



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS
MENCIÓN SALUD ANIMAL

DETERMINACIÓN DEL ESTATUS NUTRICIONAL DE COBRE EN
TERNEROS NACIDOS DE VAQUILLONAS CON Y SIN SUPLEMENTACIÓN
DE GLICINATO DE COBRE. EFECTO SOBRE LA GANANCIA DE PESO
DIARIO Y DISTINTOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Autor: Vet. Antonio Bernardo Ibarreche

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS

Esperanza, Santa Fe, Argentina, 2023



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS
MENCIÓN SALUD ANIMAL

DETERMINACIÓN DEL ESTATUS NUTRICIONAL DE COBRE EN
TERNEROS NACIDOS DE VAQUILLONAS CON Y SIN SUPLEMENTACIÓN
DE GLICINATO DE COBRE. EFECTO SOBRE LA GANANCIA DE PESO
DIARIO Y DISTINTOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Autor: Vet. Antonio Bernardo Ibarreche

Director: Dr. Juan Francisco Micheloud

Codirector: Dr. Marcelo Lisandro Signorini Porchietto

Miembros del Jurado:

Mgter. Jorge Bertero

Dr. José Maiztegui

Dra. Susana Cseh

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS VETERINARIAS

Esperanza, Santa Fe, Argentina, 2023

DEDICATORIA

A Julita, Antuco, Chiru y Laureano...para ellos, mi esfuerzo.

AGRADECIMIENTO

A Chiru, mi compañera de tantos años, por la paciencia y predisposición permanente a colaborar con mi trabajo.

A todos mis amigos, por el permanente estímulo para finalizar la tarea y continuar el camino de la capacitación.

A Paula Taddeo y Sebastián Poeta, vertiente permanente de estímulo para que cada día de mi vida sea superador. Aprendí de ustedes durante el tiempo que me tocó compartir; aprendí de ustedes cuando se fueron. Sé que me cuidan y me ayudan porque no se explicarían muchas cosas en mi vida de no ser por ustedes. Tenemos charlas pendientes...llegarán en su momento.

A mi grupo de trabajo de la Cátedra de Semiología de la FAZ-UNT. Gracias Fernanda Banegas, Pablo Stagnetto, Melisa Ibañez y Tomas Boullhesen por la colaboración en los trabajos a campo y redacción.

Al Dr. Juan Micheloud, por acceder generosamente a guiarme en la dirección de mi tesis en un momento particular en mi vida profesional y docente.

Al Dr. Marcelo Signorini por estar siempre presente, enseñarme y tenerme la paciencia necesaria para encarar las etapas finales del estudio.

A mis colegas, Alfredo Martín y Gonzalo Valdez Jaen por la ayuda desinteresada en los trabajos a campo.

A los Dres. Pablo Zambrana y Gastón Moisés, amigos que me enseñaron maniobras útiles para el desarrollo de la técnica de biopsia hepática.

A mi querido amigo José Rigazzio por la permanente colaboración en la búsqueda de materiales adecuados para la obtención de muestras.

Al personal de campo del IIACS INTA Leales por la predisposición y las ganas de colaborar en este proyecto. Sin ellos, nuestro trabajo no hubiera sido posible.

A los directivos del IIACS INTA Leales y la Asociación Cooperadora del CER INTA Leales por facilitarme las instalaciones y los animales.

A mi querida FAVE, hoy FCV-UNL. Gracias por la contención durante mis estudios; gracias por estar siempre dispuesta a crecer y hacer crecer.

A mi amigo Roque Gastaldi, por su generosidad y predisposición para ejercer la Codirección del trabajo en las etapas iniciales.

Al Dr. Balbuena por haberme impulsado para arrancar el camino de este proyecto.

A Dios...Él sabe por qué.

ABREVIATURAS

AGV: ácidos grasos volátiles.

As: arsénico.

B: boro.

Ca: calcio

CC: condición corporal.

Cd: cadmio.

Cl: cloro.

Co: cobalto.

COX: citocromo oxidasa.

Cp: ceruloplasmina oxidasa.

Cr: cromo

CRD: cobre de reacción directa.

Cu: cobre.

EAA: espectrofotometría de absorción atómica.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EICD: espacio intercostal derecho.

EICI: espacio intercostal izquierdo.

Fe: hierro.

FLR: fórmula leucocitaria relativa.

GB: glóbulos blancos.

GDP: ganancia diaria de peso.

GNT: grupo no tratado.

GR: glóbulos rojos.

GT: grupo tratado.

Hg: mercurio.

Hto: hematocrito.

I: yodo.

IT1: primer intervalo entre mediciones.

IT2: segundo intervalo entre mediciones.

K: potasio.

kDa: Kilodalton.

Mg: magnesio.

Mn: manganeso.

Mo: molibdeno.

MS: materia seca.

MT: metaltioneína.

Na: sodio.

NEA: noreste argentino.

Ni: níquel.

NOA: noroeste argentino.

P: fósforo.

PM: peso molecular.

ppm: parte por millón.

PV: peso vivo

rpm: revoluciones por minuto.

S: azufre.

S⁻²: sulfuro.

Se: selenio.

Si: silicio.

SO₄⁻²: sulfato

SOD: superóxido dismutasa.

ST: solutos totales.

TMs: tiomolibdatos.

V: vanadio.

VCA: volumen corpuscular agregado.

Zn: zinc.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
ABREVIATURAS.....	v
ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS.....	ix
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xi
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
I.1.- Los oligoelementos en la dieta.....	1
I.2.- Importancia de Cu en bovinos.....	2
I.3.- Situación de deficiencia en la región.....	3
I.4.- Deficiencia de Cu en el Noroeste Argentino (NOA).....	5
I.5.- Importancia económica de la deficiencia de Cu en terneros.....	6
I.6.- Objetivos del estudio.....	7
I.6.1.- Objetivo general.....	7
I.6.2.- Objetivos específicos.....	7
I.7.- Hipótesis.....	8
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
II.1.- Metabolismo del Cu en rumiantes.....	10
II.2.- El Cu en la gestación.....	12
II.3.- Deficiencia de Cu en terneros lactantes.....	14
II.4.- Suplementación.....	17
II.5.- Diagnóstico.....	18
II.5.1.- Diagnóstico de la deficiencia en animales.....	18
II.5.2.- Diagnóstico de los factores que provocan hipocuprosis.....	19
III.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
III.1.- Diseño experimental.....	21
III.2.- Técnicas, procesamiento y momentos de muestreo.....	23

III.2.1.- Material de vidrio para envío de muestras.....	24
III.2.2.- Muestreo de sangre.....	24
III.2.3.- Biopsia hepática.....	25
III.3.- Técnicas analíticas.....	26
III.3.1.- Determinación de Cu.....	26
III.3.2.- Hto y recuento de leucocitos.....	26
III.3.3.- Evaluación productiva.....	27
III.4.- Análisis estadístico.....	27
IV.- RESULTADOS.....	28
IV.1.- Variaciones en los niveles séricos de Cu en los terneros.....	28
IV.2.- Variaciones en los niveles hepáticos de Cu en los terneros.....	29
IV.3.- Variaciones hematológicas en los terneros.....	31
IV.3.1.- Hto.....	31
IV.3.2.- Recuento leucocitario.....	32
IV.4.- Variaciones en el PV y la GDP en los terneros.....	32
V.- DISCUSIÓN.....	34
V.1.- Agua y forraje.....	34
V.2.- Cupremia y valores de Cu hepático.....	35
V.3.- Hto y leucocitos.....	39
V.4.- GDP.....	41
VI.- CONCLUSIONES.....	44
VII.- BIBLIOGRAFÍA.....	46

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla 1. Resultados del análisis de agua	24
Gráfico 1. Valores promedio de cupremia a lo largo del ensayo ($\mu\text{g/dl}$)	29
Gráfico 2. Valores promedio de Cu hepático a lo largo del ensayo (ppm)	31
Gráfico 3. Valores promedio de Hto a lo largo del ensayo (%)	32
Tabla 2. Valores de leucocitos a lo largo del ensayo expresados en miles/ mm^3	33
Tabla 3. Control de pesos a lo largo del ensayo expresados en kg.....	34

RESUMEN

La hipocuprosis se considera una de las deficiencias minerales más importantes en la producción ganadera. En Argentina existen regiones endémicas, pudiendo ser primaria y/o secundaria. En Tucumán, algunos trabajos señalan la importancia de la misma en regiones con características ambientales propicias. Habitualmente los animales no presentan signología, siendo la deficiencia subclínica, la forma más importante y de mayor impacto económico. El objetivo del presente trabajo fue determinar variaciones en el metabolismo del cobre en terneros nacidos de vaquillonas con y sin suplementación, en el último tercio de gestación. Se seleccionaron 20 vaquillonas preñadas, que fueron divididas en 2 grupos, tratadas y no tratadas. Las tratadas fueron suplementadas con 200 mg de glicinato de cobre vía subcutánea. Luego del parto, en los terneros, se evaluó el peso y ganancia de peso diaria, concentración de cobre hepática y sérica y parámetros hemáticos relacionados. Se realizaron muestreos al primer, tercer y quinto mes de vida y los datos se compararon estadísticamente entre y dentro de cada grupo. Los resultados demostraron que: a) la suplementación mantuvo valores normales de cobre en hígado y suero por más tiempo en terneros provenientes de vacas suplementadas; b) una única aplicación de cobre inyectable en el último tercio de la gestación no fue suficiente para cubrir los requerimientos del ternero hasta el destete; c) es necesario evaluar el cobre sérico y hepático para determinar el estatus metabólico del mineral en terneros; d) la disminución del hematocrito se expresaría en períodos prolongados de deficiencia.

Palabras clave: hipocuprosis, terneros, suplementación, peso, metabolismo.

SUMMARY

Hypocuprosis is an important mineral deficiency in the cattle industry. In Argentina, there are endemic regions, where hypocuprosis can be primary or secondary. Researchers in the province of Tucuman have shown the importance of this condition in regions with specific environmental conditions. Affected animals are usually asymptomatic; the subclinical form is the most common and the most impactful on the cattle industry. This study evaluated variations on copper metabolism in calves born from heifers that received copper supplementation in the last third of gestation, versus the ones that did not receive any copper supplementation. Twenty heifers were enrolled in this study and divided into two groups: 10 heifers received 200 mg of copper glycinate subcutaneously. After being born, the body weight, daily weight gain, hepatic and serum concentration of copper and related blood values were measured in all calves. Samples were obtained in the first, third and fifth month after birth, data was collected and statistically analyzed. This study showed that a) those calves born from heifers that received copper supplementation achieved normal serum and liver copper values for longer, compared to those calves born from untreated heifers; b) a single dose of copper during the last third of pregnancy was not enough to maintain normal copper values until weaning day; c) measurement of serum and hepatic copper levels are needed to fully evaluate copper metabolism in calves; d) a drop in hematocrit would be seen after prolonged copper deficiency.

Key words: hypocuprosis, calves, supplementation, weight, metabolism.

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.-Los oligoelementos en la dieta

Los elementos inorgánicos encontrados en la corteza terrestre son denominados como minerales y constituyen entre 4-5% del peso vivo (PV) del animal (Ciria Ciria y col., 2005). Algunos son esenciales para la salud y productividad de los animales, teniendo roles bioquímicos y nutricionales definidos como: activación de enzimas, mantenimiento del balance iónico y pH, provisión de rigidez estructural de huesos y dientes (Ciria Ciria y col., 2005; NASEM, 2021), producción de hormonas, síntesis de vitaminas y transporte de oxígeno (Amorim y col., 2003). Estos procesos biológicos son indispensables para el funcionamiento de un organismo vivo (Valenzuela y col., 2008). Se considera que son el tercer grupo de nutrientes limitantes en la producción animal debido a que son indispensables para la transformación de los alimentos en componentes del organismo o en productos animales como leche, carne, crías, piel, lana, etc. (Salamanca, 2010). Además, debe destacarse que, al no poder ser sintetizados por los animales, sus necesidades deben ser cubiertas por los alimentos que ingieren (Ciria Ciria y col., 2005).

La eficiencia de absorción y los factores que afectan la biodisponibilidad de los minerales difiere enormemente entre rumiantes y no rumiantes (Spears, 2003). En la nutrición mineral del ganado bovino se debe tener en cuenta 21 elementos esenciales, o probablemente esenciales, en los que su estructura química es la responsable de su función (Ciria Ciria y col., 2005). Los macrominerales, se requieren a diario en el orden de los gramos en la dieta (Ca, P, K, Na, Cl, Mg, S) mientras que, los oligoelementos, son requeridos en el orden de los miligramos (Cu, Co, Cr, Se, Zn, Fe, Mn, I, Mo) (Blood y Radostis, 1992). Esta clasificación en macrominerales y oligoelementos, sirve para ordenar el estudio de los mismos ya que todos son igualmente importantes; si falta uno, cualquiera que sea, la producción se verá perjudicada (Mufarrege, 1999), por lo que las deficiencias minerales se encuadran dentro de las denominadas enfermedades metabólicas o de la producción (Minatel y col., 2007a).

Otros minerales adicionales, aunque menos conocidos, poseen efectos benéficos cuando son suplementados en la dieta (As, B, Ni, Si, V). Sin embargo, como aún no se

I.- INTRODUCCIÓN

conocen las funciones específicas para los mismos, no son incluidos en la lista de minerales esenciales (NRC, 2005).

Los oligoelementos tienen diversas funciones catalíticas y estructurales en el organismo e incluso intervienen en la respuesta inmune del individuo (Underwood y Suttle, 1999; Ciria Ciria y col., 2005). En el caso de los rumiantes, no se debe minimizar su intervención en el metabolismo ruminal, ya que bacterias y protozoos requieren minerales para lograr su óptimo crecimiento, reproducción y degradación de los alimentos. Es así, que gran parte de las pérdidas que se suscitan en la producción de los rumiantes por deficiencias minerales se deben a una baja eficiencia de conversión alimenticia, debido a una menor digestibilidad y aprovechamiento de nutrientes (Repetto y col., 2004). En bovinos, los desequilibrios minerales afectan la homeostasis de diversos sistemas orgánicos perjudicando la ganancia diaria de peso (GDP) e incrementando la susceptibilidad a infecciones (Amorim y col., 2003). La ingestión insuficiente conduce a deficiencias que repercuten en la productividad y en la salud, pero el exceso de algunos, provocan intoxicaciones o deficiencias de otros, por interacciones (Ciria Ciria y col., 2005), o disminuyen la fermentación ruminal y, por ende, la producción de AGV (Engle y Spears, 2000), afectando los índices productivos de los rodeos (Olson y col., 1999).

I.2.- Importancia del Cu en bovinos

Entre todas las deficiencias minerales, las de Cu y P son consideradas como las más difundidas a nivel mundial (Underwood y Suttle, 1999), afectando significativamente la ganadería bovina (Gooneratne y col., 1989; Rosa y Mattioli, 2002; Pinto Santini y col., 2007; Suttle, 2010), siendo elementos muy restrictivos para la producción (Postma y col., 2010). La hipocuprosis, en el ganado bovino, provoca severas pérdidas productivas al generar, principalmente, bajos índices reproductivos y menor tasa de crecimiento (Greene, 2000; Pinto Santini y col., 2007). Esta última podría ser una de las consecuencias más importantes de esta deficiencia, debido a que pasa desapercibida si los animales no son pesados regularmente (Rosa y Mattioli, 2002; Fazzio y col., 2010).

I.- INTRODUCCIÓN

En los rodeos de cría, esta deficiencia suele ser un problema serio dado que, en condiciones de producción extensiva, los animales dependen exclusivamente del pastoreo a campo, sin recibir, en muchos casos, ninguna suplementación (Mullis y col., 2003).

Se reconocen dos tipos de deficiencias de Cu, según su origen: la “deficiencia primaria o simple” se debe a la insuficiente concentración mineral en los pastos ingeridos; la deficiencia “secundaria o condicionada” tiene origen en la interacción o interferencia por parte de otros elementos presentes en el alimento que impiden la correcta absorción mineral (Rosa y Mattioli, 2002; Repetto y col., 2004; NRC, 2005), entre los que se encuentran el Mo, Fe y S (Gooneratne y col., 1989; Mufarrege, 1999; Spears, 2003; Minatel y col., 2007a; Suttle, 2010; NASEM, 2021).

Por lo expuesto, se afirma que el bajo nivel de Cu en los tejidos deriva de una baja concentración del mineral en los alimentos ingeridos, de una elevada concentración de sus antagonistas conocidos, o de una combinación de ambas (Greene, 2000). La mayoría de las dietas ofrecidas al bovino para alimentación tienen un rango de Cu de 4 a 15 mg Cu/ Kg MS (NASEM, 2021). En términos generales, las gramíneas y granos de cereales contienen de 3 a 8 mg Cu/kg MS; las leguminosas, por otro lado, contienen mayor cantidad de Cu que las gramíneas (García Díaz y col., 2015). Debe tenerse en cuenta que la concentración de Cu, y de sus antagonistas, no es estable, sino que varía de acuerdo a la pastura, condiciones del suelo, clima y fertilizaciones (Gooneratne y col., 1989).

Se presenta deficiencia primaria, cuando el ingreso dietético del mineral es menor a 3-5 ppm de Cu con un tenor de Mo en el alimento menor a 2-5 ppm (Dirksen y col., 2005); la deficiencia secundaria se produce con un ingreso de Cu adecuado, entre 5-25 ppm en el alimento, pero con alto contenido de Mo (Blood y Radostis, 1992), S, Fe o Zn (Underwood y Suttle, 1999; NASEM, 2021). Aún con bajas concentraciones de Mo, el S por si solo puede interferir con la absorción de Cu (Rosa y Mattioli, 2002; Spears, 2003; Pechin y col., 2006). Una alta concentración de sulfatos (SO_4^{2-}) en el agua de bebida puede ejercer un efecto sobre el Cu de manera similar al S aportado por los forrajes (Spears, 2003; NASEM, 2021). Adicionalmente, Spears (2003) menciona que cuando las concentraciones de sulfuro (S^{2-}) son bajas, el molibdeno tiene un pequeño efecto en la biodisponibilidad de Cu. Por otro lado, a concentración de Zn necesaria para que se

I.- INTRODUCCIÓN

produzcan efectos antagónicos en la absorción de Cu en rumiantes debe ser de 10 a 20 veces superior a los requerimientos del mineral, por lo que, en condiciones de campo, este proceso no tendría importancia (NASEM, 2021).

I.3.- Situación de deficiencia en Argentina

Al igual que en otras partes del mundo, las deficiencias minerales más importantes en Argentina son las de Cu y P (Balbuena y col., 2003). Otros problemas nutricionales que suelen ser limitantes para la producción son la hipomagnesemia y la hipocalcemia, aunque en áreas más restringidas (Repetto y col., 2004). Algo similar ocurre con la deficiencia de I en el noroeste argentino (NOA) (Micheloud y col, 2019).

En la hacienda de engorde o invernada, la frecuencia de hipocuprosis depende de la zona geográfica, tipo de deficiencia, estatus sanitario previo e intensidad del manejo (Repetto y col., 2004). Una característica común en todas las regiones donde la hipocuprosis es endémica, es el tipo de suelo, siendo en la mayoría de los casos, suelos bajos, inundables, salitrosos, alcalinos y ricos en Mo. Generalmente son limosos, y pueden reducir la disponibilidad del Cu debido a un incremento en la disponibilidad de Mo, en particular si los niveles del primero son marginales (Blood y Radostis, 1992).

Durante los meses de primavera y verano, en épocas de intensas lluvias, la ocurrencia de hipocuprosis en el ganado se incrementa, ya que, en campos bajos, el anegamiento favorece la capacidad de las plantas para absorber Mo y SO_4^{-2} que interfieren la absorción del Cu a nivel ruminal. Esto otorga cierta estacionalidad a la deficiencia de Cu (Repetto y col., 2004).

En el noreste argentino (NEA) se realizaron estudios del contenido de Cu en los pastos dando resultados compatibles con deficiencia primaria de Cu, con un contenido promedio del mineral de 3,9 ppm (INTA, 2004). Balbuena y col. (1999) informaron niveles marginales de Cu (5,2 ppm) y altas concentraciones de Mo (6,5 ppm) y Fe (711 ppm), en pasturas en la provincia de Chaco. En otro estudio, de la misma región, se encontraron niveles inferiores a 4 ppm de Cu en la MS del forraje en el 86% de las muestras; en el 7,4% de las mismas, las concentraciones de Mo fueron superiores a 6 ppm; en el 28% se

I.- INTRODUCCIÓN

encontraron niveles de S superiores a 0,4% MS, y en el 62% una relación Cu:Mo inferior a 2 (Balbuena y col, 1989). Distintos autores citaron niveles bajos de Cu en suero bovino y en biopsias hepáticas, en relevamientos en diferentes establecimientos del NEA (Balbuena y Mastandrea, 2003; Postma y col., 2010).

Estudios realizados en la Cuenca del río Salado, provincia de Buenos Aires, Argentina, demostraron que, en esta zona de cría por excelencia, la hipocuprosis es endémica. La prevalencia de animales con niveles séricos de Cu por debajo de lo normal en vacas de cría fue del 38% y del 62% en los terneros (Mattioli y col., 2008).

I.4.- Deficiencia de Cu en el NOA

Soler y col. (2000) describieron deficiencias primarias en animales en pastoreo y engordados a corral en varias provincias de Argentina, incluyendo Santiago del Estero. Anteriormente, Boggiato y Ruksan (1989) reportaron hipocuprosis debida a molibdenosis en la misma región. Cseh y col. (2011) informaron deficiencias primarias de Cu con concentraciones menores a 5 ppm y secundarias por elevados valores de Mo y Fe en el forraje, y SO_4^{-2} en el agua de bebida, en diferentes establecimientos de la misma provincia. En el departamento San Martín, provincia de Salta, Micheloud y col. (2017) reportaron niveles de normocupremia ($66 \pm 3,5 \mu\text{g/dl}$) en vacas de cría e hipocupremia leve a moderada ($48,6 \pm 11 \mu\text{g/dl}$) en vaquillonas de recría pastoreando gramíneas megatérmicas, sin suplementación, informando que los valores del mineral se mantuvieron a lo largo del año. Resultados similares fueron obtenidos por Saravia y col. (2015) evaluando cupremias de vacas y vaquillonas en el departamento Anta, Salta. En un estudio más reciente en la región del Chaco Semiárido Salteño, se informó la existencia de hipocupremia severa a moderada en vacas ($26,6 \pm 13 \mu\text{g/dl}$) y terneras ($26,6 \pm 13 \mu\text{g/dl}$) muestreadas cada 3 meses durante un año (Micheloud y col., 2021).

En la provincia de Tucumán, más precisamente en el departamento Leales, se realizaron muestreos de agua, forraje y sueros bovinos. Los valores de Cu en forraje oscilaron entre 5,5 y 8,12 ppm, siendo más elevados en invierno que en primavera; los valores registrados para Mo también fueron inconstantes a lo largo del año, registrándose valores de 1 ppm en primavera y 4,07 ppm en invierno. Los valores de SO_4^{-2} en la dieta

I.- INTRODUCCIÓN

variaron entre 0,22 y 0,64%, siendo más elevados en otoño y primavera y más bajos en verano. En el agua de bebida, los valores máximos y mínimos para solutos totales (ST) y SO_4^{-2} expresados en mg/l fueron, respectivamente: 780 y 66; 200 y 17. Los valores séricos de Cu se mantuvieron entre 25 y 36 $\mu\text{g/dl}$, siendo más baja en otoño y más elevada en primavera. Estos valores mostraron deficiencia de Cu anual secundaria producida por excesos dietéticos de Mo y SO_4^{-2} (Cseh y col, 2012). En el mismo departamento de la provincia de Tucumán, Boggiato y Ruksan (1988) informaron hipocuprosis secundaria por niveles elevados de molibdeno en bovinos que pastoreaban *Melilotus* y *Chloris*.

I.5.- Importancia económica de la deficiencia de Cu en terneros

La mayor parte de los animales no presentan signología clínica, siendo la forma subclínica la de real importancia económica (Gooneratne y col., 1989; Viejo y Casaro, 1992; Underwood y Suttle, 1999). Es por ello que, inadecuadas concentraciones de Cu en la dieta pueden causar disminución del crecimiento y pobres índices reproductivos en el rodeo sin presentar signos clínicos evidentes (Borges y col., 2005; Suttle, 2010; NASEM, 2021).

Una de las consecuencias más graves de la hipocuprosis bovina es la menor GDP en terneros (Rosa y col., 2006). Gengelbach y col. (1994) informaron la disminución de GDP en terneros con hipocuprosis debida a una deficiencia secundaria asociada, solamente, a ingestas elevadas de Mo y las asociaron con disminución del consumo y de la conversión de la dieta.

Estudios de relevamiento en la Cuenca Deprimida del Río Salado (provincia de Buenos Aires) demostraron que casi el 80% de terneros presentaron concentraciones plasmáticas de Cu indicativas de la deficiencia (Dirksen y col., 2005). Esta situación generó menor GDP en los terneros, que llegó hasta los 30 kg al momento del destete, aproximadamente a los 6 meses de edad (Fazzio y col., 2006). Se debe valorar que todas estas pérdidas subclínicas suelen presentar un costo muy superior al de una correcta suplementación (Ciria Ciria y col., 2005) y que la suplementación de animales con baja performance no genera crecimiento compensatorio en los mismos (Rosa y col., 2006).

I.- INTRODUCCIÓN

La suplementación con diferentes compuestos que adicionan Cu se ha difundido en las hembras bovinas preñadas, especialmente en su último tercio de gestación a fin de aumentar la reserva hepática de los terneros al nacimiento con el propósito de mejorar la GDP hasta el destete en los mismos. Si bien, mediante la suplementación con Cu a la vaca, se logran mejorar las concentraciones tanto séricas como hepáticas de Cu, gracias al mayor aporte al feto (García y col., 2007), estudios más recientes han demostrado que esta suplementación es útil pero insuficiente, ya que los terneros quedan expuestos a sufrir menor GDP a partir de los tres meses y hasta su destete, a los seis a siete meses (Mattioli y col., 2008). Otros autores no encontraron diferencias entre los terneros nacidos de vacas suplementadas con aquellos nacidos de vacas sin suplementación en el último tercio de gestación (Muehlenbein y col., 2001).

Viejo y Casaro (1993) encontraron diferencias en la GDP en terneros suplementados desde los 65 días de vida; esta diferencia fue mayor cuando los terneros pertenecían a madres suplementadas durante la gestación. En la provincia de Chaco, Argentina, se reportaron solo diferencias significativas de peso en el grupo de terneros tratados con un peso menor a 80 kg; en el grupo de mayor peso, no se observaron diferencias en la GDP al aplicar la suplementación con Cu inyectable (Balbuena y col, 1999). Debe tenerse en cuenta que la suplementación con Cu en bovinos en crecimiento, con signos de hipocuprosis, no siempre da una respuesta positiva en la GDP, a pesar de que el tratamiento fuera efectivo para restablecer el valor normal de Cu en sangre e hígado (Minatel y col., 1998) ya que solo un bajo porcentaje de animales evidencia menores tasas de crecimiento (Rosa y col., 2006).

Las prácticas rutinarias en los rodeos de cría de la zona incluyen suplementaciones con Cu en forma inyectable desde el momento del destete y con una periodicidad variable dependiendo del producto utilizado, aunque hay estudios que sugieren que las pérdidas producidas a temprana edad no se recuperan con los tratamientos tardíos (Balbuena y col., 1999).

I.- INTRODUCCIÓN

I.6.- Objetivos del estudio

I.6.1.- Objetivo general

Determinar variaciones en el metabolismo de Cu, desde el parto al destete, en terneros nacidos de vaquillonas con y sin suplementación de glicinato de Cu, en el último tercio de la gestación.

I.6.2.- Objetivos específicos

a.- Evaluar el efecto de la suplementación con Cu inyectable en vaquillonas preñadas (7 meses) sobre la GDP de sus terneros hasta la edad de destete (6 meses).

b.- Determinar el efecto de la suplementación de Cu, a las madres, sobre las concentraciones séricas y hepáticas de Cu de sus terneros hasta la edad de destete (6 meses).

c.- Evaluar la concentración hepática de Cu y su relación con los niveles séricos del mismo en los terneros hasta la edad de destete (6 meses).

d.- Evaluar los parámetros hemáticos y su relación con la concentración sérica y hepática de Cu en los terneros hasta el destete (6 meses).

I.7.- Hipótesis

La suplementación con Cu inyectable durante el último tercio de la gestación, en vaquillonas, eleva los niveles de reserva hepática en sus terneros al momento del nacimiento, lo que redundará en mayores GDP y valores de Hto superiores, cuando se los compara con los nacidos de vaquillonas no suplementadas, los cuales nacen con niveles menores de Cu hepático y sus reservas se agotan antes.

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1.- Metabolismo del Cu en rumiantes

Los requerimientos diarios de Cu son de 10 ppm (NASEM, 2021) pudiendo variar entre 4 y 16 ppm (Moreira Braga y col. 1985; INTA, 2004; Ciria Ciria y col. 2005). Los niveles máximos tolerables en la dieta son de 100 ppm de Cu (Moreira Braga y col. 1985; Ciria Ciria y col. 2005); sin embargo, los mismos varían según los componentes de la misma (Mufarrege, 1999). Si bien los monogástricos absorben el 30 y hasta el 50% del Cu presente en la dieta, en los rumiantes el porcentaje de absorción es menor, alrededor del 3% (Rosa y Mattioli, 2002), pudiendo variar entre el 1 y 10% (Spears, 2003). Estudios más recientes sugieren que desde que rumen comienza a funcionar, la absorción de Cu disminuye sustancialmente, llegando a niveles menores a 5% en bovinos adultos (NASEM, 2021). Esto se debe, en parte, al ambiente reductor del rumen que produce, por un lado, la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} , el cual es más difícil de absorber y, por otro lado, la formación de S^{-2} a partir de SO_4^{-2} (Rosa y Mattioli, 2002) y de la degradación de aminoácidos azufrados (Spears, 2003). Bajo estas condiciones, el Mo y S forman tiomolibdatos (TMs) cuando se incorporan en altas cantidades en la dieta o en el agua (NASEM, 2021). Según el número de átomos de S en la molécula, los TMs se denominan mono, di, tri o tetratiomolibdatos (Rosa y Mattioli, 2002). Los TMs fijan Cu en el tracto gastrointestinal, tornándose inabsorbibles para el animal (Underwood y Suttle, 1999). Los tri y tetratiomolibdatos que forman complejos con el Cu en el rumen, impiden la absorción intestinal de este último; mientras que los di y tritiomolibdatos que llegan a la sangre y se ligan a albúminas séricas bloquean el metabolismo intermedio del Cu, especialmente en algunas enzimas que contienen el oligoelemento (Dirksen y col., 2005; NASEM, 2021). Adicionalmente los TMs absorbidos, también aumentan las pérdidas orgánicas de Cu por bilis y orina (Rosa y Mattioli, 2002; Spears, 2003). Este fenómeno es importante cuando hay alta concentración de S^{-2} en rumen, ya que cuando esta es baja, el Mo tiene un pequeño efecto en la biodisponibilidad de Cu (Spears, 2003).

Adicionalmente, altos niveles de Fe dietarios contribuyen a exacerbar la deficiencia de Cu. El mecanismo exacto de interferencia del Fe no ha sido bien aclarado, pero podría estar relacionado con la formación de FeS en el rumen, que se solubilizan en el abomaso

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

favoreciendo la formación de CuS, no disponible para su absorción (Rosa y Mattioli, 2002). NASEM (2021) informó que, además, podría ocurrir una competencia por sitios de unión intestinal, reduciendo la absorción de Cu. Sumado a esto, Spears (2003), afirmó que altos niveles de Fe en la dieta no afectaron el estatus de Cu en terneros lactantes, pre rumiantes, lo que sugirió que se necesita un rumen funcional para que el Fe interfiera con el metabolismo del Cu.

La absorción de Cu se realiza en varios lugares del tracto digestivo, comenzando desde el estómago hasta incluso el intestino grueso en las diferentes especies de interés veterinario. En los rumiantes, el duodeno y el yeyuno son los principales lugares de absorción. En el ñeón la absorción se produce a menor intensidad (García Díaz y col., 2015). El Cu ingresa a través del ribete en cepillo del enterocito que lo deposita uniéndolo a la metalotioneína (MT), una proteína con 25-30 % de cisteína en cuyos grupos sulfhidrilos (-SH₂) liga metales (Cu, Zn, Cd, Hg). Si bien todos estos metales estimulan la producción de MT en el enterocito, la mayor estimulación la realiza el Zn, el cual es desplazado por el Cu que posee mayor afinidad por la enzima, quedando libre para estimular la síntesis de nueva MT (Mullis y col., 2003; NRC, 2005). Se ha descrito que altas cantidades de Zn pueden reducir la absorción de Cu por la mayor síntesis de MT (NRC, 2005), aunque recientemente se minimizó la importancia de este mineral como antagonista del Cu en condiciones de campo (NASEM, 2021). En el duodeno de bovinos, la MT es la principal fracción de Cu y tendría dos funciones primordiales, por un lado, sería responsable de la captación y almacenaje temporario del Cu hasta su absorción, y por otro lado representa un mecanismo defensivo evitando la captación de cantidades excesivas de Cu u otros metales (Blood y Radostis, 1992; García Díaz y col., 2015). El Cu unido a la MT se elimina con las heces en el proceso normal de descamación de la mucosa intestinal (NRC, 2005).

Al ingresar al torrente circulatorio el Cu se une principalmente a la albúmina y secundariamente a aminoácidos libres. Ambas fracciones, denominadas Cu de reacción directa (CRD) debido a que reaccionan con el dietiltiocarbamato sin acidificación previa, ceden fácilmente el Cu al hígado (Dirksen y col., 2005).

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El hígado ha sido reconocido como el principal órgano de depósito de Cu (Muehlenbein y col., 2001; NASEM, 2021); cerca de 40 a 70% del Cu absorbido es almacenado en hígado, desde donde es liberado cuando se reduce el consumo o la absorción del mismo (Borges y col., 2005). La concentración de Cu hepático, normalmente, es mayor a 20 ppm de Cu en la MS, pudiendo llegar hasta 200 ppm. La sangre normalmente tiene de 60 a 100 $\mu\text{g}/\text{dl}$ y con altos valores hepáticos queda entre 80 y 150 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (Moreira Braga y col., 1985; Mufarregge, 1999). El $92,5 \pm 5 \%$ del CRD es captado por el hígado. El resto se distribuye por otros tejidos ($2,9 \pm 0,8 \%$), leche ($3,5 \pm 4,5 \%$) y orina ($1,5 \pm 0,3 \%$) (Borges y col., 2005). Una vez incorporado al hepatocito, el Cu se almacena unido a la MT en los lisosomas, para ser utilizado en la síntesis de ceruloplasmina oxidasa (Cp), previa degradación lisosomal o por intercambio mediado por glutatión peroxidasa (GSH), o bien para ser excretado con la bilis (Mullis y col., 2003; INTA, 2004). La bilis es la principal vía de excreción del Cu absorbido. Los lisosomas serían los encargados de tomar el Cu y volcarlo a la bilis posiblemente por exocitosis. La propia bilis limita la reabsorción del Cu por lo cual la mayor parte de éste se pierde por heces (Mullis y col., 2003). Una pequeña cantidad de Cu se excreta por orina, alrededor del 1 % del absorbido (Rosa y Mattioli, 2002).

El Cu es esencial para la síntesis y actividad de numerosas enzimas (Mufarregge, 1999; Suttle, 2010; NASEM, 2021). Las metaloenzimas dependientes de Cu más importantes son la Cp, la superóxido dismutasa (SOD), la tirosinasa, la citocromo-c-oxidasa (COX) y la monoamino oxidasa o lisil oxidasa (García Díaz y col., 2015; NASEM, 2021).

La Cp, sintetizada en el hígado, se libera hacia el plasma, donde representa el 70 a 95 % del Cu sérico y es la principal fuente de Cu para los tejidos (Rosa y Mattioli, 2002), ejerciendo un papel fundamental en su metabolismo (García Díaz y col., 2015). Es una glucoproteína de PM 132.000 kDa con 6 átomos de Cu por molécula y 7 a 8 % de hidratos de carbono (Mullis y col., 2003). Sus funciones principales son el transporte de Cu desde el hígado a los tejidos (Repetto y col., 2004), acción antioxidante, modulación de la respuesta inflamatoria como proteína de fase aguda en infecciones o estrés, oxidación de aminas aromáticas y, finalmente, oxidación del Fe^{+2} para que éste pueda ser transportado hasta los tejidos hematopoyéticos por la transferrina, regulando la disponibilidad de Fe a

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

los tejidos, evitando catalizar de manera descontrolada la reacción de Fenton (Hellman y Gitlin, 2002).

La SOD es una metaloenzima ampliamente distribuida por el organismo. Posee un PM de 34.000 kDa con 2 átomos de Cu y 2 de Zn por molécula (Mullis y col., 2003). Así como la Cp es importante como antioxidante plasmático, la SOD actúa como principal antioxidante intracelular (NASEM, 2021). Su función es inactivar los iones superóxidos dando como resultado la producción de peróxido de hidrógeno y oxígeno (García Díaz y col., 2015). El peróxido de hidrógeno, aún tóxico, es inactivado por las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa (Rosa y Mattioli, 2002). Esto es particularmente importante en células fagocíticas y podría ser un mecanismo de acción principal para reducir las enfermedades infecciosas cuando se administran cantidades adecuadas de Cu (NASEM, 2021).

La tirosinasa participa en la oxidación del aminoácido tirosina, paso metabólico involucrado en la formación de melanina (NASEM, 2021). Por ello, la ausencia congénita de esta enzima causa albinismo. Los pasos iniciales de formación de melanina son también comunes a la formación de adrenalina y noradrenalina (Amorim y col., 2003).

La COX es un complejo que contiene los citocromos a y a₃ de la cadena respiratoria, posee dos átomos de Cu además de dos grupos hemo con sus respectivos átomos de Fe. Representa la enzima terminal de la cadena respiratoria y cataliza la transferencia de 4 electrones al O₂ para formar 2 moléculas de agua y ATP. Su ubicuidad y función para la obtención de energía hacen que esta enzima sea vital para el animal. Se han descrito alteraciones bioquímicas y ultraestructurales en miocardios de bovinos con bajos valores de SOD y COX debidas a deficiencia de Cu (Olivares y col., 2014).

Se han identificado varios tipos de monoamino oxidasas en el organismo. Ubicadas en la membrana mitocondrial externa, se encargan de producir la desaminación oxidativa de diversas monoaminas como adrenalina, noradrenalina, tiramina, triptamina y serotonina (Amorim y col., 2003). Una enzima similar, denominada lisil oxidasa, se encarga de producir la desaminación oxidativa de residuos de lisina en las fibras de colágeno y elastina. Esta reacción permite la formación de puentes cruzados en el colágeno y la

elastina, los cuales otorgan la resistencia mecánica y las características funcionales de estas fibras (García Díaz y col., 2015; NASEM, 2021).

II.2.- El Cu en la gestación

Los requerimientos minerales en los animales son relativamente bajos para el mantenimiento (que sirven para compensar pérdidas endógenas), mientras que los de producción (crecimiento, gestación y lactancia) varían con la edad y funciones que deben desarrollar, incluyendo la naturaleza y el nivel de producción (NASEM, 2021). Estos requerimientos indican la cantidad de Cu que debe ser absorbido, por lo cual la dieta debe aportar una cantidad mayor, que se conoce como requerimiento bruto (Rosa y Mattioli, 2002). De esta manera, la incidencia de deficiencias minerales será más alta conforme sean más intensificados los sistemas de producción y el nivel genético del ganado (Repetto y col., 2004). Se asume que el estatus de minerales en los terneros al nacer está determinado por el nivel de los minerales en las vacas durante la preñez, por lo que las deficiencias durante la gestación condicionan los niveles del ternero durante los primeros días (Widdowson y col., 1974). Sin embargo, esto no es así en todos los casos debido a que la transferencia placentaria varía según cada elemento (Pavlata y col., 2005).

Durante la gestación, el nivel de Cu se incrementa progresivamente en el hígado del ternero, mientras disminuye la concentración hepática del mineral en la madre (Gooneratne y Christensen, 1989). Debido a esto, las hembras preñadas deben ser más eficientes en la conservación y absorción del Cu para lograr adaptarse a las mayores demandas del feto (Gooneratne y col., 1989). El Cu se transfiere en gran cantidad de la madre al feto, de modo que al nacer el ternero posee una concentración hepática hasta 300 ppm, expresada sobre MS (Viejo y Casaro, 1992). Esta transferencia del mineral de la madre al feto, varía según el período de gestación, lo que modifica las necesidades de la hembra preñada a lo largo de la misma, aumentando en 4 veces desde el primer al último tercio de gestación (Gooneratne y col., 1989; NRC, 2005). En los primeros cien días de gestación se incorporan diariamente 0,5 mg de Cu en el feto, placenta y tejido uterino, incrementando la tasa de transferencia a 1,2-2 mg/día durante el último mes de gestación (NRC, 2005). Publicaciones más recientes sugirieron que, debido a que faltan datos no podría afirmarse que existe una acumulación de reservas de Cu en el feto en el

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

primer trimestre de gestación y, que la transferencia de Cu de la madre al feto es de 0,3 μg x kg de PV de la madre, entre los 90 y 190 días de gestación, y aumenta a 2,3 μg x kg de PV de la madre cuando la preñez es de más de 190 días, hasta el parto (NASEM, 2021). Es por ello que, la concentración hepática de Cu en el feto depende del período de gestación, creciendo a medida que avanza la misma, y de la concentración hepática de la madre (Kincaid, 1999). Esta última declina a medida que avanza la gestación, siendo este efecto es más pronunciado en el último trimestre de la misma (Gooneratne y Christensen, 1989). Cuando la concentración de Cu hepática de la madre es inferior a 25 ppm (MS), el depósito hepático fetal se reduce significativamente (Gooneratne y Christensen, 1989; Fazio y col., 2006), resultando en una menor concentración hepática de Cu en el ternero recién nacido (Gengelbach y col., 1994).

Los altos requerimientos fetales imponen a la madre una considerable demanda mineral, especialmente en el último trimestre de la gestación. El aumento en la incorporación de Cu por el hígado fetal refleja una adaptación fisiológica para el período post-natal (Viejo y Casaro, 1992; Gengelbach y col., 1994). Bajo estas condiciones, la concentración de Cu en la dieta debería incrementarse de 10 a 25 ppm (Gooneratne y col., 1989) o suplementar vía inyectable a las madres, lo que permite aumentar la transferencia de Cu hacia el feto al elevar los niveles de reserva de las vacas (Viejo y Casaro, 1992; Olson y col., 1999).

II.3.- Deficiencia de Cu en terneros lactantes

Después del nacimiento, la vaca es una fuente pobre de Cu para el ternero, ya que tanto el calostro como la leche tienen bajas concentraciones del mineral (Gooneratne y col., 1989; Ward y col., 1995; Soler y col., 2000). El Cu contenido en el calostro es de 0,6 ppm; el Cu contenido en la leche es de 0,04 ppm, pudiendo llegar a 0,20 ppm cuando las vacas son suplementadas con el mineral (NASEM, 2021). Debido a la baja concentración de Cu en la leche y calostro, la presentación de deficiencia del mineral depende casi exclusivamente de la reserva hepática del mismo, ya que el aporte de la lactancia exclusiva no logra cubrir los requerimientos del ternero (Mullis y col., 2003). Por ello, debe asegurarse una concentración hepática adecuada al ternero hasta que comience a ingerir alimento que pueda tener valores adecuados de Cu (Ward y col., 1995) ya que, la

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

suplementación de la madre en lactancia no eleva los niveles del mineral en calostro ni en leche de manera representativa (Muehlenbein y col., 2001). Es por esto que, reducidos valores hepáticos de Cu, en el ternero, pueden llevar a cupremias bajas, aunque la absorción del mineral en los terneros lactantes (pre-rumiantes) sea elevada (Spears, 2003).

Los cálculos de requerimientos revelan que, para prevenir un estado de deficiencia, los terneros recién nacidos deben tener una reserva de 300 ppm MS de tejido hepático (Viejo y Casaro, 1992), valores muy superiores a los que puede presentar un adulto (NASEM, 2021). Esos niveles de Cu hepático del neonato representan más del 50% del Cu total corporal del ternero (Viejo y Casaro, 1993).

En terneros recién nacidos, entre el 75 y el 85% del Cu dietético es absorbido (Spears, 2003). Durante la cuarta semana de vida el porcentaje de absorción desciende a 60% de lo ingerido. Con el desarrollo del rumen, se produce una gran disminución de la absorción de Cu, llegando a absorber menos del 5% del Cu ingerido (NASEM, 2021).

El animal expuesto a un balance negativo de Cu pasa por una serie de fases o etapas sucesivas que terminan en el cuadro clínico de hipocuprosis. La primera, denominada de depleción, comienza cuando la dieta no cubre los requerimientos del organismo, el cual comienza a mantener el aporte de Cu a los tejidos gastando su depósito hepático. Por esta razón, la etapa de depleción cursa sin signos clínicos y sólo es evidente en ella una disminución de la concentración hepática de Cu. La etapa de deficiencia se inicia cuando las reservas hepáticas comienzan a agotarse y ya no pueden mantener niveles normales de Cu en sangre ($> 50 \mu\text{g/dl}$), por lo cual esta etapa se caracteriza por la aparición de la hipocupremia. Cuando el aporte sanguíneo de Cu a los tejidos sigue disminuyendo se produce la etapa de disfunción, en la cual las enzimas tisulares Cu dependientes se ven afectadas en su funcionamiento, causando daños bioquímicos que conducen a la aparición de los signos clínicos de la hipocuprosis (Rosa y Mattioli, 2002). La cuarta y última etapa es la llamada fase de enfermedad. La duración de cada una de estas etapas depende de cada animal, siendo frecuente cierto grado de superposición entre las mismas. La detección de las deficiencias durante las fases de depleción y deficiencia permite su corrección antes de la aparición de signos o pérdidas productivas (Minatel y col., 2004).

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Debido a que varias enzimas Cu dependientes pueden verse afectadas en la etapa de disfunción, la signología relacionada con la hipocuprosis es variada e inespecífica, incluyendo alteraciones del pelaje, diarrea, desórdenes cardiovasculares, trastornos óseos y articulares, menor desarrollo corporal, anemia y menor resistencia a las infecciones (Suttle, 2010; NASEM, 2021).

Se registran cambios en el color y aspecto del pelaje debidos a la menor actividad de la enzima tirosinasa; la alteración más evidente es la acromotriquia, que suele ser evidente al principio alrededor de los ojos, para luego generalizarse (Rosa y Mattioli, 2002; Dirksen y col., 2005; NASEM, 2021).

La diarrea, si bien se presenta con más frecuencia en casos de deficiencia condicionada por exceso de Mo (Balbuena y Mastandrea, 2003), también se asocia a deficiencia simple de Cu (Salamanca, 2010; NASEM, 2021). La evaluación ultramicroscópica de las vellosidades intestinales de animales deficitarios de Cu con diarrea, revela que existen marcadas alteraciones a nivel mitocondrial, asociadas a una disminución en la actividad de la COX en todo el intestino delgado (Blood y Radostis, 1992; Rosa y Mattioli, 2002).

En casos de deficiencia extrema de Cu, se presentan desórdenes óseos y articulares (Balbuena y Mastandrea, 2003); se manifiestan con deformaciones articulares en el tarso, metatarso, carpo y metacarpo, claudicaciones y debilidad ósea que provoca fracturas espontáneas, especialmente de costillas. Las lesiones óseas incluyen rarefacción y adelgazamiento del hueso cortical en húmero, fémur, tibia, radio, metacarpo y metatarso (Blood y Radostis, 1992) que pueden ocasionar claudicaciones de diferente intensidad o fracturas espontaneas (Balbuena y Mastandrea, 2003).

La lesión ósea primaria en animales carentes es la osteoporosis debido a una disminución de la actividad osteoblástica asociada a una actividad osteoclástica normal. A nivel epifisiario se observa osificación demorada del cartílago, adelgazamiento cortical y deficiencia del hueso trabecular. Parece ser que la lesión bioquímica primaria que redunda en todos estos trastornos óseos es una menor actividad de la enzima lisil oxidasa (Viejo y Casaro, 1992), que cataliza la formación de puentes cruzados de desmosina entre

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

el colágeno y la elastina, necesarios para otorgar fuerza al tejido óseo y conectivo (NASEM, 2021).

La anemia es poco frecuente en bovinos (Gengelbach y col., 1994; Rosa y Mattioli, 2002), aunque se reportaron mayores concentraciones de hemoglobina en terneros suplementados con Cu (Balbuena y col, 1999). En bovinos, se describe la anemia como hipocrómica y macrocítica, a diferencia de los corderos que presentan anemia de tipo hipocrómica y microcítica (Suttle, 2010). La causa de la anemia se relaciona con la menor actividad ferroxidasa de la Cp y una alteración enzimática de la hefaestina, enzimas necesarias para la movilización del Fe desde el hígado e intestino, respectivamente (Bonham y col., 1987); esto se corresponde con un aumento en la concentración hepática de Fe (NRC, 2005; Salamanca, 2010). Johnson y Kramer (1987) sugirieron que la deficiencia de Cu altera las propiedades mecánicas de los eritrocitos y disminuye su supervivencia debido al reconocimiento, por parte del bazo, de una modificación en su citoesqueleto de membrana, disminuyendo su vida media. Otra causa puede ser la reducción de la vida media de los eritrocitos debido a la disminución en la actividad de la SOD eritrocitaria durante la hipocuprosis (Gooneratne y col., 1989; Muehlenbein y col., 2001). Este signo se hace presente en deficiencias crónicas y severas del mineral (Gengelbach y col., 1994, Minatel y col., 2007b; Suttle, 2010), con cupremias < 30 µg/dl (Rosa y Mattioli, 2002). Esto, sumado a la vida media prolongada del eritrocito bovino, que va de 150 (Fry y McGavin, 2007) a 160 días (Kincaid, 1999) hacen que la anemia sea una manifestación tardía de disfunción a nivel hematopoyético (Suttle, 2010).

La menor resistencia a infecciones se considera una consecuencia de la hipocuprosis (Suttle, 2010). Trabajos experimentales en bovinos con hipocuprosis inducida, demostraron que ésta se asocia con linfopenia, especialmente del grupo B, y monocitosis, con menor producción de anticuerpos contra eritrocitos porcinos, y disminución de la capacidad fagocítica y lítica de los neutrófilos (Cerone y col., 1998); la SOD protege a las células de los efectos tóxicos de los metabolitos oxigenados, siendo esto importante en la función fagocítica de las células (NASEM, 2021).

Una de las más importantes consecuencias productivas de la hipocuprosis es la disminución de la GDP en los animales afectados. Este signo puede pasar desapercibido

si no se pesan regularmente los terneros (Rosa y Mattioli, 2002; Fazzio y col., 2010). Esta manifestación se asoció a un menor consumo de alimento y a una menor conversión alimenticia (Humphries y col., 1987).

II.4.- Suplementación

Se utilizan diferentes formas para la suplementación con Cu en rumiantes. Los bolos intrarruminales que contienen CuO han demostrado elevar los niveles sanguíneos y hepáticos del mineral sin presentar signología de intoxicación (Arthington, 2005; NASEM, 2021), manteniendo una concentración del mineral adecuada durante por lo menos seis meses (Pechin y col., 2006).

La suplementación con sales de Cu, como el CuSO_4 , en la dieta tiene beneficios similares a las otras formas de adición del mineral, pero la variabilidad entre los diferentes compuestos, la competencia con las sustancias antagonistas y la necesidad de adición diaria del producto a la dieta hacen que sea de difícil implementación en los campos de cría (Engle y Spears, 2000), por lo que se utiliza poco (Mufarrege, 1999). Las opciones más recientes utilizadas en las dietas de rumiantes, para mejorar la disponibilidad y absorción de Cu en presencia de antagonistas, son las fuentes quelatadas de Cu (proteínatos de Cu, citratos de Cu y Cu quelatado con aminoácidos como lisina) y el Cu tribásico ($\text{Cu}_2\text{OH}_3\text{Cl}$) (Colombatto, 2007; García Díaz y col., 2015; NASEM, 2021).

El método de suplementación más utilizado en las condiciones de cría extensiva de bovinos es la aplicación subcutánea de sales solubles de Cu (Mufarrege, 1999), ya que evitan las interferencias a nivel digestivo y pueden ser administradas en el momento preciso o de mayores demandas de los animales, como el último tercio de la gestación (García y col., 2006). Este método tiene un satisfactorio almacenamiento hepático (90-100%) de la dosis administrada, además de poseer un margen de seguridad aceptable entre la dosis terapéutica y la dosis tóxica. Todos los métodos mencionados han resultado útiles para elevar las concentraciones hepáticas y séricas de Cu en bovinos (Blood y Radostis, 1992).

Debe tenerse en cuenta que varios factores, tales como niveles iniciales de Cu, contenido dietético del mineral y de sus antagonistas (Fe, S y Mo) pueden afectar la respuesta del ganado bovino a la suplementación (Engle y Spears, 2000).

II.5.- Diagnóstico

El diagnóstico de la hipocuprosis puede evaluarse contemplando dos aspectos diferentes: por un lado, a) cuando se busca identificar la deficiencia en los animales y, por otro lado, b) cuando se requieren conocer las causas que provocan esta deficiencia (Rosa y Mattioli, 2002). En cualquier caso, el complementar los parámetros animales en asociación con los análisis de alimento y agua, maximizan las posibilidades de realizar un diagnóstico con un grado de confiabilidad aceptable (Soler y col., 2000).

II.5.1.-Diagnóstico de la deficiencia en animales

El diagnóstico de deficiencia de Cu se realiza a través de la determinación de las concentraciones hepáticas y plasmáticas de Cu, siendo esta última la más utilizada (Postma y col., 2011), aunque no sea un buen indicador de deficiencia (Cseh y col., 1997; NASEM, 2021). Esta combinación de determinaciones se realiza debido a que la utilización de los niveles sanguíneos de Cu como único parámetro para evaluar el estado del individuo o rodeo puede llevar a diagnósticos erróneos, ya que la cupremia puede estar influenciada por diferentes factores como: reserva hepática, preñez, enfermedades concomitantes, vacunaciones, o cualquier situación de estrés que estimule la síntesis de Cp (Minatel y col., 2004; Postma y col., 2011). Cuando existe molibdenosis, las cupremias pueden ser engañosamente elevadas por complejos de Cu y Mo no disponibles (Hall, 2005), pero estos pueden descartarse tratando el plasma con ácido tricloroacético (Paynter, 1982). El análisis de cupremia puede ser un indicador sensible de la etapa de deficiencia en los animales que presentan signología clínica (Cseh y col., 1997; Cseh y col., 2014).

Los valores séricos de cupremia pueden subdividirse en tres rangos: por encima de 60 $\mu\text{g/dl}$ (normocupremia), entre 60 y 30 $\mu\text{g/dl}$ (hipocupremia leve) y aquellos menores de 30 $\mu\text{g/dl}$ (hipocupremia severa) (Rosa y Mattioli, 2002). Cseh y col. (2014) citaron un

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

rango de 50 a 150 $\mu\text{g/dl}$ como normocupremia que coincidió con lo mencionado por Underwood y Suttle (1999) y NASEM (2021) que consideraron que el valor límite de normocupremia debe ser de 50 $\mu\text{g/dl}$.

La normocupremia sugiere que los animales no se hallan expuestos al desbalance, salvo en molibdenosis donde, como se mencionó anteriormente, pueden coexistir normocupremias y signos de deficiencia. La hipocupremia leve, en cambio, es indicativa de que la reserva hepática de Cu ya no es capaz de mantener el nivel plasmático normal, pero posiblemente no se vean afectadas las enzimas Cu dependientes a nivel tisular, debido a que los animales no suelen mostrar signos clínicos importantes de la enfermedad ni responden a la suplementación con Cu en los ensayos dosis-respuesta. La hipocupremia severa es indicativa de un desbalance de Cu más importante, con la posibilidad de que, si se mantiene por un período de tiempo, se manifieste un compromiso enzimático, debido a que con valores inferiores a 30 $\mu\text{g/dl}$ se presentan las consecuencias de la enfermedad (Rosa y Mattioli, 2002).

La biopsia hepática es de gran valor diagnóstico por aportar el real estado de reserva de Cu en el organismo (Cseh y col., 1997; Kincaid, 1999; Soler y col., 2000; Amorim y col., 2003; Hall, 2005), siendo el primer parámetro afectado en la etapa de depleción. La concentración de Cu hepático, normalmente, es mayor a 20 ppm de Cu en la MS, pudiendo llegar hasta 200 ppm (Moreira Braga y col., 1985). Soler y col. (2000) propusieron que el rango óptimo de Cu en hígado debía estar entre 80 y 120 ppm. La concentración de Cu indicativa de toxicidad no se encuentra actualmente definida, aunque algunos reportes la indican entre 300 y 350 ppm Cu en MS de tejido hepático (NASEM, 2021). Algunos autores sugieren que el Cu hepático es un buen indicador de depósito, pero un insensible indicador de deficiencia (Rosa y Mattioli, 2002), debido a que, en algunas circunstancias, la presencia de tiomolibdatos en altas cantidades en sangre pueden disminuir la disponibilidad del Cu a los tejidos (NASEM, 2021). Sin embargo, Cseh y col. (2002) afirmaron que el mejor indicador para determinar deficiencia de Cu sería la concentración de este oligoelemento en hígado. En este sentido, algunos autores proponen que la concentración necesaria para sugerir el inicio de pérdidas productivas en terneros es variable, pero se ha fijado un valor de 20 (Minatel, 2007a) a 25 ppm (Balbuena y col.,

1989; Soler y col., 2000). Recientemente, NASEM (2021), sugirió que valores menores a 35 ppm deberían considerarse subnormales.

II.5.2.- Diagnóstico de los factores que provocan hipocuprosis

Una forma indirecta de diagnosticar deficiencia de Cu en animales es a través del análisis del forraje y del agua de bebida. El nivel de Cu en forraje debe ser superior a 5 ppm para que no se presente deficiencia primaria, y debe haber una relación Cu:Mo de 4:1 para evitar la deficiencia condicionada por Mo (Mufarree, 1999). Las concentraciones de S mayores a 0,2%, o de Fe superiores a 500 ppm, base MS, son responsables de deficiencia secundaria de Cu (Underwood y Suttle, 1999). NASEM (2021) sostiene que niveles mayores a 250 ppm de Fe en la dieta tienen una función depresiva en la absorción de Cu. Humphires y col. (1987), demostraron que la suplementación con Fe a terneros, a niveles tan bajos como 150 ppm en la dieta, produce un descenso significativo del Cu hepático y plasmático. Cseh y col. (2014) sugirieron una relación Cu:Mo mayor a 4,5 para que no se produzca una deficiencia secundaria condicionada al Mo; los mismos autores tomaron valores 0,5% de S y 1000 ppm de Fe como límites para producir interferencia en el metabolismo del Cu.

El análisis de agua también puede ser utilizado en el diagnóstico de deficiencias minerales, ya que altos niveles de SO_4^{-2} en el agua de bebida pueden ejercer su efecto sobre el Cu de manera similar al S, orgánico e inorgánico, de los forrajes. Con niveles de 0,5 g/L de SO_4^{-2} en agua, se producen interferencias con la absorción de Cu (Mufarree, 1999; Sager, 2006; NASEM, 2021). Cseh y col. (2014) citaron niveles de SO_4^{-2} en agua de 1,5 g/L como límite para el inicio de interferencias. El mismo valor fue sugerido por Pechin y col. (2006), aunque estos autores recomendaron sumar los aportes de S del agua y del alimento.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.- Diseño experimental

El trabajo se desarrolló completamente en el Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (IIACS INTA Leales), ubicado en Chañar Pozo, departamento Leales, provincia de Tucumán, a 52 km al sudeste de la ciudad de San Miguel de Tucumán (27°11' S y 65°17' O) y a una altitud de 335 msnm. La precipitación media anual es de 880 mm (1960-1999) concentrados de octubre a marzo. La temperatura media anual es de 19°C, siendo la media del mes más cálido 25°C y la del mes más frío 13°C. El clima es de tipo subtropical subhúmedo con estación seca, según clasificación Thornthwaite (Nasca y col., 2006).

La región está constituida por conos de deyección originados en los arrastres coluviales y aluviales de materiales detríticos provenientes de las zonas serranas (Zuccardi y Fadda, 1972). En correspondencia con el clima los suelos son de poco desarrollo, deficientes en materia orgánica y nitrógeno, de reacción neutra a alcalina, frecuentemente con tendencia a la salinización y susceptibles a la erosión. La baja capacidad de infiltración y el encostramiento son problemas comunes en los suelos cultivados de la región (Zuccardi y Fadda, 1972).

Se trabajó con 60 vaquillonas tipo Braford nacidas en el establecimiento. La selección de las hembras de reposición del establecimiento se realizó en el mes de agosto de 2014; la cría de las vaquillonas y su manejo pre-servicio se efectuó de forma rutinaria, desde agosto hasta noviembre, de manera extensiva. El plan sanitario del rodeo de cría, hasta el pre-servicio, incluyó 2 dosis de vacuna Bioabortigen® (5 ml SC) 60 y 30 días antes del servicio; se desparasitaron con Injection 1%® (10 ml SC) 30 días previos al servicio. No recibieron manejo diferencial; se mantuvieron sobre pastura de Grama Rhodes (*Chloris gayana*) y Pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*) durante todo el período, con un pastoreo rotativo según la oferta forrajera del potrero, manteniendo una carga animal de 2 EV/ha. Los animales no se suplementaron en ningún momento.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las hembras del lote seleccionado como reposición fueron inseminadas a tiempo fijo (IATF) en el mes de noviembre de 2014 para reducir la variabilidad en las fechas de parto. La confirmación de preñez por IATF se efectuó mediante ecografía a los 45 días de la fecha de inseminación. De este modo, todos los terneros nacieron en un lapso de 12 días, por lo tanto, las variaciones ambientales fueron mínimas y se considera que su efecto puede ser despreciado. Adicionalmente, para la IATF, se utilizó semen del mismo toro con el objetivo de reducir la variabilidad entre individuos, ya que los requerimientos específicos de Cu varían genéticamente y están afectados por los cruzamientos (Woolliams y col., 1985; Blood y Radostis, 1992; Ward y col., 1995; Mullis y col., 2003; NASEM, 2021).

En el mes de junio de 2015, con 7 meses de gestación, se seleccionaron veinte (20) vaquillonas preñadas mediante el uso de tablas de números aleatorios. Estas vaquillonas fueron asignadas al azar a 2 grupos de diez (10) individuos cada uno. Cada grupo se asignó a un tratamiento: grupo tratado (GT) y grupo no tratado (GNT). Al momento de la asignación de los animales a los grupos de tratamiento, se extrajo una muestra de cinco (5) ml de sangre mediante punción de la vena yugular a las veinte (20) vaquillonas seleccionadas para el ensayo. Inmediatamente después, se aplicó una inyección de 200 mg de glicinato de Cu subcutáneo (0,5 mg/kg aproximadamente) a todas las hembras del GT (Fazzio y col., 2006). Las maniobras descritas fueron realizadas por personal entrenado. Luego de estos procedimientos, los animales retornaron a los potreros junto a las otras hembras de reposición del establecimiento, y se mantuvieron juntas durante el resto de la gestación, parto y lactancia, hasta el destete de los terneros. Los partos de las vaquillonas que ingresaron al trabajo se extendieron entre el 10 y el 22 de agosto de 2015.

Los terneros no recibieron tratamiento sanitario diferencial al utilizado rutinariamente en el establecimiento, que consistía en utilizar fármacos sólo en casos específicos como diarreas o miasis. Ninguno de los terneros del ensayo presentó signos de enfermedad sistémica. Las vacunaciones y desparasitaciones del lote se realizaron al momento del destete, por lo que no tuvieron importancia en este trabajo.

En el mes de agosto de 2015, se tomaron muestras de forraje de cinco sitios diferentes y representativos del potrero (Mattioli y col., 2008) y agua de bebida para ser procesadas

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

y analizadas, detallando las concentraciones de Cu y sus antagonistas, Mo, S y Fe (Pechin y col., 2006). Esta tarea se repitió en el mes de febrero de 2016, antes de finalizar el trabajo, para evaluar la oferta de Cu y otros minerales en la dieta de los animales. A lo largo del ensayo, las vacas tuvieron una asignación forrajera en función de las necesidades para el mantenimiento de su condición corporal (CC).

Los valores de cupremia obtenidos de las vaquillonas en el muestreo previo a la suplementación arrojaron valores de $13 \pm 2,58 \mu\text{g/dl}$, los que sugirieron hipocupremia severa. Los análisis del forraje se realizaron en los meses de agosto y febrero, arrojando valores diferentes según la época del año. El primer muestreo tuvo valores de 8,1 ppm de Cu, 4,5 ppm de Mo, 25 ppm de Zn, 225 ppm de Fe y 1,13% de S. El muestreo del mes de febrero arrojó valores de 13,1 ppm de Cu, 4,3 ppm de Mo, 30 ppm de Zn, 151 ppm de Fe y 1,22 % de S.

Los análisis del agua de bebida realizados en el bebedero del potrero arrojaron valores diferentes de acuerdo a la época del año. Las determinaciones se realizaron con kits comerciales Cole (Borges y col., 2005). Los resultados obtenidos se detallan en la siguiente tabla.

Mes muestreo	ST (mg/l)	SO₄⁻² (mg/l)	Cu (ppm)	Fe (ppm)	Zn (ppm)
Agosto	736	176	0,002	0,03	0,02
Febrero	696	169	<0,002	<0,03	0,02

Tabla 1. Resultados del análisis de agua.

III.2.- Técnicas, procesamiento y momentos de muestreo

Todas las maniobras para la obtención de muestras y datos, como así también el número de animales utilizado se ajustó a las recomendaciones de bienestar animal al reducir al mínimo el número de animales y refinar las técnicas de obtención de muestras y manejo médico posterior de los individuos. El protocolo de estudio, identificado con el número 188/14, fue aprobado por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Facultad

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

de Ciencias Veterinarias de Esperanza. Se siguieron los lineamientos establecidos por la Ley Nacional contra malos tratos y actos de crueldad a los animales (Ley 14346) y la Directiva de la Unión Europea 2010/63 sobre protección de animales de experimentación.

Los terneros de todas las vaquillonas (n= 20) se pesaron antes de que el primer animal nacido cumpliera los 30 días, siendo de 22 días el promedio de edad al momento de la medición del peso; esta maniobra se repitió a los 3 y 6 meses de edad. Coincidiendo con cada movimiento, 10 animales (5 de cada grupo), seleccionados al azar, fueron sometidos a extracciones de sangre de la vena yugular y biopsias hepáticas para determinar el estatus del mineral en suero e hígado.

III.2.1.- Material de vidrio para envío de muestras

El material de vidrio que se utilizó para el envío de las muestras de sangre e hígado fue descontaminado lavándolo con agua y detergente; luego se enjuagó con agua desmineralizada y se dejó en inmersión durante 24 horas en ácido nítrico al 10% (500 ml de ácido nítrico + 4500 ml de agua desmineralizada); finalmente se enjuagó 4 ó 5 veces con agua desmineralizada (Jorhem y Engman, 2000; Pistón y Knochen, 2011).

III.2.2.- Muestreo de sangre

El muestreo de sangre se efectuó mediante punción de la vena yugular; se utilizaron agujas 40/12 acopladas a jeringas de 10 ml (Pechin y col., 2006). De los 10 ml de sangre colectados, 7 ml se colocaron en tubos de Kahn de 10 ml, descontaminados, para determinación de Cu. Posteriormente, estas muestras, se centrifugaron a 2000 rpm durante quince (15) minutos para lograr separar el suero de las partículas celulares. La alícuota de suero obtenido se colocó en tubos de Eppendorf, manteniéndolos congelados a -20°C hasta su procesamiento, para determinar la concentración de Cu sérico (Enjalbert y col., 2002). Los 3 ml de sangre restantes fueron colocados en tubos con EDTA para evaluar parámetros hemáticos y refrigeradas hasta su valoración.

III.2.3.- Biopsia hepática

Para la colecta de las biopsias hepáticas utilizadas, se adaptó la maniobra descrita por Nespoli y col. (2010). La modificación de la técnica de biopsia, gracias al uso de la guía ecográfica, difirió con lo establecido por otros autores que ubicaron el área de punción en el 12° espacio intercostal derecho (EICD) (Olson y col., 1999; Muehlenbein y col., 2001) aunque no precisaron el sitio exacto de abordaje. Néspoli y col. (2010) y Adrien-Delgado (2014) ubicaron el sitio de punción en el 11° EICD a la altura de la tuberosidad coxal; Duarte y col. (2009), describieron una técnica por videolaparoscopia en caprinos y utilizaron el 11° EICD pero ubicaron el sitio de punción a 12 cm de la columna, lo que podría deferir según el tamaño del animal.

Durante el presente trabajo, el sitio de punción determinado por ultrasonografía como el más indicado, por proximidad a la pared costal y por su menor cercanía con el riñón derecho fue en el 11° EICD en un punto medio entre dos líneas paralelas a la columna vertebral; la línea dorsal partió de la tuberosidad coxal y la ventral, de la tuberosidad isquiática.

Los animales sometidos a biopsia se sedaron con 0,1 mg/kg de xilazina vía endovenosa; la maniobra para disminuir el dolor se complementó con una infiltración local de 10 ml de clorhidrato de lidocaína al 2% en el sitio de ingreso de la aguja de biopsia. Se les realizó tricotomía y antisepsia del área de punción, utilizando alcohol etílico al 96% e iodopovidona al 10%. En el sitio de punción se realizó una incisión, en la piel, de 1 cm con bisturí, para disminuir la resistencia de la misma a la aguja de biopsia (Muehlenbein y col., 2001; Cruz y col, 2005).

Se utilizó una aguja de biopsia Tru-cut, tipo Speed cut, automática (Gallini®), con marcas de puntas ecogénica y centimétrica, calibre 14G, de 16 cm de largo. Para la guía ecográfica se utilizó un ecógrafo Edan Dus 60 vet con transductor c344 ua convex multifrecuencia, utilizándolo en 4 mhz. El uso de la aguja Speed cut, minimizó los errores que ocurrían con la técnica de aspiración descrita por otros autores (Moreira Braga y col., 1985). Esto, además, disminuyó el sangrado y los daños al órgano reportados por Buckley y col. (1986). La punta biselada de la aguja, produjo una fácil y rápida

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

penetración, sin lesionar el tejido; las marcas de puntas ecogénicas permitieron tener una buena visibilidad bajo ultrasonido, lo que favoreció la colocación precisa de la aguja. Para lograr el tamaño de muestra de 200 mg (Jorhem y Engman, 2000), se realizaron hasta seis (6) disparos sin riesgos, según lo citado por Olson y col. (1999) y Muehlenbein y col. (2001) y corroborado en este ensayo.

Finalizada la biopsia se les aplicó 1 mg/kg de meglumine de flunixin vía endovenosa como analgésico y 20 mg/kg de oxitetraciclina LA intramuscular. El tratamiento con las drogas antes mencionadas se repitió en los 20 terneros integrantes del ensayo.

Las muestras obtenidas fueron colocadas en tubos de Kahn, descontaminados, y se refrigeraron hasta ser procesadas en el laboratorio, dentro de las 24 horas post-extracción.

III.3.- Técnicas analíticas

III.3.1.- Determinación de Cu

Las determinaciones de Cu en suero, hígado y forraje se realizaron por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) utilizando un Espectrofotómetro marca Perkin-Elmer, Modelo Analyst 100 con FIAS-100 incorporado. Antes del análisis por EAA, las muestras de suero se desproteinizaron, utilizando partes iguales, con ácido tricloroacético al 10% (p/v) (Seiler y col., 1994; Perkin Elmer, 2000; Enjalbert y col., 2002; Borges y col., 2005). Las muestras de hígado y forraje fueron secadas en estufa a 90°C hasta su peso constante; luego, fueron digeridas con ácidos nítrico y perclórico (a/a) al 10% (Valenzuela y col., 2008). Las determinaciones de Fe y Cu en los forrajes y de Cu en hígado se realizaron por EAA, las de Mo por EAA con horno de grafito (Seiler y col., 1994; Minatel y col., 2007a; Valenzuela y col., 2008; Véliz y col., 2012) y las de S por titulación con arsenazo III (Hamm y col., 1973). Todas las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de análisis químico de trazas (LABTRA) perteneciente a la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán.

III.3.2.- Hto y recuento de leucocitos.

Las muestras de sangre con anticoagulante (EDTA) fueron procesadas dentro de las 24 horas de la extracción. El recuento total de leucocitos, o glóbulos blancos (GB), se realizó en cámara de Neubauer (Karft y Dürr, 2000). La determinación del Hto o VCA se realizó mediante centrifugación de la sangre en un tubo de microhematocrito (Meyer y Harvey, 2000).

III.3.3.- Evaluación productiva

Para la evaluación productiva se tomó el PV y la GDP. La medición se realizó previo a la toma de muestra de sangre y biopsia hepática, en forma individual en la balanza electrónica del establecimiento, marca Tru-Test, modelo XR5000.

III.4.- Análisis estadístico.

El efecto de la suplementación con Cu sobre la GDP en los diferentes momentos de muestreo, así como la evolución de la GDP en los meses de muestreo dentro de cada grupo experimental (tratado y controles) se evaluó mediante una prueba Mann-Whitney, previo a la evaluación de la normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) (Daniel, 1991).

La evaluación del efecto de la suplementación con Cu sobre la cupremia, nivel de Cu hepático, Hto, recuento de leucocitos y PV a lo largo del período de estudio fue realizada mediante modelos lineales generalizados, empleando distribuciones normal o gamma en función del resultado de las pruebas para comprobar normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) (Daniel, 1991).

En todas las variables se empleó un nivel de significancia $P < 0,05$ para detectar diferencias significativas. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software InfoStat de la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina) (Di Rienzo y col., 2017).

IV.- RESULTADOS

IV.1.- Variaciones en los niveles séricos de Cu en los terneros.

Los valores de cupremia obtenidos en los diferentes muestreos en los GT y GNT se detallan en el gráfico número 1. Independientemente del grupo, los valores de cupremia evidenciaron un descenso a lo largo de todo el período evaluado.

Al analizar la variable a lo largo del tiempo para el GT, los valores de cupremia disminuyeron entre los muestreos. Los resultados muestran tendencia estadística, aunque las diferencias no hayan sido estadísticamente diferentes ($P= 0,06$), cuando se comparan los valores del primer y segundo muestreo. Cuando comparamos el segundo con el tercer muestreo, hubo diferencias significativas ($P< 0,01$). Resultados similares ($P< 0,01$), se obtuvieron al comparar el primer y tercer muestreo.

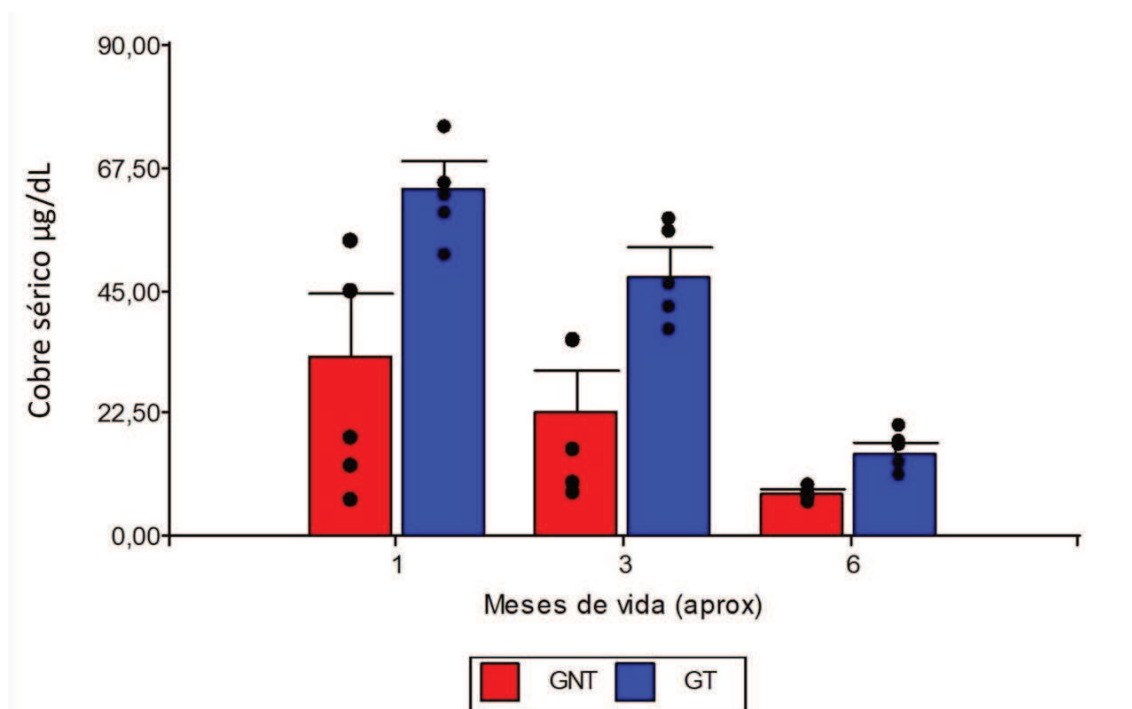


Gráfico 1. Valores promedio de Cu sérico a lo largo del ensayo ($\mu\text{g/dl}$).

Al igual que en el GT, los valores de cupremia para los animales del GNT disminuyeron entre los muestreos, aunque no se observaron diferencias entre los dos

IV.- RESULTADOS

primeros muestreos ($P= 0,35$). Cuando se comparó el segundo con el tercer muestreo y el primero con el tercero, se obtuvieron diferencias ($P= 0,02$ y $P < 0,01$, respectivamente).

La cupremia observada en el primer muestreo mostró que todos los terneros del GT nacieron con concentraciones de Cu sérico próximas a las adecuadas y, en promedio, los valores obtenidos fueron normales ($63,36 \pm 12,09 \mu\text{g/dl}$). Contrariamente, los animales del GNT nacieron, en promedio, con niveles séricos de hipocupremia leve a moderada ($32,76 \pm 25,85 \mu\text{g/dl}$). Al comparar ambos grupos no se observaron diferencias significativas ($P= 0,09$). En el segundo muestreo, el GT mostró, en promedio, hipocupremia leve ($47,46 \pm 12,26 \mu\text{g/dl}$), sin embargo, algunos animales mantuvieron niveles normales (niveles superiores a $50 \mu\text{g/dl}$). El GNT, por su parte, mostró una marcada declinación en los valores de cupremia, con valores promedio por debajo de $30 \mu\text{g/dl}$ ($22,48 \pm 17,54 \mu\text{g/dl}$). Al comparar entre los grupos, no se observaron diferencias estadísticas ($P= 0,09$). En el tercer muestreo, ambos grupos mostraron valores inferiores a $30 \mu\text{g/dl}$ por lo que todos los animales del ensayo se encontraron en hipocupremia severa en ese momento, con valores de $15 \pm 4,92$ y $7,8 \pm 1,59 \mu\text{g/dl}$ para el GT y GNT, respectivamente. Cuando se compararon los valores, se observaron diferencias entre los grupos ($P= 0,01$).

IV.2.- Variaciones en los niveles hepáticos de Cu en los terneros.

Los valores de Cu hepático se muestran en el gráfico número 2. Al analizar la variable en el tiempo, se observó una disminución de las concentraciones del mineral en ambos grupos. Cuando se comparó dentro de cada grupo, el análisis de las concentraciones del mineral en hígado de los terneros del GT no se observaron diferencias ($P= 0,12$) entre los dos primeros muestreos, aunque al comparar el segundo y el tercer muestreo las diferencias fueron significativas ($P < 0,01$). De igual forma, se encontraron diferencias al comparar el primer muestreo con el tercero ($P < 0,01$). Por su parte, en el GNT se obtuvieron diferencias al comparar los valores del primer muestreo con los obtenidos en el segundo y tercero ($P < 0,01$) y, al evaluar entre sí los valores del segundo y tercer muestreo ($P < 0,01$).

IV.- RESULTADOS

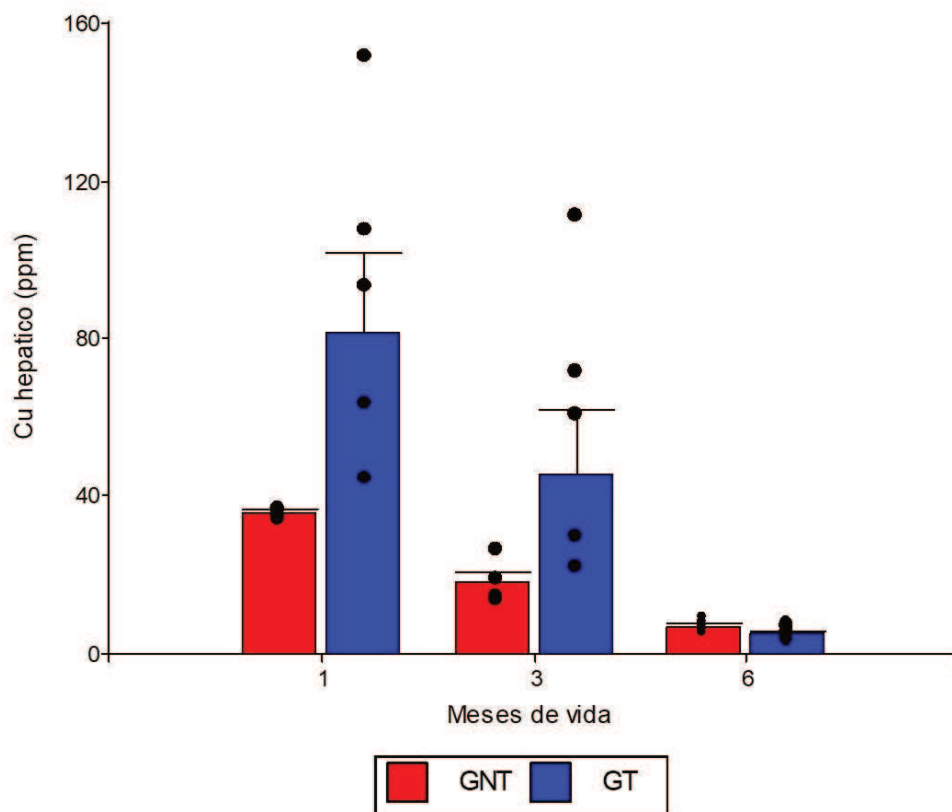


Gráfico 2. Valores promedio de Cu hepático a lo largo del ensayo (ppm).

Al comparar los niveles de Cu hepático entre los grupos, no se observaron diferencias en ninguno de los 3 muestreos ($P= 0,15$; $P= 0,31$ y $P= 0,22$, respectivamente). A pesar de esto, el GT mostró valores promedio por encima del mínimo sugerido para la especie en los dos primeros muestreos ($81,86 \pm 44,82$ ppm y $45,29 \pm 36,51$ ppm). Por su parte, el GNT evidenció solo valores adecuados en el primer muestreo ($35,86 \pm 1,23$ ppm), descendiendo en el segundo muestreo a valores inferiores a los recomendados ($18,1 \pm 5,69$ ppm). El tercer muestreo volvió a evidenciar un comportamiento similar con respecto al descenso de los valores en el tiempo, arrojando concentraciones de $5,16 \pm 0,86$ ppm para el GT y $6,6 \pm 2,35$ ppm para el GNT.

IV.3. Variaciones hematológicas en los terneros.

IV.3.1.- Hto

Los valores obtenidos para el VCA o Hto fueron variables; el comportamiento de este parámetro a lo largo del tiempo y entre los grupos se muestra en gráfico 3.

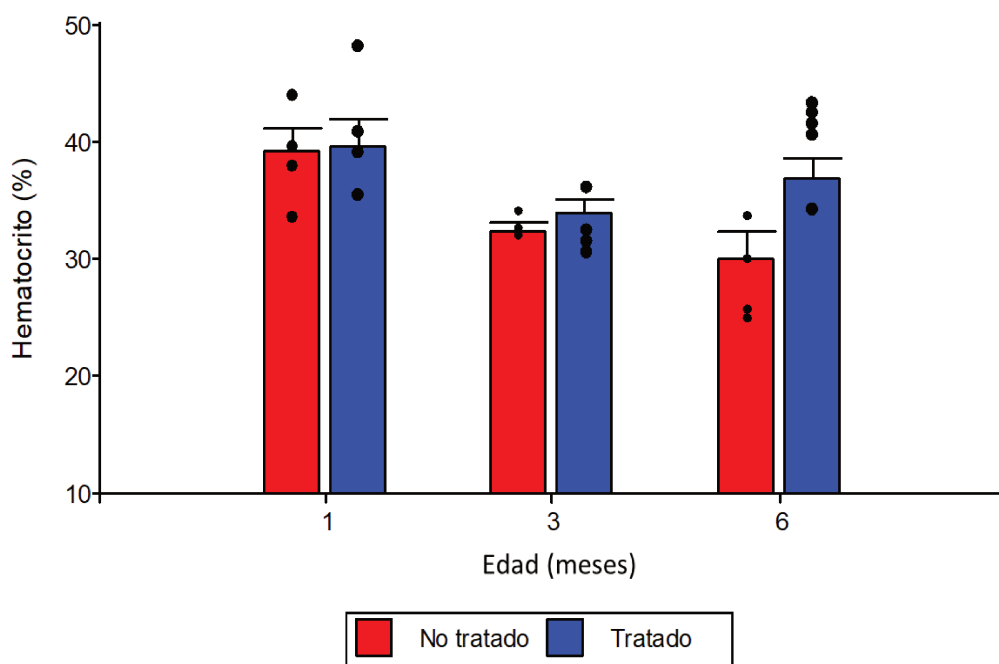


Gráfico 3. Valores promedio de Hto (%) a lo largo del ensayo.

Como se observa en el gráfico 3, el comportamiento de los niveles de Hto fue diferente entre grupos. El GT mostró diferencias entre el primer y segundo muestreo ($P= 0,01$), disminuyendo el Hto promedio de los terneros en ese período de tiempo. No se encontraron diferencias cuando se comparó el tercer muestreo con el primero ni con el segundo ($P= 0,21$). El GNT mostró un descenso sostenido de los valores de Hto a lo largo del ensayo, encontrándose diferencias al comparar el primer muestreo con el segundo ($P < 0,01$) y con el tercero ($P < 0,01$). Cuando se comparó el segundo con el tercer muestreo no se obtuvieron diferencias ($P= 0,29$).

Los valores promedio, $40 \pm 5\%$ para el GT y $39 \pm 4\%$ para el GNT no mostraron diferencias en el primer muestreo cuando se comparó entre grupos ($P= 1,00$). Los dos

IV.- RESULTADOS

grupos disminuyeron los valores de Hto en el segundo muestreo, con valores de $34 \pm 2\%$ para el GT y $32 \pm 1\%$ para los del GNT. Estos resultados tampoco fueron diferentes cuando se los comparó ($P= 0,31$). Cuando se procesaron los resultados del tercer muestreo, se observaron valores superiores en el GT ($37 \pm 4\%$) en relación al GNT ($30 \pm 5\%$), que siguió el descenso lineal de su Hto. Estos resultados, al ser comparados entre sí, mostraron diferencias ($P= 0,05$).

IV.3.2.- Recuento leucocitario

Los valores obtenidos a lo largo del ensayo se mantuvieron, en promedio, dentro de los rangos normales de la especie y no mostraron diferencias entre el GT y GNT; ninguno de los 3 muestreos realizados evidenciaron valores estadísticamente diferentes entre los grupos ($P > 0,05$). Cuando se evaluaron los resultados intra grupo, en el GT se observaron diferencias entre el primer muestreo y el tercero ($P= 0,04$) como así también entre el segundo y el tercer muestreo ($P < 0,01$); la comparación entre el primer y segundo muestro no arrojó diferencias ($P= 0,27$). En el GNT no se encontraron diferencias entre los valores obtenidos en los 3 muestreos del presente estudio ($P > 0,05$). Los resultados se expresan en la tabla 2.

	N	1 mes	3 meses	6 meses
GT	5	$7700 \pm 920,14^a$	6260 ± 1316^a	11240 ± 5799^b
GNT	5	10700 ± 2743^a	11740 ± 7346^a	13260 ± 4746^a

Tabla 2. Valores de leucocitos a lo largo del ensayo expresados en miles/mm³. Superíndices no comunes en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

IV.4.- Variaciones en el PV y la GDP en los terneros

Al comparar entre los grupos, no hubo diferencias en el PV de los terneros, en ninguno de los 3 pesajes realizados ($P= 0,16$; $P= 0,24$; $P= 0,73$, respectivamente). Si bien los terneros pertenecientes al GT nacieron más livianos que los del GNT y terminaron el

IV.- RESULTADOS

ensayo siendo más pesados, no se observaron diferencias. La dinámica de evolución del peso se describe en la tabla 3.

	N	1 mes	3 meses	6 meses
GT	10	47,6 ± 6,75 ^a	90,5 ± 8,08 ^a	161,0 ± 12,76 ^a
GNT	10	51,6 ± 9,34 ^a	92,8 ± 12,14 ^a	156,5 ± 22,89 ^a

Tabla 3. Control de pesos a lo largo del ensayo expresados en kg. Superíndices no comunes en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

La GDP se evaluó entre grupos (GT vs GNT) y dentro de cada grupo, tomando como intervalo 1 (IT1) el comprendido entre el primer y tercer mes de vida, y el intervalo 2 (IT2), comprendido entre el tercer y sexto.

Cuando se comparó entre los grupos, los valores obtenidos en el IT1 fueron similares, arrojando promedios de $0,66 \pm 0,07$ y $0,63 \pm 0,09$ kg/día para el GT y GNT, respectivamente ($P = 0,53$). En el IT2, el GT obtuvo GDP de $0,80 \pm 0,07$ kg/día mientras el GNT arrojó valores de $0,72 \pm 0,17$ kg/día ($P = 0,52$).

Al hacer la comparación entre los intervalos, dentro de cada grupo, se observó que tanto en el GT como en el GNT los resultados arrojaron valores de GDP promedio superiores en el IT2. Sin embargo, en el GNT, estos valores no mostraron diferencias ($P = 0,12$), mientras que, en el GT, fueron diferentes ($P < 0,01$).

V.- DISCUSIÓN

V.1.- Agua y forraje

Los resultados obtenidos en los análisis de minerales en el forraje y agua confirmaron que el ambiente productivo donde se desarrolló el ensayo predisponían a hipocupremia en bovinos. Si bien, para que no se produzca deficiencia primaria, los valores de Cu en el forraje deben estar entre 3-8 ppm (NASEM, 2021), en hembras preñadas, en el último tercio de gestación, el requerimiento del mineral se eleva hasta 25 ppm (Gooneratne y col., 1989). Los valores obtenidos en el primer muestreo del forraje arrojaron valores de Cu inferiores a este último. En el segundo muestreo, luego del parto de las vaquillonas, los valores de Cu obtenidos en el alimento se encontraron dentro del rango sugerido para la especie (NASEM, 2021). Asimismo, a pesar de que los valores de Mo y Fe, en ambos muestreos, estuvieron en rangos normales (Dirksen y col., 2005; NASEM, 2021), la relación Cu:Mo de 1,8 en el primero y 3,04 en el segundo, fue menor a lo sugerido por Cseh y col. (2014). Adicionalmente, los valores de S obtenidos del análisis del forraje, sumados a los del agua, fueron superiores a los recomendados (Underwood y Suttle, 1999; Pechin y col., 2006; Cseh y col. 2014, NASEM, 2021), con valores similares en los 2 muestreos.

Estos valores ponen de manifiesto una deficiencia anual secundaria del mineral, por valores elevados S y una baja relación Cu:Mo, coincidiendo con lo reportado en la región por otros autores en diferentes épocas del año (Boggiato y Ruksan, 1988; Cseh y col., 2012). Debe considerarse que las exigencias de este mineral varían dependiendo de estadios fisiológicos específicos y del nivel productivo de los animales (García Díaz y col., 2015; NASEM, 2021); es por ello que, para hembras bovinas preñadas, en el último tercio de la gestación, la concentración de Cu en la dieta debería incrementarse de 10 a 25 ppm. Debido a estos requerimientos, podría considerarse que las vaquillonas utilizadas en el presente trabajo se encontraban, además, bajo condiciones de deficiencia primaria en ese momento de su preñez.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de la pastura fueron coincidentes con los niveles de cupremia marginales que se obtuvieron en las vaquillonas previos a la

V.- DISCUSIÓN

suplementación con Cu, como así también en el descenso continuo de los niveles de cupremia y Cu hepático que se evidenció en los terneros. Esto sugirió que la combinación del estudio de Cu en los animales y de este mineral, y sus competidores, en la comida y agua de bebida permitirían realizar un diagnóstico de situación confiable, coincidiendo con otros autores (Soler y col., 2000).

V.2.- Cupremia y valores de Cu hepático

La evaluación de los niveles de Cu sérico, entre los grupos, a lo largo del tiempo mostró comportamientos diferentes. Al analizar los valores obtenidos en el primer muestreo, no hubo diferencias estadísticamente demostrables, probablemente por el número de animales empleados en este ensayo, aunque el resultado obtenido al comparar ambos grupos ($P= 0,09$), mostró una tendencia estadística. Si la cupremia se evalúa de acuerdo a los valores deseables en bovinos, los grupos se comportaron de manera distinta, ya que los terneros del GT en promedio mostraron normocupremia, mientras que los del GNT nacieron con valores de hipocupremia leve. Estos resultados pueden compararse con los obtenidos por García y col. (2007), quienes reportaron diferencias en los terneros nacidos de vacas suplementadas versus aquellos nacidos de vacas no suplementadas, aunque ambos grupos mostraban normocupremia durante ese estudio. Contrariamente, Muehlenbein y col. (2001) no obtuvieron diferencias entre los terneros de los diferentes grupos, trabajando con animales de 30 días de vida. Del mismo modo Gengelbach y col. (1994), trabajando con terneros de 7 días de edad, afirmaron que la cupremia no variaba durante las etapas iniciales. En el presente estudio, los valores obtenidos en el primer muestreo evidenciaron que las madres del GNT no transfirieron el Cu suficiente a sus crías para que éstas mantuvieran niveles de normocupremia al nacimiento, al reducirse significativamente el depósito hepático fetal, coincidiendo con lo mencionado por Fazzio y col. (2006).

Posteriormente, se produjo un descenso marcado de las concentraciones de Cu en suero en el GNT, llegando a niveles considerados de hipocupremia severa (Rosa y Mattioli, 2002). En el GT, por su parte, los valores también descendieron, en este caso por debajo de 50 $\mu\text{g}/\text{dl}$, valor límite de cupremia (Cseh y col., 2014). Esto fue importante ya que, a partir de los 3 meses de edad, los animales del GT se encontraron en una etapa

V.- DISCUSIÓN

de deficiencia al presentar valores de hipocupremia leve (Rosa y Mattioli, 2002; Cseh y col. 2014). Del mismo modo que ocurrió con la comparación de las cupremias entre grupos en el primer muestreo, y a pesar de que los valores promedio del GT fueron de más del doble que el promedio del GNT, el análisis de la variable en este momento solo mostró una tendencia estadística ($P= 0,09$), lo que no permitió evidenciar una diferencia quizás debido al número de animales utilizado. A pesar de esto, que el GT haya mantenido concentraciones promedio cercanas a los valores de normocupremia y el GNT presentara valores de hipocupremia severa, sugeriría que existió un efecto positivo del tratamiento en las madres sobre los valores de Cu que se obtuvieron a los tres (3) meses de vida en sus terneros.

El tercer muestreo se realizó a los seis (6) meses de vida del ternero, momento próximo al rutinario destete en el establecimiento. Los resultados obtenidos mostraron que en el GNT los niveles de Cu descendieron de forma continua y progresiva hasta llegar a valores promedio de 7,8 $\mu\text{g}/\text{dl}$, lo que representó, hipocupremia severa (Rosa y Mattioli, 2002). En el GT también se observó este descenso, llegando la cupremia promedio a 15,2 $\mu\text{g}/\text{dl}$. Estos resultados demostraron que, independientemente de que las madres hayan sido suplementadas de forma inyectable durante la última etapa de gestación, al momento del destete, todos los terneros se encontraron en hipocupremia severa, por lo que la suplementación de las madres fue útil pero no alcanzó para mantener niveles adecuados de Cu hasta el destete, coincidiendo con lo afirmado por Mattioli y col. (2008). Aunque estadísticamente se evidenció diferencia entre las cupremias de ambos grupos, ésta diferencia tendría poca importancia ya que los valores fueron mínimos en las dos situaciones. Resultados similares han sido descritos por Viejo y Casaro (1993), en el partido de El Tordillo, provincia de Buenos Aires.

Los resultados de Cu hepático obtenidos en el primer muestreo coincidieron con los reportados por Muehlenbein y col. (2001), quienes no encontraron diferencias en la concentración hepática de Cu en terneros cuyas madres fueron suplementadas durante la gestación, pero estos autores trabajaron con vacas normocuprémicas en los grupos suplementados y no suplementados.

V.- DISCUSIÓN

En este estudio, si bien los valores de Cu hepático como sérico fueron superiores en los terneros nacidos de vacas suplementadas en el último tercio de gestación, estos niveles no alcanzaron los descriptos por otros autores (Gooneratne y Cristensen, 1989; Viejo y Casaro, 1993). Se puede inferir que la suplementación en las madres fue insuficiente. Esto era esperable ya que las vaquillonas presentaron hipocupremias severas ($13 \pm 2,58 \mu\text{g/dl}$) antes de ser suplementadas y seguramente la aplicación de una única dosis de Cu inyectable no logró revertir dicha condición en forma significativa. Es así que la suplementación en vaquillonas gestantes y en condiciones de hipocupremia severa, debería ajustarse adecuadamente si se pretende asegurar una reserva de Cu aceptable, en la descendencia, al momento del nacimiento, ya que la concentración hepática de Cu en el ternero depende de los niveles del mineral en la madre (Ward y col., 1995; Kincaid, 1999) y niveles de cupremias bajos en la madre no permiten al feto almacenar reservas adecuadas para el período postnatal (Gengelbach y col., 1994).

Según los resultados obtenidos en este estudio, a los 3 meses de edad, los niveles de Cu hepático de los terneros pertenecientes al GNT estuvieron por debajo del umbral de 35 ppm (NASEM, 2021), sugerido para la especie, hecho que se vio reflejado en la imposibilidad de mantener niveles de Cu en sangre adecuados, coincidiendo con lo publicado por Spears (2003). En GT los niveles fueron mayores, pero no hubo diferencias. A pesar de esto, el GT mantuvo concentraciones hepáticas que le permitieron amortiguar los niveles plasmáticos de Cu, manteniendo las mismas por encima del umbral de disfunción enzimática.

Ambos grupos redujeron sus reservas hepáticas de Cu en los muestreos sucesivos. Estos resultados coincidieron con lo descrito por otros autores (Gooneratne y col., 1989; Muehlenbein y col., 2001; Minatel y col., 2007a) que mencionaron que este descenso se debe a la movilización de las reservas hepáticas de Cu para hacer frente a las necesidades de mantenimiento y crecimiento, frente a una dieta deficiente del mineral. Es así, que la leche y el calostro no fueron una buena fuente del mineral (Gooneratne y col., 1989; Ward y col., 1995; Soler y col., 2000), independientemente de la suplementación de las vaquillonas (Muehlenbein y col., 2001) y, que la misma no logró cubrir los requerimientos de los terneros, lo que coincidió con Mullis y col. (2003).

V.- DISCUSIÓN

El último muestreo arrojó, en ambos grupos, valores de Cu hepáticos inferiores a los sugeridos para los bovinos, llegando incluso a valores <10 ppm, límite considerado como de inminente deficiencia clínica (NASEM, 2021). Esto demostró que los terneros se encontraron en un balance mineral negativo desde el nacimiento, siendo lactantes, hasta el último muestreo, comportándose ya como rumiantes. Este hecho evidenció la deficiencia del mineral en el establecimiento y la importancia de la reserva hepática de Cu al momento del parto en las zonas de deficiencia del mineral ya que, independientemente del tratamiento, los terneros no acumularon las reservas necesarias de Cu para prevenir un estado de deficiencia hasta el destete (Viejo y Casaro, 1992). Comportamientos similares de este metabolismo hepático fueron descritos por varios autores en diferentes estudios experimentales (Muehlenbein y col., 2001; Minatel y col., 2007a).

Cseh y col. (2002) indicaron no haber encontrado correlación entre las concentraciones de Cu sérico y hepático. Sin embargo, estos mismos autores proponen que la medición de Cu hepático es un mejor parámetro para evaluar el estatus mineral. Otros autores sugirieron que la relación entre la concentración de Cu hepático y cupremia no es significativa en animales adultos en mantenimiento, pero sí en terneros en crecimiento (Pinto Santini y col., 2007). Los resultados obtenidos en el presente ensayo permitieron afirmar que las concentraciones de Cu hepático y su dinámica metabólica fueron útiles para apreciar más sensiblemente el balance negativo del mineral al descender sus valores en forma progresiva. Los valores de cupremia, al estar condicionados a la reserva hepática, pueden mantenerse, aunque el animal se encuentre en etapa de depleción. Al observar la relación existente entre los valores de Cu hepático y sérico, se apreció que los niveles más altos de Cu hepático aseguraron mejores niveles de Cu sérico lo que coincidió con lo expuesto por Rosa y Mattioli (2002). Durante el primer muestreo los valores de Cu sérico del GNT mostraron una tendencia estadística al ser comparados con los del GT. Sin embargo, las reservas hepáticas no demostraron diferencias, aunque la concentración promedio del mineral del GT haya duplicado al promedio del GNT. Como se mencionó anteriormente, quizás el resultado haya sido afectado por el número de terneros utilizado.

V.- DISCUSIÓN

En el segundo muestreo, las concentraciones hepáticas y séricas de Cu descendieron en el GNT por debajo de los niveles normales para la especie. Estos hallazgos concuerdan con lo mencionado por Spears (2003) y Minatel (2007a), que indicaron que cupremias bajas se correlacionan con valores reducidos de Cu hepático, cercanos o menores a 20 ppm. De modo similar, otros autores (Balbuena y col., 1989; Mufarrege, 1999; Soler y col., 2000; Minatel y col., 2007a) sugirieron que 25 ppm de Cu en hígado es el mínimo nivel de reservas capaz de mantener cupremias por encima de 30 µg/dl. Recientemente, NASEM (2021) elevó ese valor a 35 ppm. En el GT, por el contrario, los valores séricos indicaron hipocupremia leve y los niveles de Cu hepático, aunque descendieron, se mantuvieron por encima del valor crítico de 35 ppm.

En este estudio, la concentración de Cu hepático en el GT se encontró por encima del límite antes mencionado en los dos primeros muestreos, lo que seguramente permitió mantener niveles de cupremia más elevados en este grupo, durante ese período. Este hecho hizo posible determinar que la suplementación de Cu en las madres, fue capaz de elevar los niveles de reserva hepática de las crías, tal como lo mencionaron otros autores en otras regiones (Viejo y Casaro, 1992; Olson y col., 1999). Sin embargo, esta suplementación no fue suficiente para mantener estos niveles de reserva hasta los 6 meses de edad. Este hecho pudo ser comprobado debido a que en el tercer muestreo los niveles de Cu hepáticos descendieron por debajo de los 35 ppm con el consiguiente descenso de los niveles plasmáticos de Cu. Este efecto también fue mencionado por otros autores, pero en otras regiones de Argentina (Rosa y Mattioli, 2002).

Al final del ensayo los terneros de ambos grupos presentaron niveles de Cu muy bajos a nivel sérico y hepático. Estos datos indicaron que el establecimiento presentaba condiciones predisponentes para esta deficiencia. Esto último se puso más de manifiesto por los valores de cupremia observados en los terneros nacidos de madres no suplementadas (menor a 30 µg/dl, a los 3 meses de edad), lo que sugirió un alto riesgo de deficiencia de Cu en el establecimiento, según lo informado por Mattioli (2013). Por otro lado, antes de los seis meses de edad, los terneros nacidos de madres suplementadas, no alcanzaron a mantener el valor mínimo sugerido. En tales condiciones, sería necesario

V.- DISCUSIÓN

efectuar una suplementación adicional al ternero antes de esa fecha para evitar que esto ocurra tal como lo sugieren otros autores (Fazzio y col., 2006; Mattioli y col., 2008).

Todos estos eventos concordaron con lo descrito en la bibliografía donde se indica que la reserva hepática de Cu es el primer parámetro afectado en condiciones de deficiencia (etapa de depleción) (Underwood y Suttle, 1993; Cseh y col., 1997; Kincaid, 1999; Soler y col., 2000; Rosa y Mattioli, 2002; Amorim y col., 2003; Hall, 2005). En este trabajo, la determinación temprana de Cu hepático y sérico coincidió con las afirmaciones de otros autores (Minatel y col., 2004), adaptándolas al ambiente y manejo en el que se desarrolla la producción ganadera de la provincia de Tucumán.

V.3.- Hto y leucocitos

La anemia es un signo tardío del déficit prolongado de Cu (Underwood y Suttle 1999; Minatel y col., 2007b; Suttle, 2010) consecuencia de alteraciones enzimáticas que producen una disminución de la eritropoyesis (Salamanca, 2010; NASEM, 2021), particularmente la Cp y la hefaestina, necesarias para la movilización del Fe desde el hígado e intestino, respectivamente (Bonham y col., 1987). Rosa y Mattioli, (2002) indicaron que esta alteración se hace evidente cuando los valores de cupremia son inferiores a 30 $\mu\text{g/dl}$, siendo este signo, producto de una disminución de la eritropoyesis y de un acortamiento de la vida media del eritrocito (Muehlenbein y col., 2001; Suttle, 2010). Los estudios del impacto de los niveles de Cu sobre el Hto han sido estudiados por varios autores, observándose diferentes resultados (Gengerlbach y col., 1994; Balbuena y col., 1999; Underwood y Suttle, 1999; Rosa y col., 2006; García y col., 2007; Suttle, 2010; Testa, 2015).

En este trabajo se observó que, en el primer y segundo muestreo no hubo diferencias en los valores de Hto, entre los dos grupos. Estos resultados no coincidieron con lo expuesto por García y col. (2007), quienes informaron diferencias en el Hto de terneros nacidos de vacas suplementadas con Cu. En el presente estudio, la ausencia de diferencias entre los grupos hasta el segundo muestreo pudo deberse a que los terneros de ambos grupos nacieron con niveles de cupremia por sobre los valores de disfunción enzimática. Debido a esto, la eritropoyesis y la vida media de los glóbulos rojos (GR) no se afectaron.

V.- DISCUSIÓN

En el tercer muestreo se observó un descenso marcado en los valores de Hto en el GNT. Este hecho no ocurrió en el GT. Al comparar ambos grupos, hubo diferencias. A pesar del descenso descrito en los valores en el GNT, y las diferencias con el GT, los mismos no estuvieron por debajo del rango normal de la especie, que va de 24 a 46% (Kaneko y col., 1999). Estos resultados son similares a los obtenidos y descritos en otros trabajos (Genglebach y col., 1994; Balbuena y col., 1999; Minatel y col., 2007b; Testa 2015). Rosa y col. (2006) informaron valores inferiores de Hto en terneros pertenecientes a grupos no suplementados, aunque la diferencia se produjo solo en los terneros que tenían valores de cupremia $<18 \mu\text{g/dl}$.

La aparición tardía de las diferencias en los valores de Hto entre el GT y GNT coincidió con lo obtenido por diversos autores (Gengelbach y col., 1994; Rosa y col., 2006; Minatel y col., 2007b) aunque otros investigadores informaron, contrariamente, que esta alteración es un signo temprano de hipocuprosis (Fazzio y col., 2010; Testa, 2015). El efecto del tiempo sobre el Hto en el ensayo produjo diferencias dentro del GNT, pero no en el GT. Esto pudo estar relacionado a que, el GNT, a los 3 meses de edad ya evidenció hipocupremias severas, con valores de disfunción enzimática. Niveles bajos de Cu pudieron afectar la eritropoyesis (Gengelbach y col., 1994) y reducir la vida media de los eritrocitos (Johnson y Kramer, 1987). Esa combinación de causas genera una disminución progresiva y lenta en los niveles de GR (Suttle, 2010).

La menor resistencia a infecciones se considera como una de las consecuencias más importantes de la hipocuprosis en bovinos (Rosa y Mattioli, 2002; NASEM, 2021). En este caso, los valores de GB no variaron en el GNT, pero sí lo hicieron en el GT, a medida que descendían los niveles hepáticos y séricos de Cu. Este resultado podría indicar que ante niveles bajos de cupremia, los GB aumentan. Esto quizás se deba a la alteración de las capacidades funcionales de las células, como la síntesis de TNF (Gengelbach y col., 1997; Cerone y col., 2000). Estos datos coincidieron con lo descrito por Gengelbach y col. (1994), en hipocuprosis secundaria con dietas excesivas en Mo. Este aumento en el recuento de GB a medida que descendió el Cu en sangre e hígado hasta valores de disfunción, no coincidió con lo publicado por Cerone y col. (1998) quienes habían

V.- DISCUSIÓN

mencionado linfopenia, particularmente de linfocitos B y monocitosis en bovinos con hipocuprosis.

V.4.- GDP

El impacto productivo de la deficiencia de Cu ha sido ampliamente estudiado por varios autores en distintos sistemas productivos (Balbuena y col., 1999; Fazzio y col., 2006; Rosa y col., 2006; Aparicio y col., 2007; Minatel y col., 2007a; Suttle, 2010). Balbuena y col. (1999), Fazzio y col. (2006) y Rosa y col. (2006) mencionaron que terneros deficitarios de Cu tuvieron GDP inferiores a sus pares, con niveles adecuados de este oligoelemento. En contraste de los autores citados anteriormente, este trabajo no evidenció diferencias en la GDP entre terneros nacidos de vacas suplementadas con glicinato de Cu y aquellos que nacieron de vacas sin suplementación. Pese a eso, se observó que los terneros del GT culminaron el ensayo con 4,5 kg a su favor con respecto a los del GNT. Al evaluar los kg asimilados desde el primer al último pesaje, la diferencia fue de 8,5 kg a favor del GT. Estas diferencias fueron inferiores a las reportados por Fazzio y col. (2006), quienes citaron una diferencia de entre 3 y 10 kg mensuales a favor del grupo tratado. En concordancia, Minatel y col. (2007a) no encontraron diferencias en la GDP entre pesadas, aunque sí las obtuvieron en los pesos finales entre animales tratados y no tratados al terminar un experimento que tuvo una duración de 314 días. De modo similar, Balbuena y col. (1999) encontraron diferencias significativas en los pesos entre terneros tratados y no tratados al finalizar un ensayo de 5 meses de duración. Trabajos similares, con períodos prolongados de deficiencias y suplementaciones reiteradas en el grupo tratado, mostraron diferencias significativas en la GDP (Aparicio y col., 2007; Testa, 2010). Probablemente en este caso no pudieron evidenciarse diferencias significativas por el número de animales empleados en este diseño y la duración del ensayo ya que solo un bajo porcentaje (16%) de los animales con hipocupremia muestra menores GDP (Rosa y col., 2006).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo no coincidieron con los reportados por Ahola y col. (2004) quienes obtuvieron mayores GDP en terneros nacidos de madres no suplementadas, aunque las cupremias en ambos grupos mostraron valores normales. En condiciones similares a las anteriores, Olson y col. (1999) y Muehlenbein y col. (2001)

V.- DISCUSIÓN

no encontraron diferencias en las GDP entre los grupos y Gengelbach y col. (1994) sólo obtuvo diferencias significativas en el grupo suplementado con Mo, por lo que se sugirió, en ese caso, que la menor GDP estuvo asociada al exceso de Mo y no a una deficiencia de Cu.

Fazzio y col. (2006) indicaron que las tasas de crecimiento solo se ven afectadas cuando los valores de cupremia descienden por debajo de los 30 $\mu\text{g/dl}$ (hipocupremia severa). Hallazgos similares fueron señalados por Rosa y col. (2006) quienes observaron riesgos de menores GDP con cupremias entre 15 y 22 $\mu\text{g/dl}$ y hallaron disminución de la performance con valores inferiores a 13 $\mu\text{g/dl}$. En este trabajo los resultados se ajustaron parcialmente a lo reportado por estos autores ya que los terneros del GNT y GT se mantuvieron con similares GDP hasta el segundo muestreo, momento en donde los niveles de Cu sérico descendieron por debajo de estos límites en GNT.

Aunque en este ensayo no se encontraron diferencias en los pesos de los terneros, ni en las GDP, entre los grupos, cuando se analizó el comportamiento de esta última variable, intra grupo, se observó diferencia entre los intervalos, en el GT, pero no en el GNT. Este hecho hizo suponer que el GNT, al encontrarse en hipocupremia en ese momento, no fue capaz de aprovechar el beneficio de la incorporación de dieta sólida y, por ende, mostró una menor tasa de crecimiento que la esperada, lo que coincidió con lo citado por Greene (2000). Este comportamiento también sugirió que los animales mantuvieron un adecuado ritmo de crecimiento hasta un estatus umbral, que una vez transpuesto generó la baja de performance productiva (Rosa y col., 2006). El comportamiento del GT, mejorando la GDP en el IT2, no coincidió con los reportes de Mattioli y col. (2008), ya que estos autores sostuvieron que, a pesar de haber suplementado a las madres, los terneros quedaban expuestos a mostrar menores GDP desde los 3 meses. Quizás en ese estudio, al no evaluarse la reserva hepática del mineral, no se obtuvo un diagnóstico completo de la situación, hecho que sí se evidencia en el presente trabajo.

Si bien no hubo diferencias estadísticas entre los grupos, los 8,5 kg a favor del GT resultan para el productor de la zona, la consecuencia más importante de la deficiencia de Cu, debido a que la misma pasaría prácticamente desapercibida si los animales no se

V.- DISCUSIÓN

pesaran regularmente, hecho que representa un problema de manejo en estos sistemas de producción, en los que la vaca se maneja prácticamente en forma extensiva, pastoreando a campo, y sin recibir suplementación (Mullis y col., 2003).

Debido a esto, es importante determinar el estatus metabólico del Cu para el establecimiento, lo que permitiría complementar las estrategias de manejo con la suplementación, para lograr una GDP adecuada en terneros y un moderado almacenamiento hepático en adultos. Hay que tener en cuenta que, en el presente estudio, las vacas mostraron hipocupremias severas al momento del muestreo y, a pesar de ser suplementadas, solo un ternero nació con valor hepático de reserva mayor a 100 ppm, demostrando que la respuesta al tratamiento depende del déficit que muestre el animal al momento de la suplementación, coincidiendo con lo mencionado por Humphries (1987).

Quedará para estudios posteriores una reproducción del presente trabajo, aumentando el número de animales y realizando suplementaciones adicionales a las madres, al momento del tacto y/o pre servicio para evaluar si las mismas elevan los niveles hepáticos en el ternero al momento de su nacimiento a valores que le permitan mantener concentraciones óptimas hasta el destete.

VI.- CONCLUSIONES

- La suplementación de vaquillonas con hipocupremia severa, en el último tercio de la gestación, no aumentó las GDP en sus terneros, pero sí les permitió mejorar la misma desde el tercer mes de vida hasta el destete.
- La suplementación con Cu en vaquillonas con hipocupremia, en el último tercio de la gestación, posibilitó a sus crías mantener niveles séricos mayores a 30 µg/dl por, al menos, 3 meses.
- En las condiciones del presente trabajo, la suplementación a vaquillonas en el último tercio de la gestación no fue suficiente para que los niveles de cupremia, de sus terneros, se mantengan por encima de los valores de disfunción enzimática hasta el momento del destete.
- Los terneros entraron en la fase de depleción al nacimiento, debido al bajo aporte de Cu a partir de la leche y calostro. Esto se evidenció por el descenso sostenido de los valores hepáticos del mineral durante la lactancia.
- Las mayores concentraciones hepáticas de Cu, al nacimiento, en terneros cuyas madres fueron suplementadas, permitieron mantener la demanda orgánica del mineral por más tiempo.
- Los valores de Cu sérico deben ser complementados con los hepáticos para un correcto diagnóstico de hipocuprosis. Estos parámetros deben ser utilizados para determinar el momento óptimo de suplementación por categoría en un rodeo de cría.
- En las condiciones en las que se desarrolló el trabajo, los terneros fueron incapaces de responder a las demandas orgánicas de Cu, cayendo sus valores a niveles de hipocupremia severa antes del destete, al no haber logrado un nivel de reserva hepática adecuado al momento del nacimiento.
- La determinación de Cu y sus competidores en pasto y agua sirvieron para diagnosticar en forma indirecta la deficiencia en el establecimiento.
- La valoración de Cu en pasto, agua, suero e hígado, de manera conjunta en el presente ensayo, permitió explicar las variaciones de los niveles del mineral en terneros, determinar sus consecuencias hasta el destete y establecer los momentos de suplementación.

VI.- CONCLUSIONES

- En el presente trabajo, la suplementación con Cu a las madres permitió mantener mayores niveles de Hto en terneros, al destete.
- Los valores absolutos de GB aumentan en hipocuprosis.
- La técnica de biopsia hepática empleada fue de utilidad en el ensayo y no evidenció complicaciones derivadas o relacionadas con la maniobra.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

Amorim RM, Borges AS, Graf Kuchembuck MR, Takahira RK, Alencar NX. 2003. Bioquímica sérica e hemograma de bovinos antes após a técnica de biópsia hepática. *Ciência Rural*. 33:519-523.

Aparicio R, Torres R, Astudillo L, Cordova L, Carrasquel J. 2007. Suplementación parenteral con cobre sobre el peso de becerros en crecimiento. *Rev. Zoot. Trop.* 25(3):221-224.

Arthington JD. 2005. Effects of copper oxide bolus administration or high-level copper supplementation on forage utilization and copper status in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 83:2894–2900.

Balbuena O, Mc Dowell LR, Luciani C, Conrad JH, Wilkinson NS, Martín FG. 1989. Estudios de la Nutrición Mineral de los Bovinos para carne del este de las provincias de Chaco y Formosa (Argentina). 3. Cobre, Molibdeno y Azufre. *Rev. Vet. Arg.* 6(56):364-374.

Balbuena O, Ivancovich JC, Mastandrea O, Luciani CA, Stahringer RC, Toledo HO. 1993. Variación estacional de cobre, fósforo y sodio en bovinos en crecimiento en el Dorsal agrícola occidental subhúmedo de Chaco. *Rev. Vet. Arg.* 10(96):396-403.

Balbuena O, Mc Dowell LR, Stahringer RC. 1999. Suplementación con cobre inyectable en terneros y vacas con hipocupremia. *Rev. Vet. Arg.* 16(154):272-280.

Balbuena O, Mastandrea O. 2003. Trastornos Clínicos en bovinos pastoreando *Melilotus alba* con niveles altos de molibdeno en la zona centro-chaqueña. INTA EEA Col. Benítez. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta -
trastornos clnicos en bovinos pastoreando meli.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-_trastornos_clnicos_en_bovinos_pastoreando_meli.pdf).

Blood DC, Radostis OM. 1992. Enfermedades causadas por deficiencias minerales. En: *Medicina Veterinaria*. 7° ed. Mc Graw-Hill. Interamericana. Madrid. P. 1237-1321.

VII- BIBLIOGRAFÍA

Boggiato PR, Ruksan B. 1988. Hipocuprosis secundaria de bovinos en Leales. Rev. Arg. De Prod. Anim. 8:158.

Boggiato PR, Ruksan B. 1989. Molibdenosis en bovinos en el Noroeste santiagueño. Rev. Arg. De Prod. Anim. 9:106.

Bonham VR, Poole SC, Kvasnicka WG, Tronstad RJ, Collinson RW. 1987. The toxicology and composition of bovine tissues after parenteral administration of high levels of copper salts. Vet. Hum. Toxicol. 29(4):307-312.

Borges AS, Amorim RM, Kuchembuck MRG, Araújo RS, Silva SB, Silva HF, Benes FJ, Mirandola R, Morano M. 2005. Correlação entre a atividade sérica da ceruloplasmina e os teores sérico e hepático de cobre em novilhas Nelore. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 57(2):150-155.

Cerone SI, Sansinanea AS, Streitenberger SA, García MC, Auza NJ. 1998. The effect of copper deficiency on the peripheral blood cells of cattle. Veterinary Research Communications. 22:47-57.

Cerone SI, Sansinanea AS, Streitenberger SA, García MC, Auza NJ. 2000. Bovine monocyte-derived macrophage function in induced copper deficiency. Gen. Physiol. Biophys. 19(1)49-58.

Ciria Ciria J, Villanueva Marín R, Ciria García De La Torre J. 2005. Avances en nutrición mineral en ganado bovino. IX Seminario de pastos y forrajes. FEDNA, España. p. 50-69.

Colombatto D. 2007. Uso del cobre tribásico como fuente de cobre en dietas de rumiantes. Rev. Vet. Arg. 24:574.

Cruz JC, Cal Pereyra L, Abreu MN, Benech A, Borteiro C, Rodas E. 2005. Biopsia hepática en ovinos. Modificación a la técnica de aspiración por aguja. Veterinaria (Montevideo). 40 (159-160):15-17.

Cseh S, Soler J, Moore D, Drake M. 2002. Determinación de minerales en suero e hígado y actividad enzimática en sangre, relacionados con la deficiencia de cobre en bovinos.

VII- BIBLIOGRAFÍA

XIV Reunión científico-técnica de la AVVLD. Córdoba, Argentina. 13-15 de Noviembre de 2002. PC 01.

Cseh S, Ramiro FA, Fumagalli AE, Avila AM, Reineri PS. 2011. Relevamiento de deficiencias minerales en cuatro sitios de Santiago del Estero. 2 Oligolementos. Comunicación. Rev. Arg. De Prod. Anim. 31(1):19.

Cseh S, Fumagalli A, Fernandez E, Reineri P. 2012. Deficiencia de Cobre, Zinc y Selenio en rodeos bovinos para carne en el NOA. Acta Resúmenes XIX Reunión de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios Diagnóstico. Buenos Aires, Argentina. 7-9 de Noviembre de 2012.

Cseh S, Fernandez E, Odriozola E, Armendano J, Lagleyze B, Barambilla E, Drake M, Poo J. 2014. Hipocupremia en bovinos asociada a exceso de molibdeno y deficiencia de cobre en pasturas. XX Reunión científico técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio Diagnóstico (AAVLD). Tucumán, Argentina. 27-29 de Octubre de 2014.

Cseh S, Drake M, Calderón G, Perez S. 1997. Parámetros bioquímicos relacionados con la deficiencia de cobre en bovinos. XXV Jornadas Uruguayas de Buiatría y IX Congreso Latinoamericano de Buiatría. Paisandú, Uruguay. 18-21 de junio de 2017. Págs 25-26.

Daniel WD. 1991. Estadísticas no paramétricas y de libre distribución. En: Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa. México DF. p 503-557.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. 2017. "InfoStat versión 2017". Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <https://www.infostat.com.ar/>

Dirksen G, Gründer H, Stöber M. 2005. Enfermedades con la participación de varios sistemas orgánicos. En: Medicina interna y cirugía del bovino. 4° ed. Buenos Aires, Argentina. Inter-Médica. Págs 1095-1157.

VII- BIBLIOGRAFÍA

Duarte L, Cattelan J, Bezerra M, Vicente W, Cordeiro M. 2009. Biopsia hepática con aguja tru-cut guiada por videolaparoscopia em caprinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61(1):12-19.

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

Enjalbert F, Lebreton P, Salat O, Meschy F, Schelcher F. 2002. Effects of copper supplementation on the copper status of peripartum beef cows and their calves. *Veterinary Record.* 151:50-53.

Fazzio LE. 2006. Caracterización de terneros con hipocuprosis. [Tesis doctoral]. Buenos Aires: Fac. Cs. Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Fazzio LE, Rosa DE, Picco S, Melani G, Minatel L, Mattioli GA. 2006. Efecto de la suplementación parenteral con cobre durante el último tercio de gestación de vacas en zona de hipocuprosis. *Rev. Vet.* 17:84-87.

Fazzio LE, Mattioli GA, Picco SJ, Rosa DE, Minatel L, Gimeno EJ. 2010. Diagnostic value of copper parameters to predict growth of suckling calves grazing native range in Argentina. *Pesq. Vet. Bras.* -30(10):827-832.

García J, Cuesta M, Pedroso R, Rodríguez J, Gutiérrez M, Mollineda A, Figueredo J, Quiñones R. 2007. Suplementación parenteral de cobre en vacas gestantes: efecto sobre el postparto y terneros. *Rev. MVZ Córdoba.* 12:985-995.

García Díaz T, Teodoro AL, Ospina Rojas IC, Pachón Chitiva AF, Pardo Guzmán JA. 2015. Metabolismo do cobre na nutrição animal: Revisão. *Rev. Pub Vet* 9(5):279-286.

Gengelbach GP, Ward JD, Spears JW. 1994. Effect of dietary copper, iron and molybdenum on growth and copper status of beef cows and calves. *J. Anim. Sci.* 72:2722-2727.

VII- BIBLIOGRAFÍA

Gengelbach GP, Ward JD, Spears JW, Brown TT. 1997. Effects of copper deficiency and copper deficiency coupled with high dietary iron or molybdenum on phagocytic cell function and response of calves to a respiratory disease challenge. *J. Anim. Sci.* 74(4):1112-1118.

Gooneratne SR, Christensen DA. 1989. A survey of maternal copper status and fetal tissue copper concentrations in saskatchewan bovine. *Can. J. Anim. Sci.* 69:141-150.

Gooneratne SR, Buckley WT, Christensen DA. 1989. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. *Can. Jour. of An. Sci.* 69:819-845.

Greene LW. 2000. Designing mineral supplementation of forage programs for beef cattle. *J. Anim. Sci.* 77:1-9.

Hall JO. 2005. Appropriate methods of diagnosing mineral deficiencies. Proceedings of the Mid-South Ruminant Nutrition Conference. Arlington, 2005. Págs. 21–26.

Hamm JW, Bettany JR, Halstead EH. 1973. A soil test for sulfur and interpretative criteria for Saskatchewan. *Comm Soil Sci Plant Anal.* 4: 219-231.

Hellman NE, Gitlin JD. 2002. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr.* 22:439-458.

Humphries WR, Walter M J, Morrice PC, Bremmer I. 1987. Effect of dietary molybdenum and iron on copper metabolism in calves. Abstracts International symposium on trace elements in man and animals. California, USA. P 17.

INTA Mercedes, Corrientes. 2004. Animales sin cobre. *Rev. Brangus.* 48:64-66.

Johnson WT, Kramer TR. 1987. Effect of copper deficiency on erythrocyte membrane proteins of rats. *Jour. Nut.* 117:1085-1090.

Jorhem L, Engman J. 2000. Determination of Lead, Cadmium, Zinc, Copper and Iron un Foods by Atomic Absorption Spectofotometry after Microwave Digestion: NMKL Collaborative Study. *Jorunal of AOAC International.* 83(5):1189-1203.

VII- BIBLIOGRAFÍA

Kaneko JJ, Harvey JW, Brus ML. 1999. The Erythrocyte: Physiology, Metabolism and Biochemical Disorders. En: Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6th Edition. British Library. Págs. 173-240.

Kincaid RI. 1999. Assessment of trace mineral status of ruminants: a review. Proceedings of the American Society of Animal Science. Pp1-10.

Kraft W, Dürr U. 2000. Diagnóstico clínico de laboratorio en veterinaria. Ed. Edimsa. España. Págs. 69-71.

Mattioli GA, Fazzio LE, Rosa DE, Picco SJ, Angelico D, Turic E. 2008. Eficacia de la suplementación con Cu-Zn en terneros. Rev. Vet. Arg. 25(242):90-98.

Mattioli GA. 2013 Nutrición mineral y vitamínica de bovinos. Editorial CCB Academic press. Primera edición. La Plata, Argentina. 264 págs.

Meyer DJ, Harvey JW. 2000. Evaluación de las anomalías eritrocitarias. En: El laboratorio en medicina veterinaria. Ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. Págs. 54 y 55.

Micheloud JF, Suarez VH, Martinez GM, Rosa DE, Ventura MB, Mattioli GA. 2017. Niveles séricos de minerales en hembras de cría bovina en un establecimiento de la región de selva y pastizal pedemontano del norte de Salta. Rev. FAVE 16:97-100.

Micheloud JF, Olmos LH, Garcia JA, Mattioli G, Uzal F. 2019. Perinatal mortality in cattle associated with goitre. Braz J Vet Pathol 12:48-52.

Micheloud JF, Martinez GM, Araoz V, Suarez VH, Rosa DE, Mattioli GA. 2021. Niveles séricos de minerales en hembras bovinas en un establecimiento de la región del Chaco Semiárido salteño. Rev. RIA. <http://ria.inta.gov.ar/sites/default/files/trabajosenprensa/micheloud-castellano-2.pdf>.

Minatel L, Buffarini MA, Dallorso ME, Homse A, Carfagnini JC. 1998. Relevamiento mineral de la región noroeste de la provincia de Buenos Aires. Ver. Arg. Prod. Anim. 18:67-75.

VII- BIBLIOGRAFÍA

- Minatel L, Buffarini MA, Scarlata EF, Dallorso ME, Carfagnini JC. 2004. Niveles de cobre, hierro, zinc y selenio en bovinos del noroeste de la provincia de Buenos Aires. Ver. Arg. de Prod. Anim. 24(4):225-235.
- Minatel L, Underwood SC, Postma GC, Dallorso ME, Carfagnini JC. 2007a. Reproducción experimental de la deficiencia de cobre en bovinos mediante el empleo de altos niveles de molibdeno y sulfato en la dieta. Rev. Arg. de Prod. Anim. 27(3):179-187.
- Minatel L, Underwood SC, Postma GC, Schapira A, Dallorso ME, Carfagnini JC. 2007b. Alteraciones en los glóbulos rojos de terneros con deficiencia de cobre inducida por altos niveles de molibdeno y azufre en la dieta. Rev. Arg. de Prod. Anim. 27(1):333-334.
- Moreira Braga M, Lima Castilhos LM, Nogueira Dos Santos M. 1985. Biópsia hepática em bovinos: proposta de nova técnica. Rev. Centro de Cs. Rurais. 15(1):79-88.
- Muehlenbein EL, Brink DR, Deutscher GH, Carlson MP, Johnson AB. 2001. Effects of inorganic and organic copper supplemented to first-calf cows on cow reproduction and calf health and performance. J Anim Sci. 79:1650-1659.
- Mufarrege DJ. 1999. Los minerales en la alimentación de vacunos de carne en la Argentina. E.E.A. INTA Mercedes, Corrientes. Trabajo de divulgación técnica. www.produccion-animal.com.ar/suplementacion_mineral/60-minerales_en_la_alimentacion_vacun.pdf.
- Mullis LA, Spears JW, Mc Graw RL. 2003. Estimated copper requirements of Angus and Simmental heifers. J. Anim. Sci. 81:865-873.
- Nasca JA, Toranzos M, Banegas NR. 2006. Evaluación de la sostenibilidad de dos modelos ganaderos de la llanura deprimida salina de Tucumán, Argentina. Ver. Zootecnia Trop. 24(2):121-136.
- NASEM. 2021. Minerals. En: Nutrient Requirements of Dairy Cattle: 8^o Revised Edition. Washington, DC: The National Academies Press. p 135-138.

VII- BIBLIOGRAFÍA

Néspoli PB, Gheller VA, Peixoto PV, Franca TN, Carvalho AU, Godoy De Araujo DK, Malm C. 2010. Avaliação de técnicas de biópsia hepática em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(1):29-36.

NRC. 2005. Copper. En: *Mineral tolerance of animals*. 2º Edición. Washington, D.C. National Academy Press. p 134-144.

Olivares RWI, Schapira A, Postma GC, Iglesias DE, Valdez LB, Breininger E, Minatel L. 2014. Deficiencia de cobre y alteraciones cardíacas: una posible patogenia para la enfermedad de las caídas. *Rev. Arg. De Prod. Anim.* 34(1):3.

Olson PA, Brink DR, Hickok DT, Carlson MP, Schneider NR, Deutscher GH, Adams DC, Colburn DJ, Johnson AB. 1999. Effects of supplementation of organic and inorganic combinations of copper, cobalt, manganese and zinc above nutrient requirement levels on postpartum two-year old cows. *J. Anim. Sci.* 77:522-532.

Pavlata L, Podhorsky A, Pechova A, Chomat P. 2005. Differences in the occurrence of selenium, copper and zinc deficiencies in dairy cows, calves, heifers and bulls. *Vet. Med. – Czech.* 9: 390–400.

Paynter DI. 1982. Differences between serum and plasma ceruloplasmin activities and copper concentrations: Investigation of possible contributing factors. *Aust. J. Biol. Sci.* 35:353-361.

Pechin GH, Sánchez LO, Cseh S. 2006. Evaluación de dos formas de administración (bolos de liberación lenta vs. EDTA Cu inyectable) en la prevención de la deficiencia de cobre en bovinos para carne. *Ciencia Veterinaria.* 8:5-15.

Perkin Elmer. 2000. *Analytical methods for absorption spectrometry*. Estados Unidos. pp 1-300.

Pinto Santini L, Godoy S, Chicco C, Chacón T. 2007. Efecto de altos niveles de hierro y molibdeno sobre la nutrición del cobre en vacas mestizas. *Rev. Cient. (Maracaibo)* 17(6):558-596.

VII- BIBLIOGRAFÍA

- Pistón M, Knochen M. 2011. Desarrollo de un sistema de flujo mediante inyección secuencial (SIA) para la determinación de Zn en leche en polvo y fórmulas infantiles. *Rev. ACI* 2(3):57-66.
- Postma GC, Minatel L, Carfagnini JC. 2010. Deficiencia de Cobre en bovinos en pastoreo de la Argentina. *Rev. Arg. de Prod. Anim.* 30(2):189-190.
- Postma GC, Minatel L, Olivares RWI, Schapira A, Dallorso ME, Pera AR, Carfagnini JC. 2011. Relación entre cupremia y actividad de superóxido dismutasa eritrocitaria en bovinos con deficiencia de cobre. *Rev. Arg. De Prod. Anim.* 31(1):1.
- Repetto JC, Donovan A, García Mata F. 2004. Carencias minerales, limitantes de la producción. *Rev. Motivar.* 18:6-7.
- Rosa DE, Mattioli GA. 2002 Metabolismo y deficiencia de cobre en los bovinos. *Analecta Vet.* 22(1):7-16.
- Rosa DE, Fazzio LE, Picco SJ, Minatel L, Mattioli GA. 2006. Caracterización de terneros con menores ganancias diarias de peso por hipocuprosis. *Rev. Vet. Cuyana.* 1(2):41-45.
- Salamanca A. 2010. Suplementación de minerales en la producción bovina. *REDVET.* 11(9):1-9. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090910/091009.pdf>.
- Sager RL. 2006. El agua de bebida para bovinos en San Luis (2º Parte). *Informativo Rural. INTA San Luis.* 3(8):5.
- Saravia FC, Martínez MV, Ávila GN. 2015. Relevamiento de la cupremia en rodeos de cría bovina del chaco semiárido salteño (Argentina). *Rev. Vet* 26(1):59-62.
- Seiler H, Sigel A, Sigel H. 1994. *Handbook on metals in clinical and analytical chemistry.* Ed. Marcel Dekker. New York. p 339-500.
- Soler J, Moore D, Cseh S. 2000. Empleo del cobre sanguíneo y hepático como indicadores del nivel de cobre en bovinos. *Rev. Therios.* 7:43-45.

VII- BIBLIOGRAFÍA

Spears JW. 2003. Trace mineral bioavailability in ruminants. *Journal of Nutrition*. 133:1506S-1509S.

Suttle NF. 2010. Copper. En: *Mineral nutrition of livestock*. 4° Ed. MPG Books Group. London. P255-305.

Testa JA. 2015. Caracterización de las consecuencias inmunológicas de la hipocuprosis en terneros de cría. [Tesis doctoral]. Buenos Aires: Fac. Cs. Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Underwood EJ, Suttle NF. 1999. Copper. En: *The mineral nutrition of livestock*. 3° Ed. Ed. CABI Publishing. UK. P 283-342.

Valenzuela V C, Letelier C Ma, Olivares G M, Arredondo O M, Pizarro A F. 2008. Determinación de hierro, zinc y cobre en carne de bovino. *Rev. Chil. Nutr.* 35(2):139-146.

Veliz MA, Balverdi MP, Rodriguez RR, Villamil FG, Sales A. 2012. Cuantificación de hierro hepático por espectrometría de absorción atómica con vaporización electrotérmica. *Acta Bioq. Clínica Latinoamericana*. 46(2):221-228.

Viejo RE, Casaro AP. 1992. Suplementación parenteral con cobre en vacas gestantes y su efecto sobre el ternero al nacimiento. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 12:339-346.

Viejo RE, Casaro AP. 1993. Efecto de la suplementación con cobre sobre la ganancia de peso, cobre hepático y plasmático en terneros. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 13:97-105.

Ward JD, Spears JW, Gengelbach GP. 1995. Differences in copper status and copper metabolism among Angus, Simmental and Charolais cattle. *J. Anim. Sci.* 73:571-577.

Widdowson EM, Dauncey J, Shaw JCL. 1974. Trace elements en foetal and early postnatal development. *Proc. Nutr. Soc.* 33(3):275-284. <https://doi.org/10.1079/PNS19740050>.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

Woolliams JA, Weiner G, Woolliams C, Suttle NF. 1985. Retention of copper in the liver of sheep genetically selected for high and low concentrations of copper in plasma. Anim. Prod. 41:219:226.

Zuccardi RB, Fadda GS. 1972. Mapa de reconocimiento de suelos de la provincia de Tucumán. Publicación especial n°3. Fac. de Agronomía y Zootecnia- Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.