Reproducción experimental de la deficiencia de cobre en bovinos mediante el empleo de altos niveles de molibdeno y sulfato en la dieta

Experimental copper deficiency in bovines induced by high molibdenum and sulphur levels in the diet

Minatel[1], L., Underwood[1], S.C., Postma[1], G.C., Dallorso[2], M.E. y Carfagnini[1], J.C.
Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Área de Patología
Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Facultad de Ciencias Agrarias

Resumen
El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo experimental que reprodujera la deficiencia de cobre (Cu) en bovinos, empleando altos niveles de molibdeno (Mo) y azufre (S) en la dieta. Se utilizaron 12 terneros machos, con un peso promedio de 68 kg. Los terneros recibieron una dieta base baja en Cu, consistente en grano de maíz partido, harina de pluma, paja de trigo y un núcleo vitamínico-mineral sin Cu. Al cabo de 21 días, los animales fueron divididos en dos grupos: uno de los grupos recibió 9 mg adicionales de Cu/kg MS (grupo +Cu), mientras que al otro grupo se le suministraron 11 mg de Mo/kg MS y S adicional, hasta completar 3 g de S/kg MS (grupo +Mo). Durante el ensayo, que tuvo una duración de 314 días, los animales fueron pesados y se les extrajeron muestras de sangre e hígado periódicamente cada 28 a 35 días. Se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en: peso de los animales, concentración de Cu en hígado, plasma y glóbulos rojos, actividad de la enzima superóxido dismutasa en glóbulos rojos y cantidad de hemoglobina. Tres animales del grupo +Mo presentaron acromotriquia periocular durante el ensayo. Se concluye que el modelo experimental utilizado reprodujo con éxito la deficiencia de Cu en bovinos.
Palabras clave: deficiencia de cobre, reproducción experimental, bovinos.

Summary
The aim of this work was to develop an experimental model to produce copper (Cu) deficiency in bovines, using high molybdenum (Mo) and sulphur (S) levels in the diet. Twelve male calves, averaging 68 kg body weight, were used. Calves were fed a basal low Cu diet consisting of corn grain, feather flour, weat straw, and a mineral and vitamin mix without Cu. After 21 days, animals were allocated in two groups: one group received 9 mg of Cu/kg DM with the diet (+Cu group), while the other group received 11 mg of Mo/kg DM, and enough S to reach 3 g of S/kg DM (+Mo group). During the experiment, covering 314 days, animals were weighed and samples of blood and liver were taken every 28-35 days. Significant differences between groups in live weight,

Recibido: junio 2007
Aceptado: noviembre 2007
1. Área de Patología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Av. San Martín 5285 (1417) Ciudad de Buenos Aires. E-mail: patolbas@fvet.uba.ar
2. Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Facultad de Ciencias Agrarias. Camino de Cintura Km 2 (1836) Llavallol.

liver, plasma, and erythrocyte Cu levels, and superoxide dismutase activity in erytrhocytes were observed. Three calves from +Mo group showed changes in hair pigmentation around the eyes. It is concluded that this experimental model reproduced Cu deficiency in bovines successfully.
Key words: copper deficiency, experimental model, bovines.

Introducción

En 1970, Suttle et al. reprodujeron experimentalmente la deficiencia de cobre (Cu) en ovinos, empleando dietas con bajo contenido de este elemento. Años más tarde, Suttle y Angus (1976) y Mills et al. (1976) lograron reproducirla en bovinos utilizando dietas similares. Experimentos realizados posteriormente por otros investigadores (Humphries et al., 1983; Phillippo et al., 1987) demostraron que la enfermedad también podía ser reproducida en bovinos suplementando la dieta con molibdeno (Mo) y azufre (S). A través de estos modelos se estudió experimentalmente la patogenia de la enfermedad, lo que permitió observar la asociación entre la aparición de diversos signos clínicos y la disfunción de enzimas dependientes de Cu.

En los rumiantes, el Mo y el S son los principales antagonistas del Cu. El S de la dieta es reducido a sulfuro en el rumen, reaccionando con el ion molibdato para formar tiomolibdatos (Suttle, 1974; Dick et al., 1975). Tanto el S elemental como los sulfatos son capaces de generar tiomolibdatos (Lamand, 1989). De acuerdo con Mason et al. (1978), los tiomolibdatos formados en el rumen seguirían dos caminos: formación de compuestos insolubles con el Cu en el rumen o el intestino, o absorción en el tracto gastrointestinal, dependiendo de las cantidades relativas de Cu y tiomolibdatos. Frente a un exceso relativo de Cu, los tiomolibdatos se unirían a este oligoelemento y los complejos así formados serían eliminados con las heces. Frente a un exceso relativo de tiomolibdatos, estos serían absorbidos. Una vez absorbidos, los tiomolibdatos se unen a la albúmina formando complejos Cu-tiomolibdato-albúmina (Mason et al., 1986), disminuyen la actividad de la ceruloplasmina plasmática (Mason et al., 1982) y aumentan la excreción fecal de Cu, presumiblemente a través del aumento de su excreción biliar (Mason et al., 1988).

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo experimental que permitiera reproducir la deficiencia de Cu en bovinos, utilizando altos niveles de Mo y S en la dieta.

Materiales y Métodos

Para esta experiencia se utilizaron 12 terneros macho, 6 de ellos Holando Argentino y 6 cruza Aberdeen Angus x Holando Argentino, deslechados, de aproximadamente 70 días de edad, con un peso promedio de 68 kg. Los terneros provenían de un tambo de la localidad de Navarro (provincia de Buenos Aires), donde habían sido criados en estaca desde los 2 días de edad y alimentados con leche del tambo y alimento iniciador comercial.

Los terneros fueron alojados de a dos en corrales de 3 x 2 m, parcialmente techados y con piso de cemento.

La dieta base consistió en grano de maíz partido (60%), harina de plumas (15%) y rastrojo de trigo (22%), más el agregado de un núcleo vitamínico-mineral (3%) sin Cu, en una cantidad equivalente al 2,5% de su peso vivo en materia seca (MS). Esta dieta base contenía 3,8 mg de Cu/kg MS; 0,4 mg de Mo/kg MS y 1,9 g de S/kg MS.

A los 21 días de ingresados (día 0 del ensayo) los animales fueron divididos en dos grupos, según su peso, raza y concentración de Cu hepático. Uno de los grupos recibió 9 mg adicionales de Cu/kg MS agregados al núcleo vitamínico mineral (grupo +Cu), mientras que al otro grupo se le suministró Mo (como molibdato de sodio) en cantidad suficiente para lograr una relación Cu/Mo en la dieta de 1/3 (11 mg de Mo/kg MS), y S adicional (en la forma de sulfato de sodio) hasta completar 3 g de S/kg MS (grupo +Mo).

Los animales fueron pesados y se les extrajeron muestras de sangre e hígado cada 28 a 35 días, hasta la finalización del ensayo. Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la vena yugular y recogidas en tubos heparinizados. Las muestras de hígado fueron extraídas por biopsia hepática transcutánea (Minatel, 1999).

Las muestras de sangre fueron centrifugadas durante 20 minutos a 3600 rpm para separar el plasma, el cual fue diluido ½ con ácido tricloroacético al 10%, determinándose en el sobrenadante la concentración de Cu por espectrofotometría de absorción atómica (EAA), utilizando un equipo Metrolab 250 AA.

Una vez separado el plasma, se procedió a descartar la capa flogística y se lavaron los glóbulos rojos tres veces con una solución de cloruro de sodio al 0,9%. Estos fueron fraccionados y conservados a -20°C hasta su procesamiento.

Para la determinación de Cu intraeritrocitario, se utilizó 1 ml de glóbulos rojos, a los cuales se le adicionó 1 ml de una solución de sulfato de magnesio (4 mM) en ácido acético (1 mM), y 1 ml de ácido tricloroacético al 10%. Esta mezcla fue centrifugada durante 30 minutos a 3600 rpm, empleándose el sobrenadante para la determinación de Cu por EAA. La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos fue determinada según la técnica descripta por Jones y Suttle (1981), con las modificaciones incorporadas por Xin et al. (1991), utilizando un espectrofotómetro Metrolab UV240. Se empleó como estándar SOD de glóbulos rojos bovinos (Sigma, Saint-Louis, EEUU).

Las muestras de hígado fueron secadas en estufa a 90°C hasta peso constante y digeridas con ácido nítrico/perclórico (a/a). Los residuos minerales fueron resuspendidos en ácido nítrico/perclórico (a/a) al 10% y sobre este extracto se determinó la concentración hepática de Cu por EAA.

La cantidad de hemoglobina en los glóbulos rojos y en una muestra de sangre entera recolectada a los 287 días de comenzado el ensayo fue determinada utilizando un kit comercial (Wiener lab.) y un espectrofotómetro Metrolab UV240.

En la muestra de sangre entera se realizó, además, un recuento de glóbulos rojos mediante un hemocitómetro, y un hematocrito usando tubos capilares heparinizados. Se calcularon los índices hematimétricos volumen corpuscular medio (VCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM).

El peso, las concentraciones de Cu en hígado, plasma y glóbulos rojos y la actividad de la enzima superóxido dismutasa en eritrocitos fueron comparados entre los grupos utilizando un análisis de varianza para muestras repetidas. El hematocrito, la cantidad de glóbulos rojos y de hemoglobina, el VCM y la CHCM fueron comparados mediante un test de T. Para estos análisis se utilizó el programa Statistix for Windows 7.0.

Resultados

El ensayo tuvo una duración de 314 días. Durante la misma, uno de los animales del grupo +Cu fue encontrado muerto a causa de timpanismo (día 131).

En la Figura 1 se observa la evolución del peso de los animales de ambos grupos durante el ensayo (media y desvío estándar). Si bien se observaron diferencias significativas entre los grupos en el análisis de varianza ($p=0,000$), no se encontraron diferencias significativas al analizar cada muestreo por el método de contrastes generales. La ganancia diaria de peso en el grupo +Cu fue de 596,8 ± 55,7 g, mientras que en el grupo +Mo fue de 514,8 ± 47,1 g.

La Figura 2 muestra los niveles de Cu hepático a lo largo del ensayo (media y desvío estándar). Al comenzar el mismo, los valores de Cu en hígado en los grupos +Cu y +Mo fueron de 562,5 ± 78,3 µg/g MS y 523,6 ± 128,5 µg/g MS, respectivamente. Luego de 287 días de ensayo, los valores en el grupo +Cu fueron de 166,4 ± 56,4 µg/g de MS, mientras que los del grupo +Mo fueron de 11,2 ± 2,4 µg/g de MS. Se observaron diferencias significativas entre los grupos ($p=0,000$) a partir de los 56 días.

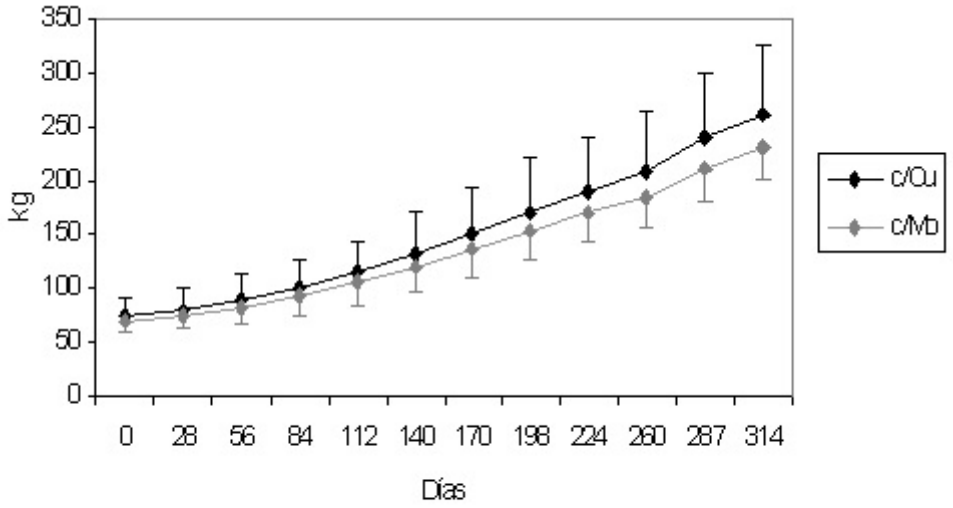

Figura 1: Evolución del peso (media y desvío estándar).
Figure 1: *Changes in live weight (mean and standard deviation).*

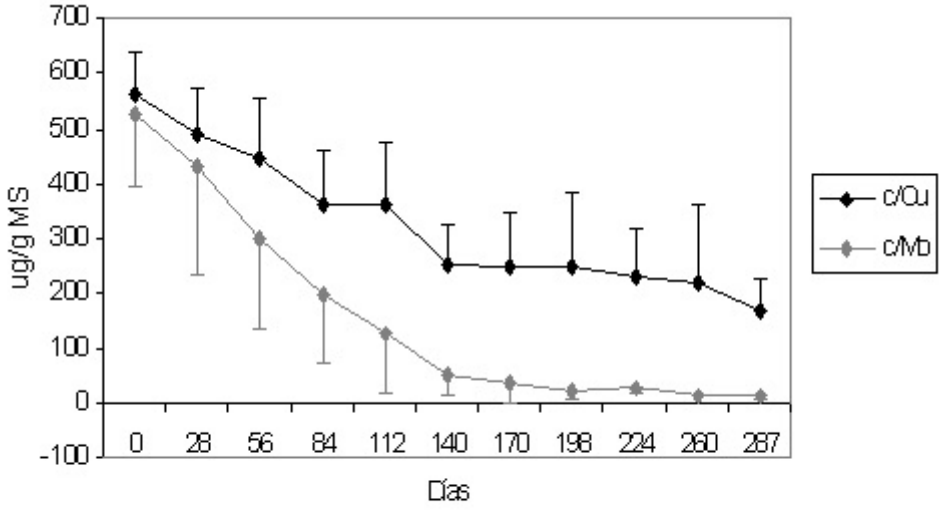

Figura 2: Niveles de cobre hepático (media y desvío estándar).
Figure 2: *Liver copper levels (mean and standard deviation).*

En la Figura 3 se observan los niveles de Cu plasmáticos registrados durante el ensayo (media y desvío estándar). Las concentraciones de Cu en plasma al comienzo del mismo fueron de 91,1 ± 6,6 µg/dl en el grupo +Cu, y de 85,5 ± 6,6 µg/dl en el grupo +Mo. Al finalizar el ensayo, las mismas fueron de 77,8 ± 6,4 µg/dl y 26,1 ± 6,2 µg/dl, respectivamente. Se observaron diferencias estadísticas altamente significativas entre los grupos (p=0,000) a partir de los 140 días de ensayo.

La Figura 4 muestra los niveles de Cu en los glóbulos rojos (media y desvío estándar). Los valores de Cu intraeritrocitario al comienzo del ensayo fueron de 4,54 ± 0,47 µg/g Hb en el grupo +Cu y de 4,5 ± 0,53 µg/g Hb en el grupo +Mo, mientras que al final del ensayo dichos valores fueron de 4,09 ± 0,22 µg/g Hb y 2,94 ± 0,54 µg/g Hb, respectivamente. Se observaron diferencias significativas entre los grupos a partir del día 260 (p=0,000).

La Figura 5 presenta la actividad de la SOD en eritrocitos. La actividad de la enzima al comienzo del ensayo fue de 0,67 ± 0,7 UI/mg Hb en el grupo +Cu, y de 0,73 ± 0,15 UI/mg Hb en el grupo +Mo. Estos valores aumentaron en los meses siguientes para luego comenzar a disminuir, alcanzando al final del ensayo niveles de 0,43 ± 0,7 UI/mg Hb y 0,25 ± 0,1 UI/mg Hb en los grupos +Cu y +Mo, respectivamente. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos a partir del día 224 (p=0,000).

El recuento de glóbulos rojos a los 287 días de ensayo fue de 8,55 x 10 ± 6,5 x 10^5 células/mm^3 en el grupo +Cu, y de 8,3 x 10^6 ± 7,8 x 10^5 células/mm^3 en el grupo +Mo. Los valores de hematocrito fueron de 39,2 ± 2,6 % y 35,4 ± 4 %, mientras que la concentración de hemoglobina fue de 12,5 ± 0,6 g/l y 10,9 ± 1 g/l, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en

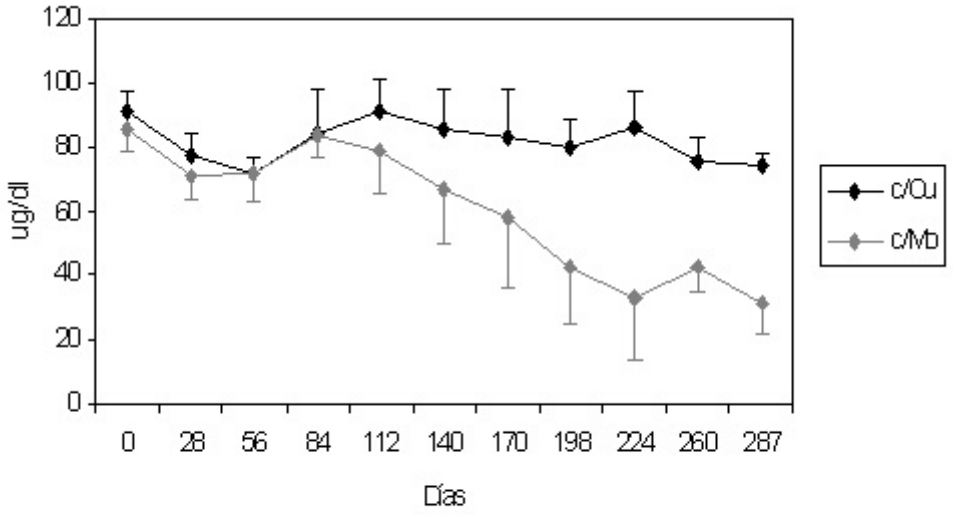

Figura 3: Valores plasmáticos de cobre (media y desvío estándar).
Figure 3: *Plasma copper levels (mean and standard deviation).*

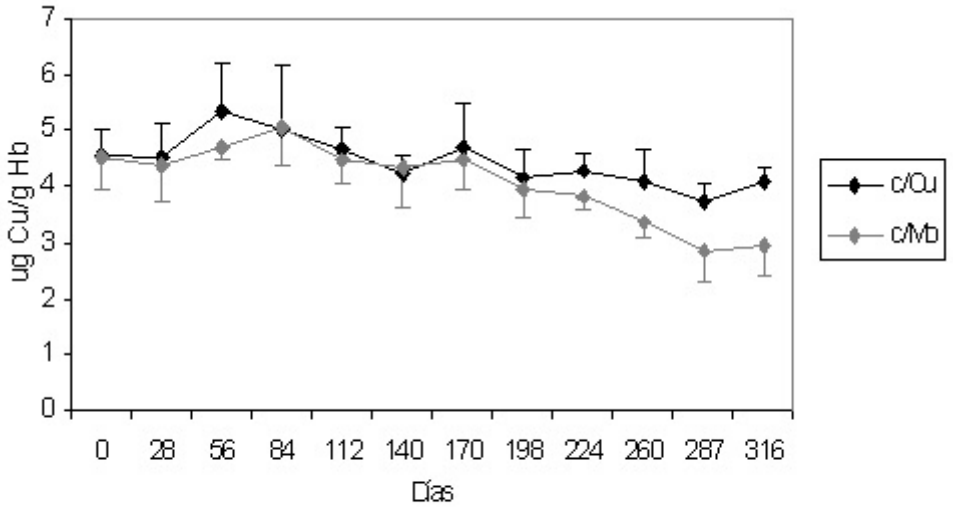

Figura 4: Niveles de cobre en eritrocitos (media y desvío estándar).
Figure 4: *Erythrocyte copper levels (mean and standard deviation)*.

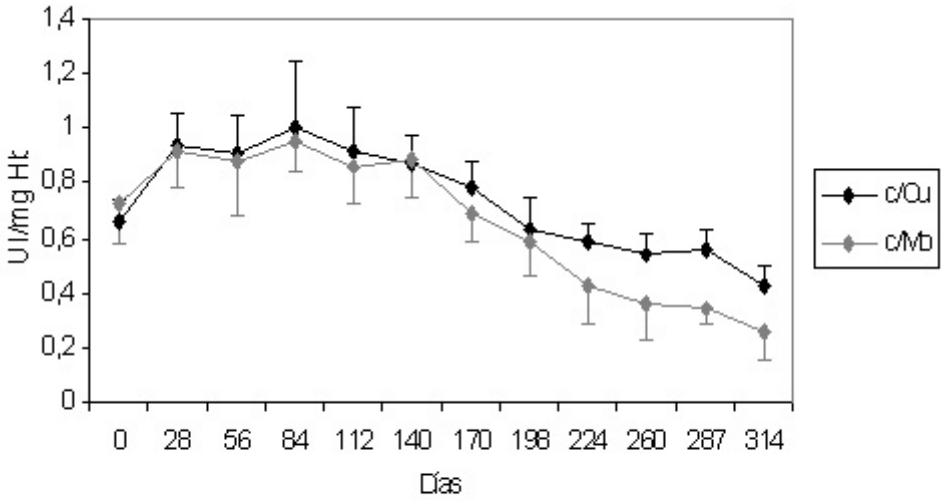

Figura 5: Actividad de la SOD eritrocitaria (media y desvío estándar).
Figure 5: *SOD activity in erythrocytes (mean and standard deviation)*.

el recuento de glóbulos rojos (p=0,6) y en el hematocrito (p=0,1), pero sí en la concentración de hemoglobina (p=0,01). El VCM fue de 46,1 ± 5 μm^3 para el grupo +Cu vs. 42,8 ± 5,6 μm^3 para el grupo +Mo, mientras que la CHCM fue de 32 ± 1,2% para el grupo +Cu vs. 30,9 ± 1,3% para el grupo +Mo. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en el VCM (p=0,34) ni en la CHCM (p=0,16).

Durante este ensayo, tres animales del grupo +Mo presentaron acromotriquia alrededor de los ojos. El signo se observó por primera vez a los 260 días en dos de ellos, evidenciándose en el otro animal al siguiente muestreo (día 287). La acromotriquia fue mucho más marcada en los dos animales cruza que en el ternero Holando Argentino.

Discusión

El modelo experimental utilizado en este ensayo reprodujo las cuatro fases de la deficiencia de Cu descriptas por Suttle (1986). La dieta empleada redujo los altos niveles de Cu hepático que presentaban los animales del grupo +Mo al comienzo del ensayo, hasta valores dentro del rango de 6 a 19 µg/g de MS, considerados como deficitarios (Underwood y Suttle, 1999). Esta reducción de las reservas hepáticas de Cu constituye la llamada fase de depleción.

La fase de deficiencia marginal, en la cual se reducen los niveles plasmáticos de Cu, se alcanzó a los 198 días de ensayo, momento en que la concentración de Cu en el plasma de los animales del grupo +Mo alcanzó el rango de 19 a 57 µg/dl, indicativo de deficiencia (Underwood y Suttle, 1999). Estos bajos valores plasmáticos en el grupo +Mo se observaron con concentraciones hepáticas muy cercanas a los valores deficitarios (20,1 ± 11,5 µg/g de MS). Cabe remarcar que la tendencia declinante en los niveles plasmáticos de Cu del grupo +Mo comenzó el día 112, tal como puede observarse en la Figura 3, siendo ya significativas las diferencias entre los grupos para el día 140.

Las diferencias en la actividad de la SOD eritrocitaria entre ambos grupos, observadas a partir del día 224 de ensayo, indican la aparición de la fase de disfunción, caracterizada por una disminución en la actividad de las enzimas dependientes del Cu. La aparición tardía de estas diferencias está relacionada con la vida media de los eritrocitos bovinos, que es de aproximadamente 150 días (Fry y McGavin, 2007). De acuerdo con Andrewartha y Caple (1980), la incorporación de Cu a la SOD en las ovejas se produciría durante la eritropoyesis [aunque esta hipótesis fue cuestionada por Suttle y McMurray (1983), quienes propusieron que el Cu podía ser incorporado a la apoenzima en el eritrocito maduro]. Si se tiene presente que los animales del grupo +Mo presentaron niveles plasmáticos de Cu indicativos de deficiencia recién el día 198 de ensayo (26 días antes que se observaran diferencias significativas en la actividad de la SOD eritrocitaria entre los grupos), y que la vida media de los glóbulos rojos bovinos es de 5 meses, es indudable que la incorporación de Cu a esta enzima se vio comprometida mucho antes que el grupo +Mo alcanzara valores plasmáticos inferiores a 57 µg/dl.

La concentración de Cu eritrocitaria mostró un comportamiento similar a la actividad de la enzima SOD, exhibiendo ambos parámetros una muy buena correlación (r = 0,74; p=0,000). Resultados similares obtuvieron Humphries et al. (1983) en su reproducción experimental de la deficiencia de Cu, concluyendo que la determinación de la actividad de esta enzima en glóbulos rojos no tendría ninguna ventaja sobre la concentración eritrocitaria de Cu. Teniendo en cuenta lo laborioso y costoso de la técnica para la determinación de la actividad de la SOD en glóbulos rojos, la determinación de los valores de Cu en eritrocitos sería una alternativa válida para el diagnóstico de una deficiencia crónica de este elemento.

La alteración de la actividad de otra enzima, la tirosinasa, pudo haber ocasionado la aparición de acromotriquia en los tres animales del grupo +Mo a partir del día 260 de

ensayo, indicando el comienzo de la fase de enfermedad. Tanto en la reproducción experimental efectuada por Mills et al. (1976) como en la realizada por Suttle y Angus (1976) la acromotriquia fue el primer signo clínico observado, indicativo de deficiencia de Cu.

La disminución en la ganancia de peso es otro de los indicadores de enfermedad más observados en la reproducción experimental de la deficiencia de Cu en bovinos (Phillippo et al., 1987; Suttle y Angus, 1976). En este ensayo, si bien se observaron diferencias significativas en el peso de los animales de ambos grupos al finalizar el ensayo, no se encontraron diferencias al analizar cada muestreo por separado por el método de contrastes generales. Esto quizás se deba a que los animales fueron alimentados con una dieta restringida, calculada para proporcionar una ganancia diaria promedio de 0,5 kg/d. Es probable que con una dieta *ad libitum* estas diferencias hubiesen sido más notorias. En ensayos realizados a campo, terneros con bajos niveles hepáticos y plasmáticos de Cu (similares a los observados en el grupo +Mo) presentaron ganancias de peso significativamente menores que terneros suplementados con Cu (Rosa et al., 2006).

Otra alteración indicativa de la fase de enfermedad fueron las diferencias significativas observadas en la concentración de hemoglobina entre los grupos a los 287 días de ensayo. Estas diferencias podrían deberse a alteraciones en la síntesis del grupo hemo en aquellos animales con deficiencia de Cu (Mills, 1987). Este grupo está constituido por un anillo tetrapirrólico, con un átomo de hierro ferroso unido a los nitrógenos de los pirroles (Blanco, 2000). La ceruloplasmina, otra enzima dependiente del Cu, interviene en la movilización del hierro hasta la médula ósea, órgano donde se lleva a cabo la síntesis de hemoglobina durante la hematopoyesis. Si bien en este ensayo no se determinó la actividad de esta enzima, la buena correlación existente entre los niveles de Cu plasmático y la actividad de la ceruloplasmina (Underwood y Suttle, 1999) permite inferir que el grupo +Mo presentaría una baja actividad de la enzima, comprometiendo el transporte de hierro hasta la médula ósea. Reducciones semejantes en los valores de hemoglobina se observaron en las reproducciones experimentales de la deficiencia de Cu realizadas por Mills et al. (1976) y Suttle y Angus (1976).

De acuerdo con Underwood y Suttle (1999), la anemia que se produce en la deficiencia de Cu en vacas y ovejas es de tipo macrocítica hipocrómica, mientras que en cerdos y corderos es de tipo microcítica hipocrómica. Si bien en este ensayo no se observaron diferencias significativas entre los grupos en el VCM y en la CHCM, los eritrocitos del grupo +Mo tendieron a ser más pequeños e hipocrómicos que los eritrocitos del grupo +Cu, mostrando una tendencia hacia un tipo de anemia microcítica hiporcrómica, semejante a la observada en los corderos. Este tipo de anemia es característico de la deficiencia de hierro (Jones et al., 1997). Suttle et al. (1987) describieron la presencia de cuerpos de Heinz en los glóbulos rojos de corderos con deficiencia de Cu. Los cuerpos de Heinz son indicativos de daño oxidativo en los eritrocitos, y podrían estar relacionados con los bajos niveles en la actividad de la enzima superóxido dismutasa. La hemólisis producida por dicho daño oxidativo contribuiría al desarrollo de la anemia.

Cabe señalar que, pese a los elevados niveles de Mo y S utilizados en este ensayo, ninguno de los animales del grupo +Mo presentó diarrea.

Conclusiones

El modelo experimental empleado en este ensayo reprodujo con éxito las distintas etapas de la deficiencia de Cu.

Considerando los resultados obtenidos con la SOD eritrocitaria, es probable que la disminución en la actividad de algunas otras enzimas dependientes del Cu comience antes que los valores plasmáticos o hepáticos de este elemento hayan disminuido hasta los niveles considerados como críticos por la bibliografía.

Agradecimientos

A la firma ALINEX S.A. por la donación de las sales minerales utilizadas en este ensayo.

Al Sr. Carlos Cisneros, por la atención y cuidado de los animales.

Bibliografía

Andrewartha, K.A. and Caple, I.W. 1980. Effects of changes in nutritional copper on erythrocyte superoxide dismutase activity in sheep. Res. Vet. Sci. 28: 101-104.

Blanco, A. 2000. Química biológica. 7ª edición. Editorial El Ateneo, Argentina. Pp. 605.

Dick, A.T., Dewey, D.W. and Gawthorne, J.M. 1975. Thiomolybdates and the copper-molybdenum-sulphur interaction in ruminant nutrition. J. Agric. Sci. 85: 567-568.

Fry, M.M. y McGavin, M.D. 2007. Bone marrow, blood cells, and lymphatic system. *In*: McGavin M.D. y Zachary, J.F. Pathologic basis of veterinary disease. 4th edition, China. Mosby – Elsevier. Pp. 743-832.

Humphries, W.R., Phillippo, M., Young, B.W. and Bremner, I. 1983. The influence of dietary iron and molybdenum on copper metabolism in calves. Br. J. Nutr. 49: 77-86.

Jones, T.C., Hunt, R.D. and King, N.W. 1997. The hemic and lymphatic systems. *In*: Veterinary pathology. 6th edition. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. pp: 1009-1042.

Jones, D.G. and Suttle, N.F. 1981. Some effects of copper deficiency on leucocyte function in sheep and cattle. Res. Vet. Sci. 31: 151-156.

Lamand, M. 1989. Influence of molybdenum and sulphur on copper metabolism in sheep: comparison of elemental sulphur y sulphate. Ann. Rech. Vét. 20: 103-106.

Mason, J., Lamand, M. and Kelleher, C.A. 1982. The effect of duodenal infusion of tri- and dithiomolybdate on plasma copper and on the diamine oxidase activity of caeruloplasmin in sheep. J. Comp. Path. 92: 509-518.

Mason, J., Lamand, M., Tressol, J.C. and Lab, C. 1978. The influence of dietary sulphur, molybdate and cooper on the absorption, excretion and plasma fraction levels of 99Mo in sheep. Ann. Rech. Vét. 9: 577-586.

Mason, J., Lamand, M., Tressol, J.C. y Mulryan, G. 1988. Studies of the changes in systemic copper metabolism and excretion produced by the intravenous administration of trithiomolybdate in sheep. Br. J. Nutr. 59: 289-300.

Mason, J., Woods, M. and Poole, D.B.R. 1986. Accumulation of copper on albumin in bovine plasma *in vivo* after intravenous trithiomolybdate administration. Res. Vet. Sci. 41: 108-113.

Mills, C.F. 1987. Biochemical and physiological indicators of mineral status in animals: copper, cobalt and zinc. J. Anim. Sci. 65: 1702-1711.

Mills, C.F., Dalgarno, A.C. and Wenham, G. 1976. Biochemical and pathological changes in tissues of Fressian cattle during the experimental induction of copper deficiency. Br. J. Nutr. 35: 309-330.

Minatel, L. 1999. Biopsia hepática en bovinos: su empleo en la evaluación de los niveles de cobre de un rodeo. Rev. Arg. Prod. Anim. 19(2): 359-365.

Phillippo, M., Humphries, W.R. and Garthwaite, P.H. 1987. The effect of dietary molybdenum and iron on copper status and growth in cattle. J. Agric. Sci. Camb. 109: 315-320.

Rosa, D.E., Fazzio, L.E., Picco, S.J., Minatel, L. y Mattioli, G.A. 2006. Caracterización de terneros con menores ganancias de peso por hipocuprosis. Veterinaria Cuyana 1: 41-44.

Suttle, N.F. 1974. Recent studies of the copper molybdenum antagonism. Proc. Nutr. Soc. 33: 299-305.

Suttle, N.F. 1986. Problems in the diagnosis and anticipation of trace element deficiencies in grazing livestock. Vet. Rec. 119: 148-152.

Suttle, N.F. and Angus, K.W. 1976. Experimental copper deficiency in the calf. J. Comp. Path. 86: 595-608.

Suttle, N.F., Field, A.C. and Barlow, R.M. 1970. Experimental copper deficiency in sheep. J. Comp. Path. 80: 151-162.

Suttle, N.F., Jones, D.G., Woolliams, J.A. and Woolliams, C. 1987. Heinz body anemia in lambs with deficiencies of copper or selenium. Br. J. Nutr. 58: 539-548.

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

Underwood, E.J. and Suttle, N.F. 1999. The mineral nutrition of livestock. 3rd ed. U.K., CABIPublishing. 614 p.

Xin, Z., Waterman, D.F., Hemken, R.W. and Harmon, R.J. 1991. Effects of copper status on neutrophil function, Superoxide Dismutase, and copper distribution in steers. J. Dairy Sci. 74: 3078-3085.