

Discurso de ingreso a la Academia de Felipe Prieto Montaña

Título: ACUMULACIÓN CRÓNICA DE COBRE EN RUMIANTES

I. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

Los elementos minerales son compuestos esenciales para la vida de los animales siendo su función salvaguardar la integridad funcional y estructural de los tejidos, manteniendo inalterado el crecimiento, la salud y la productividad de los mismos. Dentro de este grupo encontramos al cobre, importante cofactor de numerosas enzimas y procesos metabólicos entre los que se incluyen la fosforilación oxidativa, el transporte de oxígeno y la detoxificación de radicales libres.

A lo largo del proceso evolutivo, los organismos vivos han desarrollado mecanismos homeostáticos altamente especializados para secuestrar, almacenar y excretar cobre, así como eficientes mecanismos detoxificadores para contrarrestar sus posibles efectos deletéreos cuando está presente en concentraciones excesivas.

Hoy en día se sigue avanzando en el estudio del metabolismo del cobre, pudiendo enumerar los últimos hallazgos de proteínas implicadas en su metabolismo como las metalotioneínas, chaperones y Cu-ATPasas, su función como base molecular en importantes enfermedades hereditarias en la especie humana (Enfermedad de Menkes y Enfermedad de Wilson) hasta llegar a su reciente implicación en procesos neurológicos de relevancia como la encefalopatía espongiiforme bovina (EBB). Sin embargo no se conocen en detalle los mecanismos homeostáticos que regulan el metabolismo de cobre a nivel celular.

Dentro de las especies animales, los rumiantes son las más susceptibles a padecer procesos de intoxicación por cobre, siendo particularmente dispuesto el ganado ovino, probablemente por su incapacidad de incrementar la excreción biliar de cobre en respuesta a niveles altos en su dieta; en cambio al ganado vacuno se le considera como una especie resistente ya que los episodios de toxicidad son poco frecuentes.

Sin embargo, en los últimos años el número de casos de intoxicación por cobre en ganado vacuno se ha incrementado de forma drástica, incluso con niveles de acumulación hepática claramente inferiores a los considerados de forma clásica como tóxicos, pudiendo estar asociados a un cambio en el tipo y disponibilidad de los suplementos de cobre empleados o a la contaminación de pastos o forrajes por emisiones industriales, mineras o lodos, especialmente purines de cerdo ricos en cobre.

El desarrollo de problemas de deficiencia y toxicidad en rumiantes independientemente de la concentración de cobre en la dieta, va a verse afectado por factores que condicionan tanto la absorción/excreción como la biodisponibilidad del mismo; entre ellos principalmente el molibdeno y el azufre, aunque también el zinc y el hierro van a ser fundamentales para estimar los requerimientos nutricionales de cobre. Así, pequeños cambios en la concentración de molibdeno y azufre en el pasto o en la ración pueden ser capaces de producir cambios en la absorción, distribución o excreción de cobre, dando como resultado síndromes clínicos tanto de deficiencia como de toxicidad.

La importancia del componente racial en el metabolismo del cobre está bien estudiada en ganado ovino, pues la existencia de determinados genes que controlan las concentraciones plasmáticas ha quedado demostrada al seleccionar líneas genéticas con altos y bajos niveles de cobre (incluso en una misma raza).

También se han hallado diferencias genéticas en las concentraciones de cobre hepático dentro del ganado bovino lechero, donde la raza Jersey, por ejemplo, muestra mayor susceptibilidad a la intoxicación por cobre al acumular mayor cantidad del mismo en hígado comparado con la raza Holstein frente a igual contenido de cobre en la dieta.

Igualmente se ha observado que los terneros de raza Rubia Gallega presentan concentraciones de cobre superiores a los de raza Frisona en todos los tejidos, a excepción del cerebro, ocupando los cruces industriales una posición intermedia entre ambas razas; no obstante en ningún caso las diferencias entre razas alcanzan significación estadística.

Todos estos hallazgos, si bien permiten realizar un manejo más eficaz de los animales según sus características raciales a fin de evitar alteraciones metabólicas, no logran identificar los verdaderos puntos críticos dentro del metabolismo de cobre entre las distintas razas. Tan solo podemos considerar que las diferencias genéticas entre las razas bovinas se centrarían en la variabilidad en la absorción de cobre de la dieta, la excreción de cobre endógeno, la cantidad de alimento consumido y su capacidad de excretar vía biliar los excesos de cobre.

Este hecho podría tener relevancia, ya que aquellos animales expuestos de forma natural a contaminantes en el medio ambiente, al ser sometidos a sistemas de explotación intensivos además se suplementan las dietas de forma rutinaria con niveles relativamente altos de cobre.

Muchas veces la suplementación puede ser la adecuada para los animales, pero ante situaciones estresantes o de interacciones con otros oligoelementos en la dieta, se genera una situación de desequilibrio que dispara los signos de deficiencia o intoxicación, y en estos casos serán más susceptibles aquellas razas que acumulan mayor cantidad de cobre hepático en condiciones normales .

II. FUENTES Y NECESIDADES DE COBRE EN RUMIANTES

II.1 FUENTES DE COBRE

Para establecer las necesidades dietéticas de cobre, es necesario previamente tener conocimiento de cuales son las principales fuentes de este nutriente, y conocer los niveles en suelos y plantas, así como conocer los factores que pueden afectar la disponibilidad de los mismos.

Los niveles de cobre en suelo oscilan entre 6 y 60 mg/kg, dependiendo su concentración de dos factores, la roca madre y los procesos de formación del mismo.

El cobre es un catión versátil que en los suelos o en la materia reposicionada cuenta con una gran capacidad para interaccionar químicamente con otros minerales y compuestos orgánicos. Aunque es soluble, y por tanto móvil y disponible, la forma química en la que se presenta en el suelo es de gran importancia para las prácticas agrícolas, mientras que el contenido total de cobre ofrece únicamente información básica para los estudios geoquímicos.

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

Este mineral es más abundante en las rocas *mafic* e intermedias de la corteza terrestre, mientras que en las rocas eruptivas, como los granitos, se encuentra en concentraciones muy bajas.

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

II.1.1 Cobre en suelos

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

Los purines de cerdo contienen elevadas concentraciones de cobre como promotor de crecimiento y zinc para prevenir cuadros de intoxicación por cobre y problemas de paraqueratosis y/o deficiencia del mismo, estando considerado

como uno de los problemas medioambientales más importantes en los países y/o regiones con elevada densidad de porcino en intensivo, como Francia, Dinamarca, Holanda, Reino Unido, e incluso en zonas de nuestro país, caso de Galicia, donde hemos demostrado que el uso de estos purines como fertilizante en los campos provoca un incremento importante de cobre en los suelos, llegando a producir efectos detectables en la biomasa microbiana del suelo e incluso pueden ser tóxicos para los animales que pastan esos campos, suponiendo sobre todo para la oveja, niveles elevados de cobre en hígado, siendo frecuentes los casos de intoxicación y con menor frecuencia, también en ganado vacuno.

En menor medida, debemos señalar el potencial contaminante del empleo de gallinaza como fertilizante agrícola, pues a los pollos de crecimiento acelerado, al igual que a los cerdos, se les aportan excesos de minerales por lo que sus excrementos son también una importante fuente de contaminación por acumulo excesivo, principalmente de cobre, zinc y manganeso, en el suelo y plantas.

II.1.2 Cobre en plantas

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

Además, debemos señalar que el contenido de cobre de las plantas que crecen en zonas irrigadas se va a ver condicionado también por los niveles de cobre en el agua y demás propiedades de la misma.

La distribución del cobre dentro de la planta tiende generalmente a acumularse en sus órganos reproductivos; así, la mayor concentración de cobre ha sido encontrada en el embrión de los granos de cereales (de 8 a 18 mg/kg materia seca) y en la cubierta de la semilla (de 8 a 23 mg/kg), mientras que considerando el total de la misma el valor mayor registrado fue 4 mg/kg.

El movimiento del cobre en la planta todavía no se conoce de forma completa, sin embargo se sabe que la excreción del cobre va desde la raíz hacia el xilema y el floema, donde se encuentran las formas móviles del cobre.

De todas formas, únicamente aquellos suelos muy ricos en cobre (por el contenido de la roca madre o bien por aportes de cobre durante mucho tiempo) suelen presentar un riesgo potencial para las plantas.

Para valorar el riesgo de toxicidad se consideran dos criterios principales que son la cantidad de hierro cambiante y el pH ácido.

Para un desarrollo óptimo, la planta debe tener no sólo una cantidad apropiada de cobre activo en las células sino también poseer un equilibrio entre los elementos químicos. Existen iones con similar afinidad a las proteínas a las que

se une el cobre por lo que van a dar lugar a antagonismo, interfiriendo en la función significativa que tiene el cobre en los enzimas.

II.1.3 Factores de variación de las fuentes de cobre

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

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

II.1.3.1 Factores dependientes del suelo

Existe una amplia variedad geográfica en el contenido de cobre en los suelos, el cual se refleja en la incidencia natural de la deficiencia o toxicidad de este micromineral en los animales; lo que hace necesario el diseño de mapas que señalen su contenido en los suelos y sedimentos de arrastre, pudiendo así delimitarse las áreas de mayor riesgo para los animales.

II.1.3.2 Factores vegetales y composición de los forrajes

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

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

En estudios realizados por nosotros, en los años noventa en ganado vacuno de la Montaña de Luna y Omaña (Provincia de León), se comprobó concentraciones bajas de cobre en el heno que consumen el ganado vacuno, aunque esta carencia puede ser compensada con la administración de pienso, lo que da lugar a que los niveles de cobre en sangre se mantengan en valores normales a lo largo del año, con ascensos moderados entre uno y dos meses después de la salida al pasto.

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

La especie, la variedad y la madurez de la planta así como las condiciones del suelo y los fertilizantes utilizados influyen en los contenidos de cobre y de otros minerales íntimamente relacionados en su metabolismo. Así, las concentraciones excesivamente altas de molibdeno en los forrajes se dan de forma natural en suelos alcalinos y suelos ricos en materia orgánica, contando además con niveles elevados de azufre en los forrajes.

Las gramíneas de clima templado tienden a ser más pobres en cobre que las leguminosas (4,7 versus 7,8 Cu mg/kg materia seca), presentando un mayor contenido de cobre las hojas que los tallos, de manera que las concentraciones de cobre tienden a disminuir durante la estación de crecimiento.

La disponibilidad de cobre es además superior en henos que en praderas, especialmente cuando se pastan antes de la floración.

II.1.3.3 Composición de los alimentos concentrados

La intoxicación por cobre es más frecuente en animales alimentados con concentrados. Esto es debido a que a pesar de que los pastos pueden contener más o menos cobre, la disponibilidad del mismo en los cereales es mayor, llegando a un coeficiente de absorción 10 veces superior.

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

La mayoría de las fuentes minerales de cobre (metionato, lisinato, sulfato, acetato, cloruro, óxido cuproso, etc.) son bien utilizadas tanto en monogástricos como en rumiantes.

II.1.3.4 Factores estacionales

Los antagonistas del cobre se ven afectados de forma muy importante por los factores estacionales. Así, el hierro se encuentra en sus máximos niveles en primavera y otoño; las concentraciones de molibdeno aumentan gradualmente según avanza el año con máximos en la primavera llegando incluso a duplicarse durante la estación de pastoreo. La concentración de azufre descende con la maduración de la planta mientras que la disponibilidad del cobre aumenta.

Todos estos factores hacen que existan importantes variaciones en el estatus del cobre en animales entre la primavera y el otoño; así, se han registrado fluctuaciones estacionales en los niveles plasmáticos de cobre, con concentraciones más bajas entre febrero y marzo y más altas en agosto y setiembre.

II.1.3.5 Factores nutricionales

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

Se conoce poco sobre las formas en que se presenta el cobre en los alimentos. Debemos considerar que las variaciones en los valores de disponibilidad del cobre para rumiantes de un mismo ingrediente o entre ellos, dependen de lo que ocurra en el rumen, y en particular de la sincronía entre la liberación de cobre y de sus antagonistas potenciales, principalmente molibdeno, azufre e hierro.

II.1.3.6 Otros factores

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

La fase de preñez afecta a la cinética tanto del feto como de la madre. Así, durante el primer trimestre la concentración hepática de cobre fetal está entorno a 200 mg/kg de materia seca, independientemente de la edad de la madre, raza y estatus de cobre.

La ingesta de cobre durante la gestación modifica los niveles hepáticos del ternero neonato, por lo que debe tenerse mucho cuidado ya que no se han determinado los niveles que provocan toxicidad en los terneros.

En los recién nacidos la regulación orgánica de cobre es deficiente ya que van a tener un sistema homeostático muy simple. El sistema de la ceruloplasmina no madura antes de los 4 días tras el nacimiento, en este momento el cobre es liberado del hígado y se alcanzan en plasma los valores de referencia en adultos; estos aumentos que se dan tras el nacimiento son independientes de la madre o de las concentraciones de cobre en el hígado de los terneros.

II.2 NECESIDADES DE COBRE EN RUMIANTES

El nivel de cobre en la dieta necesario para el mantenimiento de la salud depende de la especie animal y sobre todo, como hemos indicado anteriormente, de numerosos factores nutricionales, estando sobre todo

correlacionado con los niveles de molibdeno y azufre inorgánico. Cuando las condiciones dietéticas son óptimas para la utilización del cobre, concentraciones de 8 a 10 mg/kg materia seca son suficientes para cubrir las necesidades en rumiantes.

Las necesidades de cobre aumentan en momentos de mayor exigencia como en periodos de alta producción láctea, crecimiento rápido o estrés, por lo que estas recomendaciones deberán ser reconsideradas. También es conocido que ciertos minerales, nitratos, sulfatos, proteínas y plantas estrogénicas reducen la utilización de cobre; por ello todos estos factores deberían de ser identificados para determinar de forma precisa los requerimientos dietéticos de cobre en los animales.

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

II.2.1 Tipo de alimento

Existen grandes diferencias en la biodisponibilidad del cobre de los alimentos que normalmente consumen los rumiantes, lo cual condiciona de forma muy importante las necesidades nutricionales de los animales.

El cobre se absorbe con mayor facilidad en alimentos bajos en fibra como cereales y brassica, mientras que la absorción es más pobre en hierba fresca. La conservación de la hierba o heno y el propio ensilado generalmente mejoran su disponibilidad, aunque raramente hacen que las mejoras sean consistentes.

Diversos componentes de la dieta, como los fitatos, el ácido ascórbico, los tiomolibdatos, la fructosa o la fibra presentan la capacidad de copularse con el cobre y por tanto limitar su absorción.

Expuesto todo lo anterior podemos afirmar que la intoxicación por cobre es esencialmente un problema en ganado en sistemas de explotación intensiva, pero no por el hecho en sí, si no porque su alimentación implica que la disponibilidad del cobre va a ser mayor. Siguiendo este razonamiento lógico, la deficiencia de cobre es un problema del ganado en pasto por la pobre disponibilidad del cobre en la hierba.

II.2.2 Efectos del molibdeno y azufre en la disponibilidad del cobre

La capacidad del molibdeno y azufre para inducir deficiencia de cobre en rumiantes es un hecho perfectamente constatado, cuantificando en algunas ocasiones un 78% de variación en la disponibilidad del cobre en ovejas.

Las interacciones con hierro, molibdeno y azufre van a condicionar las necesidades de cobre, y esto debe tenerse en cuenta antes de valorar la capacidad de los alimentos para proporcionar el cobre disponible necesario.

II.2.3 La importancia de la constitución genética

La constitución genética cobra una gran importancia al conocerse que los desórdenes metabólicos del cobre podrían ser controlados por manipulación genética. La influencia genética en la susceptibilidad a padecer procesos de deficiencia o toxicidad de cobre ha sido ampliamente estudiada en ganado ovino, lo que ha permitido adaptar las razas (susceptibles o tolerantes al cobre) a las características de los pastos. En ganado vacuno el efecto de la genética sobre las necesidades de cobre ha sido mucho menos estudiado, limitándose a un número reducido de razas, si bien hay evidencias de que existen diferencias genéticas en cuanto a sus necesidades de cobre.

III. METABOLISMO Y FUNCIONES DEL COBRE

III.1 Absorción

Aunque no se conoce con precisión el mecanismo de absorción de cobre en el animal adulto, se sabe que se lleva a cabo en varios tramos del tracto digestivo, desde el estómago al intestino grueso. En los rumiantes la absorción se limita principalmente a duodeno y yeyuno, con una capacidad de absorción entre el 30 y 60%. No obstante, una gran parte de este cobre absorbido se excreta, haciendo que al final las cifras que se manejen sean del 5-10%.

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

En rumiantes se presenta predominantemente como cobre monovalente Cu^+ cuya absorción es más difícil que en su forma divalente Cu^{2+} , pues la valencia del ion de cobre influye en la disponibilidad del metal en el intestino.

Los animales monogástricos y los terneros absorben del 45-55 % del cobre dietético, lo que puede ser debido a los bajos niveles de hierro en su comida y a la formación de sulfato de cobre por la reducción de sulfato a sulfito.

El sistema microbiótico en el rumen es un factor importante que determina la disponibilidad del cobre, lo que se denota claramente por la influencia de la

producción de sulfuro en el rumen; se piensa que está unido el cobre a S^{2-} formando sulfuro cuproso Cu_2S una forma más insoluble incluso que el sulfuro cuprico CuS . En el ambiente ruminal con un pH reducido, el cobre se puede presentar de forma monovalente, y de hecho se puede demostrar que muestras de rumen reducen fácilmente grandes cantidades de cobre iónico. La razón de la vulnerabilidad del rumiante al déficit del cobre tiene su explicación en los procesos digestivos que tienen lugar en el rumen, donde se degradan las fuentes orgánicas e inorgánicas de azufre a sulfuro. Los protozoos del rumen juegan un papel muy importante en la generación de sulfuro; así se ha visto que en animales libres de patógenos que son extraídos mediante cesárea o mediante la administración de ionóforos antiprotozoarios, la absorción de cobre está aumentada. Durante la digestión ruminal la mayor parte del cobre liberado va a precipitar en forma de sulfuro de cobre y permanece sin absorberse, mientras que el liberado durante la digestión postruminal se une parcialmente a componentes no digeridos.

En ovejas se han propuesto una serie de teorías para explicar la acumulación de cobre por el desequilibrio de la actividad o la composición de la microflora del rumen, sin embargo no hay evidencias que constaten estas teorías.

Aunque no se conocen en detalle los mecanismos bioquímicos involucrados, hay evidencias de que la absorción intestinal de cobre se regula en gran medida por las necesidades del organismo, donde las metalotioneínas juegan un papel destacado en el mantenimiento de un estatus nutricional adecuado. La razón por la que estas proteínas varían tanto en animales de genética y estados fisiológicos distintos no se conoce, algunas posibilidades podrían ser cambios en el flujo de cobre o ratio de síntesis/degradación de la proteína. A modo de ejemplo, el cordero que es alimentado con leche puede llegar a absorber un 70-85 % del cobre ingerido, mientras que el destetado absorbe menos del 10%.

Cuando se enriquece la ración con molibdeno y azufre se forman tiomolibdatos, que llevan a la formación de compuestos de cobre que son más complejos y además el cobre tiende a unirse más fuertemente al material particulado, se reduce entonces la disponibilidad del cobre llevándolo a una absorción menor del 1%

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

- Elementos de transición.

La existencia de elementos químicos que son similares al cobre y que van a competir con él por los sitios de unión en los sistemas metabólicos específicos, incluyendo la absorción intestinal. Ya Evans y colaboradores aislaron y purificaron en 1970 unas proteínas metalafines en el duodeno de ganado vacuno y demostraron que el cadmio y el zinc desplazan al cobre de los puntos de unión sulfhídricos.

- Ácido ascórbico.

El ácido ascórbico es reconocido como un antagonista del cobre en numerosas especies animales probablemente debido a la capacidad de reducción de su forma divalente a la monovalente. Se ha demostrado una disminución en la unión de cobre a las metalotioneínas en intestino e hígado después de la adición de ácido ascórbico; sugiriendo que el ácido ascórbico daña el estatus de cobre a través de una disminución en la absorción o un aumento en la movilización del mismo

- Complejos dietéticos cúpricos.

La disponibilidad del cobre se ve condicionada por la naturaleza de los componentes de la dieta. Investigaciones demuestran que la proteína ingerida tiene un papel protector frente a la acumulación de cobre y que consiste en la formación de complejos macromoleculares que los invalidan para su absorción.

- Aniones.

La forma más conocida como inhibidora sobre la absorción del cobre es el sulfito, hecho comprobado en numerosas especies animales.

III.2 Transporte y almacenamiento

El cobre a nivel intestinal se enlaza a una metalotioneína de la mucosa lo que limita su traslocación posterior y permite la adaptación a ingestiones excesivas. Después de la absorción intestinal el cobre es transportado a través de la sangre por la albúmina.

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

Cuando hay un déficit de cobre, se produce un aumento en la actividad hepática de los enzimas encargados de la síntesis de glutatión que estimulan la eficacia en la captación de cobre por el hígado; lo mismo sucede en la exposición a un exceso de selenio.

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

La ceruloplasmina constituye la fracción de cobre plasmático más elevada en animales. En los no rumiantes supone el 95% del cobre plasmático frente al 80%

de los rumiantes. En vacuno los niveles de ceruloplasmina disminuyen drásticamente durante una deficiencia de cobre y pueden alcanzar niveles no detectables en ganado aparentemente sano.

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

Ante situaciones de deficiencia de cobre se produce un estímulo del reciclaje al optimizar la eficacia de su absorción, si bien los mecanismos involucrados en este proceso homeostático no se conocen en detalle. Tampoco se sabe hasta qué punto el cobre es vulnerable a los tiomolibdatos capaces de estimular las pérdidas de cobre.

Se ha demostrado que en ovejas que recibían grandes suplementos de molibdeno (25 mg/kg) y azufre (4.5 mg/kg), las pérdidas fecales endógenas de cobre aumentaban dos veces y media, e igualmente se observaron incrementos notables en la velocidad de depleción hepática del cobre, al tiempo que veían un efecto de la estimulación del molibdeno de la ración sobre las pérdidas endógenas de cobre.

Como el cobre circula en la sangre unido a la ceruloplasmina o se encuentra confinado dentro de los eritrocitos, la excreción urinaria de cobre en todas las especies animales es insignificante, al ser muy poco permeable el cobre en los capilares glomerulares, aunque se sabe que en las ovejas aumenta ante la exposición a molibdeno. No estando la captación del cobre condicionada por la excreción del mismo por vía urinaria.

III.2.1 Metabolismo hepático

El éxito en la adaptación a las variaciones en el aporte de cobre en la dieta se consigue gracias al almacenamiento hepático y la excreción biliar, si bien la proporción de cobre almacenado así como la capacidad de eliminación biliar varía ampliamente según la especie animal. Los rumiantes, especies más vulnerables a la deficiencia e intoxicación de cobre, almacenan los excesos de este micronutriente.

La incapacidad del ovino para la eliminación biliar de cobre explica su mayor vulnerabilidad a padecer procesos de intoxicación crónica frente a otras especies como el porcino donde esta capacidad no es limitada.

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

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

III.2.1.1 Distribución subcelular de cobre y almacenamiento hepático

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

Estudios de fraccionamiento subcelular, llevados a cabo principalmente por técnicas de centrifugación diferencial, consideran que en las células hepáticas el cobre está contenido en cuatro grandes fracciones, desempeñando unas funciones específicas en cada una de ellas:

- Fracción microsomal. Contiene al menos un 10% del cobre total en la célula hepática y representa las fracciones del retículo endoplasmático rugoso, retículo endoplasmático liso, aparato de Golgi y ribosomas. Está involucrada en la nueva síntesis de proteínas que contienen cobre que están siendo transportadas con el fin de su uso o secreción.
- Fracción nuclear. Contiene aproximadamente el 20 % del cobre total hepático en la mayoría de los mamíferos, si bien su contenido exacto es difícil de evaluar puesto que en esta fracción queda además englobado el cobre unido a restos de tejidos y células intactas. Se considera una organela que puede funcionar como un almacén temporal. Está constituido por ácido nucleico y proteínas básicas a las cuales se une el cobre.
- Fracción granular. En la mayor parte de los animales con un estatus adecuado representa el 20% del cobre total. Está compuesta por mitocondrias y lisosomas, éstos últimos con un papel vital para mantener la homeostasis del cobre. El material que no puede ser digerido o preparado para su excreción por el parénquima es almacenado dentro de los lisosomas, organelas que secuestran el exceso de cobre previa excreción biliar.
- Citosol. El sobrenadante final o citosol contiene la mayoría del cobre hepático en los mamíferos adultos. Está asociado en su mayor parte a proteínas específicas metal-afines como las metalotioneínas (principales puntos de almacenamiento temporal de cobre en la célula) aunque en menor medida también a enzimas cobre-dependientes como la superóxido dismutasa.

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

III.2.2 Variaciones en la distribución subcelular de cobre dependientes de la especie animal

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

III.2.3 La edad como agente modificador de la distribución subcelular de cobre en el hígado

La concentración hepática de cobre en la mayoría de las especies de mamíferos va aumentando de forma constante durante el periodo intrauterino, alcanzando un máximo antes o en el momento del nacimiento, y después disminuye hasta alcanzar los niveles encontrados en adultos.

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

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

la mayoría de las especies, a excepción de los rumiantes que presentan una capacidad de síntesis de metalotioneínas muy limitada.

III.2.4 Efecto del estatus del cobre en su distribución subcelular

Ante el acúmulo de cobre en el hígado la distribución subcelular se asemeja a la de los neonatos, en ambos casos el contenido de cobre en las organelas subcelulares y la concentración hepática siguen una función lineal. La capacidad de unión es alta en la fracción granular y nuclear, mientras que en el citosol es limitada; el retículo endoplasmático liso y las proteínas del núcleo son los encargados de mantener la homeostasis del cobre hepático.

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

III.2.5 Influencia materna en el metabolismo fetal del cobre

Salvo la especie ovina la mayoría de los animales neonatos presentan una mayor concentración de cobre en el hígado que los adultos. Gracias al almacén mineral en el hígado fetal, el recién nacido obtiene el cobre necesario para los primeros estadios de vida. Las reservas neonatales se reducen si se produce una restricción del aporte materno, con esto se acelera su depleción posterior.

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

En cuanto a la concentración de cobre en la leche materna se ha observado que, la secreción de este oligoelemento se reduce cuando el aporte dietético es inadecuado, si bien no se incrementa al suplementar cobre en la ración. También es destacable la existencia de diferencias en los niveles de cobre en leche entre especies, mientras que en vaca y cabra son bajos (0,15 mg/1 Cu) la cerda secreta niveles altos (0,75 mg/1 Cu) durante un periodo breve,

posiblemente debido a que se trata de una lactación de una camada grande y de rápido crecimiento.

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

III.3 Proteínas implicadas en el metabolismo del cobre

III.3.1 Ceruloplasmina

La ceruloplasmina, ejerce un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio entre el cobre hepático y extrahepático, al ser la principal proteína transportadora de cobre hepático hacia los tejidos.

Por una parte, el aumento de la concentración hepática de cobre induce la síntesis de ceruloplasmina, lo que permite una mayor redistribución del metal hacia los tejidos periféricos, así como el mantenimiento de los niveles de cobre hepáticos dentro de los límites fisiológicos, si bien es cierto, que por encima de una determinada concentración de cobre en el hígado los niveles de ceruloplasmina alcanzan una fase de meseta.

Por otra parte, como demostraron Campbell y colaboradores, hace más de dos décadas, el transporte de cobre hacia los tejidos está estrictamente relacionada con la liberación de ceruloplasmina por parte del hígado.

La ceruloplasmina se considera como una proteína de fase aguda, con marcadas propiedades antiinflamatorias, así como de protección frente a fenómenos de peroxidación lipídica. Como ejemplos del aumento de ceruloplasmina asociada a procesos inflamatorios podemos citar enfermedades crónicas comunes como la artritis y la enfermedad periodontal.

Se ha podido constatar que las diferencias en la acumulación de cobre a nivel hepático entre terneros de distintas razas puedan deberse, al menos en parte, a una distinta capacidad de redistribución del cobre hepático hacia los tejidos, fundamentalmente en forma de ceruloplasmina.

Varios experimentos han demostrado, además, que la ceruloplasmina en plasma se eleva en respuesta a determinados aumentos patológicos de cobre en el hígado, como por ejemplo en la cirrosis biliar humana, la enfermedad de Wilson y cirrosis biliar primaria. En estos casos, el aumento de la función de la

ceruloplasmina como antioxidante se debe posiblemente al aumento de la producción de metabolitos oxidantes por parte del cobre, entre los que se incluye superperóxido y peróxido de oxígeno (O_2^- y H_2O_2).

III.3.2 Metalotioneínas

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

Las metalotioneínas están mayoritariamente unidas a cobre y zinc en un amplio rango de tejidos y que su síntesis puede ser inducida por la administración de uno de estos metales esenciales, además de por una gran variedad de estímulos fisiológicos, incluyendo el hambre y el estrés.

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

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

No obstante, las grandes diferencias entre especies animales en cuanto a su capacidad de síntesis de metalotioneínas, podrían explicar la diferencia de susceptibilidad a la acumulación de cobre y subsiguiente toxicidad. De hecho la toxicidad por cobre es muy alta en la oveja en las que solamente una pequeña proporción de cobre está ligado de esta forma.

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

tanto a la hora de su síntesis, competencia por los puntos de fijación, como en su degradación.

Estudios experimentales han demostrado que el cadmio y el cobre compiten por los sitios tiol de las metalotioneínas. Las metalotioneínas inducidas por el cadmio se van a unir con más facilidad al cadmio que al cobre. La capacidad de unión a las metalotioneínas va a depender de las concentraciones relativas de cada metal, de manera que si se presentan concentraciones de cadmio relativamente altas en relación a los ratios de cobre hepáticos se facilita el desplazamiento del cobre. Estas relaciones negativas entre el cadmio y el cobre hepático se observaron en ganado vacuno y ovino expuesto experimentalmente a cadmio o que procedía de zonas contaminadas.

La distinta afinidad de varios metales por las metalotioneínas es también importante para comprender como es el ratio de degradación de la proteína en función del contenido del metal. La unión tan sólida de la metalotioneína al cobre se ilustra también por la incapacidad del EDTA para desplazar al cobre de la proteína, mientras que si es capaz de hacerlo en el caso del zinc y en menor medida del cadmio. El tetratiomolibdato (TTM) es extremadamente efectivo en el desplazamiento del cobre de las metalotioneínas, lo cual permite explicar los efectos adversos del molibdeno en el metabolismo del cobre en rumiantes.

III.3.3 Otras proteínas involucradas en el transporte intracelular

Los chaperones de cobre y las cobre ATP-asas son proteínas citosólicas pequeñas, ubicuas, que se encargan de transportar cobre en el citoplasma hacia el lugar de utilización por proteínas dependiente de cobre.

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

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

III.4 Distribución tisular de cobre

Los niveles de cobre en hígado en rumiantes son muy altos si los comparamos con otras especies de monogástricos como los cerdos, caballos e incluso el

hombre. Los rumiantes, especialmente el ganado ovino y a diferencia de otras especies, presentan una capacidad de eliminación biliar limitada, y por ello, cuando el consumo es superior a las necesidades fisiológicas, se produce un almacenamiento continuado de cobre en este órgano hasta alcanzar concentraciones superiores a 600 e incluso 1200 mg/kg. Mientras que el cobre se acumula en el hígado no se produce ninguna alteración patológica, sin embargo cuando se supera su capacidad de almacenamiento, después de periodos de exposición superiores a 6 meses, el cobre se libera a la sangre, provocando una crisis hemolítica que conduce en la mayor parte de los casos a la muerte del animal.

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

Los órganos que más contribuyen al peso de la canal, que son músculo, grasa y hueso, presentan concentraciones de cobre muy bajas. Por este motivo, cuando no se incluye el hígado en la canal, las concentraciones de cobre máximas son relativamente bajas. En general, se indica una cantidad de 1,2 mg/kg de cobre peso fresco para ovejas y 0,8 mg/kg de cobre peso fresco para el bovino. Hemos de señalar además que en la lana del ganado ovino se depositan grandes cantidades de cobre.

En sangre los niveles de cobre también son bajos, aunque reflejan la cantidad de oligoelemento que el animal ingiere, especialmente en los casos donde los niveles en la dieta son altos. Por tanto la sangre es un buen marcador diagnóstico en la intoxicación aguda de cobre.

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

III.5 Excreción biliar

La bilis es la principal vía para la excreción de cobre en mamíferos. En menor medida el cobre también es excretado durante la transpiración y lactación. En casos de obstrucción biliar o en la enfermedad de Wilson se excretan grandes cantidades de cobre por el sistema urinario. La excreción biliar permite por un lado combatir los excesos de cobre en la dieta y además da una opción al reciclaje enterohepático del cobre, hecho de gran importancia en rumiantes si tenemos en cuenta la baja eficacia de absorción a nivel intestinal del cobre procedente de la ración en estas especies animales.

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

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

La velocidad de excreción biliar es muy variable dependiendo de la especie animal. De forma experimental se ha demostrado que terneros a los que se les administra cobre, excretan menos de un 4 % del total infundido en los tres días siguientes a la administración, mientras que en cerdos se alcanzan cifras del 80-90%.

Estas bajas concentraciones de cobre en la excreción biliar, explican la enorme susceptibilidad de los rumiantes a padecer procesos de intoxicación crónica de cobre en comparación con los cerdos. Aunque el ganado vacuno puede trasladar por vía intravenosa el cobre infundido de la circulación sistémica al hígado más rápidamente que los cerdos, sin embargo no es capaz de excretarlo vía biliar; en contraste, los cerdos trasladan el cobre infundido más lentamente del plasma, pero son capaces de excretar casi todo el cobre infundido a bilis en un periodo de 3 días.

En vacas aproximadamente el 95% del cobre infundido es aclarado rápidamente del plasma, excretando pequeñas cantidades en orina y bilis; esta pérdida de cobre por la bilis parece estar determinada la por las concentraciones hepáticas de cobre, no estando influida de forma significativa por las distintas concentraciones de cobre que el ganado vacuno reciba a través de la dieta.

IV. FUNCIONES DEL COBRE

Hace casi un siglo que se conoce la necesidad de que el cobre se encuentre en la dieta de los mamíferos, así como la existencia de patologías asociadas tanto a su deficiencia, entre las que podemos destacar por su importancia la anemia,

depresión del crecimiento, diarrea severa, cambios en la coloración del pelo o de la lana (acromotriquia), ataxia neonatal, alteraciones en el crecimiento con presencia de huesos largos, débiles y frágiles, infertilidad temporal e insuficiencia cardíaca, y que afectan fundamentalmente a los rumiantes en pasto, como a su toxicidad por una exposición excesiva.

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

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

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

A continuación citamos las principales enzimas dependientes de cobre presentes en los tejidos de mamíferos (Tomado de Frieden, 1986).

- Citocromo-c-oxidasa (CCO): localizada en la membrana mitocondrial interna. Participa en el transporte electrónico. La falta de esta enzima desencadena una deficiente producción energética, conducción nerviosa y fallo respiratorio.
- Superoxido dismutasa (SOD): localizada en citoplasma de cerebro, hígado, corazón y eritrocitos. Actúa en la dismutación de radicales superóxido, y su déficit desencadena degeneración del SNC y convulsiones.
- Tirosinasa: localizada en los melanocitos del ojo y de la piel, participa en la producción de melanina y su déficit desencadena despigmentación cutánea.
- Dopamina- β -hidroxilasa: está presente en el plasma y médula adrenal y participa en la producción de catecolaminas. La falta de esta enzima desencadena desequilibrio en el centro hipotalámico, hipotermia, anorexia, fallo respiratorio, somnolencia, deshidratación y ataxia.
- Amino-oxidasa: está presente en plasma, cerebro, pulmón, riñón, intestino, placenta, y participa en la oxidación de mono-, di- y poliaminas. El déficit produce aumento de los niveles de histamina y consecuentemente urticaria.

- Lisil-oxidasa: presente en el cartílago, hueso y sangre, participa en la formación de colágeno y elastina. El déficit de esta enzima provoca alteraciones en el tejido conectivo, ruptura vascular, anormalidades óseas, etc.

- Ceruloplasmina: está presente en el plasma. Participa en el transporte de cobre y movilización de hierro y antioxidantes. Los bajos niveles de esta enzima provocan anemia.

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

IV.1 Eritropoyesis

La sangre es uno de los tejidos diana del cobre ya que este metal está fuertemente involucrado en los procesos de síntesis de la médula ósea. La anemia se desarrolla cuando los niveles de cobre se reducen a 0,095-0,190 mg/dl no siendo posible mantener la hematopoyesis normal.

Aunque no está totalmente esclarecido el papel del cobre en la hematopoyesis, y por tanto la patogenia de la deficiencia del mismo, todo parece indicar que en vacuno y ovino se trata de una anemia hipocrómica y macrocítica a diferencia de lo que ocurre en otras especies.

Aunque en un principio se sostuvo la idea de que el metabolismo del hierro agrava la deficiencia de cobre en los animales, hay evidencias de que en algunas especies el efecto eritropoyético no se relaciona con la síntesis de hemoglobina.

Se han propuesto numerosos mecanismos de participación del cobre en la hematopoyesis:

- En animales con un estatus normal de cobre, la alta actividad de la enzima citocromo-c-oxidasa en la médula ósea está totalmente asociada a la hematopoyesis, mientras que en animales cobre-deficientes esta enzima está seriamente disminuida hasta un nivel que afecta la hematopoyesis; en los eritroblastos de los animales cobre deficientes las mitocondrias están ampliadas pudiendo presentar una estructura espiral o apilada.

- La ceruloplasmina es esencial para la promoción de saturación de hierro de la transferrina y en su utilización en la médula ósea. En animales cobre deficientes la actividad plasmática de ceruloplasmina está disminuida de forma marcada, mientras que en animales con un estatus de cobre dentro de la normalidad su actividad es mayor a la mínima requerida para la máxima movilización de hierro. Parece ser que los defectos de movilización de hierro tan sólo se detectan en procesos de deficiencia de cobre largos y severos, cuando la ceruloplasmina disminuye intensamente, de ahí que la anemia pueda ser un signo tardío de deficiencia de cobre.

- Junto con los efectos en la síntesis de hemoglobina, la disminución severa de la actividad de la citocromo-c-oxidasa en animales deficientes afecta a la síntesis de fosfolípidos y retrasa la maduración de los glóbulos rojos.

- En cerdos con deficiencia de cobre el tiempo de supervivencia en la circulación de los glóbulos rojos es bastante más corto de lo normal y se atribuye al daño provocado por la peroxidación en las membranas de los glóbulos rojos por el anión superóxido, además de la disminución del enzima superóxido-dismutasa. Finalmente, señalar que se han observado cuerpos de Heinz dentro de los eritrocitos en corderos deficientes de cobre.

IV.2 Protección frente a oxidantes

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

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

IV.3 Desarrollo cardíaco

Se han registrado casos de cardiomegalia en ganado vacuno tras sufrir episodios de deficiencia de cobre, ya que la disminución de la actividad de la citocromo-c-oxidasa en el miocardio que se produce en la depleción de cobre se acompaña de cambios morfológicos con un agrandamiento del corazón.

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

Los estudios histoquímicos llevados a cabo para evaluar la posibilidad de una adaptación de las mitocondrias ante situaciones de déficit de cobre, mostraron que mientras se producía la disminución de la actividad citocromo-c-oxidasa aumentaban otras enzimas oxidativas mitocondriales. Por ello, se sugirió que el agrandamiento del miocardio junto con el incremento en la actividad enzimática se podría explicar por el aumento de las mitocondrias; de forma alternativa, los mecanismos oxidativos para la producción energética podrían también estar aumentado por el uso de vías glucolíticas que son menos eficientes.

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

La cronicidad con la que aparecen las lesiones en ganado vacuno contrasta con el carácter severo y agudo de las deficiencias de cobre experimentales en cerdos, donde el corazón presenta un aspecto pálido y friable.

IV.4 Desarrollo de los vasos sanguíneos

El cobre ejerce un papel esencial en la formación de los vasos sanguíneos a través de la metaloenzima lisil-oxidasa, una de las lesiones registradas con más frecuencia y de mayor importancia en la deficiencia del mismo es la formación defectuosa de los tejidos elásticos debido a la falta de dicha enzima. Como consecuencia de esta falta de actividad de la lisil-oxidasa, los enlaces de los residuos de lisina resultan dañados y el tejido elástico sufre fallos estructurales por la supresión de la síntesis de elastina, de hecho los test mecánicos realizados en segmentos aislados de aorta muestran que las fuerzas tensionales están disminuidas.

En numerosas especies animales la debilidad progresiva de las paredes arteriales conlleva la aparición de aneurismas y muerte repentina por la rotura de las arterias principales, sin embargo, ni la fragmentación del tejido elástico ni la ruptura de la aorta han sido observados en ganado vacuno y ovino con deficiencia de cobre, si bien en vacuno se han constatado cambios en el tejido elástico del ligamento nuchal.

IV.5 Desarrollo óseo

El cobre ejerce una función importante en el desarrollo óseo a través de la enzima lisil-oxidasa, encargada del entrecruzamiento de las fibras de colágeno y elastina, puesto que la mineralización del colágeno es un importante paso en la fase temprana del desarrollo óseo, siendo para ello fundamental el correcto establecimiento de los enlaces de colágeno.

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

Es frecuente durante el periodo de crecimiento en el ganado vacuno con deficiencia de cobre que se manifieste un ensanchamiento de las epífisis en los huesos de las extremidades posteriores.

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

IV.6 Desarrollo del sistema nervioso central

Estudios experimentales enfocados hacia el estudio de la deficiencia de cobre en corderos se contraponen a las teorías de la patogenia del estado atáxico conocido como "ataxia neonatal" o "ataxia enzoótica", que es uno de los primeros trastornos reconocidos de la deficiencia de cobre. Por un lado se piensa que la lesión primaria se localiza en las neuronas con una degeneración secundaria de mielina y por el otro que la aplasia de la mielina cobra una mayor importancia. En cuanto a la deficiencia de citocromo-c-oxidasa descrita en este tipo de procesos, hay investigadores que afirman que esta enzima es necesaria para mantener la integridad neuronal y axonal, mientras que otros defienden su papel en el mantenimiento de la síntesis de fosfolípidos; la dificultad desde el punto de vista temporal y anatómico para realizar estudios en los tractos nerviosos prolongan esta falta de acuerdo, es más, se ha visto que pueden ocurrir lesiones en la materia blanca y gris en animales normales bajo el punto de vista clínico. También se observaron descensos de otras enzimas dependientes de cobre, como el peptidil- α -amidomonooxigenasa (PAM) en el cerebro de ratas recién nacidas de madres deficientes en cobre, ya que del cobre dependen numerosas moléculas biogénicas como las hormonas reguladoras del apetito gastrina y colecistoquinina.

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

núcleo rojo del cerebro, así como del contenido en cobre, en la ataxia neonatal tardía.

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

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

IV.7 Cambios en el tejido elástico

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

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

También se ha descrito el proceso de elastogénesis del ligamento nucal en vacas, que provoca una dislocación de la escápula que causa una “joroba” mientras baja la cabeza, estando relacionado con el alto nivel de la actividad celular en animales cobre-deficientes.

IV.8 Pigmentación

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

La despigmentación suele ser el síntoma clínico más precoz de la deficiencia de cobre en todas las especies animales de capa pigmentada. Así, la falta de pigmentación en la lana de ovejas negras y la formación de pelo gris en ganado vacuno, especialmente alrededor de los ojos, puede ya aparecer con niveles marginales de cobre en la dieta, pero suficientes para evitar la aparición de otros síntomas de deficiencia. En las ovejas, el proceso de pigmentación es tan sensible a cambios en la ingestión de este oligoelemento que se pueden encontrar bandas de fibras de lana despigmentadas alternadas con pigmentadas, según se retire o añada cobre a la ración.

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

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

IV.9 Inmunocompetencia

El cobre juega un papel esencial en el funcionamiento normal del sistema inmune de los rumiantes. El cobre juega un papel muy importante en la función efectiva de los linfocitos B, T y los neutrófilos, macrófagos y función del complemento.

Se ha comprobado la relación entre la susceptibilidad a la infección y la deficiencia de cobre, ya que los animales deficientes en cobre eran más susceptibles a padecer infecciones específicas (*Salmonella typhimurium* y *Pasteurella haemolyticum*); la debilidad se sitúa en los leucocitos del complejo inmune, la alteración de sus funciones está asociada a la deficiencia de superóxido-dismutasa, que es una enzima que contiene cobre y que posee actividad bactericida. Esta susceptibilidad es tan temprana en la vida de la oveja que la inhabilita para conferir inmunidad pasiva a sus crías vía calostro, de hecho se ha observado que la mortalidad perinatal también está aumentada en

rebaños que presentan deficiencias de cobre, si bien disminuye cuando se añaden suplementos de cobre al final de la gestación.

Sin embargo, en vacas jóvenes con una deficiencia de cobre inducida por molibdeno, las respuestas febriles a infecciones experimentales de tipo viral se mantuvieron inalteradas o no estuvieron relacionadas con el contenido de cobre.

IV.10 Nuevas implicaciones del cobre en el sistema nervioso

Estudios recientes sitúan al cobre, junto con otros oligoelementos como el manganeso, en la etiología de importantes patologías nerviosas, entre ellas la Encefalopatía espongiiforme transmisible bovina o la Enfermedad de Alzheimer.

El metabolismo del cobre está regulado por finísimos mecanismos de control homeostáticos, como indica el hecho de que la concentración de cobre libre a nivel citoplasmático es inferior a 10^{-18} M. Estos sistemas de regulación están integrados por numerosas proteínas situadas a varios niveles biológicos como membranas citoplasmáticas, organelas o citosol. Entre ellas podemos nombrar a una nueva familia de chaperones solubles con la función de distribuir eficazmente el tráfico intracelular de los iones de cobre; estos chaperones se encargan de hacer llegar iones de cobre a diferentes proteínas que necesitan este oligoelemento para obtener la máxima actividad enzimática, entre ellas la citocromo oxidasa en la membrana mitocondrial o la superóxido dismutasa en el citosol. En particular, la superóxido dismutasa, cobre y zinc dependiente, actúa limitando la reactividad oxidativa de ciertos radicales libres, catalizando la dismutación de superóxidos a productos intermediarios menos reactivos y por lo tanto regulando el estatus redox de las células, lo que obviamente tiene un impacto significativo en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas.

Entre las proteínas relacionadas con las enfermedades neurodegenerativas se han descrito dos proteínas que ligan cobre: la proteína precursora de amiloide (PPA) relacionada con la enfermedad de Alzheimer (AD) y la Proteína priónica (PrP) relacionada con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Aunque todavía no se conocen en detalle los mecanismos fisiopatológicos involucrados, se cree que estas proteínas participan en el transporte de cobre desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula. Bajo ciertas circunstancias todavía no bien establecidas, estas proteínas podrían ganar actividad prooxidativa debido a una incorrecta adquisición de cobre, lo que explicaría algunos aspectos relacionados con el daño oxidativo que aparece en estas enfermedades neurodegenerativas.

En la patogenia de esta enfermedad podrían también ocupar un papel destacado las metalotioneínas. Así, en un estudio llevado a cabo por Hanlon y colaboradores en el 2002 se compararon animales con encefalopatía espongiiforme bovina, animales con otra enfermedad neurológica distinta y animales clínicamente sanos, se encontró que al igual que en estudios anteriores

ocurría un aumento en la inmuno-reactividad de las metalotioneínas I/II en los tejidos medulares del sistema cerebral de los animales afectados por encefalopatía espongiiforme bovina, indicando que estas proteínas podrían jugar un papel todavía sin identificar en la respuesta a la infección por priones.

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

V INTOXICACIÓN POR COBRE EN RUMIANTES

Dentro de la intoxicación por cobre en rumiantes debemos distinguir dos tipos, la *forma aguda*, bastante infrecuente, debido a la ingestión de concentraciones anormalmente altas de cobre en un espacio de tiempo breve, y la *forma crónica*, la más frecuente, que se debe a la acumulación de cobre en el hígado en concentraciones muy elevadas, y cuya etiología se relaciona en la mayoría de los casos con niveles de cobre en la dieta no necesariamente muy elevados pero sí por encima de las necesidades nutricionales durante periodos de tiempo prolongados.

Las diferencias de tolerancia a niveles altos de cobre en la dieta entre rumiantes y no rumiantes pueden relacionarse también, en gran parte, con el metabolismo del azufre, así como con diferencias en los niveles en la dieta de azufre, molibdeno, zinc, hierro y selenio.

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

Cuando la vía de exposición es la oral el cuadro clínico que muestra el animal es de una gastroenteritis aguda con dolor abdominal, diarrea y en ocasiones muerte. La intoxicación aguda por una dosis oral única de cobre se produce a una concentración de 20-50 mg/kg materia seca en corderos, 130 mg/kg en ovejas y 200 mg/kg en vacas.

La inyección parenteral de dosis elevadas de cobre también puede causar una intoxicación en todas las especies de rumiantes. Las dosis necesarias pueden ser variables dependiendo de la especie animal, tipo de compuesto y vía de administración. A modo orientativo podríamos hablar de 10-50 mg/kg del

complejo CuCa EDTA en ovejas y 50-300 mg de sulfato de cobre pentahidratado en vacuno administrado subcutáneamente.

En casos de intoxicación aguda por cobre en ganado ovino, la muerte suele ocurrir antes de 3 días después de la inyección, aunque en vacuno pueden tardar 12 días.

Los animales comienzan a sentirse débiles y letárgicos y muestran una coloración amarilla de las mucosas. Es frecuente encontrar hemólisis y hemoglobinuria, así como una elevación importante de las enzimas hepáticas como la sorbitol deshidrogenasa.

El examen postmortem de los animales revela la existencia de lesiones hemorrágicas (petequias y equimosis) en las serosas y un exceso de fluido en las cavidades corporales, congestión y edema pulmonar; el hígado se muestra aumentado de tamaño, congestionado y hemorrágico. Si se ha producido hemólisis la orina muestra un color rojo oscuro.

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

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

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

V.1 Intoxicación crónica

Es la forma más común de intoxicación por cobre y se debe a la ingestión repetida del metal por encima de la capacidad del animal para excretarlo vía biliar, si bien las dosis con las que se relaciona no están muy por encima de los requerimientos corporales.

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

V.1.1 Etiopatogenia

El ganado criado en régimen intensivo es el más susceptible a padecer intoxicación crónica por cobre, si bien también se detectan episodios de toxicidad en animales que pastan.

Existen 3 circunstancias principales que inducen toxicidad:

(1) La ingesta alta de cobre junto con unos niveles adecuados o bajos de molibdeno, (2) cuando la dieta contiene bajos niveles de molibdeno pero los niveles de cobre son de normales a elevados y (3) la ingestión de plantas hepatotóxicas.

En la mayor parte de las ocasiones el exceso de cobre tiene su origen en la propia dieta, bien por un contenido alto de cobre en los forrajes, bien (lo más frecuente) asociado al empleo durante periodos de tiempo largos de suplementos minerales por encima de las necesidades del animal.

En otras ocasiones, sin embargo, la suplementación de cobre puede ser adecuada (o al menos estar dentro de los límites que marca la legislación para suplementos animales) y la susceptibilidad a la intoxicación podría estar ligada a ciertos factores estresantes o a la deficiencia de otros oligoelementos en la dieta, como por ejemplo el molibdeno y selenio.

La intoxicación por cobre suele ser más frecuentes en animales jóvenes debido a su menor capacidad de metabolización del metal. Existen numerosos ejemplos que describen la intoxicación crónica en terneros alimentados con lactorreemplazantes, que por un error en la formulación contenía niveles de cobre entre 120 y 159 mg/kg materia seca; la intoxicación iatrogénica en terneros neonatos debido a la administración de bolos de óxido de cobre o la intoxicación en terneros de entre 2 y 4 meses de edad debido al empleo de antihelmínticos que contenían cobre.

La intoxicación crónica en vacuno se puede producir además por la contaminación de los pastos por residuos de minería o emisiones industriales y basura, o por el empleo de purines de cerdo ricos en cobre en los pastos destinados al ganado.

Se considera que la susceptibilidad de esta especie se asocia con la incapacidad de acumular el exceso de cobre en las metalotioneinas en el hígado, lo que limita su capacidad de excreción biliar. Cuando se supera la capacidad de almacenamiento en el hígado sobreviene una crisis hemolítica que termina en muchos casos con la muerte del animal.

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

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

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

Aunque no se conoce en detalle el mecanismo de necrosis hepática en animales que presentan una acumulación de cobre en el hígado, se ha sugerido que el exceso de acumulación de cobre conlleva la ruptura de las membranas lisosomales, dando lugar a una filtración de hidrolasas ácidas en el citoplasma y la destrucción de las células hepáticas. Lindquist (1968) sugiere que la ruptura lisosómica ocurriría por oxidación catalítica de la membrana lipídica, que se podría iniciar por la acción directa del cobre con oxígeno formándose radicales libres. Pero es también posible que la acumulación de cobre en la fracción nuclear desestabilice el ADN e inhiba la actividad de la RNA polimerasa, dando

lugar a una desorganización y la consecuente muerte de la célula. El aumento de iones de cobre libres en el citosol podría afectar a la actividad enzimática de los microsomas, causando la peroxidación lipídica de las membranas y la degeneración y necrosis de las células.

V.1.2 Manifestaciones clínicas

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

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

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

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

V.1.3 Cambios en hígado

Dentro de los lóbulos hepáticos los hepatocitos muestran un gran número de lisosomas cargados de cobre, se presume que la carga excesiva precede a la muerte individual de los mismos. Durante el periodo prehemolítico se ha demostrado mediante estudios morfométricos un gran aumento en el número de lisosomas que acumulan más cobre, aumentan en tamaño y presumiblemente en peso. A nivel ultraestructural, muchos hepatocitos muestran un aumento marcado en número, tamaño y densidad de los lisosomas que eran normales en otras situaciones. Algunos de estos lisosomas mostraron interrupciones focales de sus membranas, lo que se asocia a liberación de material granular.

V.1.4 Cambios en sangre

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

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

V.1.5 Cambios en el riñón

Durante la fase pre-hemolítica el metal se acumula sin que el riñón pierda su función y presenta únicamente mínimos daños estructurales.

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

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

V.2 Problemas subclínicos de la acumulación de cobre en rumiantes

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

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

La toxicidad subclínica de cobre es un tema de gran relevancia, puesto que estudios de monitorización del estatus de cobre llevados a cabo en diversos países ponen de manifiesto que un porcentaje relativamente alto de animales presenta niveles de cobre por encima de los límites fisiológicos, lo que indica un riesgo potencial de toxicidad.

VI PARÁMETROS PARA VALORAR EL ESTATUS DE COBRE

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

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

VI.1 Diagnóstico de la intoxicación por cobre

A la hora de realizar el diagnóstico de la intoxicación por cobre debemos de tener en cuenta además de las características clínicas del animal, la historia de exposición al metal, la predisposición genética, los cambios morfológicos y bioquímicos y el análisis del contenido de cobre en la dieta, tejidos y sangre. El

no considerar en conjunto todos estos datos puede hacer que el diagnóstico resulte dificultoso.

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

VI.1.1 Cobre dietético y sus antagonistas

La determinación de las concentraciones de cobre en la ración o en los pastos no tiene valor diagnóstico, a no ser que se determinen también otros elementos que interaccionan con él. En este sentido, la determinación de las concentraciones de molibdeno es uno de los criterios más usados para diagnosticar la deficiencia secundaria de cobre y predecir su riesgo según un cociente Cu:Mo determinado. A pesar de conocerse el efecto de la relación Cu:Mo sobre las deficiencias o toxicidades del cobre, no se sabe donde está el límite crítico de este cociente. Para algunos investigadores un cociente Cu:Mo dietético inferior a 2:1 puede condicionar una deficiencia de cobre en el ganado vacuno, mientras que otros consideran que es necesario un cociente de casi 4:1 para evitar ataxia neonatal en ovejas.

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

VI.1.2 Cobre en hígado

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

Al igual que sucedía con los niveles de cobre en hígado indicativos de deficiencia, los niveles de residuo asociados con toxicidad no están claramente establecidos. Aunque de forma tradicional se establecía un umbral de toxicidad para el ganado vacuno en 250 mg/kg peso fresco, de forma reciente se han descrito casos de intoxicación crónica en animales donde los niveles de cobre

exceden los 150 mg/kg. Así por ejemplo, en un estudio de inducción experimental de intoxicación por cobre en vacuno adulto se observaron signos clínicos de intoxicación en los animales con una concentración media de cobre en el hígado de 152 ± 56.6 (rango: 69-194) mg/kg.

En nuestra opinión la determinación de la concentración de cobre en biopsias hepáticas *in vivo* es un procedimiento adecuado para evaluar la acumulación hepática de este metal en rumiantes.

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

VI.1.3 Cobre en sangre

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

VI.1.4 Cobre plasmático y sérico

La concentración de cobre en plasma o suero es uno de los parámetros más utilizados para establecer el estatus de cobre en un animal; a ello contribuye el que se trate de una muestra fácil de recoger y que pueda ser procesada de forma rutinaria por muchos laboratorios.

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

En muestras de animales adultos debemos tener en cuenta que los valores en suero son entre un 10-20% inferiores a los correspondientes en plasma y esto es debido a que parte del contenido en ceruloplasmina se pierde con la coagulación. Para convertir valores de cobre en suero a plasma se multiplica por 1,200 y se resta 0,032.

Las enfermedades infecciosas y otros factores que estimulan el sistema inmune, especialmente la vacunación, aumentan sustancialmente los niveles de cobre en sangre, puesto que inducen la síntesis de ceruloplasmina, incluso en animales inicialmente hipocuprémicos; esta falta de especificidad probablemente haya contribuido al escaso interés del cobre sérico como ayuda diagnóstica en

comparación con el cobre hepático. Sin embargo, determinar la hipocupremia es una ayuda importante para el diagnóstico ya que es un indicativo de que las reservas hepáticas están agotadas, y que por tanto puede verse comprometida la síntesis de ceruloplasmina, principal transportador de cobre a los tejidos.

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

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

Al igual que sucede con los niveles de cobre en hígado, no es fácil establecer un umbral indicativo de deficiencia para los niveles de cobre en plasma, puesto que como hemos indicado, va a verse condicionado por distintos factores, entre ellos los que estimulan la síntesis de ceruloplasmina. En general se admite que niveles de cobre en plasma que permanecen por debajo de 0,5 mg/l pueden ser indicativos de deficiencia. No obstante, tanto en ganado vacuno como en ovino con manifestaciones clínicas de deficiencia de cobre suelen encontrarse concentraciones plasmáticas entre 0,2-0,3 mg/l.

VI.1.5 Cobre en riñón

La determinación de los niveles de cobre en riñón presenta importancia para confirmar el diagnóstico de intoxicación en los animales que muestren niveles de cobre próximos al umbral de toxicidad. Si bien las concentraciones renales de cobre permanecen próximas a la normalidad (4-6 mg/kg peso fresco; durante la fase de almacenamiento, una vez que ésta se satura y se produce la crisis hemolítica, una gran parte del cobre liberado pasa al riñón donde se acumula. Así, en un estudio sobre el diagnóstico de la intoxicación de cobre en terneros, se registraron valores en hígado y riñón de 36-166 mg/kg y 22-35 mg/kg respectivamente, lo que llevó a los autores a concluir que concentraciones de cobre renales elevadas confirman el diagnóstico provisional de intoxicación, mientras que las concentraciones normales hepáticas eran la consecuencia de la previa liberación del cobre almacenado en los lisosomas hacia la circulación periférica.

Además, junto con los niveles de cobre es importante considerar las concentraciones renales de hierro, que permanecerán normales o ligeramente

elevadas antes de la crisis hemolítica mientras que estarán muy aumentadas durante y después de la fase hemolítica.

VI.1.6 Ceruloplasmina

La actividad de la ceruloplasmina, el principal exportador de cobre hepático hacia los tejidos, se considera un buen indicador del estatus de cobre en vacuno. Así, si las concentraciones de cobre caen por debajo de 0,3 mg/l en sangre y 40 mg/kg en el hígado, la actividad de ceruloplasmina estará significativamente disminuida.

Es reconocida la importante ventaja de la ceruloplasmina, ya que es mucho más precisa que la concentración de cobre en sangre para identificar problemas de deficiencia de cobre ligados a un exceso de molibdeno en la dieta, debido a que cuantifica únicamente el cobre fisiológicamente disponible.

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

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

VI.1.7 Cu-Zn-Superóxido dismutasa (SOD)

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

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

Debe tenerse en cuenta que las unidades convencionales de medida no son cuantitativas, utilizando como unidad la actividad necesaria para alterar en un 50% la tasa de "superoxidación". Como las tasas de superperoxidación varían según el método, la equivalencia molecular de SOD de una unidad también

varía. Además, los glóbulos rojos deben lavarse para eliminar los inhibidores plasmáticos y diluirse para minimizar la interferencia de los constituyentes de los hematíes, incluyendo probablemente la hemoglobina. Se han propuesto intervalos específicos para ensayos particulares. Gracias a que la actividad de SOD está correlacionada de forma importante con el cobre eritrocitario, la medición del cobre en los glóbulos rojos sería más útil y menos problemática.

VI.1.8 Biomarcadores de acumulación hepática de cobre

En la actualidad, los medios diagnósticos disponibles para la identificación de los animales que sufren una intoxicación por cobre son únicamente válidos para la fase clínica de la enfermedad, en la que ha acontecido un importante daño orgánico.

Hay por tanto una clara necesidad de identificar nuevos marcadores sensibles a cambios tempranos, con la capacidad de predecir riesgo de acumulación de cobre a nivel hepático, antes de que aparezcan las alteraciones funcionales características de la intoxicación crónica de cobre.

En un intento por encontrar marcadores potenciales de la exposición a niveles elevados de cobre, y teniendo en cuenta que la ceruloplasmina, principal componente del cobre en la sangre, puede verse afectada por multitud de factores a parte de la exposición a cobre, la fracción no-ceruloplasmina (como un valor calculado) se ha usado de forma reciente como marcador de exposición a cobre en la especie humana. Así, se ha demostrado que la fracción no-ceruloplasmina de cobre en el suero está positivamente correlacionada con los niveles de cobre en el suero, tanto en pacientes que reciben niveles altos de cobre en la dieta como en aquellos que presentan alteraciones en el metabolismo del cobre que dan lugar a altos depósitos de cobre en el hígado (como por ejemplo en la enfermedad de Wilson o en otras formas de cirrosis en niños).

El ratio actividad ceruloplasmina frente al cobre sérico también se ha empleado como herramienta en el diagnóstico de deficiencia de cobre en rumiantes, permitiendo incluso valorar la interferencia de niveles elevados de molibdeno sobre el estatus de cobre. No obstante se desconoce la utilidad de este parámetro como posible indicador de la acumulación de cobre en rumiantes.

Finalmente, señalar que nuevos estudios realizados en medicina humana apuntan la posibilidad del empleo de ciertas proteínas eritrocitarias como marcadores de exposición a niveles elevados de cobre, basándose en el hecho de que el cobre es capaz de fijarse con una gran afinidad a ciertas proteínas presentes en los eritrocitos.

VI.1.9 Enzimas marcadoras de daño hepático

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

Se han realizado numerosas investigaciones con el fin de identificar cuáles son los indicadores bioquímicos más adecuados para el diagnóstico de intoxicación por cobre en rumiantes. Entre ellas las más empleadas han sido la aspartato-aminotransferasa que se libera normalmente en respuesta a cambios en la permeabilidad hepatocelular, daño subletal y necrosis; y la gamma-glutamyl-transferasa que está asociada con membranas microsomales y se suele liberar durante la necrosis celular letal. También se han empleado otras enzimas específicas hepáticas como la arginasa, sorbitol deshidrogenasa y la glutamato deshidrogenasa además de enzimas lisosomales como la fosfatasa ácida.

Los resultados de estos estudios son bastante inconsistentes, tanto en lo relacionado a la sensibilidad de los parámetros como en la correlación existente entre el daño hepático y la magnitud en la elevación de sus niveles plasmáticos. Algunos estudios muestran que las actividades de las enzimas tan sólo se elevan al comienzo de la crisis hemolítica, por lo tanto no son realmente técnicas diagnósticas válidas. Además la correlación entre la actividad sérica de la enzima aspartato-aminotransferasa y la manifestación clínica de la insuficiencia hepática es pobre.

VI.1.10 Hematología

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

VI.1.11 Cobre en lana y pelo

Las concentraciones de cobre en lana y pelo, tanto en ovejas como en ganado vacuno respectivamente, tienen un valor relativo como ayuda diagnóstica. Pueden reflejar una ingestión de cobre subóptima, lo que se vería con el deterioro de la capa del animal. A la hora de la interpretación diagnóstica no se debe olvidar que otras deficiencias nutritivas también pueden influir en el crecimiento del pelo y de la lana.

VI.2 Hallazgos de necropsia

En los animales que mueren durante la fase hemolítica se constata la presencia de una ictericia generalizada y líquido seroso en las cavidades; el hígado

presenta un aspecto friable y un color anaranjado o amarillento; los riñones muestran un color marrón-oscuro, presentan aspecto edematoso y consecuentemente consistencia disminuida; la orina es de color café o rojo oscuro.

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

Para finalizar, podemos decir de los rumiantes que al ser tan susceptibles a la deficiencia de cobre (debido a la baja disponibilidad y contenido del mismo en los pastos) hace que hayan evolucionado hacia un "ahorro" o acumulación a nivel hepático (a través de una baja capacidad de eliminación biliar) lo que los predispone a su vez a sufrir procesos de intoxicación crónica

El metabolismo del cobre en rumiantes es muy complejo, debido fundamentalmente a las interacciones que presenta con otros elementos como el azufre y molibdeno, pero también el zinc y hierro. Esto hace que no sea posible establecer unos requerimientos nutricionales únicos (deben de tenerse en cuenta el conjunto de la dieta) y que los riesgos de deficiencia y sobre todo intoxicación crónica sean importantes.

Aunque se ha avanzado mucho en los últimos años en el metabolismo de cobre en rumiantes, identificando proteínas transportadoras a nivel celular así como su implicación en ciertas enfermedades nerviosas o degenerativas, todavía quedan muchas incógnitas por resolver en la excreción biliar de este elemento, donde el componente racial puede ser un punto importante en la susceptibilidad de ciertos rebaños a sufrir procesos de intoxicación crónica.

He dicho.