunque se ha demostrado que el Cu puede inducir la síntesis de MT en animales de laboratorio, esto sólo sucede cuando la dosis administrada es muy grande (por ejemplo mediante inyecciones por vía intraperitoneal) y las variaciones del Cu dietético tienen poco efecto en la expresión de MT en el hígado hasta que los niveles son extremadamente altos (Mercer, 1997). Las marcadas diferencias entre las especies animales a la toxicidad de Cu parecen estar muy relacionadas con su capacidad para sintetizar MT y acumular más Cu unido a MT. Por lo tanto, la toxicidad por Cu es más reducida en especies como el cerdo y perro en el que la mayoría del Cu hepático está ligado a MT (Bremner y Beattie, 1990) y es muy alta en otras, como ovejas y vacas, que tienen una limitada capacidad para inducir la síntesis de MT en respuesta al aumento en la ingesta alimentaria de Cu, incluso a muy altas concentraciones (Saylor *et ál.*, 1980; Bremner y Beattie, 1995; López-Alonso *et ál.*, 2005).

### **Conclusiones**

En las condiciones de este estudio, que son las condiciones del ganado vacuno criados en los sistemas intensivos en el noroeste de España y muchos países europeos, la aplicación rutinaria de suplementos de Cu aumentó el riesgo de los animales a padecer una toxicidad subclínica de Cu, sin cambios significativos en la capacidad de almacenamiento de Cu y el sistema de defensa antioxidante evaluada por la expresión de MT y SOD, pero con un aumento significativo e importante del daño oxidativo medido por la iNOS y NITT. iNOS y NITT podrían ser utilizados como marcadores tempranos de los cambios patológicos iniciales en el hígado causados por la suplementación de Cu en ganado vacuno.

Elsevier Editorial System(tm) for The Veterinary Journal  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Histopathological study on the effects of Cu supplementation on antioxidant defense and oxidative damage in the liver of cattle

Article Type: Original Article

Keywords: cattle; copper; subclinical toxicity; oxidative stress; antioxidant defense.

Corresponding Author: Dr. Miranda M, DMV, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade de Santiago de Compostela,

First Author: García-Vaquero Marco, Ph.D.

Order of Authors: García-Vaquero Marco, Ph.D.; Benedito JL, DMV, Ph.D.; López-Alonso M., DMV, Ph.D.; Miranda M, DMV, Ph.D.

**Abstract:** The aim of this paper is to evaluate at a histopathological level the effect of the commonly used Cu supplementation (15 mg/kg DM) in intensively reared cattle on (i) the antioxidant capacity—by the determination of MT and SOD expression in the liver—as well as (ii) the possible induction of oxidative damage—by the determination of inducible nitric oxide synthase (iNOS), nitrotyrosine (NITT), malondialdehyde (MDA) and 8-oxoguanine (8-oxo)—that (iii) could increase apoptotic cell death—determined by cytochrome c (cyto-c), caspase 1 (casp1) and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL). Liver samples from Cu-supplemented (15 mg Cu sulphate/kg MS, n=5) and non-supplemented calves (n=5) that form part of other experiment to evaluate Cu status were collected at slaughter and processed for immunohistochemistry and TUNEL. MT expression was diffuse and SOD showed slight changes although without statistical significance. iNOS and NITT positive (+) cells significantly increased, mainly around the central veins in the animals from the Cu supplemented group, while no differences were appreciated for the rest of the oxidative stress and apoptosis markers. Thus, under the conditions of this study, which are the conditions of the cattle raised in intensive systems in many European countries, routinely Cu supplementation increased the risk of the animals to undergo subclinical Cu toxicity, with no significant changes in the antioxidant defensive system evaluated by MT and SOD expression and with a significant and important increase of oxidative damage measured by iNOS and NITT increases that could be considered as the initial pathological changes in the liver of Cu exposed cattle before further oxidative damage in lipids, DNA and finally apoptosis will occur.

## ***Histopathological study on the effects of Cu supplementation on antioxidant defense and oxidative damage in the liver of cattle.***

M. García-Vaquero<sup>a</sup>, J.L. Benedito<sup>a</sup>, M. López-Alonso<sup>a</sup>, M. Miranda<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Patoloxía Animal, Facultade de Veterinaria, 27002, Lugo, Spain.

<sup>b</sup> Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultade de Veterinaria, 27002, Lugo, Spain.

### **Abstract**

*Copper (Cu) although essential to maintain an adequate antioxidative defense, can be act as a potent oxidant when present in excess. Recent studies in cattle point out that the regularly used levels of Cu supplementation in intensively reared cattle could be excessive, leading to excessive hepatic Cu accumulation and subclinical hepatopathy. The aim of this paper is to evaluate at a histopathological level the effect of the commonly used Cu supplementation (15 mg/kg DM) in intensively reared cattle in NW Spain on (i) the antioxidant capacity—by the determination of MT and SOD expression in the liver—as well as (ii) the possible induction of oxidative damage—by the determination of inducible nitric oxide synthase (iNOS) as a marker of nitric oxide production, nitrotyrosine (NITT) as a marker of oxidative damage in proteins, malondialdehyde (MDA) as a marker of oxidative damage in lipids and 8-oxoguanine (8-oxo) as a marker of oxidative damage in DNA—that (iii) could increase apoptotic cell death—determined by cytochrome c (cyto-c), caspase 1 (casp1) and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL). Liver samples from Cu-supplemented (15 mg Cu sulphate/kg MS, n=5) and non-supplemented calves (n=5) that form part of other experiment to evaluate Cu status during all the productive cycle were collected at slaughter and processed for immunohistochemistry and TUNEL staining. MT expression was diffuse all over the hepatic parenchyma, with no clear positive (+) cells and SOD showed slight changes with Cu supplementation in central veins and portal triads although without statistical significance. iNOS and NITT + cells significantly increased, mainly around the central veins in the animals from the Cu supplemented group, while no differences were appreciated for the rest of the oxidative stress (MDA and 8-oxo) and apoptosis markers (cyto-c, casp1 and TUNEL). Thus, under the conditions of this study, which are the conditions of the cattle raised in intensive systems in NW Spain and also many European countries, routinely Cu supplementation increased the risk of the animals to undergo subclinical Cu toxicity, with no significant changes in the antioxidant defensive system evaluated by MT and SOD expression and with a significant and important increase of oxidative damage measured by iNOS and NITT increases that could be considered as the initial pathological changes in the liver of Cu exposed cattle before further oxidative damage in lipids, DNA and finally apoptosis will occur.*

## Introduction

Copper (Cu) is an essential metal associated with several enzymes (either as a cofactor or as an allosteric component) that acts as an electron transfer intermediate in redox reactions (Uauy et al., 1998) therefore being vital for the normal function of the organisms. Cu in the liver is accumulated bound to metallothioneins (MT), proteins involved in the detoxification of essential and non-essential metals, storage of essential metals and sequestration of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) (López-Alonso et al., 2005; Yoshida et al., 2005; Formigari et al., 2007) Cu also forms part of the antioxidant defense system of the cells due to its essential role in the Cu-Zn superoxide dismutase (SOD) and caeruloplasmin (Pan and Loo, 2000). Thus, Cu deficiency in cattle is associated with increased oxidative damage (Ward and Spears, 1997; Gengelbach and Spears, 1998; Cerone et al., 2000 a-b).

However, the same properties that make Cu essential, when excess also generate free radicals that can be seriously deleterious to cells (Rana, 2008). Hepatic toxicity, caused by Cu overload, is hypothesized to result from redox properties of Cu and is connected with the formation of ROS (Britton, 1996; Luza and Speisky, 1996). ROS are highly reactive and are capable to damage all biological macromolecules like proteins, lipids and DNA (Grune et al. 1995) that can lead to apoptosis (Lin et al., 2003; Wätjen and Beyersmann, 2004; Banasik et al., 2005; Xu et al., 2006).

Traditionally, cattle were thought to be relatively tolerant to Cu accumulation and since Cu deficiency is considered one of the main nutritional disorders in grazing cattle (Ramirez et al. 1998), cattle diets are regularly supplemented with high Cu concentrations (up to 35 mg/kg DM, the maximum level of Cu supplementation for cattle established by the European Union; Commission Regulation 1334/2003/EC), well above general physiological requirements (10 mg/kg DM; NRC, 2000). However, in recent years an increase in the number of episodes of Cu toxicity has been reported in cattle reared under intensive systems (Bidewell et al., 2000; VLA, 2001) and Cu oversupplementation has been associated with subclinical hepatopathy and increase in liver enzymes without clinical signs of toxicity (Laven et al., 2004). It is widely accepted that diagnosis of chronic Cu toxicity is complicated and that health risk assessment cannot be based solely on Cu chemical analyses (Walker, 1998; Kakkar and Jaffery, 2005); however, little attention was paid to the liver tissue from an histological point of view and when it does, the studies focused in rat tissue or ruminants that were experimentally induced clinical Cu intoxication (Kumaratilake and Howell, 1987; Alexandrova et al., 2008).

In a recent study carried out by our research group it was found that the addition of 15 mg/kg Cu to a standard concentrate feed, the commonly used Cu supplementation in cattle intensive production systems in NW Spain and also in many European countries, was not justified to maintain an adequate Cu status in the animals or to improve productive parameters; on the contrary, a high percentage of animals fed this Cu-supplemented diet had hepatic Cu concentrations that could be associated to subclinical Cu toxicity (García-Vaquero et al., 2010).

The aim of this paper is to evaluate at a histopathological level the effect of this Cu supplementation on (i) the antioxidant capacity—by the determination of MT and SOD expression in the liver—as well as (ii) the possible induction of oxidative damage—by the determination of inducible nitric oxide synthase (iNOS) as a marker of nitric oxide production, nitrotyrosine (NITT) as a marker of oxidative damage in proteins, malondialdehyde (MDA) as a marker of oxidative damage in lipids and 8-oxoguanine (8-oxo) as a marker of oxidative damage in DNA—that (iii) could increase apoptotic cell death—determined by cytochrome c (cyto-c), caspase 1 (casp1) and Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL).

## Material and methods

### Animals

10 animals were randomly selected (non-supplemented group, n=5; Cu supplemented group, n=5) from a previous experiment to evaluate the need of the commonly used Cu supplementation (15 mg Cu sulphate/kg DM) in the concentrate feed of intensive beef cattle during all the productive cycle to maintain the physiological requirements. More details concerning animal care and handling, clinical evaluation of the animals, mineral, chemical composition and balance of the diet available in García-Vaquero et al., 2010).

### Sample collection and tissue processing

Liver samples from the right external lobe were collected at slaughter at the end of the finishing period when animals were approximately 9 months old. Samples were then stored in formaldehyde, dehydrated according to standard procedures and embedded in paraffin by the fully automatic Shandon Excelsior Tissue Processor Histokinette and cut in serial 6 µm thick sections for immunohistochemistry.

Sections were rehydrated and underwent heat induced antigen retrieval in a microwave oven in citrate buffer at pH 6.0 for 10 min in the case of casp1 and 30 min for MT or TEG buffer at pH 9,1 for 10 minutes for iNOS and 30 minutes for NITT. They were incubated in 1,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS/Nonidet P-40 to quench endogenous peroxidase (TBS: 0.05 M Tris, pH 7.4, 0.15 M NaCl; with 0.01% Nonidet P-40) (Sigma-Aldrich, code N6507). The sections were then preincubated with 10% goat serum (In Vitro, Fredensburg, Denmark, 04009-1A) in TBS/Nonidet P-40 for 30 minutes at room temperature in order to block nonspecific binding.

### Immunohistochemistry

Sections were incubated overnight at 4°C with one of the following primary antibodies: mouse anti-horse metallothionein (MT-I+II) 1:50 (DAKO, code M0639); mouse anti-human Cu-Zn superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) 1:50 (Biogenesis, UK, code 8474-9702); rabbit anti-mouse inducible nitric-oxide synthase (iNOS) 1:100 (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA, code 210-503-R050; as a marker of nitric oxide production); rabbit anti-nitrotyrosine (NITT) 1:200

(Alpha Diagnostics Int.; code NITT 12-A; as a marker for peroxynitrite-induced nitration of tyrosine residues); rabbit anti-mouse malondialdehyde (MDA) 1:100 (Alpha Diagnostics Int.; code MDA 11-S; as a marker of byproducts of fatty acid peroxidation); mouse anti-8-oxoguanine (8-oxo) 1:100 (Chemicon, code MAB 3560; as a marker of free radical-induced base modification in the DNA); rabbit anti-horse cytochrom-c (cyto-c) 1:100 (Cell Signaling Technology, code 4272; as a marker for apoptotic signalling); and rabbit anti-mouse ICE/Caspase-1 (casp1) 1:100 (Santa Cruz, code sc-1218R; as a marker of apoptosis).

The primary antibodies were detected by using biotinylated mouse anti-rabbit IgG 1:400 (Sigma-Aldrich, B3275) or biotinylated goat anti-mouse IgM 1:10 (Jackson ImmunoResearch Lab., West Baltimore Pike, West Grove, PA, USA, code 115-065-020) or biotinylated goat anti-mouse IgG 1:200 (Sigma-Aldrich, code B8774) for 30 minutes at room temperature. These secondary antibodies were detected by streptavidin-biotin-peroxidase complex (StreptABComplex/HRP, DAKO, code K377 and Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, code NEL 750001EA) for 30 minutes at room temperature and tyramide signal amplification (TSA)-kit (NEN, Life Science Products, USA, code NEL700A) prepared according to the manufacturer's recommendations. The immunoreactions was visualized using 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in DAB/TBS (TBS: 0,05 M TRIS, pH 7,4, 0,15 M NaCl) for 10 minutes at room temperature. In order to evaluate the extent of nonspecific binding in the immunohistochemical experiments, control sections were incubated in absence of primary antibody, absence of secondary antibody and absence of DAB. Results were considered only if these controls were negative.

#### In situ detection of DNA fragmentation (TUNEL)

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end labeling (TUNEL) was performed using the Fragment End Labeling (FragEL) Detection Kit (Calbiochem, USA, code QIA33). The FragEL kit contains all the materials used below and each step was performed according to the manufacturer's recommendations. Rehydrated sections were incubated with 20 µg/ml proteinase K for 20 min to strip off nuclear proteins. After immersion in equilibration buffer for 20 min, the sections were incubated with TdT and biotin-labeled deoxynucleotids (dNTP-biotin) in a humidified chamber at 37°C for 1.5 h. This was followed by a wash buffer and the stop solution for 5 min at room temperature to stop the reaction. After washing in TBS and incubation in blocking buffer for 10 min, the sections were incubated with peroxidase-streptavidin for 30 min and afterwards DAB was used as chromogen. The sections were counterstained with methyl-green. Negative control sections were treated similarly, but incubated in the absence of TdT enzyme or dNTP-biotin or peroxidase-streptavidin. TUNEL stained tissue sections were compared with tissue sections stained for the apoptotic markers cyto-c and casp1. In addition, morphologic criteria for apoptosis (e.g. cell shrinkage, formation of apoptotic bodies, membrane blebbing, pyknotic nuclei) were evaluated.

### Cell counts

Cell counts were carried out in 0,39 mm<sup>2</sup> areas around central veins and portal triads (0,78 mm<sup>2</sup> for each animal) in 6 µm liver sections which allowed statistical analysis. To this end, positively stained cells, defined as cells with staining of the soma (cytoplasm), or in the case of 8-oxo and TUNEL cells with nuclear staining, were counted. The cells counts were made in a blinded and randomized manner by the same independent attending person, who was blinded to the animal identity.

### Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS for Windows v. 15.0. The results were evaluated by an analysis of variance (ANOVA) to check for the influence of the region within the liver (central veins versus portal triads) and Cu supplementation (Cu-supplemented versus non-supplemented) on positive cells of the different staining distribution. In all cases the criterion for statistical significance was  $p < 0.05$ .

## Results

### MT and SOD expression

In all liver sections from both non-supplemented and Cu-supplemented cattle, MT expression was diffuse all over the hepatic parenchyma, with no clear positive (+) cells, so it was no possible to make the cell counts (Fig. 1).

The animals from the non-supplemented group showed significantly more SOD + cells around the portal triads than central veins, however this difference was not appreciated in the animals from the Cu-supplemented group (Table 1). In all calves the SOD + cells were distributed all over the hepatic parenchyma, without any special association of the + cells around any particular liver structure such as vessels or connective tissue in central veins and portal triads, resulting in a identical image in both groups of animals (Fig. 2).

### Oxidative stress

Non-supplemented animals showed significantly higher iNOS and NITT + cells in the portal triads than in the central veins, however in the Cu-supplemented animals differences in the cell counts between both regions could no longer be appreciated since the number of + cells significantly increased in both regions, although this increase was higher around the central veins (71% for both iNOS and NITT) than in the portal triads (32 and 42% for iNOS and NITT respectively) (Table 1). The iNOS (Fig.3) and NITT (Fig. 4) + cells in the non-supplemented animals were occasional hepatocytes, Kupffer cells and macrophages localized immediately around the central vessel of the central veins, and as Cu load increased in the Cu-supplemented group, the number and immunoreactivity of the cells increased in this same location. However in the portal triads the + cells were localized as dispersed + cells all over the

field around the portal triad area, while in Cu-supplemented animals the + cells were placed immediately close to the connective tissue of the portal triads.

There were no statistically significant differences in 8-oxo and MDA + cells between central veins and portal triads in both groups of animals and also no differences with Cu supplementation (Table 1). In the case of 8-oxo (Fig. 5) and MDA (Fig. 6), the + cells were distributed all over the parenchyma without any special association to any liver structure in central veins and in portal triad areas of both non-supplemented and Cu-supplemented animals.

#### Apoptotic cell death

There were no statistically significant differences in TUNEL, cyto-c and casp1 + cells between central veins and portal triads or non-supplemented and Cu-supplemented cattle as well as between both groups of animals in each hepatic area (Table 1). The + cells of all these markers were basically undetectable, and the immunoreactivity for cyto-c and casp1 was predominantly punctuate suggesting the mitochondrial localization of the protein (Woo et al., 1999), while the number of casp1 and cyto-c + cells considered as those with cytosolic diffuse staining patterns were rare and were in good agreement with the reduced number of TUNEL + cells (Fig. 7).

### Discussion

The results of our study, with significantly higher SOD, iNOS and NITT + cells around the portal triads compared to the central veins in the control non-supplemented animals points out the antioxidative role of copper in the hepatic cell. Since these animals have an adequate Cu status –tissue Cu concentrations and haematological parameters were within the normal ranges described for cattle (see more at García-Vaquero et al., 2010)—the higher SOD activity as well as the higher oxidative damage measured by the iNOS and NITT immunoreactivity in the portal triads could indicate a higher metabolic activity in this region in a normal liver. Because of the characteristic blood flow within the hepatic lobules –oxygenated blood, nutrients and toxins arrive first into the hepatic lobules through the vessels of the portal triad (Ross and Pawlina, 2006)—cells around the portal triads act as the first defense line against toxins entering the liver.

At higher Cu hepatic loads in the animals of the Cu supplemented group (ca. 50% of calves showed hepatic Cu concentrations within the toxic range; García-Vaquero et al., 2010) an increase of the oxidative damage, measured as a higher iNOS and NITT immunoreactivity, was observed in portal triads but especially around the central veins. This distribution of iNOS and NITT + cells agreed with histological studies in sheep in which at early stages of hepatic copper accumulation the greatest intensity of Cu staining granules was appreciated in the cells of the centrolobular zones, particularly adjacent to central veins, and as Cu loading increased the

number and size of Cu granules increased and the positive reaction extended through the midlobular zones towards the portal triads (Kumaratilake and Howell, 1987). The fact that both iNOS and NIT followed the same distribution within the liver is in good agreement with some studies that demonstrated that tyrosine nitration of proteins is a process localized in close proximity to iNOS and to enzymes capable of peroxidative chemistry and ROS production (Druzhyina et al., 2005; Heijnen et al., 2006).

Despite the increase of iNOS and NIT, no significant effect of Cu supplementation was appreciated for MDA, 8-oxo, cyto c, casp1 and TUNEL. Studies in the liver of rats reported increased oxidative stress damage of proteins and protein degeneration caused by Cu (Alexandrova et al., 2007; Alexandrova et al., 2008), lipid peroxidation expressed as MDA activity or immunoreactivity (Ohhira et al., 1995; Britton, 1996; Sansinanea et al., 1998; Zhang et al., 2000; Ozcelik and Uzun, 2009) and DNA damage (Halliwell and Gutteridge, 1990; Britton, 1996; Gaetke and Chow, 2003; Alexandrova et al., 2007) that finally could lead to apoptotic cell death (Scheinberg and Sternlieb, 1996; Rana, 2008). In fact, lipid peroxidation produced by ROS is considered to be the most likely mechanism to damage proteins, rather than a direct action of ROS generated by Cu or other metals overload (Yamada et al., 1992; Ogihara et al., 1995). However, in these studies animals/cells were treated with high Cu doses. Thus, in the animals of the current study despite the oxidative damage appreciated in proteins, the Cu overload of the liver was not enough to cause cell and tissue injury, reflected in the almost non-detectable apoptotic cell death.

In spite of the Cu dosed animals in our study showed more oxidative damage in the liver Cu supplementation did not improve their antioxidative protection, SOD activity in the Cu-supplemented animal did not differ from that in the controls. Controversial results have been found in animals exposed to high Cu doses and other oxidative toxics. Decreased SOD activity was appreciated in the liver and/or serum of Cu loaded rats (Zhang et al., 2000; Gaetke et al., 2003; Roy et al., 2009) that could be due to an increase in protein degradation (Steinkühler et al., 1994; Kwon et al., 1998) or nuclear damage caused by Cu toxicity that could affect gene expression, and thus, a drop of SOD activity (Mauriz et al., 2007; Yu et al., 2008). However, elevated concentrations of hepatic SOD were described in the liver of cattle due to increased levels of ROS produced by toxics such as ethionine (Abd Allah et al., 2009).

The incipient oxidative damage found in the liver of the Cu supplemented animals in our study could be explained by the very low capacity of cattle to accumulate Cu safely-bound to MT. The poor immunoreactivity for MT and the lack of differences between non-supplemented and Cu supplemented calves in the current study are in good agreement with previous toxicological studies in cattle showing that Cu is a poor inducer of MT synthesis. Although it has been demonstrated that Cu can induce MT synthesis in laboratory animals, this only happens when administrated in a very large dose (i.e. intraperitoneal injections) and variations of dietary Cu have little effect on liver MT expression until the levels are extremely high (Mercer, 1997). The marked differences between animal species to Cu toxicity seem to be highly related to their

ability to synthesize MT and accumulate Cu bound to MT. Thus, Cu toxicity is reduced in the liver of species such as pig and dog in which most of the hepatic Cu is bound to MT (Bremner and Beattie, 1990) and is very high in others, as sheep and cattle, that have a limited capacity to induce MT synthesis in response to increased dietary Cu intake even at very high concentrations (Saylor et al., 1980; Bremner and Beattie, 1995; López-Alonso et al. 2005).

## **Conclusions**

Under the conditions of this study, which are the conditions of the cattle raised in intensive systems in NW Spain and also many European countries, routinely Cu supplementation increased the risk of the animals to undergo subclinical Cu toxicity, with no significant changes in the Cu storage capacity and the antioxidant defensive system evaluated by MT and SOD expression, but with a significant and important increase of oxidative damage measured by iNOS and NITT. iNOS and NITT could be used as early markers of initial pathological changes in the liver caused by Cu supplementation in cattle.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the Xunta de Galicia (Spain) through contract 07MRU030261PR and by a research grant María Barbeito awarded to García-Vaquero M. by the Dirección Xeral de Investigación, Desenvolvemento e Innovación from Xunta de Galicia and to FSE (Fondo Social Europeo) funds through Programa de Recursos Humanos, do Plan Galego de Investigación, Desenvolvemento e Innovación Tecnolóxica de Galicia. The authors thank Dr. Gutiérrez B. for samples collection.

**Bibliografía/References**

- Abd Ellah MR, Okada K, Goryo M, Oishi A, Yasuda J. 2009. Superoxide dismutase activity as a measure of hepatic oxidative stress in cattle following ethionine administration. *Vet J.* 182(2):336-41.
- Alexandrova A, Kebis A, Mislanova C, Kukan M. 2007. Copper impairs biliary epithelial cells and induces protein oxidation and oxidative DNA damage in the isolated perfused rat liver. *Exp Toxicol Pathol.* 58:255–261.
- Alexandrova A, Petrov L, Georgieva A, Kessiova M, Tzvetanova E, Kirkova M, Kukan M. 2008. Effect of copper intoxication on rat liver proteasome activity: relationship with oxidative stress. *J Biochem Mol Toxicol.* 22(5):354-62.
- Banasik A, Lankoff A, Piskulak A, Adamowska K, Lisowska H, Wojcik A. 2005. Aluminum-induced micronuclei and apoptosis in human peripheral-blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle. *Environ Toxicol.* 20(4):402–406
- Bidewell CA, David GP, Livesey CT. 2000. Copper toxicity in cattle. *Vet Rec.* 147:399–400.
- Bremner I, Beattie JH. 1990. Metallothionein and trace minerals. *Annu Rev Nutr.* 10: 63–83.
- Bremner I, Beattie JH. 1995. Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. *Proc Nutr Soc.* 54: 489–499.
- Britton RS. 1996. Metal-induced hepatotoxicity. *Semin Liver Dis.* 16(1):3–12.
- Cerone SI, Sansinanea AS, Streitenberg SA, García MC, Auza NJ. 2000a. Cytochrome c-oxidase, Cu,Zn-superoxide dismutase and caeruloplasmin activities in copper-deficient bovines. *Biol Trace Element Res.* 73: 269–278.
- Cerone SI, Sansinanea AS, Streitenberg SA, García MC, Auza NJ. 2000b. Bovine monocyte-derived macrophage function in induced copper deficiency. *Gen Physiol Biophys.* 19: 49–58.
- Commission Regulation 1334/2003/EC on amending the conditions for authorisation of a number of additives in feedingstuffs belonging to the group of trace elements. *Off. J. Eur Union.*
- Druzhyzna NM, Musiyenko SI, Wilson GL, LeDoux SP. 2005. Cytokines induce nitric oxide-mediated mtDNA damage and apoptosis in oligodendrocytes. Protective role of targeting 8-oxoguanine glycosylase to mitochondria. *J Biol Chem.* 280(22):21673-9.
- Formigari A, Irato P, Santon A. 2007. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 146(4):443-59.
- Gaetke LM, Chow CK. 2003 Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 189(1-2):147-63.

García-Vaquero, M., Miranda, M., López-Alonso, M., Castillo, C., Benedito, J.L., 2010. Evaluation of the need of copper supplementation in intensively reared beef cattle. doi:10.1016/j.livsci.2010.11.002.

Gengelbach GP, Spears JW. 1998. Effects of dietary copper and molybdenum on copper status, cytokine production and humoral immune response of calves. *J Dairy Sci.* 81: 3286–3292.

Grune T, Reinheckel T, Joshi M, Davies KJ. 1995. Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J Biol Chem.* 270(5):2344–2351.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Method Enzymol.* 186:1–85

Heijnen HF, van Donselaar E, Slot JW, Fries DM, Blachard-Fillion B, Hodara R, Lightfoot R, Polydoro M, Spielberg D, Thomson L, Regan EA, Crapo J, Ischiropoulos H. 2006. Subcellular localization of tyrosine-nitrated proteins is dictated by reactive oxygen species generating enzymes and by proximity to nitric oxide synthase. *Free Radic Biol Med.* 40(11):1903-13.

Kakkar P, Jaffery FN. 2005. Biological markers for metal toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol.* 19:335–349

Kumaratilake JS, Howell JM. 1987. Histochemical study of the accumulation of copper in the liver of sheep. *Res Vet Sci.* 42(1):73-81.

Kwon OJ, Lee SM, Floyd RA, Park JW. 1998. Thiol-dependent metal-catalyzed oxidation of copper, zinc superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol.* 1387: 249–256.

Laven RA, Livesey CT, Offer NW, Fountain D. 2004. Apparent subclinical hepatopathy due to excess copper intake in lactating Holstein cattle. *Vet Rec.* 155: 120-121.

Lin AMY, Fan SF, Yang DM, Hsu LL, Yang HJ. 2003. Zinc-induced apoptosis in substantia nigra of rat brain: neuroprotection by vitamin D3. *Free Radic Biol Med.* 34(11):1416–1425.

López-Alonso M, Prieto F, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Benedito JL. 2005. The role of metallothionein and zinc in hepatic copper accumulation in cattle. *Vet J.* 169(2):262-7.

Luza SC, SpeiskyHC. 1996. Liver copper storage and transport during development: Implications for cytotoxicity. *Am J Clin Nutr.* 63(5):812S–820S.

Mauriz JL, Molpeceres V., García-Mediavilla MV, González P, Barrio JP, González JG. 2007. Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J Pineal Res.* 42:222–230.

Mercer JFB. 1997. Gene regulation by copper and the basis for copper homeostasis. *Nutr.*13: 48–49.

- NRC (National Research Council), 2000. Nutrient Requirements of Beef Cattle, 7th ed. National Academy Press, Washington. Revised.
- Ogihara H, Ogihara T, Miki M, Yasuda H, Mino M. 1995. Plasma copper and antioxidant status in Wilson's disease. *Pediatr Res.* 37(2):219-26.
- Ohhira M, Ono M, Ohhira M, Sekiya C, Namiki M, Fujimoto Y, Nagao M, Mori M. 1995. Changes in free radical-metabolizing enzymes and lipid peroxides in the liver of Long-Evans with cinnamon-like coat color rats. *J Gastroenterol.* 30(5):619-23.
- Ozcelik D, Uzun H. 2009. Copper intoxication; antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Biol Trace Elem Res.* 127(1):45-52.
- Pan YJ, Loo G. 2000. Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T-lymphocytes. *Free Radic Biol Med.* 28: 824–830.
- Ramirez CE, Mattioli GA, Tittarelli CM, Giuliadori MJ, Yano H. 1998. Cattle hypocuprosis in Argentina associated with periodically flooded soils. *Livestock Prod Sci.* 55: 47–52.
- Rana SV. 2008. Metals and apoptosis: recent developments. *J Trace Elem Med Biol.* 22(4):262-84.
- Ross MH, Pawlina W. 2006. Histology. A text and atlas with correlated cell and molecular biology. 5<sup>th</sup> ed. Lippincott & Wilkins, Inc. EEUU.
- Roy DN, Mandal S, Sen G, Biswas T. 2009. Superoxide anion mediated mitochondrial dysfunction leads to hepatocyte apoptosis preferentially in the periportal region during copper toxicity in rats. *Chem Biol Interact.* 182(2-3):136-47.
- Sansinanea AS, Cerone SI, Streitenberger SA, García C, Auza N. 1998. Oxidative effect of hepatic copper overload. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.* 48(1):25-31.
- Saylor WW, Morrow FD, Leach RM. 1980. Copper-and zinc binding proteins in sheep liver and intestine: effects of dietary levels of the metals. *J Nutr.* 110: 460–468.
- Scheinberg IH, Sternlieb I. 1996. Wilson disease and idiopathic copper toxicosis. *Am J Clin Nutr.* 63:842S–845S.
- Steinkühler C, Carrì MT, Micheli G, Knoepfel L, Weser U, Rotilio G. 1994. Copper dependent metabolism of Cu-Zn superoxide dismutase in human K562 cells. Lack of specific transcriptional activation and accumulation of a partially inactivated enzyme. *Biochem J.* 302: 687–694.
- Uauy R, Olivares M, Gonzalez M. 1998. Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr.* 67(5):952S-959S.
- VLA Surveillance Report. 2001. July sees an increased incidence of copper poisoning in cattle. *Vet Rec.* 149:257–260.
- Walker CH. 1998. Biomarker strategies to evaluate the environmental effects of chemicals. *Environ Health Perspect* 106(S2):613–620

Ward JD, Spears J. 1997. Long-term effects of consumption of low-copper diets with or without supplemental molybdenum on copper status, performance and carcass characteristics of cattle. *J Anim Sci.* 75: 3057–3065.

Wätjen W, Beyersmann D. 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *BioMetals.* 17:65–78

Xu J, Ji LD, Xu LH. 2006. Lead-induced apoptosis in PC 12 cells: involvement of p53, Bcl-2 family and caspase-3. *Toxicol Lett.* 166:160–167

Yamada T, Sogawa K, Suzuki Y, Izumi K, Agui T, Matsumoto K. 1992. Elevation of the level of lipid peroxidation associated with hepatic injury in LEC mutant rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 77(1):121-4.

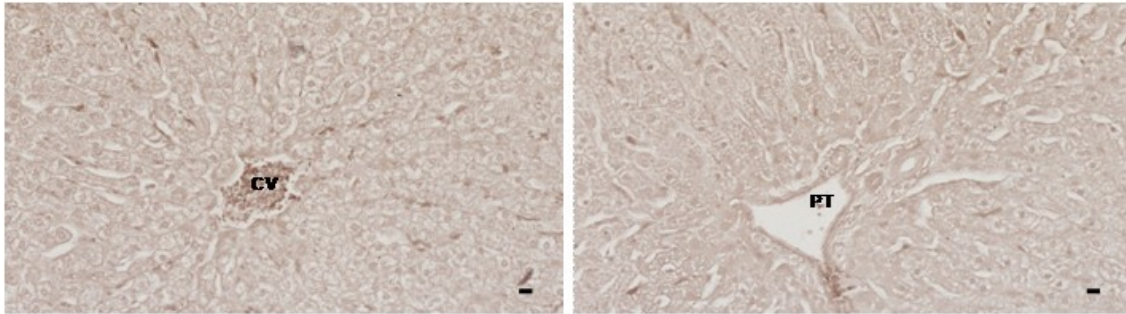
Yoshida M, Saegusa Y, Fukuda A, Akama Y, Owada S. 2005. Measurement of radical-scavenging ability in hepatic metallothionein of rat using in vivo electron spins resonance spectroscopy. *Toxicology.* 213(1-2):74-80.

Yu DY, Li WF, Deng B, Mao XF. 2008. Effects of lead on hepatic antioxidant status and transcription of superoxide dismutase gene in pigs, *Biol. Trace Elem Res.* 126:121–128.

Zhang SS, Noordin MM, Rahman SO, Haron J. 2000. Effects of copper overload on hepatic lipid peroxidation and antioxidant defense in rats. *Vet Hum Toxicol.* 42(5):261-4.

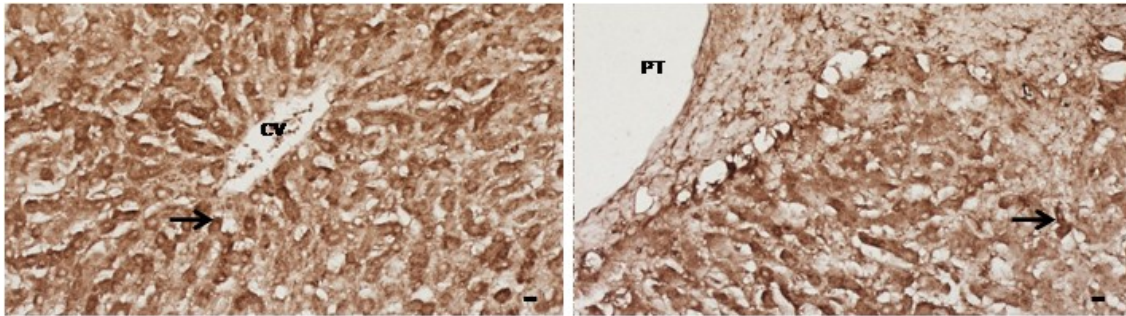
**Figura 1.** Metalotioneinas (MT-I+II) en áreas de venas centrales (CV) y triadas portales (PT) en el hígado. En todas las secciones hepáticas tanto de los animales suplementados como no suplementados, la expresión de MT fue difusa por todo el parénquima, no existiendo células claramente +. Barras de escala 50  $\mu$ m.

**Fig. 1.** *Metallothionein (MT-I+II) in matched areas of central veins (CV) and portal triads (PT) in the liver. In all liver sections from both non-supplemented and Cu supplemented cattle, MT expression was diffuse all over the hepatic parenchyma, with no clear + cells. Scale bars 50  $\mu$ m.*



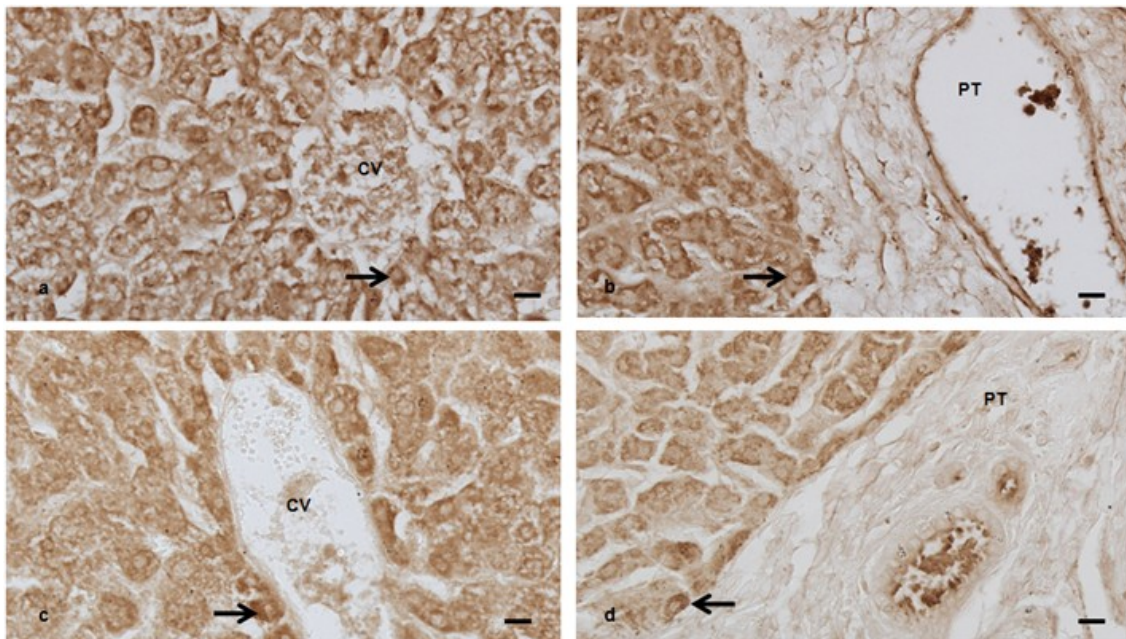
**Figura 2.** Inmunorreactividad a Cu-Zn superoxide dismutasa (SOD) en áreas de venas centrales (CV) y triadas portales (PT). Las células SOD + estuvieron distribuidas por todo el parénquima hepático sin ningún tipo de asociación especial alrededor de vasos o tejido conectivo de las venas centrales y triadas portales tanto en los animales no suplementados como suplementados con Cu. Flechas señalan algunas células +. Barras de escala 50  $\mu$ m.

**Fig. 2.** *Cu-Zn superoxide dismutase (SOD) immunoreactivity in matched areas of central veins (CV) and portal triads (PT). The SOD + cells were distributed all over the hepatic parenchyma, without any special association around vessels or connective tissue in central veins and portal triads in both non-supplemented and Cu supplemented animals. Arrows pointing out some + cells. Scale bars 50  $\mu$ m.*



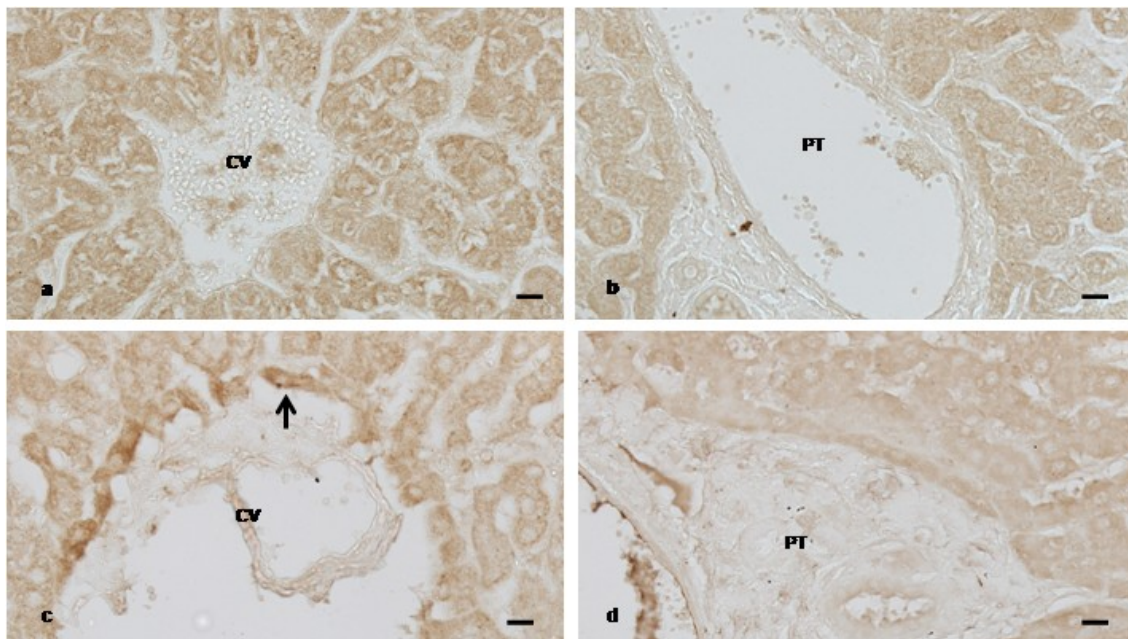
**Figura 3.** Inmunorreactividad óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en áreas de venas centrales (CV) y triadas portales (PT) en el hígado de los animales no suplementados (a, b) y suplementados con Cu (c, d). Las células iNOS + en las venas centrales de los animales no suplementados (a) fueron escasas y localizadas inmediatamente alrededor del vaso central y en los animales suplementados con Cu (c) el número e inmunorreactividad de las células aumentó en esta misma localización. En las triadas portales de los animales del grupo no suplementado (b) las células + se distribuyeron de un modo más disperso que en los animales del grupo suplementado con Cu (d) en el que las células + se encontraban más próximas al tejido conectivo de las triadas portales. Flechas señalan algunas células +. Barras de escala 100  $\mu$ m.

**Fig. 3.** Inducible nitric oxide synthase (iNOS) immunoreactivity in matched areas of central veins (CV) and portal triads (PT) of the liver of both non-supplemented (a, b) and Cu-supplemented (c, d) animals. The iNOS + cells in the central veins of the non-supplemented animals (a) were a few cells localized immediately around the central vessel and in the Cu supplemented animals (c) the number and immunoreactivity of the cells increased in the same location. In the portal triads of the non-supplemented animals (b) the + cells were more dispersed than in the animals of the Cu supplemented group (d) in which the + cells were closer to the connective tissue of the portal triads. Arrows pointing out some + cells. Scale bars 100  $\mu$ m.



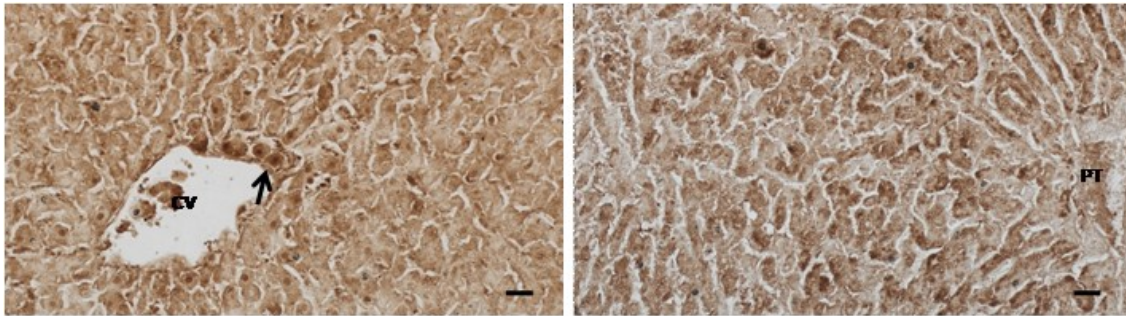
**Figura 4.** Inmunorreactividad nitrotirosina (NITT) en áreas de venas centrales (CV) y triadas portales (PT) en el hígado de los animales no suplementados (a, b) y suplementados con Cu (c, d). Las células NITT + presentaron la misma distribución que en el caso de iNOS. En las venas centrales de los animales no suplementados (a) las células + fueron escasas y localizadas inmediatamente alrededor del vaso central y en los animales suplementados con Cu (c) el número e inmunorreactividad de las células aumentó en esta misma localización. En las triadas portales de los animales del grupo no suplementado (b) las células + se distribuyeron de un modo más disperso que en los animales del grupo suplementado con Cu (d) en el que las células + se encontraban más próximas al tejido conectivo de las triadas portales. Flechas señalan algunas células +. Barras de escala 100  $\mu$ m.

**Fig. 4.** Nitrotyrosine (NITT) immunoreactivity in matched areas of central veins (CV) and portal triads (PT) of the liver of both non-supplemented (a, b) and Cu-supplemented (c, d) animals. The NITT + cells followed the same distribution as + iNOS. In the central veins of the non-supplemented animals (a) were a few cells localized immediately around the central vessel and in the Cu supplemented animals (c) the number and immunoreactivity of the cells increased in the same location. In the portal triads of the non-supplemented animals (b) the + cells were more dispersed than in the animals of the Cu supplemented group (d) in which the + cells were closer to the connective tissue of the portal triads. Arrows pointing out some + cells. Scale bars 100  $\mu$ m.



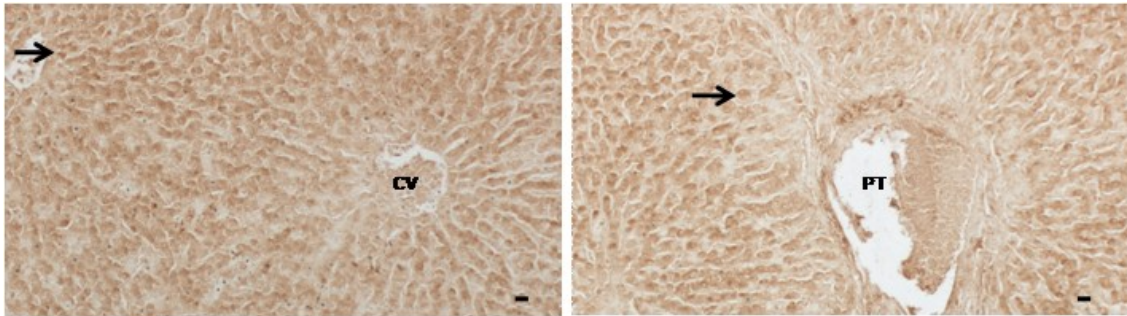
**Figura 5.** Inmunorreactividad 8-oxoguanina (8-oxo) en áreas de venas centrales (CV) y triadas portales (PT) en el hígado. Las células + estuvieron distribuidas por todo el parénquima hepático sin ningún tipo de asociación especial alrededor de vasos o tejido conectivo de las venas centrales y triadas portales tanto en los animales no suplementados como suplementados con Cu. Flechas señalan algunas células +. Barras de escala 100  $\mu$ m.

**Fig. 5.** 8-oxoguanine (8-oxo) immunoreactivity in matched areas of central veins (CV) and portal triads (PT) of the liver. The + cells were distributed all over the parenchyma without any special association to any structure in central veins and in portal triad areas of both non-supplemented and Cu-supplemented animals. Arrows pointing out some + cells. Scale bars 100  $\mu$ m.



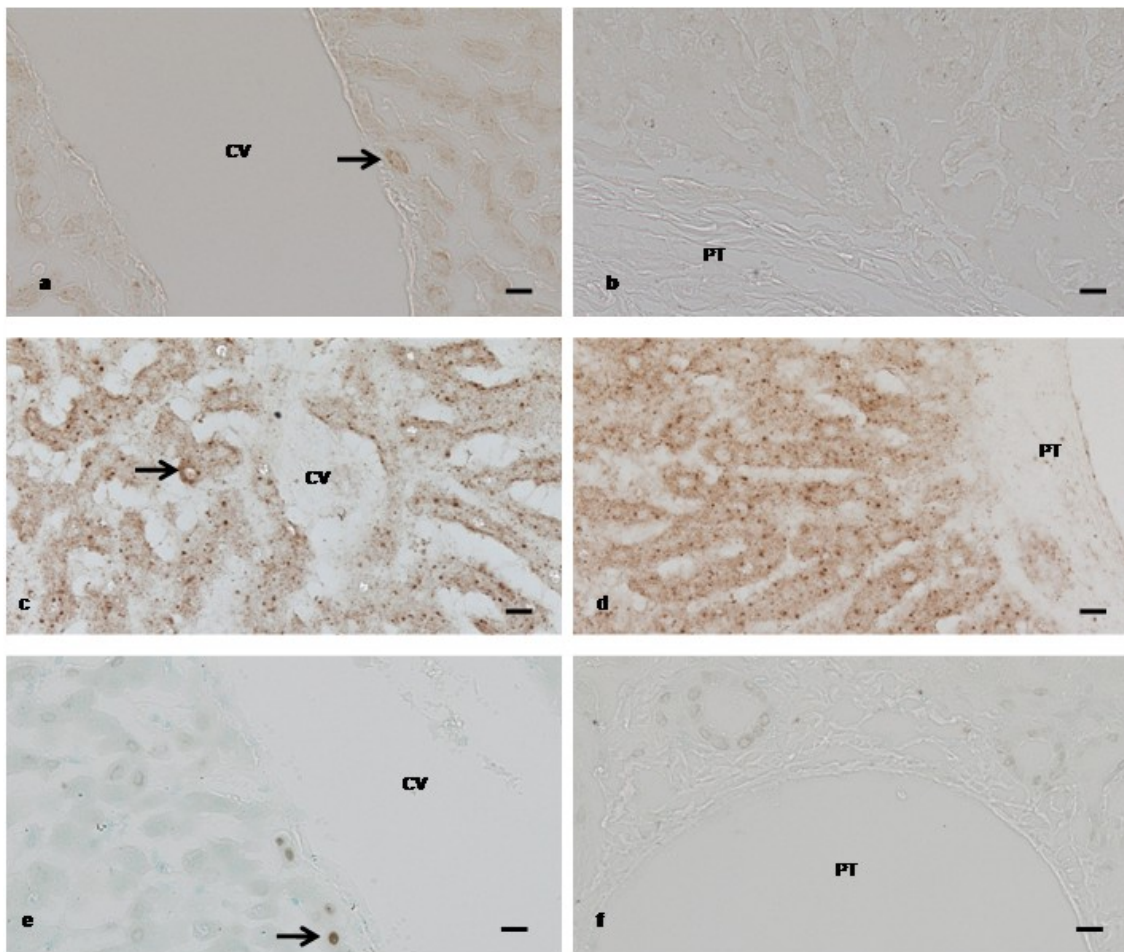
**Figura 6.** Inmunorreactividad malondialdehído (MDA) en áreas de venas centrales (CV) y triadas portales (PT) en el hígado. Las células + estuvieron distribuidas por todo el parénquima hepático sin ningún tipo de asociación especial alrededor de vasos o tejido conectivo de las venas centrales y triadas portales tanto en los animales no suplementados como suplementados con Cu. Flechas señalan algunas células +. Barras de escala 50  $\mu$ m.

**Fig. 6.** Malondialdehyde (MDA) immunoreactivity in matched areas of central veins (CV) and portal triads (PT). The + cells were distributed all over the parenchyma without any special association to any structure in central veins and in portal triad areas of both non-supplemented and Cu-supplemented animals. Arrows pointing out some + cells. Scale bars 50  $\mu$ m.



**Figura 7.** Inmunorreactividad citocromo c (cyto-c) (a, b) y caspasa 1 (casp1) (c, d) y TUNEL (e, f) en áreas de venas centrales (CV) y triadas portales (PT) en el hígado. Las células + fueron básicamente no detectables, y la inmunorreactividad para cyto-c y casp1 fue predominantemente puntuada lo que sugiere la localización mitocondrial de la proteína, por tanto las células casp1 y cyto-c consideradas como + fueron aquellas con un patrón de tinción citosólico. Las células + para cyto-c, casp1 y TUNEL fueron poco frecuentes y no mostraron ningún tipo de asociación especial alrededor de vasos o tejido conectivo de las venas centrales y triadas portales tanto en los animales no suplementados como suplementados con Cu. Flechas señalan algunas células +. Barras de escala 100  $\mu$ m.

**Fig. 7.** *Cytochrome c (cyto-c) (a, b) and caspase 1 (casp1) (c, d) immunoreactivity and TUNEL staining (e, f) in matched areas of central veins (CV) and portal triads (PT). The + cells were basically undetectable, and the immunoreactivity for cyto-c and casp1 was predominantly punctate suggesting the mitochondrial localization of the protein, thus the considered casp1 and cyto-c + cells were those with cytosolic diffuse staining patterns. The cyto-c, casp1 and TUNEL + cells were rare and did not show any special association to any structure in central veins and in portal triad areas of both non-supplemented and Cu-supplemented animals. Arrows pointing out some + cells. Scale bars 100  $\mu$ m.*



**Tabla 1.** Recuentos celulares de células + a SOD, iNOS, 8-oxo, MDA, cyto-c, casp1 y TUNEL alrededor de las venas centrales (CV) y tríadas portales (PT) de animales no suplementados (NS) y suplementados con Cu (S). Los resultados se presentan como media±desviación standard, mediana y rango de células + por 0,39 mm<sup>2</sup>.

**Table 1.** Cellular counts of SOD, iNOS, NITT, 8-oxo, MDA, cyto-c, casp1 and TUNEL + cells from central veins (CV) and portal triads (PT) from non-supplemented (NS) and Cu-supplemented animals (S). Results are shown as mean±standard deviation, median and range + cells per 0,39 mm<sup>2</sup>.

Staining	Region <sup>(†)</sup>	NS (n=5)			S (n=5)		
		mean±sd <sup>(‡)</sup>	median	range	mean±sd	median	range
SOD	CV	3,7±1,8 **	3	1-7	5,1±2,1	6	2-7
	PT	6,9±1,7	6,5	5-10	5,7±1,8	5,5	4-9
iNOS	CV ***	6,5±5,1 **	6	1-18	21,7±8,9	21	8-39
	PT *	16±8,3	15	4-28	24,5±7,9	24,5	10-36
NITT	CV ***	5,1±2,6 *	5,5	0-9	17,6±6,6	16	10-26
	PT *	7,8±2,9	7	4-12	13,4±5,6	12	6-23
8-oxo	CV	1,2±1,9	0,5	0-6	0,7±1,1	0	0-3
	PT	1,4±0,8	1	0-3	1,6±1,5	2	0-4
MDA	CV	8,9±2,9	8	5-14	6,5±3,4	6,5	1-12
	PT	8,7±2,9	8,5	6-14	8±3	7	4-14
cyto c	CV	0,4±0,8	0	0-2	0,5±1,1	0	0-3
	PT	0,1±0,3	0	0-1	0,5±1,1	0	0-3
casp1	CV	0,4±0,5	0	0-1	0,6±0,7	0,5	0-2
	PT	0,4±0,5	0	0-1	0,4±0,7	0	0-2
TUNEL	CV	0	0	0	0,2±0,6	0	0-2
	PT	0,1±0,3	0	0-1	0,5±1,3	0	0-4

\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 indican diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos celulares entre <sup>(†)</sup> animales suplementados y no suplementados en CV y PT y entre <sup>(‡)</sup> las regiones CV y PT dentro del mismo grupo de animales (suplementado o no suplementado).

\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 indicate statistical significant differences in cell counts between <sup>(†)</sup> non-supplemented and Cu-supplemented animals in CV and PT regions and between <sup>(‡)</sup> CV and PT within the same group of animals (supplemented or non-supplemented).

**CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**



1. En las condiciones de este estudio, que son las condiciones del ganado de cría en muchos países europeos, la suplementación rutinaria con Cu no está justificada para mantener un adecuado status de Cu en los animales o para mejorar los parámetros productivos. Más información sobre el riesgo de la presencia de los antagonistas de Cu en la dieta a base de concentrados debe ser necesaria para justificar el uso de suplementos de Cu en el ganado vacuno de cría intensiva.

*1. Under the conditions of this study, which are the conditions of the cattle raised under intensive system in many European countries, routinely Cu supplementation is not justified to maintain an adequate Cu status in the animals or to improve productive parameters. More information about the risk of presence of Cu antagonists in the concentrate diets should be necessary to justify routinely Cu supplementation in intensively reared beef cattle.*

2. En las condiciones nutricionales de los terneros de este estudio, que son las típicas en los sistemas intensivos en muchos países europeos, la suplementación con Cu dio lugar a una mayor acumulación de Cd. Por el contrario, se observó una disminución de As, Pb y Hg en la mayoría de los tejidos, y aunque los mecanismos de estas interacciones se desconocen, podría estar relacionado, al menos en parte, con el ratio Se:Cu en el animal, así, este ratio podría ser una herramienta o estrategia para disminuir los residuos de metales tóxicos en animales que procedan de zonas altamente contaminadas. Sin embargo, debido al efecto negativo de la suplementación con Cu sobre los niveles de Se en el músculo en los animales de este estudio, se necesitan nuevas investigaciones sobre la suplementación con Cu-Se para entender mejor el riesgo de los animales a sufrir una deficiencia de Se. Por último, el posible papel de la suplementación con Cu sobre el estado de ciertos metales asociados a enfermedades neurológicas (principalmente Mn y Ni) en el cerebro necesita ser más estudiado.

*2. Under the nutritional conditions of cattle in this study, which are the typical in intensive systems in many European countries, Cu supplementation was associated with a higher Cd accumulation. On the contrary, Cu supplementation lead to a lower As, Pb and Hg accumulation in most tissues, and although the mechanisms of these interactions are unknown, it could be related, at least in part, to the ratio Se:Cu in the animal, and so, this ratio be a tool or strategy to decrease toxic metal residues in animal from environmental polluted areas. However, due to the negative effect of Cu supplementation on Se muscular status in calves in this study, new research on Cu-Se supplementation is necessary to better understand the risk of the animals to suffer from Se deficiency. Finally, the possible role of Cu supplementation on the status of certain metals associated to neurological diseases (mainly Mn and Ni) in the brain deserves further investigation.*

**3.** Este estudio ha demostrado que en ganado vacuno las concentraciones de metales no esenciales y esenciales varían significativamente entre los diferentes tipos de músculos. Los músculos más activos y con menor contenido en grasa (CA y DI) mostraron, en general, mayores concentraciones de elementos esenciales y menores concentraciones de elementos no esenciales que los restantes músculos analizados (SE y PE). Los residuos de As y Hg musculares son indicativos de la exposición reciente de los animales, sin embargo, en situaciones de un adecuado status mineral, las concentraciones de elementos esenciales en el músculo son independientes del status mineral de los animales y podrían estar posiblemente relacionadas con su propio metabolismo muscular. La suplementación con Cu, a concentraciones generalmente usadas en el ganado de cría intensiva, reduce significativamente los residuos de As en el músculo, pero provocaron una disminución significativa de las concentraciones de Se, que podrían tener importancia para la salud animal.

*3. This study has demonstrated that in cattle non-essential and essential trace element concentrations significantly varied between muscles. The most active and less fat content muscles (CA and DI) showed in general the highest essential and the lowest non-essential trace element accumulation in comparison with the other muscles analyzed (SE and PE). As and Hg muscular residues are indicative of recent animal exposure, however, in situations of an adequate mineral status, essential trace element concentrations in muscle are irrespective of the mineral status of the animal and could be possibly related to their own particular muscular metabolism. Cu supplementation, at concentrations generally used in intensively raised cattle, significantly reduced As residues in muscle but caused a significant decrease of Se concentrations, which could have significance for the animal health.*

4. En las condiciones de este estudio, la suplementación rutinaria con Cu (15 mg/kg MS) a terneros alimentados a base de concentrado durante el crecimiento y acabado no tuvo un efecto significativo los parámetros productivos ni sobre los niveles de ROS, pero dio lugar a una marcada diferencia en la evolución temporal de la defensa antioxidante, lo que sugiere el papel potencial antioxidante de Cu contra la producción de ROS asociada a una dieta de engorde. Aunque no hay síntomas clínicos de intoxicación por Cu se han apreciado actividades numéricamente mayores de AST y GGT en los animales suplementados como consecuencia de una mayor acumulación de Cu hepático. Se necesitan estudios adicionales para evaluar la conveniencia de la suplementación de cobre en los sistemas de engorde, debido a sus efectos positivos y negativos a través de diferentes vías.

*4. Under the conditions of this study, routinely Cu supplementation (15 mg/kg DM) of the concentrate fed to growing and finishing calves had no significant effect on either productive performance or ROS levels, but was associated with a marked difference in the time course of antioxidant defence, suggesting the potential antioxidant role of Cu against ROS production associated to a fattening diet. Although no clinical symptoms of Cu toxicosis were observed, the numerically higher AST and GGT activities in supplemented animals are consequent to higher Cu hepatic accumulation. Further studies are required to evaluate the convenience of Cu supplementation in feedlot systems, due to their positive and negative effects through different routes.*

5. En las condiciones de este estudio, que son las condiciones del ganado vacuno criados en los sistemas intensivos en el noroeste de España y muchos países europeos, la aplicación rutinaria de suplementos de Cu aumentó el riesgo de los animales a padecer una toxicidad subclínica de Cu, sin cambios significativos en la capacidad de almacenamiento de Cu y el sistema de defensa antioxidante evaluada por la expresión de MT y SOD, pero con un aumento significativo e importante del daño oxidativo medido por la iNOS y NITT. iNOS y NITT podrían ser utilizados como marcadores tempranos de los cambios patológicos iniciales en el hígado causados por la suplementación de Cu en ganado vacuno.

*5. Under the conditions of this study, which are the conditions of the cattle raised in intensive systems in NW Spain and also many European countries, routinely Cu supplementation increased the risk of the animals to undergo subclinical Cu toxicity, with no significant changes in the Cu storage capacity and the antioxidant defensive system evaluated by MT and SOD expression, but with a significant and important increase of oxidative damage measured by iNOS and NITT. iNOS and NITT could be used as early markers of initial pathological changes in the liver caused by Cu supplementation in cattle.*



**RESUMEN**/*SUMMARY*/**RESUMO**

## RESUMEN

Al estudiar el metabolismo y acumulación de Cu 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 Cu 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 ál.*, 1989). 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 los requerimientos nutricionales de Cu. En un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación se observó que los animales de explotaciones intensivas, que recibían una dieta comercial de engorde típica en España basada principalmente (hasta un 80%) en una ración de concentrado suplementado con 15-20 mg de sulfato de Cu/kg MS, presentaron una mayor acumulación hepática de Cu en comparación con los terneros de sistemas de producción ecológica (sin suplementación mineral), y aproximadamente el 60% de los animales de cría intensiva presentaron concentraciones que excedían las consideradas como seguras para esta especie animal (Blanco-Penedo *et ál.*, 2009).

En granjas de cría intensiva en Galicia, la composición del alimento concentrado es bastante estándar, principalmente a base de maíz (40% MS) y cebada (20% MS) procedentes del mercado internacional. Es posible que este tipo de dieta posea una biodisponibilidad de Cu bastante alta, así como una baja concentración de sus antagonistas (Engle y Spears, 2000a), de modo que la suplementación con Cu puede no estar justificada. A pesar de ello, los animales de las granjas intensivas reciben normalmente suplementos de este mineral muy por encima de sus necesidades fisiológicas, pudiendo conducir a una excesiva acumulación hepática de Cu, muy difícil de evaluar durante el crecimiento de los animales a menos que sus concentraciones se determinen mediante toma de muestra por biopsia hepática (López Alonso *et ál.*, 2006), pero que puede provocar efectos negativos en el rendimiento de los animales (toxicidad subclínica). Además, esta suplementación con Cu superior a los requerimientos nutricionales representa un peligro ambiental debido a su excreción por las heces, dando lugar a purines ricos en Cu (Jondreville *et ál.*, 2003) que cuando se usan como fertilizantes en los pastos puede llevar a un aumento de concentraciones de Cu en el suelo y efectos tóxicos en las plantas y microorganismos (Coppinet *et ál.*, 1993).

El objetivo general de este estudio fue evaluar si, con el manejo nutricional de las granjas de cría intensiva del noroeste de España (basado principalmente en alimento concentrado de materias primas del mercado internacional), el uso de suplementos de Cu está justificado para mantener las necesidades fisiológicas de este metal, así como su influencia sobre el status de diferentes elementos tóxicos y esenciales que pudieran dar lugar a una mayor susceptibilidad de los animales al padecimiento de otros procesos patológicos relacionados con los desórdenes en el metabolismo mineral. Para ello se plantearon los siguientes objetivos concretos: (1) Evaluar la necesidad de la suplementación con Cu en terneros de cebo de cría intensiva, (2) valorar la influencia de la suplementación de Cu sobre la acumulación de metales

tóxicos y esenciales en terneros de cría intensiva, (3) estudiar el efecto del tipo de músculo y de la suplementación con Cu sobre la acumulación de metales tóxicos y esenciales en la carne de terneros, (4) valorar el efecto de la suplementación con Cu sobre parámetros metabólicos y de estrés oxidativo séricos en terneros y (5) estudiar a nivel histopatológico los efectos de la suplementación con Cu sobre la defensa antioxidante y el daño oxidativo en el hígado de ganado vacuno.

Para realizar este estudio se emplearon 30 terneros cruces de rubia gallega x Holstein-Friesian que se mantuvieron en la misma granja de cría intensiva de terneros de carne desde las 8 semanas de edad y posteriormente fueron distribuidos aleatoriamente a los dos grupos de estudio no suplementado y suplementados con Cu (15 mg sulfato de Cu/kg MS) durante las etapas de engorde comercial de terneros en España correspondientes a los períodos de crecimiento (12 a 24 semanas) y cebo (24 a 36 semanas). Se tomaron muestras de sangre a lo largo del ciclo productivo y una vez sacrificados se tomaron muestras tisulares de hígado, riñón, cerebro, corazón, bazo y músculos. Los animales fueron tratados y manejados, durante todo el proceso de cría y extracción de muestras, conforme a las directrices del Gobierno español (RD 1201/2005). Para la determinación de metales las muestras fueron sometidas a un proceso de digestión ácida en microondas y los niveles de los distintos metales fueron determinados por ICP-MS. La ceruloplasmina se determinó mediante la técnica de p-fenilediamina, los parámetros hematológicos mediante un contador hematológico y los distintos parámetros bioquímicos se determinaron mediante métodos colorimétricos. Para el estudio histológico los tejidos preservados en formol fueron procesados y parafinados para posteriormente aplicar distintas técnicas inmunohistoquímicas y enzimáticas.

Bajo las condiciones nutricionales de este estudio, que son las condiciones del ganado de cría intensiva en Galicia y en muchos países europeos, se puede sugerir que la dieta estándar sin suplementación con Cu recibida por los terneros de cría intensiva de nuestro grupo control durante todo el ciclo productivo fue suficiente para cubrir las necesidades fisiológicas de Cu de los terneros (a nivel hematológico y productivo), por lo que la suplementación debería basarse en datos objetivos de la dieta como la concentración de los diferentes antagonistas presentes en la misma. De hecho los animales del grupo suplementado de nuestro estudio presentaron en el 90% de los casos niveles hepáticos de Cu superiores a los considerados como adecuados y el 50% presentaban concentraciones que podrían estar relacionados con una toxicidad por Cu.

En cuanto a la influencia de la suplementación con Cu sobre el estatus del resto de los metales tóxicos y esenciales en los diferentes órganos se observó que la suplementación con Cu estaba relacionada con una mayor acumulación de Cd y una disminución de As, Pb y Hg en la mayoría de los tejidos. Si bien los mecanismos de la mayoría de estas interacciones se desconocen, podrían estar relacionado, al menos en parte, con el ratio Se:Cu en el animal que podría ser una herramienta o estrategia para disminuir los residuos de metales tóxicos en animales que procedan de zonas altamente contaminadas. Sin embargo, debido al efecto negativo de la

suplementación con Cu sobre los niveles de Se en el músculo en los animales de este estudio, se necesitarían nuevas investigaciones sobre la suplementación con Cu-Se para entender mejor el riesgo de los animales a sufrir una deficiencia de Se. El posible papel de la suplementación con Cu sobre el estado de ciertos metales asociados a enfermedades neurológicas (principalmente Mn y Ni) en el cerebro de los animales del presente estudio también resulta de interés para nuevas investigaciones sobre la influencia de un adecuado estatus mineral en el riesgo de padecer determinadas enfermedades neurológicas.

Además, este estudio ha demostrado que en ganado vacuno las concentraciones de metales no esenciales y esenciales varían significativamente entre los diferentes tipos de músculos. Los músculos más activos y con menor contenido en grasa (cardíaco y diafragmático) mostraron, en general, mayores concentraciones de elementos esenciales y menores concentraciones de elementos no esenciales que los restantes músculos analizados (semitendinoso y pectoral). Los residuos de As y Hg musculares son indicativos de la exposición reciente de los animales, sin embargo, en situaciones de un adecuado status mineral, las concentraciones de elementos esenciales en el músculo son independientes del status mineral de los animales y podrían estar posiblemente relacionadas con su propio metabolismo muscular. La suplementación con Cu, a concentraciones generalmente usadas en el ganado de cría intensiva, reduce significativamente los residuos de As en el músculo, pero provocaron una disminución significativa de las concentraciones de Se, que podrían tener importancia para la salud animal.

En las condiciones de este estudio, la suplementación rutinaria con Cu (15 mg/kg MS) a terneros alimentados a base de concentrado durante el crecimiento y acabado no tuvo un efecto significativo los parámetros productivos ni sobre los niveles de ROS, pero dio lugar a una marcada diferencia en la evolución temporal de la defensa antioxidante, lo que sugiere el papel potencial antioxidante de Cu contra la producción de ROS asociada a una dieta de engorde. Aunque no hay síntomas clínicos de intoxicación por Cu se han apreciado actividades numéricamente mayores de AST y GGT en los animales suplementados como consecuencia de una mayor acumulación de Cu hepático. Por tanto se necesitan estudios adicionales para evaluar la conveniencia de la suplementación de cobre en los sistemas de engorde, debido a sus efectos positivos y negativos a través de diferentes vías.

En cuanto a la evaluación histológica del hígado se observó que la aplicación rutinaria de suplementos de Cu aumentó el riesgo de los animales a padecer una toxicidad subclínica, sin cambios significativos en la capacidad de almacenamiento de Cu y el sistema de defensa antioxidante evaluada por la expresión de MT y SOD tisular, pero con un aumento significativo e importante del daño oxidativo medido por la iNOS y NITT. iNOS y NITT podrían ser utilizados como marcadores tempranos de los cambios patológicos iniciales en el hígado causados por la suplementación de Cu en ganado vacuno antes de que se aprecien los primeros signos clínicos de intoxicación.

## SUMMARY

*One important fact when studying the metabolism and accumulation of Cu in animals, especially in ruminants, is that the development of Cu disorders such as deficiency and toxicity depend on numerous factors which influence the absorption/excretion and bioavailability of Cu, and not only on Cu concentration in the diet (Gooneratne et al., 1989). Among these factors, the status of other elements in the diet, mainly molybdenum and sulfur, but also zinc and iron, is crucial to estimate the nutritional requirements of Cu. In a study carried out by our research group, the animals from intensive farms, fed a typical Spanish commercial diet based mainly (up to 80%) on concentrate feed supplemented with 15-20 mg Cu/kg DM showed increased hepatic accumulation of Cu in comparison with calves from organic production systems (without mineral supplementation), and approximately 60% of intensive livestock had levels that exceeded those considered as safe for this animal species (Blanco-Penedo et al., 2009).*

*In farms from intensive systems in Galicia, the composition of concentrate food is standard, mostly corn (40% DM) and barley (20% DM) from the international market. It is possible that calves fed this diet with relatively high bioavailability of Cu and a low concentration of their antagonists, the Cu supplementation may not be justified (Engle and Spears, 2000a). However, the animals from intensive farms receive normally mineral supplementation well above their physiological needs, which may lead to excessive hepatic accumulation of Cu, very difficult to evaluate during animals' growth unless their concentrations are determined by liver biopsy (López Alonso et al., 2006) and to cause negative effects on animal performance (Subclinical toxicity). Moreover, this supplementation exceeding Cu nutritional requirements represents an environmental problem due to its excretion by the faeces, resulting in Cu-rich slurry (Jondreville et al., 2003) that can lead to increased Cu concentrations in soil and toxic effects in plants and microorganisms when used as fertilizer on pastures (Coppenet et al., 1993).*

*The overall objective of this study was to assess whether, nutritional management of intensive farms in northwest Spain (fed mainly concentrate feed composed with raw materials from the international market), the use Cu supplementation is justified to fill the Physiological needs and its influence on the status of other toxic and essential elements that could lead to a higher susceptibility of the animals to suffer from other disorders related to mineral metabolism. The specific objectives were: (1) to evaluate the need of copper supplementation in intensively reared beef cattle, (2) the influence of Cu supplementation on toxic and essential trace element status in intensive reared beef cattle, (3) study effect of type of muscle and Cu supplementation on trace element concentrations in cattle meat, (4) and on metabolism and oxidative stress in feedlot calves (5) and the histopathological study on the effects of Cu supplementation on antioxidant defense and oxidative damage in the liver of cattle.*

*We studied 30 beef calves (Galician Rubia x Holstein-Friesian) that were kept in the same intensive farm since 8 weeks old and were subsequently randomly assigned to two study groups non-supplemented and supplemented with Cu (15 mg copper sulfate/kg DM) during the*

growing (12 to 24 weeks) and finishing (24 to 36 weeks) periods in the spanish feedlot systems. Blood samples were taken and samples of liver, kidney, brain, heart, spleen and muscles tissues were collected at slaughter. Animals were treated and managed, throughout the all breeding period and the samples were extracted according to the guidelines of the Spanish Government (RD 1201/2005). For metal determination, samples acid digested in a microwave and the levels of different metals were determined by ICP-MS. Ceruloplasmin was determined by p-phenylenediamine technique, haematological parameters by hematology cell counter and biochemical parameters were determined by colorimetric methods. For the histological study the tissues were preserved in formalin and afterwards paraffin embedded to apply different immunohistochemical and enzymatic techniques.

Under the conditions of this study, which are the conditions of the cattle raised under intensive system in many European countries, routinely Cu supplementation is not justified to maintain an adequate Cu status in the animals or to improve productive parameters. More information about the risk of presence of Cu antagonists in the concentrate diets should be necessary to justify routinely Cu supplementation in intensively reared beef cattle.

Cu supplementation was associated with a higher Cd accumulation. On the contrary, Cu supplementation lead to a lower As, Pb and Hg accumulation in most tissues, and although the mechanisms of these interactions are unknown, it could be related, at least in part, to the ratio Se:Cu in the animal, and so, this ratio be a tool or strategy to decrease toxic metal residues in animal from environmental polluted areas. However, due to the negative effect of Cu supplementation on Se muscular status in calves in this study, new research on Cu-Se supplementation is necessary to better understand the risk of the animals to suffer from Se deficiency. Finally, the possible role of Cu supplementation on the status of certain metals associated to neurological diseases (mainly Mn and Ni) in the brain deserves further investigation.

This study has demonstrated that in cattle non-essential and essential trace element concentrations significantly varied between muscles. The most active and less fat content muscles (CA and DI) showed in general the highest essential and the lowest non-essential trace element accumulation in comparison with the other muscles analyzed (SE and PE). As and Hg muscular residues are indicative of recent animal exposure, however, in situations of an adequate mineral status, essential trace element concentrations in muscle are irrespective of the mineral status of the animal and could be possibly related to their own particular muscular metabolism. Cu supplementation, at concentrations generally used in intensively raised cattle, significantly reduced As residues in muscle but caused a significant decrease of Se concentrations, which could have significance for the animal health.

Under the conditions of this study, routinely Cu supplementation (15 mg/kg DM) of the concentrate fed to growing and finishing calves had no significant effect on either productive performance or ROS levels, but was associated with a marked difference in the time course of

*antioxidant defence, suggesting the potential antioxidant role of Cu against ROS production associated to a fattening diet. Although no clinical symptoms of Cu toxicosis were observed, the numerically higher AST and GGT activities in supplemented animals are consequent to higher Cu hepatic accumulation. Further studies are required to evaluate the convenience of Cu supplementation in feedlot systems, due to their positive and negative effects through different routes.*

*Also routinely Cu supplementation increased the risk of the animals to undergo subclinical Cu toxicity, with no significant changes in the Cu storage capacity and the antioxidant defensive system evaluated by MT and SOD expression, but with a significant and important increase of oxidative damage measured by iNOS and NIT. iNOS and NIT could be used as early markers of initial pathological changes in the liver caused by Cu supplementation in cattle.*

## RESUMO

Ao estudar o metabolismo e acumulación de Cu nos animais, e especialmente en ruminantes, é importante sinalar que o desenvolvemento de problemas de deficiencia e toxicidade non vai depender solo da concentración de Cu na dieta, senón que se vai ver afectado por numerosos factores que condicionan tanto a absorción/excreción como a biodisponibilidade do mesmo (Gooneratne *et ál.*, 1989). Entre estes factores, o estatus de outros elementos na dieta, principalmente o molibdeno e o zufre, aínda que tamén zinc e ferro, van ser fundamentais para estimar os requirimentos nutricionais de Cu. Nun estudo do noso grupo de investigación observouse que os animais de granxas intensivas, cunha dieta comercial de engorde típica en España baseada principalmente (ata un 80%) en concentrado suplementado con 15-20 mg de sulfato de Cu/kg MS, presentaron unha maior acumulación hepática de Cu en comparación cos becerros de sistemas de produción ecolóxica (sen suplementación mineral), e aproximadamente o 60% de los animais de cría intensiva presentaron concentracións que excedían as consideradas como seguras para esta especie animal (Blanco-Penedo *et ál.*, 2009).

En granxas de cría intensiva en Galicia, a composición do alimento concentrado é bastante estándar, principalmente a base de millo (40% MS) e cebada (20% MS) procedentes do mercado internacional. É posible que este tipo de dieta posúa unha biodisponibilidade de Cu bastante alta, así como una baixa concentración dos seus antagonistas (Engle e Spears, 2000a), de modo que a suplementación con Cu pode non estar xustificada. A pesar desto, os animais das granxas intensivas reciben normalmente suplementos deste mineral moi por encima das súas necesidades fisiolóxicas, podendo conducir a una excesiva acumulación hepática de Cu, moi difícil de evaluar durante o crecemento dos animais a menos que as súas concentracións se determinen mediante unha mostra por biopsia hepática (López Alonso *et ál.*, 2006), pero que pode provocar efectos negativos no rendemento dos animais (toxicidade subclínica). Ademais, esta suplementación con Cu superior aos requirimentos nutricionais representa un perigo ambiental debido á súa excreción polas feces, dando lugar a puríns ricos en Cu (Jondreville *et ál.*, 2003) que cando se usan como fertilizantes nos pastos poden levar a un aumento das concentracións de Cu no solo e efectos tóxicos nas plantas e microorganismos (Coppenet *et ál.*, 1993).

O obxectivo xeral deste estudo foi avaliar se, co manexo nutricional das granxas de cría intensiva do noroeste de España (baseado principalmente en alimento concentrado de materias primas do mercado internacional), o uso de suplementos de Cu está xustificado para manter as necesidades fisiolóxicas deste metal, así como a súa influencia sobre o status de diferentes elementos tóxicos y esenciais que puideran dar lugar a unha maior susceptibilidade dos animais ao padecemento doutros procesos patolóxicos relacionados con desórdenes no metabolismo mineral. Para esto se plantexaron os seguintes obxectivos concretos: (1) Evaluar a necesidade da suplementación con Cu en tenreiros de cebo de cría intensiva, (2) valorar a influencia da suplementación de Cu sobre a acumulación de metais tóxicos y esenciais en tenreiros de cría intensiva, (3) estudar o efecto do tipo de músculo y da suplementación con

Cu sobre a acumulación de metais tóxicos e esenciais na carne de tenreiros, (4) valorar o efecto da suplementación con Cu sobre os parámetros metabólicos e de estrés oxidativo séricos en tenreiros y (5) estudar a nivel histopatolóxico os efectos da suplementación con Cu sobre a defensa antioxidante e o dano oxidativo no fígado do gando vacún.

Para realizar este estudo usáronse 30 tenreiros cruces de rubia galega x Holstein-Friesian que se mantiveron na mesma granxa de cría intensiva de tenreiros de carne dende as 8 semanas de idade e posteriormente foron distribuídos aleatoriamente aos dous grupos de estudo non suplementado e suplementados con Cu (15 mg sulfato de Cu/kg MS) durante as etapas de engorde comercial de tenreiros en España correspondentes aos períodos de crecemento (12 a 24 semanas) e cebo (24 a 36 semanas). Tomáronse mostras de sangue ao longo do ciclo produtivo e unha vez sacrificados tomáronse mostras tisulares de fígado, ril, cerebro, corazón, bazo e músculos. Os animais foron tratados e manexados, durante todo o proceso de cría e extracción de mostras, conforme ás directrices do Goberno español (RD 1201/2005). Para a determinación de metais as mostras foron sometidas a un proceso de dixestión ácida en microondas e os niveis dos distintos metais foron determinados por ICP-MS. A ceruloplasmina determinouse mediante a técnica da p-fenilediamina, os parámetros hematolóxicos mediante un contador hematolóxico e os distintos parámetros bioquímicos determináronse mediante métodos colorimétricos. Para o estudo histolóxico os tecidos preservados en formol foron procesados e parafinados para posteriormente aplicar distintas técnicas inmunohistoquímicas e encimáticas.

Baixo as condicións nutricionais deste estudo, que son as condicións do gando de cría intensiva en Galicia e en moitos países europeos, pódese suxerir que a dieta estándar sen suplementación con Cu recibida polos tenreiros de cría intensiva do noso grupo control durante todo o ciclo produtivo foi suficiente para cubrir as necesidades fisiolóxicas de Cu dos tenreiros (a nivel hematolóxico e produtivo), polo que a suplementación debería basearse en datos obxectivos da dieta como a concentración dos diferentes antagonistas presentes na mesma. De feito os animais do grupo suplementado do noso estudo presentaron no 90% dos casos niveis hepáticos de Cu superiores aos considerados como adecuados e o 50% presentaban concentracións que poderían estar relacionadas cunha toxicidade por Cu.

En cuanto á influencia da suplementación con Cu sobre o estatus do resto dos metais tóxicos e esenciais nos diferentes órganos observouse que a suplementación con Cu estaba relacionada cunha maior acumulación de Cd e unha diminución de As, Pb y Hg na maioría dos tecidos. Se ben os mecanismos da maioría destas iteracións se descoñecen, poderían estar relacionados, polo menos en parte, co ratio Se:Cu no animal que podería ser unha ferramenta ou estratexia para diminuír os residuos de metais tóxicos en animais que procedan de zonas altamente contaminadas. Sen embargo, debido ao efecto negativo da suplementación con Cu sobre os niveis de Se no músculo nos animais deste estudo, necesitaríanse novas investigacións sobre a suplementación con Cu-Se para entender mellor o risco dos animais a sufrir unha deficiencia de Se. O posible papel da suplementación con Cu sobre o estado de certos metais asociados a

enfermedades neurológicas (principalmente Mn e Ni) no cerebro dos animais do presente estudo tamén resulta de interés para novas investigacións sobre a influencia dun adecuado estatus mineral no risco de padecer determinadas enfermidades neurológicas.

Ademais, este estudo demostrou que en gando vacún as concentracións de metais non esenciais y esenciais varían significativamente entre os diferentes tipos de músculos. Os músculos máis activos e con menor contido en graxa (cardíaco e diafragmático) mostraron, en xeral, maiores concentracións de elementos esenciais e menores concentracións de elementos non esenciais que os restantes músculos analizados (semitendinoso e pectoral). Os residuos de As e Hg musculares son indicativos da exposición recente dos animais, sen embargo, en situacións dun adecuado estatus mineral, as concentracións de elementos esenciais no músculo son independentes do estatus mineral dos animais e poderían estar posiblemente relacionadas co seu propio metabolismo muscular. A suplementación con Cu, a concentracións xeralmente usadas no gando de cría intensiva, reduce significativamente os residuos de As no músculo, pero provocaron unha diminución significativa das concentracións de Se, que poderían ter importancia para a saúde animal.

Nas condicións deste estudo, a suplementación rutinaria con Cu (15 mg/kg MS) a tenreiros alimentados a base de concentrado durante o crecemento e acabado non tivo un efecto significativo nos parámetros produtivos nin sobre os niveis de ROS, pero deu lugar a unha marcada diferenza na evolución temporal da defensa antioxidante, o que suxire o papel potencial antioxidante do Cu contra a produción de ROS asociada a unha dieta de engorde. Aínda que non hai síntomas clínicos de intoxicación por Cu apreciáronse actividades numericamente maiores de AST y GGT nos animais suplementados como consecuencia dunha maior acumulación de Cu hepático. Polo tanto necesítanse estudos adicionais para avaliar a conveniencia da suplementación de cobre nos sistemas de engorde, debido os seus efectos positivos e negativos a través de diferentes vías.

En canto á avaliación histolóxica do fígado observouse que a aplicación rutinaria de suplementos de Cu aumentou o risco dos animais a padecer unha toxicidade subclínica, sen cambios significativos na capacidade de almacenamento de Cu e o sistema de defensa antioxidante avaliado pola expresión de MT e SOD tisular, pero cun aumento significativo e importante do dano oxidativo medido pola iNOS e NITT. iNOS e NITT poderían ser empregados como marcadores tempranos dos cambios patolóxicos iniciais no fígado causados pola suplementación de Cu en gando vacún antes de que se aprecien os primeiros signos clínicos de intoxicación.